

## بررسی الگوی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های کمپیلوباکتریایی حیوانات خانگی

مرتضی سلجوقی<sup>۱</sup>، علی شریف زاده<sup>۲\*</sup>

۱- دانش آموخته دکترا، دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

### چکیده

کمپیلوباکتریایی یکی از عوامل مهم بیماری زای مشترک بین انسان و حیوان است. علیرغم آنکه غالب موارد عفونت های انسان ناشی از خوردن مواد غذایی آلوده که بخوبی پخته نشده اند می باشد ولی از راه های متفاوت دیگری از جمله مدفوعی دهانی، مصرف آب آلوده غیر بهداشتی و تماس با حیوانات خانگی نیز منتقل می شود. هدف از انجام این تحقیق تعیین فراوانی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های کمپیلوباکتریایی سگ ها و گربه های خانگی شهرستان اصفهان بود. در این تحقیق ۱۰۰ ۵۰ نمونه مدفوع از سگ ها و ۵۰ نمونه مدفوع از گربه های خانگی با دو روش میکروبی کشت و مولکولی PCR بررسی گردید. در روش میکروبی کشت فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ ها و گربه های خانگی به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش مولکولی PCR به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) ارتباط معنی داری بین آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ ها و گربه های خانگی با متغیرهای سن، نوع تغذیه، سیستم نگهداری و آلودگی با سایر بیماری های گوارشی در آزمون مربع کای (تست پیرسون) ارتباط معنی داری نشان داده شد ( $p < 0/01$ ). شایع ترین گونه در همه موارد آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ ها و گربه های خانگی، کمپیلوباکتر ژژونی بود. در آزمایش آنتی بیوگرام تمامی نمونه های جدا شده حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند. تمام سویه های جدا شده به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بودند. در مورد ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی نیز بیشترین فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه ژژونی در مورد bla<sub>oxA-61</sub> و در گونه کولای در مورد aadE1 و bla<sub>oxA-61</sub> مشاهده گردید. از ۷ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن ها در کمپیلوباکتر ژژونی وجود داشت اما در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۳ ژن cdtA، cdtF و iam1 ردیابی گردید. در نهایت از این مطالعه نتیجه گرفته شد که به جهت فراوانی قابل توجه آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه ها و سگ های خانگی، و با نظر به نقشی که میتوانند برای سلامت جوامع انسانی ایفا نمایند، انجام آزمایش های دوره ای اهمیت زیادی داشته و با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه ها مصرف آنتی بیوتیک بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام ضروری به نظر می رسد.

**کلمات کلیدی:** کمپیلوباکتر، سگ، گربه، حدت، مقاومت آنتی بیوتیکی

\* نویسنده مسئول: علی شریف زاده

آدرس: دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: al.sharifzadeh@iau.ac.ir

## مقدمه

کمپیلوباکتر یک باکتری گرم منفی، میله‌ای متحرک (در اندازه ۵-۱/۵ × ۰/۵-۰/۲ میکرومتر)، اکسیداز مثبت کاتالاز متغیر، فاقد اسپور و میکروآئروفیلیک است. گونه‌های این باکتری موجب اسهال در انسان، سگ، گربه و دیگر حیوانات اهلی و وحشی می‌گردد (Natsos et al., 2019). از گونه‌های مهم کمپیلوباکتر در حیوانات خانگی می‌توان به کمپیلوباکتر آپسالینسیس، کمپیلوباکتر ژرونی، کمپیلوباکتر هلو تیکوس، کمپیلوباکتر لاری، کمپیلوباکتر فلیس و کمپیلوباکتر کولای اشاره کرد که از سگ‌ها و گربه‌های اهالی و حتی بدون علامت جدا شده‌اند (Bojanic et al., 2019). در انسان در هشتاد درصد موارد، باکتری‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای غالب می‌باشد (Acke et al., 2006). روش انتقال اجرام، غالباً مدفوعی-دهانی است و شدت بیماری بستگی به تعداد ارگانیزم‌های خورده شده توسط میزبان، میزان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و سطح آنتی‌بادی محافظ در بدن دارد. زمانی که استرس به حیوانات وارد شود، حساسیت به بیماری بیشتر خواهد بود. عفونت‌های هم‌زمان نظیر آلودگی با پاروویروس، کروناویروس، ژیاودیلا، سالمونلا و شیگلا ممکن است نقش سینرژسم ایفا نمایند (Zenebe et al., 2020). حضور خون و لکوسیت‌ها در مدفوع، پرخونی، ادم، اولسر مخاط و گاهی سپتی سمی نشان می‌دهد که باکتری می‌تواند حالت تهاجمی داشته باشد. به نظر می‌رسد که حیوانات نسبت به آلودگی کمپیلوباکتریایی مقاوم‌تر باشند و یا به اثرات بیماری‌زای گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر، بهتر سازگاری پیدا کرده باشند (Andrzejewska et al., 2013). علائم اسهال ناشی از کمپیلوباکتر در

حیوانات خانگی و نیز انسان، از مدفوع شل تا آبکی و اسهال موکوئیدی همراه با خون متغیر است. کمپیلوباکتریوز حاد، با اسهال مملو از موکوس، آبکی و یا رگه‌های صفر، بی‌اشتهایی جزئی و گاهی استفراغ، بالارفتن درجه‌ی حرارت و لکوسیتوز همراه است. علائم بالینی در گربه‌ها نسبت به سگ‌ها، شدت کمتری دارد و در صورت بروز علائم، در گربه‌های با سن کمتر از ۶ ماه، بیشتر دیده می‌شود. بچه‌گربه‌ها و توله سگ‌ها، به دلیل فقدان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و توسعه‌ی آنتی‌بادی محافظ، بیشتر علائم بالینی را نشان می‌دهند. (Facciola et al., 2017). در ایران شناسایی کمپیلوباکتر، از سگ‌ها و گربه‌های شهر تهران گزارش شده است (Mosallanejad et al., 2020). روش معمول برای تشخیص باکتری، تهیه‌ی سوآب از مدفوع تازه یا گرفتن نمونه از رکتوم است. تست‌های رایج نظیر الیزا برای تشخیص کمک‌کننده هستند؛ اما روش مولکولی نظیر PCR، از دقت بالاتری برخوردار است. توجه به توانایی حمل ژن‌های مختلف مرتبط با حدت باکتریایی نظیر توکسین‌های گوارشی (*cdt* و ...) و عوامل مرتبط با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در آلودگی محیط به کمپیلوباکتر از اهمیت زیادی برخوردار است (Raiesi et al., 2017).

از آن جا که موارد عفونت ناشی از کمپیلوباکتر در انسان، در حال افزایش است و سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم ممکن است بدون علائم بالینی آلوده بوده و باکتری را از خود دفع نمایند، تعیین گونه‌های غالب این باکتری به همراه آگاهی از ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به خصوص در حیواناتی که در محل‌های بسته و در تماس نزدیک با انسان زندگی می‌کنند، حائز اهمیت است که در این تحقیق به آن پرداخته شده است.

## مواد و روش ها

### جدایه های مورد مطالعه

در این بررسی به روش تصادفی از ۱۰۰ نمونه مدفوع (۵۰ مورد سگ خانگی، ۵۰ مورد گربه خانگی)، نمونه-گیری صورت پذیرفت. ترجیح تحقیق بر آن بود که حیوانات مورد نظر، در یک ماه گذشته سابقه استفاده از آنتی بیوتیک را نداشته باشند. از هر نمونه حیوانی، ۲ سواب اخذ گردید. یکی از سواب ها در میکروتیوب حاوی سرم فیزیولوژی برای بررسی مستقیم مولکولی و دیگری در محیط کشت انتقالی پرستون براث (Himedia, India) جهت بررسی میکروبی قرار گرفت. در روش میکروبی، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت انتقالی، به محیط *Campylobacter selective agar* (CCDA) حاوی آنتی بیوتیک های آمفوتریسین B و سفوپرازون انتقال و به صورت خطی کشت گردید. هر دو محیط مایع و جامد، در جار مخصوص تحت شرایط میکرو آتروفیلیک به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۱۰ درصد دی اکسید کربن در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پرگنه های مشکوک به کمپیلوباکتر (انجام آزمایش اکسیداز بر روی پرگنه های با اندازه متوسط) انتخاب و آزمون های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، رشد در دمای ۲۵ و ۴۲ درجه سانتی گراد و تجزیه هیپورات سدیم انجام گردید (Mosallanejad *et al.*, 2020). در روش مولکولی نیز در مورد سواب های مدفوعی اخذ شده، DNA مورد نیاز جهت آزمون مولکولی توسط کیت استخراج شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت آماده سازی و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری گردید. در آزمون مولکولی از آغازگرهای

اختصاصی جنس کمپیلوباکتر و گونه های ژرژونی و کولای به همراه ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده گردید.

توالی آغازگرهای ژن های اختصاصی جنس و گونه های کمپیلوباکتر هم چنین ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدول ۱ آمده است. در این تحقیق از DNA استخراج شده جدایه های مشکوک به عنوان DNA الگو و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR برای تکثیر این ژن ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دوازده و نیم میکرولیتر مستر میکس، نیم میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰mM)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و دو میکرولیتر از هر نمونه DNA انجام پذیرفت. در تمام واکنش های PCR از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده گردید. برنامه های حرارتی در مورد ژن های مختلف متفاوت بود. در مورد ژن اختصاصی جنس و گونه، یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. برنامه حرارتی دستگاه PCR در مورد ژن های حدت، یک سیکل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، ۴۵ تا ۵۲ درجه (برحسب نوع ژن) به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در مورد ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی نیز برنامه حرارتی در قالب یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ تا ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک

دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه برنامه ریزی گردید. برای بررسی و مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گرد (Banisharif *et al.*, 2019).

## نتایج

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد تعیین گردید. این فراوانی در روش PCR مستقیم نمونه، به ترتیب در مورد سگ و گربه ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در گربه، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۸۰ درصد و آلودگی هم‌زمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۲۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در سگ، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۹۱ درصد، آلودگی هم‌زمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۹ درصد مشاهده گردید. تصویر حاصل از ردیابی جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر در شکل ۱ آمده است. در تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از تعیین فراوانی آلودگی در دو روش کشت و مولکولی، نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) نشان داد که ارتباط معنی داری بین رده‌های سنی، نوع نگهداری، وضعیت دستگاه گوارش با آلودگی کمپیلوباکتریایی وجود دارد ( $p < 0/01$ ). ارتباط معنی داری بین نوع جنسیت، نژاد با آلودگی کمپیلوباکتریایی مشاهده نگردید ( $p < 0/01$ ). هم چنین همان طور که در جدول شماره ۲ آمده است بر اساس نتایج آزمون فوتویی مقاومت آنتی بیوتیکی در آزمایش آنتی بیوگرام که به روش دیسک انتشاری صورت پذیرفت، بین جدایه‌های کمپیلوباکتریایی بیشترین مقاومت نسبت به تتراسایکلین و کمترین مقاومت در مورد پنی سیلین و

جتتامایسین مشاهده گردید. آنالیز آماری نتایج حاصل از این جدول نیز نشانگر وجود اختلاف آماری معنادار بین مقاومت آنتی بیوتیکی به تتراسایکلین و آزیترومایسین با سایر آنتی بیوتیک ها ( $p=0.002$ ) بود. در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های کمپیلوباکتر، حضور پنج ژن کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه به روش PCR چندگانه ای ارزیابی شد که ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده و توزیع حضور این ژن‌ها در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه ژرونی در مورد *blaoxA-61* و در گونه کولای در مورد *blaoxA-61* و *aadE1* مشاهده گردید. در مورد ژن *aphag-1* هیچ مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده نگردید. در آنالیز آماری اختلاف آماری معناداری بین حضور دو ژن *aphag-1* و *cmeB* با سه ژن *boxA-61* و *TetO* و *aadE1* در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $p = 0.04$ ) مشاهده گردید. تصویر ۲ نیز به الگوی برخی از این ژن‌ها ی مقاومت آنتی بیوتیکی در روی ژل آگارز پرداخته است.

حضور شایع ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای به روش PCR ارزیابی گردید که نتایج در جدول ۳ آورده شده است. همان طور که در جدول شماره ۴ آمده است تمامی ژن‌های حدت در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی حضور داشتند. در جدایه‌های کمپیلوباکتر کولای تنها ژن‌های حدت *iam1*، *cdtA* و *cdtF* ردیابی گردید. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات این جدول با مدل آماری دقیق فیشر، اختلاف آماری معناداری بین حضور ژن‌های *Iam2* و *Iam3* با

گردید که از این تعداد تنها ۵ مورد (۸/۵۵ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر ژژرونی بودند (Mohammadzadeh et al., 2012) محزونیه و همکاران نیز، در تحقیق روی ۱۰۰ نمونه مدفوع گربه و سگ در تهران، ۳۹ مورد آلودگی به کمپیلوباکتر گزارش نمودند (Mahzounieh et al., 2012). هم چنین وزیریان و همکاران در سال ۲۰۱۶، بر روی ۵۰ نمونه مدفوع گربه، از نظر حضور کمپیلوباکتر، شیوع آلودگی را ۲۲ درصد تعیین نمودند (Vazirian et al., 2016). در مطالعه رحیمی و همکاران بر روی ۴۷ قلاده گربه از استان های اصفهان و فارس نشان دادند که ۲۷/۷ درصد از آنها، آلوده به کمپیلوباکتر می باشند. در این میان گونه غالب کمپیلوباکتر هلو تیکوس تعیین گردید. (Rahimi et al., 2017).

میزان جداسازی اجرام کمپیلوباکتر بسته به عوامل مختلف، از جمله موقعیت جغرافیایی، گونه حیوانی، استرس، تغییرات جیره ی غذایی (مصرف غذای خام)، آلودگی با سایر عفونت های گوارشی، محیط نگهداری و روش های مختلف تشخیص آلودگی، متفاوت می باشد (Son et al., 2007).

هم چنین در بررسی حاضر فراوانی آلودگی در سگ- های با سن کمتر از یک سال، بیشتر بوده و ارتباط آماری معنی داری بین رده های سنی و فراوانی آلودگی وجود داشت. همسو با این بررسی، Selwet و همکاران در سال ۲۰۱۵، Holmberg و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Vazirian و همکاران در سال ۲۰۱۶، نیز میزان فراوانی عفونت در حیوانات جوان را بیشتر از رده های سنی بالاتر اعلام نمودند که از جمله دلایل آن می توان به ضعیف بودن توله ها به شکل مادرزادی، عدم دسترسی به مادر پس از تولد (نخوردن آغوز)، تغذیه از شیر جایگزین شونده اشاره کرد (Holmberg et al., 2015).

سایر ژن های حدت در جدایه های کمپیلوباکتر ژژرونی ( $p=0.01$ ) و نیز بین حضور ژن های *cdtF* با سایر ژن های مورد مطالعه در جدایه های کمپیلوباکتر کولای مشاهده گردید ( $p=0.001$ ). شکل های ۳ نیز به الگوی برخی از ژن ها حدت کمپیلوباکتریایی در روی ژل آگارز پرداخته است. بیشترین ژن حدت در گونه ژژرونی در مورد *cdtA* و در گونه کولای در مورد *cdtF* مشاهده گردید.

### بحث و نتیجه گیری

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش PCR، به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. اغلب نمونه ها آلوده به کمپیلوباکتر ژژرونی (۷۵ درصد) بوده در حالی که فراوانی آلودگی به کمپیلوباکتر کولای، ۱۲/۵ درصد مشاهده گردید. در مطالعات مشابه نیز فراوانی آلودگی متفاوت می باشد به شکلی که فراوانی عفونت در آلمان (۴۷/۸ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر هلو تیکوس)، ایرلند (۴۲/۹ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، سوئیس (۴۱/۹ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، نیجریه (۱۸/۳ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، نروژ (۱۸ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، آرژانتین (۱۶ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر ژژرونی)، لهستان (۸۶/۹ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر ژژرونی) و برزیل (۸ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر ژژرونی) گزارش شده است (Sandberg et al., 2002). در ایران نیز تاکنون چندین مطالعه صورت گرفته است، از جمله محمدزاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ و با استفاده از روش PCR، که بر روی ۶۰ قلاده سگ خانگی در شهر کرد صورت گرفت، شیوع آلودگی، ۱۸ مورد (۳۰ درصد) ذکر

همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در گربه‌ها و سگ‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سالمین است که احتمالاً به دلیل بیمار بودن حیوانات و دفع اجرام کمپیلوباکتر می‌باشد (Selwet et al., 2015 Rodriguez et al., 2015). البته بحث عفونت‌های همزمان و ضعف سیستم ایمنی نیز می‌تواند مطرح باشد. در موارد بروز بیماری‌های مختلف، خوردن پسماندهای غذایی، تغییر ناگهانی رژیم غذایی و بسیاری از عوامل دیگر، اسهال اتفاق می‌افتد که متعاقب آن بدن به تدریج ضعیف می‌گردد و این خود عامل بروز بسیاری از عفونت‌های دیگر از جمله آلودگی به گونه‌های کمپیلوباکتر می‌باشد. برای جلوگیری از انتقال این عامل، باید محل نگهداری حیوانات و ظروف آب و غذا مرتب با مواد آنتی‌سپتیک ضد عفونی گردد. همان طور که در جدول ۲ مشخص است تمامی نمونه‌های جدا شده به روش کشت در این مطالعه حداقل به یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

گونه‌های کمپیلوباکتر مانند سایر ارگانسیم‌های ایجاد کننده بیماری مشترک انسان و دام به طور فزاینده‌ای به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. توسعه بالقوه مقاومت توسط این میکروب‌ها مزایای عوامل ضد میکروبی را به خطر انداخته است (Davies et al., 2010). گونه‌های مقاوم کمپیلوباکتر می‌توانند از طریق خوردن مستقیم غذای آلوده یا از طریق تماس با حیوانات به انسان منتقل شوند. سازمان بهداشت جهانی عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد را که متعلق به یک کلاس ضد میکروبی است که در پزشکی انسانی استفاده می‌شود، پیشنهاد کرده است. استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌های اضافی در حیوانات باعث می‌شود که حیوانات نسبت به دستیابی به سویه‌های مقاوم ارگانسیم حساس‌تر شوند (Angulo et al., 2004). پیامدهای

پایین بودن سطح ایمنی در سگ و گربه‌های جوان، آنها را مستعد ابتلا به بیماری‌های مختلف، از جمله عفونت ناشی از گونه‌ی کمپیلوباکتر ژرونی می‌کند. در بررسی حاضر، ارتباط معنی‌داری بین جنسیت و آلودگی وجود نداشت. همسو با این یافته، محزونیه و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Lazou و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعه روی سگ‌ها، نشان دادند که هیچ ارتباط معنی‌داری بین جنس و میزان آلودگی وجود ندارد (Lazou et al., 2014). تحقیق حاضر، از این نظر با نتایج محققین فوق همخوانی دارد. هر چند در بررسی در بررسی وزیران و همکاران، در گربه‌ها، مشاهده گردید که فراوانی آلودگی در جنس ماده بیشتر از نر می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، هم چنین ارتباط معنی‌داری بین نوع تغذیه و آلودگی وجود داشت به شکلی که فراوانی آلودگی در سگ‌های مصرف کننده‌ی غذای خام بیشتر از پخته بود. به خصوص گوشت مرغ یکی از مواد غذایی است که به شکل خام مورد استفاده‌ی گربه‌ها و سگ‌ها قرار می‌گیرد و از آن جا که پرندگان می‌توانند آلوده به کمپیلوباکتر شوند، در انتقال این عامل به حیوانات خانگی بسیار مؤثر می‌باشند. James و همکاران در سال ۲۰۱۲، نیز نشان دادند که احتمال بروز آلودگی در سگ‌هایی که از گوشت خام تغذیه می‌کنند، بیشتر می‌باشد (James., 2012). همچنین Andrzejewska و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳، بیان کردند که بسیاری از حیوانات آلوده به کمپیلوباکتر، از منابع غذایی موجود در محیط اطراف مانند گوشت خام پرندگان وحشی و سایر حیوانات تغذیه داشته‌اند (Andrzejewska et al., 2013). در تحقیق حاضر، شانس آلودگی سگ‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سگ‌های به ظاهر سالم بود. همسو با بررسی حاضر ، Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Selwet و

## بررسی الگوی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های... ( شریف زاده و همکاران)..... ۷.

نشان داده اند. با این حال، ۷ درصد از ۱۴۳ سویه کمپیلوباکتر مقاوم به حداقل سه آنتی بیوتیک غیر مرتبط مقاوم بودند. مطالعه ای در مورد شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سگ ها که در هند انجام شد نشان داد که تمام جدایه های کمپیلوباکتریایی به استرپتومایسین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، لینکومایسین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین و پنی سیلین مقاوم بودند (Mackiw et al., 2012). بیماریزایی گونه های کمپیلوباکتر وابسته به عوامل مختلفی است که در این تحقیق حضور شایع ترین ژن های کد کننده عوامل حدت در دو گونه کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای بررسی گردید. از ۷ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن ها در کمپیلوباکتر ژرونی وجود داشت اما در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۳ ژن *iam1* و *cdtA*, *cdtF* ردیابی گردید. نتایج مطالعات دیگر نیز با نتایج تحقیق حاضر همخوان است. در مطالعه بنی شریف و همکاران از ۱۱ ژن حدت مورد مطالعه تمام ژن های بجز *iam* در جدایه های کمپیلوباکتر ژرونی وجود داشت و البته در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۵ ژن *iam*, *recR*, *cdtA*, *cdtB* و *cdtC* ردیابی گردید (Banisharif et al., 2019). Wieczorek و همکاران نیز فراوانی حضور ژن *iam1* در جدایه های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای جدا شده از گوشت مرغ را به ترتیب ۳۱ و ۲۷ درصد گزارش نمودند (Wieczorek., 2010).

رو به افزایش بوده و احتمال انتقال آلودگی کمپیلوباکتر به صاحبان این حیوانات وجود دارد؛ لذا انجام آزمایش کشت مدفوع یا بررسی آلودگی به طرق

سلامت عمومی استفاده از آنتی بیوتیک در حیوانات را می توان با در نظر گرفتن هر موقعیت پاتوژن-آنتی بیوتیک مهمتر ارزیابی کرد. مقاومت چند دارویی در هر دو گونه کمپیلوباکتر از مطالعات مختلف گزارش شده است (Wieland et al., 2005. Nadalian et al., 2017).

در ایالات متحده، شیوع کمپیلوباکتر مقاوم به آنتی بیوتیک در لاشه جوجه های گوشتی ۹۹/۵ درصد به یک یا چند آنتی بیوتیک و ۲۸/۴ درصد نسبت به دو یا چند آنتی بیوتیک نشان داده شده است. مقاومت نشان داده شده به تتراسایکلین توسط کمپیلوباکتر ژرونی ۹۵/۵ درصد و کولای ۹۶/۳ درصد گزارش گردیده است (Son et al., 2007). به طور مشابه، مطالعه انجام شده در اسلوانی بروز مقاومت آنتی بیوتیکی برای کمپیلوباکتر کولای ۷۵/۹ درصد و کمپیلوباکتر ژرونی ۳۸/۵ درصد اعلام گردیده است. میزان مقاومت مشاهده شده به انروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین و تتراسایکلین به ترتیب ۵۸/۲، ۴۹/۱، ۱۴/۵ و ۱۲/۷ درصد بوده است. ۱۱ درصد از کمپیلوباکترهای جدا شده به اریترومایسین و سیپروفلوکساسین و ۱۲/۷ درصد از جدایه ها به تتراسایکلین و کینولون ها مقاوم بوده اند (Kurincic et al., 2007). Mackiw و همکاران نیز در مطالعه خود بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های کمپیلوباکتر را با ۹۷/۹ درصد به سیپروفلوکساسین، ۶۴/۳ درصد از همان جدایه ها به تتراسایکلین، ۹/۱ درصد به اریترومایسین و ۶/۳ درصد به اریترومایسین

### نتیجه گیری نهایی

از آن جایی که علاقه به نگهداری حیوانات خانگی از جمله سگ و گربه به خصوص در برخی مناطق کشور



*Veterinary Diagnostic investigation*, **31(1)**: 23-32.

6. Davies, J., Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Molecular Biology Review*, **74(3)**: 417-433.

7. Facciola, A., Rioso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S.A., Lagana, P. (2017). *Campylobacter: from microbiology to prevention, Journal of preventive medicine and hygiene*, **58(2)**: 79-92.

8. Holmberg, M., Rosendal, T., Engvall, E.O., Ohlson, A. and Lindberg, A. (2015). *Prevalence of thermophilic Campylobacter species in Swedish dogs and characterization of C. jejuni Isolates, Acta Veterinaria Scandinavica*, **57(19)**: 1-8.

9. James, G.F. (2012). *Enteric bacterial infections. In: Infectious diseases of the dog and cat. Greene. Vol. 1. 4th Ed. St. Louis Missouri* 370-374.

10. Kurincic, M., Berce, I., Zorman, T., Mozina, S. S. (2005). *The prevalence of multiple antibiotic resistance in Campylobacter spp. from retail poultry meat, Food Technology Biotechnology*, **43(2)**: 157-163.

11. Lazou, T., Houf, K., Soultos, N., Dovas, C., and Iossifidou, E. (2014). *Campylobacter in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance, International Journal of Food Microbiology*, **173 (3)**: 54-61.

12. Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., Rożynek, E. (2012). *Antibiotic resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from food in Poland, Food Control*, **23(2)**: 297-301.

13. Mahzounieh, M.R., Ghorbani, M., Zahraei, M.T. (2012). *Identification of campylobacter species in feces of apparently healthy dogs and cats by mPCR, Comparative pathobiology*, **10(4)**: 1101-1106.

14. Mohammadzadeh, A., Hakimi, R., Sharifi, A., Ghorbani, M. (2012). *Investigation of campylobacter contamination of domestic*

مختلف از جمله روش‌های مولکولی، به منظور تشخیص سریع آلودگی، جهت درمان به موقع و اقدامات پیشگیری کننده‌ی دیگر ضروری می‌باشد. از طرفی شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های جدا شده نشانگر مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک به ویژه آنتی بیوتیک‌های غیر مجاز می‌باشد و به همین جهت ضروری می‌باشد مصرف آنتی بیوتیک زیر نظر دامپزشک و بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام انجام گردد.

#### منابع

1. Acke, E., Whyte, P., Jones, B.R., McGill, K., Collinsand, J.D. and Fanning, S. (2006), *Prevalence of thermophilic Campylobacter species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland, Veterinary Record*, **158(2)**: 51-54.

2. Andrzejewska, M., Szczepanska, B., Klawe, J.J., Spica, D. and Chudzinska, M. (2013). *Prevalence of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli species in cats and dogs from Bydgoszcz (Poland) region. Polish Journal of Veterinary Sciences*, **16 (1)**: 115-120.

3. Angulo, F., Nargund, V., Chiller, T. (2004). *Evidence of an Association Between Use of Anti- microbial Agents in Food Animals and Anti- microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance, Journal of Veterinary Medicine*, **51(8)**: 374-379.

4. Banisharif, GH., Karimi, S., Momtaz, H. (2019). *Virulence and antimicrobial resistance pattern in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains isolated from the liver of slaughtered broiler chickens in Chaharmahal va Bakhtiari province, New Findings in Veterinary Microbiology*, **2(1)**: 15-25.

5. Bojanic, K., Midwinter, A., Marshall, J., Biggs, P. and Acke, E. (2019). *Isolation of emerging campylobacter species in working farm dogs and their frozen home killed raw meat diets, Journal of*



- Norwegian cats and dogs, *Preventive Veterinary Medicine*, **55** (4): 241- 253.
22. Selwet, M., Clapa, T., Galbas, M., Slomski, R., porzucek, F. (2015). *The Prevalence of Campylobacter spp. and occurrence of virulence genes isolated from dogs*, *Polish Journal of Microbiology*, **64**(1): 73-76.
23. Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., Harrison, M. A. (2007). *Antimicrobial resistance of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29**(4): 451-455.
24. Vazirian, B., Torkan, S., Khamesipour, F. (2016). *Isolation of Campylobacter species in feces of cats of Isfahan and Shahrekord. First national conference zoonosis*, 1-2.
25. Wieland, B., Regula, G., Danuser, J., Wittwer, M., Burnens, A.P., Wassenaar, T.M., Stark, K.D. (2005). *Campylobacter spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP*, *Journal of Veterinary Medicine*, **52** (4): 183-189.
26. Wiczorek, K.(2010). *Antimicrobial resistance and virulence markers of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from retail poultry meat in Poland*, *Bull Vet Inst Pulawy*, **54**:563-9.
27. Zenebe, T., Zegeye, N., Eguale, T.(2020). *Prevalence of campylobacter species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in ethiopia: a systematic review and meta-analysis*, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **19**(61):2-11.
27. Zenebe, T., Zegeye, N., Eguale, T.(2020). *Prevalence of campylobacter species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in ethiopia: a systematic review and meta-analysis*, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **19** (61):2-11.
- dogs by PCR, *sanandaj veterinary journal*, **6**(2):25-31.
15. Mosallanejad, B., Gharibi, D., Avizeh, R., Abbassi, R.(2020). *Isolation and characterization of Campylobacter spp. in feces of companion cats in Ahvaz district by culture and PCR methods*, *Iranian Veterinary Journal*, **16**(1):94-104.
16. Nadalian, M.G.h., Tadjbakhsh, H., Mokhber Dezfouli, M.R., Akbarein, H.(2017). *A review of the most important Zoonoses with a special vision towards emerging and re-emerging diseases and its status in Iran*, *Veterinary Clinical Pathology*, **11**(43):197-224.
17. Natsos, G., Mouttotou, N.K., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A. and Koutoulis, K.C. (2019): *The genus Campylobacter: detection and isolation methods, species identification & typing techniques*, *Journal of the Hellenic veterinary medical society*, **70**(1): 1327-1338.
18. Raeisi, M., Khoshbakht, R., Ghaemi, E. A., Bayani, M., Hashemi, M., Seyedghasemi, N. S., Shirzad-Aski, H. (2017). *Antimicrobial resistance and virulence-associated genes of Campylobacter spp. isolated from raw milk, fish, poultry, and red meat*, *Microbial Drug Resistance*, **23**(7): 925-933.
19. Rahimi, E., Alipoor-Amroabadi, M., Khamesipour, F. (2017). *Investigation of prevalence of thermotolerant Campylobacter spp. in livestock feces*, *Canadian Journal of Animal Science*, **97**(2), 207-213.
20. Rodrigues, C. G., Melo, R. T., Fonseca, B. B., Martins, P. A., Ferreira, F. A., Araújo, M. B., Rossi, D. A. (2015). *Occurrence and characterization of Campylobacter spp. isolates in dogs, cats and children*, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 365-370.
21. Sandberg, M., Bergsj, B., Hofshagen, M., Skjerve, E., Kruse, H. (2002). *Risk factors for Campylobacter infection in*

## **Examination the pattern of virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter isolates from pets**

**Saljoughi M<sup>1</sup>, Sharifzadeh A<sup>2\*</sup>**

1. Graduate of Veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine , , Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 18 August 2023

Accepted: 29 November 2023

---

### **Abstract**

The Middle-East, known-to-be the birthplace for animal domestication, is among the few remained geographical theaters in the world where glanders-stricken solipede and human cases are still reported. In the Persian environment with some 60 years of maleination test history in its horse, mule and donkey populations, mini or midi outbreaks of glanders are seen now and then mostly in the Western and central regions. This work was aimed to characterize the phenotypic and genotypic properties of the most recently-collected isolates of *Burkholderia mallei* in Iran (A tiger sample and 3 horse samples). Bacterial culture, Biochemical tests, complement fixation test and Western blot, Flip 407-PCR, Bim A-PCR and also Strauss reaction tests were included in the assessment. The results obtained from experiments conducted on four isolates from Tehran, Kordan, Oshnavieh and Semirum outbreaks, displayed the expected characteristics of *B. mallei*. Whether our isolates of interest represent the local/regional population(s) of *B. mallei*, we assume further molecular epidemiology studies will enable us to address.

**Keywords: Glanders, Solipedes, Iran**

---

\*Corresponding author: ali sharifzadeh

Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

E. mail: sharifzadeh@iaushk.ac.ir

## بررسی اثر داروی گیاهی تیماسین پلاس<sup>®</sup> بر عفونت تجربی خوراکی سالمونلا تیفی موریوم در جوجه های گوشتی

زهرا داودی<sup>۱</sup>، حمید استاجی<sup>۲\*</sup>، سحر غفاری خلیق<sup>۳</sup>، سید حسام الدین عمادی چاشمی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷

### چکیده

سالمونلا تیفی موریوم یکی از مهمترین و بیماریزاترین سالمونلاها بوده که منجر به آلودگی در انسان، دام و طیور می شوند و کاهش تولید و متعاقباً خسارات اقتصادی فراوانی در صنعت طیور به همراه دارد. استفاده از آنتی بیوتیک ها در جهت کاهش عوارض و از بین بردن باکتری ها در دوزهای مختلف، منجر به ایجاد مقاومت می شود. در گیاهان، خاصیت ضد میکروبی، بطور ذاتی در عناصر سازنده وجود دارد، بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی آنتی بیوتیک ها، نظیر مقاومت آنتی بیوتیکی، واکنش آلرژیک، مشکلات معده و... به بار نمی آورند. پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضد میکروبی داروی گیاهی تیماسین پلاس<sup>®</sup> و اثر هم افزایی این دارو با آنتی بیوتیک اریترومايسين بر عفونت سالمونلا تیفی موریوم در جوجه های گوشتی یک روزه نژاد رأس ۳۰۸، انجام گرفت. بدین منظور از ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد رأس ۳۰۸ در چهار گروه ده تایی، استفاده گردید. مقدار ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰<sup>۶</sup> CFU باکتری سالمونلا تیفی موریوم با سوند معدی به روش گاوآژ چینه دان به تمام جوجه ها، به طور تجربی القاء شد. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل منفی (القای عفونت ولی بدون مداخلات درمانی)، درمان با اریترومايسين، درمان با تیماسین پلاس<sup>®</sup> (حاوی عصاره آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و ختمی (*Althea officinalis*)) و درمان با ترکیب اریترومايسين و تیماسین پلاس<sup>®</sup>، بود. درمان از ۲۴ ساعت پس از القای عفونت آغاز و تا یک روز قبل از نمونه گیری ادامه داشت. در روزهای چهارم و دوازده، بعد از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جداسازی و برای بررسی های میکروبی شامل شمارش کلونی و تست Real-time PCR و آسیب های بافتی، مورد آزمایش، قرار گرفت. نتایج حاصل از تست Real-time PCR و شمارش کلونی ثابت کرد، شربت تیماسین پلاس<sup>®</sup> دارای اثر ضد میکروبی بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم است. در این بررسی بیشترین میزان باکتری مختص گروه کنترل و کمترین مقدار مربوط به گروه درمان با اریترومايسين و تیماسین پلاس<sup>®</sup>، بود؛ همچنین در مطالعه نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد و طحال، اختلاف معنی داری میان گروه کنترل با سایر گروه ها مشاهده شد. از این مطالعه نتیجه گیری شد داروی گیاهی تیماسین پلاس عملکردی مشابه با اریترومايسين دارد و به صورت هم افزایی با اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتری سالمونلا تیفی موریوم موثر می باشد. با توجه به پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی، بهتر است به جای استفاده از مواد شیمیایی، از داروهای گیاهی و یا ترکیب داروی گیاهی و آنتی بیوتیک، استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** سالمونلا تیفی موریوم، شربت تیماسین پلاس<sup>®</sup>، Real-time PCR، آویشن باغی، ختمی.

\* نویسنده مسئول: حمید استاجی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

پست الکترونیکی: hstaji@semnan.ac.ir

## مقدمه

به بیماری‌ها و عفونت‌هایی که به طور طبیعی بین مهره‌داران در حال انتقال است، زئونوز می‌گویند. از دلایل اهمیت توجه به زئونوزها می‌توان به علل مرگ و میر در انسان و حیوانات و ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجه در صورت وخامت شرایط، اشاره کرد (Wu Y, Luo L, Wang Y, Chen X, Mo D, Xie L, 2023). سالمونلا تیفی موریوم میکروارگانیزم درون سلولی اختیاری با باسیل‌های گرم منفی، فاقد اسپور در اندازه بین ۲ تا ۵ میکرومتر و قطر ۰/۷ تا ۲/۵ میکرومتر به صورت منفرد، زنجیره‌ی دوتایی و یا چندتایی که قادر به تولید سولفید هیدروژن است و منجر به بیماری‌زایی یا کلونیزه در انسان و حیوانات می‌شود (Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, 2012; Marchello CS, Birkhold M, Crump JA, Martin LB, Ansah MO, Breggi G, Canals R, Fiorino F, Gordon MA, Kim JH, 2022). اعضای این جنس، معمولاً از راه دهان وارد دستگاه گوارش می‌شود. علائم عمومی این عفونت شامل اسهال، استفراغ، دل‌درد و تب می‌باشد که نهایتاً ۳ تا ۵ بعد از ورود به بدن، ظاهر می‌شود. سروتیپ مهاجمی غیر تیفوئیدی سالمونلا به اصطلاح iNTS (invasive Non-Typhoidal Salmonella) می‌باشد (Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, 2011; Galán JE, 2021). بدن برای مقابله با سالمونلا و کاهش عوارض درگیری، به پاسخ ایمنی همورال و سلولی نیاز دارد. عفونت‌زایی سالمونلا، با اتصال پیلی باکتری به سلول‌های اتروسیت (سلول‌های M لایه اپی تلیال) روده آغاز می‌شود. به محض رسیدن میکروارگانیزم به سطح اپی تلیوم، پرزهای حاشیه مسواکی روده (Brush border) تخریب شده و بعد از آزاد شدن باکتری به درون سلول، توسط فرورفتگی

غشاهای سیتوپلاسمی در برگرفته می‌شوند (اندوسیتوز) و به لامینا پروپریا می‌رسند و به دیگر نقاط بدن منتشر می‌شوند (Balasubramanian D, López-Pérez M, Grant TA, Ogbunugafor CB, 2022; Xiong L, Wang S, Dean JW, Oliff KN, Jobin C, Curtiss III R, 2022). میزان دز عفونی در گونه‌های سالمونلا با یکدیگر متفاوت است. برای ایجاد عفونت سالمونلایی باید میزان باکتری به گونه‌ای باشد که بتواند بر اسیدیته معده غلبه کرده و در رقابت با فلور طبیعی روده پیروز شود. به طور کلی، حدود  $10^6$  CFU باکتری برای ایجاد عفونت ضروری است. در شرایط خاص مثلاً کاهش اسیدیته معده، افزایش سن و یا استفاده از آنتی‌اسیدها، میزان این دوز به  $10^3$  کاهش می‌یابد (Wibisono FM, Wibisono FJ, Effendi MH, Plumeriastuti H, Hidayatullah AR, Hartadi EB, 2020). بیماری‌زایی سالمونلا در طیور؛ به نژاد، سن، قدرت مهاجمی و توانایی باکتری در زنده ماندن در برابر ایمنی ذاتی و تکثیر داخل سلول بستگی دارد. اندام‌های درگیر در عفونت سالمونلایی شامل ریه‌ها، میوکارد، پریکارد، تخمدان، مجرای تخم‌بر، سنگدان و کیسه زرده می‌باشد (Jibril AH, Okeke IN, Dalsgaard A, Menéndez VG, 2021; El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, 2022). علائم جوجه‌های درگیر با سالمونلا تیفی موریوم، شامل: کندی رشد، بی‌حالی و خواب‌آلودگی، بال و پرهای آشفته و آویزان، تاج رنگ پریده و چروکیده، ضایعه‌های گچی اطراف مخرج، آسیب‌های چشمی، خس خس سینه، کاهش قابلیت باروری و تخم‌گذاری، اسهال و دهیدراسیون می‌باشد (Hossain MJ, Attia Y, Ballah FM, Islam MS, Sobur MA, Islam MA, Ievy S, Rahman A, Nishiyama A, Islam MS, 2021).

این داروها در پزشکی و دامپزشکی شده است. به همین دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سالمونلا و کلون‌های بدخیم می‌توانند درمان عفونت و کنترل بیماری در انسان را دشوار کند و یک خطر جدی برای سلامت عمومی جهانی باشد (۱۵،۱۶). بنابراین سازمان بهداشت جهانی عنوان کرد، سالمونلا یک پاتوژن الویت‌دار است و هدف اصلی ترویج تحقیق و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا جایگزینی روش یا ماده جدید بجای آنتی‌بیوتیک برای درمان آن است (۱۷،۱۸) با توجه به عوارض و سمیت بی‌شمار داروهای شیمیایی، هزینه‌های بالای سنتز و خرید، تمایل به جایگزینی و استفاده از داروهای گیاهی، روز به روز گسترش پیدا می‌کند و از آنجایی که خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، موجود در عناصر سازنده، در داروهای گیاهی به صورت ذاتی می‌باشد، این مواد با یکدیگر در تعادل بیولوژیک هستند بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی خاصی به بار نمی‌آورند ( Xu Z, Dong M, Yin S, Dong J, Zhang M, Tian R, Min W, Zeng L, Qiao H, 2023). شربت تیماسین پلاس® ساخت شرکت مدین فارما، برای تسکین سرفه، درمان برونشیت، خلط آور و برطرف کننده التهاب مجاری تنفسی، استفاده می‌شود. در هر ۵ میلی‌لیتر از این شربت، مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره آویشن باغی ( *Thymus vulgaris*) و ۲۷۶ میلی‌گرم عصاره ختمی ( *Althea officinalis*) وجود دارد. تیمول و کارواکرول دو جز اصلی موجود در آویشن با اثر هم‌افزایی و ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های غشاء باکتری، فعالیت ضد باکتری خود را اعمال کرده ( Antih J, Houdkova M, Urbanova K, 2021) همچنین کارواکرول، قادر به مهار تجمع پلاکتی و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ در درگیری‌های التهابی و پرولیفراسیون سلولی می‌باشد

Hao G, Li P, Huang J, Cui K, Liang L, Lin F, (Lu Z, 2023).

استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله استفاده از آنها در سیستم‌های تولید دام به عنوان محرک رشد و استفاده بیش از حد از آنها در درمان‌های بالینی، به یک نگرانی بزرگ تبدیل شده است. بعد از شیوع یک بیماری در جامعه، به منظور کاهش عوارض و از بین بردن باکتری، از طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در دزهای مختلف استفاده می‌شود؛ این اقدام به مرور زمان، تغییراتی در ساختار ژنتیکی باکتری به وجود می‌آورد که منجر به بروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک می‌شود. این اتفاق، قابل انتقال به نسل‌های بعد می‌باشد زیرا بسیاری از سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق مصرف مواد غذایی آلوده با منشاء حیوانی وارد بدن انسان‌ها می‌شود و به خطر انداختن سلامت عمومی و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی را به همراه دارند. مقاومت گسترده گونه‌های مختلف باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به عامل مرگ و میر صدها هزار نفر در سال مبدل شده است. افزایش مداوم تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و سرعت انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سرتاسر جهان، این نگرانی را تایید می‌کند (۱۳،۱۲). دانشمندان پیش‌بینی کرده‌اند که پاتوژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ مسئول ۱۰ میلیون مرگ در سراسر جهان خواهند بود (Marquardt, R.R. and Li, 2018). به تازگی سویه‌های خاصی از باکتری‌های مقاوم به بتالاکتامازها و یا AmpC بتالاکتامازها از محصولات غذایی حیوانی جدا و شناسایی شده‌اند. علاوه بر این طیف گسترده‌ای از مقاومت در برابر داروهای ضد میکروبی مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم، کارباپنم‌ها، گلیکوپپتیدها و تیگسایکلین، باعث استفاده محدود از

Lopes PD, Freitas Neto OC, ) تلقیح گردید ( Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, 2016). در طول دوره، حرارت و رطوبت محل نگهداری جوجه‌ها، به ترتیب برابر با  $32 \pm 2$  درجه سانتی گراد و  $60 \pm 5\%$  بود. جوجه‌ها طی این مدت با استفاده از پلت استاندارد (پری‌استاتر و استاتر) تغذیه شدند؛ آب نیز بدون محدودیت خاصی در اختیار آن‌ها قرار داده شد ( Bustamante E, Guijarro E, García-Diego FJ, Balasch S, Hospitaler A, 2012). در روزهای پنجم و سیزدهم پس از القای باکتری، نمونه‌گیری انجام گرفت و پس از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جدا و به ظرف‌های نمونه‌گیری انتقال داده شد. جهت تعیین بار میکروبی موجود در دو بافت کبد و طحال، از آزمون Real-time PCR و تست‌های میکروبیولوژی و هم‌چنین برای بررسی میزان آسیب سالمونلا تیفی موریوم در بافت‌ها، از روش‌های هیستوپاتولوژی استفاده گردید.

#### ارزیابی تأیید حضور باکتری با کالبدگشایی

بعد از نمونه‌گیری، ارگان‌های داخلی جوجه‌ها از نظر تأیید حضور باکتری سالمونلا تیفی موریوم، مورد بررسی کالبدگشایی قرار گرفت و پدیده‌هایی مانند، التهاب و عدم جذب کیسه زرده، مدفوع گچی، تورم و پرخونی کبد و طحال، مشاهده شد ( Gutierrez A, 2022).

#### آزمون Real-time PCR

Real-time PCR، روشی استاندارد برای شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌ها و نشانگرهای خاص ژنتیکی، در انواع مختلف نمونه‌ها بکار می‌رود. حساسیت، سرعت بالا و تکرارپذیری، از مزایای این روش تشخیصی می‌باشد؛ بدین منظور برای شمارش کمی سالمونلا تیفی موریوم در بافت کبد و طحال در تیمارهای آزمایشی، از این روش استفاده گردید. برای

(Kaeidi A, Rahmani M, 2020)، خواص عصاره آویشن در کنار اثرات محافظتی و پانسمان‌کننده عصاره ریشه ختمی (Mahboubi M, 2020) و درمان بیماری‌های معده و روده با وجود منابع مهم موسیلاژ، موجود در انتهای ریشه ختمی ( Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, 2014)، مانع از تبدیل التهاب به یک عفونت باکتریال می‌شود.

هدف از این مطالعه، استفاده از یک داروی گیاهی تجاری برای درمان عفونت سالمونلا تیفی موریوم موجود در جوجه‌های گوشتی آلوده، است. از این شربت به طور معمول برای درمان سرفه و استفاده می‌شود ولی با مطالعه خاصیت ضد میکروبی دو جز سازنده این شربت (آویشن باغی و ختمی)، از بین بردن عفونت سالمونلایی دور از انتظار نیست.

#### مواد و روش کار

در این پژوهش، از ۴۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه رأس ۳۰۸، مخلوط از هر دو جنس با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم، در قالب طرح کاملاً تصادفی، در چهار گروه، استفاده گردید. چهار تیمار آزمایشی شامل کنترل منفی (القای عفونت ولی بدون مداخله دارویی)، درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن جوجه، درمان با شربت تیماسین پلاس® با دوز ۵۰ میکرولیتر و درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و شربت تیماسین پلاس®، بود (Owuama CI, 2017; Gerivani B, Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, 2020). درمان در این گروه‌ها از یک روز بعد از القای عفونت شروع و تا یک روز قبل از نمونه‌برداری ادامه داشت. مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی  $10^6$  CFU باکتری سالمونلا تیفی موریوم (ATCC14028)، با روش گاوآژ چینه‌دان (توسط سوند معدی)، در دهان تمام جوجه‌ها



مقدار ۱ گرم از بافت کبد و طحال جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه، جداسازی و به همراه ۱ سی سی محلول پیتونواتر، درون هاون ریخته شد و کاملاً مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده را به یک لوله آزمایش با ۹ سی سی پیتونواتر انتقال و رقت  $10^{-1}$  ساخته شد. سپس به صورت سریال دایلوژن تا رقت  $10^{-3}$  این کار ادامه پیدا کرد. برای کشت باکتری میزان  $10^6$  لانداز هر سه رقت با ۵ بار تکرار برداشته و به محیط کشت SS آگار (Salmonella Shigella Agar) و بلاد آگار (Blood Agar) اضافه و کشت سطحی داده شد. پلیت‌های بلاد آگار به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های SS آگار به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، درون انکوباتور قرار گرفت و سپس شمارش کلونی انجام شد (Zhou Z, Pan C, Lu Y, Gao Y, Liu W, Yin P, ) 2017; Farikoski IO, Medeiros LS, Carvalho YK, Ashford DA, Figueiredo EE, Fernandes (DV, Silva PJ, 2019

### بررسی هیستوپاتولوژی

مکعب‌هایی یکسانی با اندازه حدودی ۱ سانتی‌متر مکعب، از بافت کبد و طحال نمونه‌ها، به صورت جداگانه کد گذاری شدند و در ظرف‌های حاوی ۶۰ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، فرمالین قدیم با جدید تعویض شد و تمام پروسه آبیگری با الکل، شفاف سازی به کمک گزلیل، آغشته سازی با پارافین، کد گذاری نمونه‌ها، قالب زنی، برش و رنگ آمیزی با رنگ هماتوکسیلین اتوزین (Haematoxylin and Eosin)، طبق پروتکل انجام گرفت (Bescucci DM, Moote ) (PE, Ortega Polo R, Uwiera RR, 2020

برای بررسی نتایج هیستوپاتولوژی، روش درجه بندی انتخاب شد. لام‌های تهیه شده از بافت طحال از نظر

این تست، ابتدا میزان یکسان (۱ گرم) از بافت کبد و طحال همه گروه‌های برداشته و بعد از تهیه عصاره سلولی، DNA موجود در بافت‌ها به روش فنول کلروفرم ایزو آمیل الکل، استخراج گردید. سپس در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری، میزان ۱۰ میکرولیتر از مخلوط PCR (PCR master mix) شرکت سیناکلون، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward

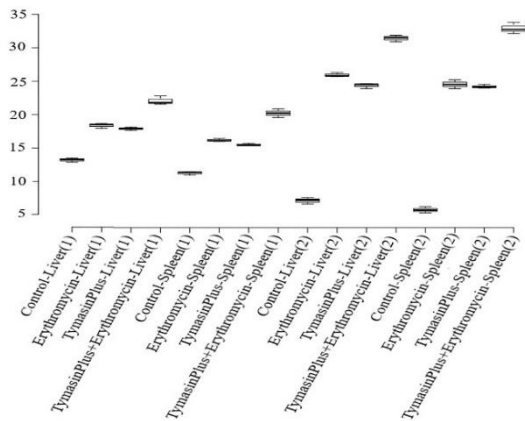
(GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA) و Reverse (GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG)

مرتبط با DNA سالمونلا تیفی موربوم (Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, 2012)، ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر نمونه و ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل شده، جمعاً به میزان ۲۰ میکرولیتر، ریخته شد (Staji H, Tonelli A, Javaheri-) Vayeghan A, Changizi E, 2015; Staji H, (Khoshgoftar J, Javaheri Vayeghan A, 2017) برای تهیه نمونه کنترل مثبت، از نیم مک‌فارلند، رقت ۰/۱ تهیه و  $S_1$  نامیده شد سپس با رقت سازی سریالی تا  $10^{-5}$ ، ۵ استاندارد به نام‌های  $S_1, S_2, S_3, S_4$  و  $S_5$  به وجود آمد. به جای نمونه کنترل منفی از آب مقطر استفاده و تمامی نمونه‌ها در دستگاه از قبل تنظیم شده، قرار داده شد (Staji H, Birgani SF, 2018; Flores-) Ramirez A, Ortega-Cuenca J, Cuetero-(Martínez Y, de Los Cobos D, 2023).

سیکل‌های آستانه به صورت نمودار خطی و منحنی توسط دستگاه Real-time PCR رسم شد و اعدادی بر حسب حد آستانه (Cycle Threshold (CT)) به دست آمد و با استفاده از روش Oneway Anova، مورد آنالیز آماری قرار گرفت و داده‌ها در قالب گراف بیان شدند.

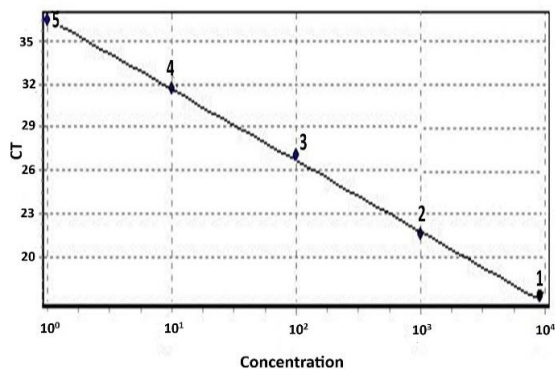
### تست‌های میکروبیولوژی و شمارش کلونی





تصویر ۱. نمودار میزان چرخه‌های آستانه در گروه‌های مورد مطالعه در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی، میزان عدد چرخه‌های آستانه و محور افقی، نام گروه‌های مورد بررسی.

نمودار استاندارد (Standard curve) نشانگر غلظت DNA تکثیر شده، در چرخه‌های آستانه مختلف است (تصویر ۲).



تصویر ۲. نمودار استاندارد بیانگر میزان غلظت باکتری بر حسب چرخه‌های آستانه. محور عمودی میزان عدد چرخه‌های آستانه و محور افقی غلظت باکتری.

### نتایج تست میکروبی

باکتری‌های رشد یافته در دو محیط SS آگار و بلاد آگار در غلظت  $10^{-1}$  با روش کلونی کانت، شمارش شد. نتایج به دست آمده نشان داد، در هر دو محیط کشت، میزان باکتری در گروه کنترل از سایر گروه‌ها بیشتر و بعد از آن به ترتیب گروه شربت تیماسین پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين قرار

رسوب آهن (Hemosiderosis) و تخلیه لنفاوی (Lymphatic Drainage) و لام‌های بافت کبد از نظر نکروز (Necrosis) و التهاب (Inflammation)، به طور کاملاً تصادفی با عدسی‌های ۴، ۱۰ و ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس هر لام در چهار شان میکروبی با درشت‌نمایی ۴۰۰ X یا لنز ۴۰، مشاهده و هر عارضه به صورت جداگانه در لام‌ها، بر حسب میزان آسیب درجه‌بندی شدند، به این صورت که اگر در هیچ شان عارضه‌ای دیده نشد، درجه آن ۰ می‌شود، اگر در یک شان عارضه دیده شد درجه آن ۱، در دو شان عارضه دیده شد درجه آن ۲، اگر در ۳ شان عارضه دیده شد درجه آن ۳ و اگر در ۴ شان عارضه دیده شد درجه آن ۴ می‌شود (Gerivani B, Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, 2020). نتایج مربوط به تست‌های انجام گرفته با نرم افزار One-way ANOVA، با اختلاف معیار  $P < 0.05$  (Pvalue) مورد بررسی آماری قرار گرفت.

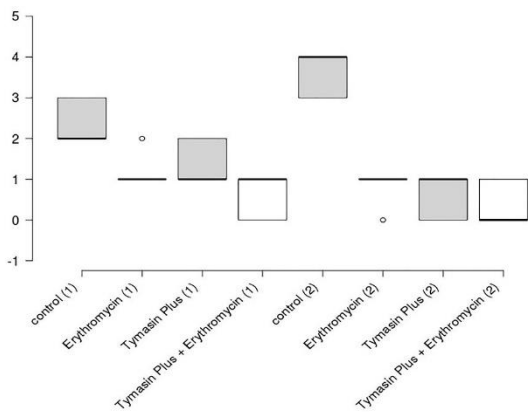
### نتایج

#### نتایج آزمون Real-time PCR

برای تفسیر نتایج حاصل از آزمون Real-time PCR به میزان چرخه‌های آستانه (Ct) توجه می‌کنیم، به این صورت که، هرچه میزان چرخه‌های آستانه کمتر باشد یعنی میزان تکثیر و بیان باکتری بیشتر بوده است و در مقابل هرچه میزان چرخه آستانه بیشتر باشد، میزان تکثیر و بیان باکتری کمتر بوده است به عبارت دیگر، در گروه‌هایی که میزان باکتری کمتر باشد، شاهد مقدار چرخه آستانه بالاتری هستیم. ب در این پژوهش، کمترین میزان چرخه آستانه به گروه‌های ترکیب آنتی‌بیوتیک اریترومايسين و شربت تیماسین پلاس® اختصاص داشت (تصویر ۱).

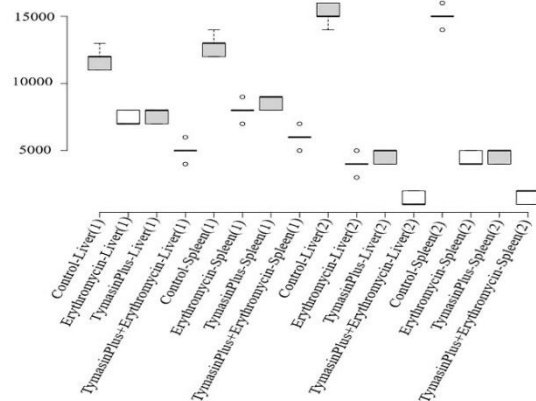
(تصویر ۶)، نکروز کبد (تصویر ۷) و التهاب کبد (تصویر ۸) در دو نمونه گیری اول و دوم با یکدیگر مقایسه شدند و نتایج حاصل از این بررسی نشان داد بیشترین میزان آسیب بافتی وارد شده، مربوط به گروه کنترل در هر دو نمونه گیری می‌باشد و اختلاف معنی‌داری بین این گروه با سایر گروه‌ها وجود دارد. در گروه درمان با ترکیب اریترومايسين و شربت تیماسین پلاس کمترین میزان آسیب مشاهده شد (۰/۰۵)  $P <$ . گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومايسين و شربت تیماسین پلاس نتایج تقریباً مشابهی داشتند و می‌توان نتیجه گرفت تیماسین پلاس و اریترومايسين دارای عملکردی یکسان در کاهش میزان آلودگی و آسیب بوده‌اند.

تفاوت نتایج در بررسی هیستوپاتولوژی با دو آزمون میکروبی دیگر، نشان داد که تغییرات مولکولی زودتر از تغییرات سلولی بوجود می‌آید.

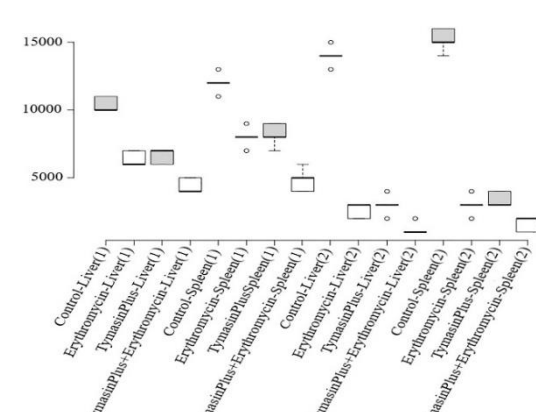


تصویر ۵. نمودار مقایسه تخلیه بافت طحال در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی درجه بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.

داشت. کمترین میزان باکتری مشاهده شده مربوط به گروه، ترکیب شربت تیماسین پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين بود. هم‌چنین در تمام گروه‌های مورد مطالعه، میزان باکتری در بافت طحال نسبت به کبد بیشتر بود (تصویر ۳ و ۴).



تصویر ۳. نمودار میزان باکتری رشد یافته در محیط کشت SS آگار در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی میزان باکتری و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.



تصویر ۴. نمودار میزان باکتری رشد یافته در محیط کشت بلاد آگار در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی میزان باکتری و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.

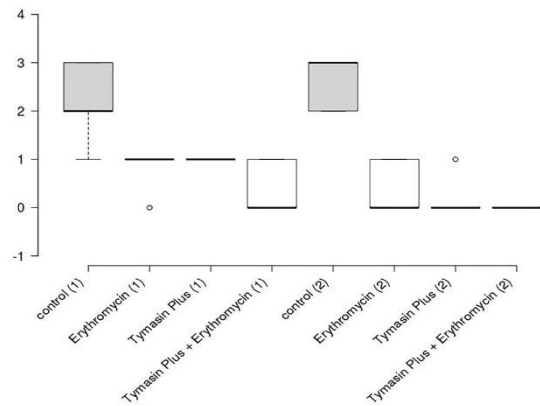
### نتایج بررسی هیستوپاتولوژی

آسیب‌های بافتی وارد شده به نمونه‌های مورد مطالعه، شامل تخلیه بافتی طحال (تصویر ۵)، هموسیدروز طحال

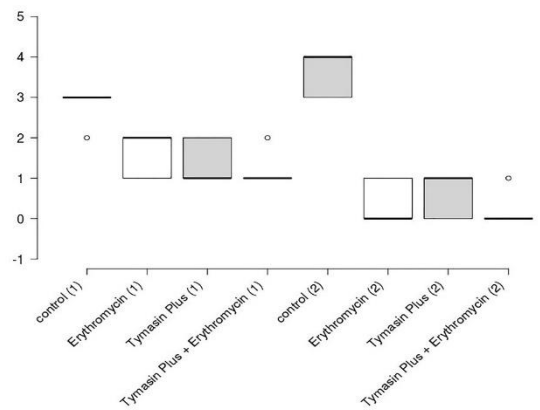
تصویر ۸. نمودار مقایسه التهاب کبد در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی درجه بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه های مورد مطالعه.

### بحث

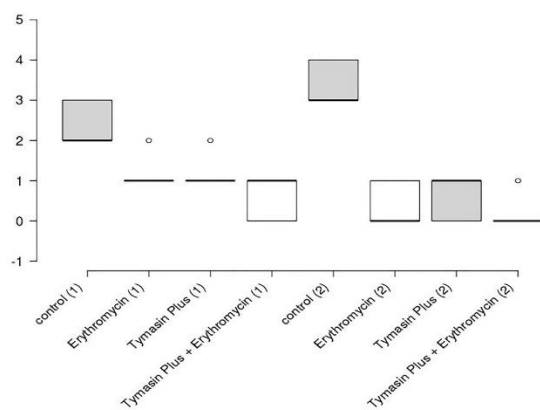
طی بررسی هایی که بین سال های ۲۰۲۱-۲۰۱۱ توسط Shen W و همکاران در سال ۲۰۲۲، Farikoski IO و همکاران در سال ۲۰۱۹، Oladeinde A و همکاران در سال ۲۰۱۹، Malek Pour و همکاران در سال ۲۰۱۷ و Pouyan و همکاران در سال ۲۰۲۱، انجام گرفت، مشخص شد، در بین ۴۷۱۴ ایزوله جداسازی شده از انسان، حیوانات، غذاها و محیط زیست، بیشترین مقادیر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ( $\leq 75\%$ ) مربوط به تتراسایکلین، آمپی سیلین، سولفیسوکسازول و استرپتومایسین؛ (۵۰-۷۵٪) برای نالیدیکسیک اسید، آموکسی سیلین، اسید کلاوولانیک و کلرامفنیکل؛ (۲۵-۵۰٪) برای تری متوپریم، سولفامتوکسازول، کانامایسین، تری متوپریم و جنتامایسین و ( $\geq 25\%$ ) یا کمترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، سفنازیدیم و کولیستین بوده است (۲۹، ۴۰-۳۶). Aelenei P و همکاران در ۲۰۱۹ به مقایسه اثر دو آنتی بیوتیک اریترومایسین و جنتامایسین بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی پرداختند و دریافتند اریترومایسین دارای اثر مهارى بهتری بر روی سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی نسبت به جنتامایسین است (Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoiaie AC, Brebu M, Horhoge CE, Galgano و همکاران در 2019). در پژوهشی دیگر، و همکاران در سال ۲۰۲۳، به بررسی اثر چندین آنتی بیوتیک مختلف بر روی سویه های سالمونلا انتریکا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، پرداختند و دریافتند که اثر



تصویر ۶. نمودار مقایسه هموسیدروز طحال در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی درجه بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه های مورد مطالعه.



تصویر ۷. نمودار مقایسه نکروز کبد در نمونه گیری اول و دوم. محور عمودی درجه بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه های مورد مطالعه.



همکاران در سال ۲۰۲۳، ثابت کردند که عصاره آویشن با قدرت مهار رادیکال‌های آزاد، هگزان و کلاته کنندگی آهن پلاسما، حائز اهمیت است؛ این ترکیبات می‌تواند با مهار آنزیم‌های باکتریایی، افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و سنتز اجزای شبه ساختاری، ماده ژنتیکی را از نظر عملکردی مختل کند. به طور کلی عصاره‌های حاوی ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول و اوژنول در سطوح بالا، اثر ضد میکروبی قوی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند (Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, 2023). Galgano و همکاران در سال ۲۰۲۳، از عصاره آویشن باغی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی برای از بین بردن سالمونلا دربی، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در بستر طیور استفاده کردند (Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, 2023). گیاه ختمی حاوی پکتین ۱۱ درصد، موسیلاژ، اسید فنولیک، اسکوپولتین، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و فیتواسترول‌ها می‌باشد و در کاهش عفونت بسیار مفید می‌باشد. گیاه ختمی دارای فواید پزشکی زیاد و بدون عوارض جانبی جدی است. این عصاره، به دلیل خواص ضد التهابی و ضد میکروبی به عنوان یک داروی گیاهی سنتی برای التیام زخم شناخته شده است. خواص موسیلاژینی، اثرات مرطوب کنندگی و تغذیه‌ای بر تکثیر سلول‌های پوستی دارد. برخی از پلی ساکاریدهای موجود در ختمی که از نوع رامنوگالاکتورونان هستند، تشکیل بافت‌های موسینی در بالای بافت‌های تحریک شده و آسیب دیده را به عهده دارند (Ayrle H, Mevissen M, Kaske M, Nathues H, Gruetzner N, Melzig M, 2016). به طور کلی از عصاره ختمی برای عفونت‌های دستگاه گوارش و مجاری ادراری و هم‌چنین برای التهاب، زخم، آبسه، یبوست و اسهال

آنتی‌بیوتیکی ماکرولیدها شامل اریترومايسين، آزیترومایسین بیشتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند ونکومايسين، آموکسی‌سیلین، کلیندامایسین و... می‌باشد (Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, 2023). با توجه به این نتایج، آنتی‌بیوتیک اریترومايسين به عنوان آنتی‌بیوتیک کاندید در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. استاجی و همکاران در سال ۲۰۱۸، اعلام کردند، عفونت‌زایی در طیور ممکن است یک مسیر بالقوه برای ورود باکتری‌های بیماری‌زا به زنجیره غذایی و افزایش تعداد میزبان باشد (Staji H, Birgani SF, 2018). بنابراین انجام اقداماتی در جهت کاهش عفونت بدون ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، امری حیاتی تلقی می‌شود. به این منظور چندین سال است، داروهای گیاهی مورد توجه همگان قرار گرفته است و به نظر می‌رسد می‌توان از آن‌ها به صورت جایگزین و یا هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد. آویشن باغی و ختمی دو گیاه استفاده شده در این پژوهش‌اند که به تنهایی دارای خواص بسیار می‌باشند. اسانس آویشن در حال حاضر در سطح جهانی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی، با اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد قارچی شناخته شده است. طبق بررسی‌های بیوانفورماتیکی که Marques J و همکاران در سال ۲۰۲۳، حول محور اتصال مولکولی و تجزیه و تحلیل همبستگی اجزای آویشن انجام دادند، ثابت شد، اتصال و پیوند مولکولی قوی بین کارواکرول و تیمول، با حوزه‌های عملکردی پروتئین حدت، مانع از انتشار و آسیب میکروارگانیسم به سایر ارگان‌های بدن میزبان می‌شوند (Monteiro Marques J, Serrano S, Selmi H, Giesteira Cotovio P, 2023).

اسانس کافور و میخک برای مهار تولید TEMbla در اشرشیاکلی جدا شده از کولی باسیلوز طیور استفاده کردند و با استفاده از تست MIC ثابت کردند، ضمن اثر مهاری هر یک از این اسانس‌ها به تنهایی، ترکیب این دو نیز دارای قدرت بازدارندگی زیادی بر روی جدایه اشرشیاکلی می‌باشد (Malekpour B, Kafshdouzan K, Javan AJ, 2019). همچنین Pouyan و همکاران در سال ۲۰۲۱، به اثر مهاری اسانس دارچین و پونه چه به صورت تکی و ترکیبی با یکدیگر بر تولید bla CTX-M بر سویه‌های اشرشیاکلی با تست MIC پی بردند (Pouyan S, Kafshdouzan K, 2021). با توجه به بررسی‌های صورت گرفته مشخص شد، ترکیب دو یا چند عصاره گیاهی، نسبت به استفاده از تک عصاره، خاصیت درمانی و ضد میکروبی بیشتری را دارا می‌باشد و این تصور که خاصیت مواد مؤثر موجود در گیاهان در همبستگی با یکدیگر تشدید می‌شود، دور از انتظار نیست (Mokhtari R, Kazemi, Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, 2023). استفاده همزمان داروهای گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌ها به نوع گیاه و ماده شیمیایی بستگی دارد و می‌تواند سه واکنش هم‌افزایی، بی‌اثر و مضر را از خود نشان دهد. کاهش مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک و یا کاهش تعداد دفعات مصرف، در مقابل تاثیر ضد میکروبی بسیار زیاد، از دلایل اهمیت و توجه به اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک با داروی گیاهی می‌باشد. مطالعات زیادی بر روی بررسی اثر هم‌افزایی انجام گرفته است، بطور مثال زاهدی و همکاران در سال ۱۳۹۴، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس گیاه لیمو عمانی بر روی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (Zahedi B, Eghbal J, Zartoshti M, 2015) محمدپور و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم‌افزایی

استفاده می‌شود. فلاونوئیدهای موجود در ختمی، تأثیر بسیار قوی‌تر از فیل بوتازون در سرکوب فاز حاد التهاب داشتند؛ هم‌چنین فاز التهابی برخلاف فیل بوتازون، موجب فرسایش معده نمی‌شود و وجود هیپولاتین ۸-گلوکوزید، کاهش درد در بیماران را به همراه دارد (Pausan MR, 2022). داروی گیاهی تیماسین پلاس® به طور معمول برای درمان برونشیت، گلودرد و تسکین سرفه استفاده می‌شود اما با توجه به مواد مؤثر این دارو که شامل آویشن باغی و ختمی می‌باشد و تاثیر ضد میکروبی هر یک از این عناصر به تنهایی، بررسی تاثیر ضد میکروبی این دارو بر روی عفونت سالمونلا تیفی موریوم، به یکی از اهداف این پژوهش مبدل شد.

معصومی پور و همکاران در سال ۱۳۹۸، ثابت کردند که تاثیر ضد میکروبی ترکیب سه عصاره کلپوره، فلفل سیاه و چای سبز بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک نسبت به حالت منفرد، بسیار زیاد و قابل مقایسه نیست (Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, 2019). همچنین D Amenu در سال ۲۰۱۴، ثابت کرد ترکیب عصاره گیاهان خزره‌ره، جینسنگ هندی، درمنه دشتی و انجیر سیکامور نسبت به حالت تکی این عناصر، در برابر سویه‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اثر ضد میکروبی بیشتری دارند (Amenu D, 2016). Moussii IM و همکاران در سال ۲۰۲۰ پی بردند که ترکیب سه عصاره درمنه دشتی، اسطوخودوس و رزماری اثر ضد میکروبی زیادی بر روی سه سویه اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا دارند (Moussii IM, Nayme K, Timinouni M, Jamaledine J, Filali H, 2020) Malek Pour و همکاران در سال ۲۰۱۹ از ترکیب دو



PCR سنجیدند (Liu N, Lin L, Wang JQ, Zhang, 2019). Malekpour (FK, 2019) و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای بررسی کمی میزان اثر بخشی دو اسانس کافور و میخک بر مهار تولید TEM<sub>bla</sub> در اشرشیاکلی از تست Real-time PCR برای ردیابی ژن مورد نظر استفاده کردند (Malekpour B, Kafshdouzan K, 2019). Javan AJ, 2019) و همکاران در سال ۲۰۲۱، از روش Real-time PCR برای بررسی میزان اثر هم افزایی ترکیب دو عصاره دارچین و پونه بر مهار تولید bla<sub>CTX-M</sub> در اشرشیاکلی جدا شده از کولی باسیلوز طیور استفاده کردند (Pouyan S, 2021). Kafshdouzan K, 2021) و همکاران در سال ۲۰۲۱، به بررسی اثر ضد میکروبی دو گیاه زیره سیاه و زردچوبه بر علیه باکتری گرم منفی پاستورلا مولتوسیدا در جوجه های گوشتی پرداختند، در این پژوهش ضمن آلودگی طیور و سپس درمان با گیاهان مدنظر، از بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد، طحال و ریه برای بررسی میزان اثر بخشی گیاهان فوق استفاده کردند (Raheem MA, Jiangang H, Yin D, 2021). Xue M, ur Rehman K, Rahim MA, Gu Y, Fu D, Song X, Tu J, 2021). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۲۰ توسط Chen C و همکاران صورت گرفت، از پروبیوتیک برای از بین بردن باکتری سالمونلا پلوروم در جوجه های گوشتی استفاده شد، در این پژوهش، محلول پروبیوتیک به صورت گاوآژ چینه دان به جوجه ها خورانده و سپس از نمونه بافت کبد و طحال برای بررسی میزان اثر بخشی پروبیوتیک استفاده شد (Chen C, Li J, Zhang H, Xie Y, Xiong L, Liu H, 2020). در این پژوهش میزان آسیب بافتی و تعداد باکتری های موجود در بافت طحال تا حدودی بیشتر از بافت کبد گزارش شد که نظر می رسد دلیل این اتفاق

آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و عصاره سیاهدانه بر روی سویه ی استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، (Mohammadpour P, Ahmadi M, Niakan M, 2023). Rahimi F, 2023) اسدی و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم افزایی آنتی بیوتیک سفکسیم و کارواکربول بر روی باکتری اشرشیاکلی (Asadi S, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Yahya Rayat R, 2023)، استاجی و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثر هم افزایی آنتی بیوتیک اریترومايسين و بزاق زالو بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Gerivani B, Staji H, 2020). Rassouli M, Ghazaleh N, 2020) و Aelenei P و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثر هم افزایی عصاره گشنیز با آنتی بیوتیک اریترومايسين بر روی سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی (Aelenei P, Rimbu CM, 2019). Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoai AC, Brebu M, Horhoge CE, 2019)، ثابت کردند. طبق نتایج این پژوهش ها، بررسی اثر هم افزایی داروی گیاهی تیماسین پلاس<sup>®</sup> و آنتی بیوتیک اریترومايسين، دومین هدف مورد بررسی در این پژوهش بود. Dar MA و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای بررسی میزان بیان ژن و پاسخ آنتی بادی از DNA موجود در بافت های کبد، طحال و روده، جوجه های گوشتی چالش یافته شده با سالمونلا تیفی موریوم، با استفاده از آزمون Real-time PCR استفاده کردند (Dar MA, 2019). Urwat U, Ahmad SM, Ahmad R, Kashoo ZA, Dar TA, Bhat SA, Mumtaz PT, Shabir N, Shah RA, 2019) همچنین در پژوهش دیگر که در سال ۲۰۱۹ توسط Liu N و همکاران انجام گرفت، برای بررسی اثر بخشی مکمل تترامیتیل پیرازین در کاهش میزان باکتری سالمونلا تیفی موریوم در جوجه های گوشتی، از نمونه DNA موجود در بافت کبد و طحال استفاده شد و مقدار باکتری موجود با تست Real-time

نتایج را نشان داد و مؤفق‌ترین گروه در کاهش میزان باکتری بوده است و مشخص شد، ترکیب این دو ماده نه تنها برای بیمار، ضرری ندارد بلکه می‌توان با استناد به اثر هم‌افزایی، بجای استفاده از آنتی‌بیوتیک در دوز بالا یا مدت زمان بیشتر، از این ترکیب در زمان کوتاه‌تر و مقدار آنتی‌بیوتیک کمتر، بهترین نتیجه را مشاهده کرد.

### تأییدیه اخلاقی

پژوهش حاضر با کد اخلاق IR.SU.REC.1402.6، در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان و طبق دستورالعمل‌ها کمیته اخلاق، انجام گرفت.

### تعارض منافع

بین نویسندگان، تعارض در منافع گزارش نشده است.

به مکانسیم عمل این دو بافت برمی‌گردد. از آنجایی که بافت طحال بزرگترین بافت لنفاوی بدن است و مسئولیت فاگوسیتوز و تصفیه خون برعهده دارد، پس بالا بودن آسیب و تغییرات بالای مورفولوژی مانند پرخونی و.. در این بافت دور از انتظار نیست.

### نتیجه‌گیری نهایی

با مطالعه نتایج حاصل از تست‌های Real-time PCR، شمارش کلونی در دو محیط SS آگار و بلاد آگار و بررسی‌های پاتولوژی، مشخص شد، شربت تیماسین پلاس® توانسته میزان باکتری را کاهش دهد و نتایجی شبیه به گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومايسين داشته باشد، اما بطور کلی ترکیب شربت تیماسین پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين بهترین

### منابع

- vapours and their GC/MS analysis using solid-phase microextraction and syringe headspace Sampling Techniques.," *Molecules*, 26(21)(6553).
- Asadi S, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Yahya Rayat R, S.N. (2023) "Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against Escherichia coli O157:H7," *Journal of Veterinary Research*, 78(1), 76\_67 .
  - Ayrle H, Mevissen M, Kaske M, Nathues H, Gruetzner N, Melzig M, W.M. (2016) "Medicinal plants—prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review," *BMC veterinary research*, 12, 31\_1 .
  - Balasubramanian D, López-Pérez M, Grant TA, Ogbunugafor CB, A.-M.S. (2022) "Molecular mechanisms and drivers of pathogen emergence," *Trends in Microbiology* .
  - Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoiaie AC, Brebu M, Horhogeia CE, M.A. (2019) "Coriander essential oil and linalool—interactions with antibiotics against Gram- positive and Gram- negative bacteria," *Letters in applied microbiology*, 68(2), 64\_156 .
  - Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, H.C. (2011) "Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract," *Microbiology*, 157(12), 81\_3268 .
  - Amenu D (2016) "Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens," *American Journal of Ethnomedicine*, 1(1), 29\_18 .
  - Antih J, Houdkova M, Urbanova K, K.L. (2021) "Antibacterial activity of Thymus vulgaris L. essential oil

- H.M. (2022) "The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview," *Poultry Science*, 101(4), 101716 .
15. Farikoski IO, Medeiros LS, Carvalho YK, Ashford DA, Figueiredo EE, Fernandes DV, Silva PJ, R.V. (2019) "The urban and rural capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as reservoir of *Salmonella* in the western Amazon, Brazil," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39, 9\_66 .
  16. Flores-Ramírez A, Ortega-Cuenca J, Cuetero-Martínez Y, de Los Cobos D, N.A. (2023) "Viability and removal assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. by real-time PCR with propidium monoazide in the hygienization of sewage sludge using three anaerobic processes," *Waste Management*, 161, 62\_25 .
  17. Galán JE (2021) "Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair," *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 25\_716 .
  18. Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, C.M. (2023) "Pilot Study on the Action of *Thymus vulgaris* Essential Oil in Treating the Most Common Bacterial Contaminants and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Derby in Poultry Litter," *Antibiotics*, 12(3), 436\_448 .
  19. Gerivani B, Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, V.A. (2020) "Co-administration of erythromycin and leech salivary extract alleviates osteomyelitis in rats induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 33(4), 51\_243 .
  20. Gutierrez A, S.K. (2022) "Survival and inactivation kinetics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in
  8. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M. and Retamal, P. (2016) "Salmonella enterica: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile," *Rev. Chil. Infectología*, 33(5), 557\_547 .
  9. Bescucci DM, Moote PE, Ortega Polo R, Uwiera RR, I.G. (2020) "Salmonella enterica serovar Typhimurium temporally modulates the enteric microbiota and host responses to overcome colonization resistance in swine," *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01569-20.
  10. Bustamante E, Guijarro E, García-Diego FJ, Balasch S, Hospitaler A, T.A. (2012) "Multisensor system for isothermal measurements to assess indoor climatic conditions in poultry farms," *Sensors*, 12(5), 74\_5752 .
  11. Castellanos, L.R., van der Graaf-van Bloois, L., Donado Godoy, P., León, M., Clavijo, V., Arévalo, A., Bernal, J.F. و Mevius, D.J., Wagenaar, J.A., Zomer, A. and Hordijk, J. (2018) "Genomic Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* in the Colombian Poultry Chain," *Front. Microbiol*, 9, 1\_11 .
  12. Chen C, Li J, Zhang H, Xie Y, Xiong L, Liu H, W.F. (2020) "Effects of a probiotic on the growth performance, intestinal flora, and immune function of chicks infected with *Salmonella pullorum*," *Poultry Science*, 99(11), 23\_5316 .
  13. Dar MA, Urwat U, Ahmad SM, Ahmad R, Kashoo ZA, Dar TA, Bhat SA, Mumtaz PT, Shabir N, Shah RA, H.M. (2019) "Gene expression and antibody response in chicken against *Salmonella Typhimurium* challenge," *Poultry Science*, 98(5), 13\_2008 .
  14. El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, A.E.-

- Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum,” *Vet J*, 214, 6\_40 .
28. Mahboubi M (2020) “Marshmallow (*Althaea officinalis* L.) and its potency in the treatment of cough,” *Complementary medicine research*, 27(3), 83\_174 .
  29. Malekpour B, Kafshdouzan K, Javan AJ, B.M. (2019) “Inhibition of TEMbla Producing *Escherichia coli* Isolated From Poultry Colibacillosis Using *Cinnamomum camphora* and *Syzygium aromaticum* Essential Oils,” *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 6(3), 94\_88 .
  30. Marchello CS, Birkhold M, Crump JA, Martin LB, Ansah MO, Breggi G, Canals R, Fiorino F, Gordon MA, Kim JH, H.M. (2022) “Complications and mortality of non-typhoidal salmonella invasive disease: a global systematic review and meta-analysis,” *The Lancet Infectious Diseases*, Published.
  31. Marquardt, R.R. and Li, S. (2018) “Antimicrobial resistance in livestock: advances and alternatives to antibiotics,” *Anim. Front*, 8(2), 37\_30 .
  32. Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, J.T. (2019) “Antimicrobial Effect of Combined Extract of Three Plants *Camellia Sinensis*, *Teucrium Polium* and *Piper Nigrum* on Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria,” *Iran J Med Microbiol*, 13(2), 124\_114 .
  33. Mohammadpour P, Ahmadi M, Niakan M, Rahimi F, H.F. (2023) “Survey the synergistic effect of the cotrimoxazole and *Nigella sativa* extract on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteria,” *Daneshvar Medicine*, 31(1), 22\_13 .
  34. Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, M.A. (2023) “Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of irradiated and natural poultry litter microcosms,” *PLoS One*, 17(4), e0267178.
  21. Hao G, Li P, Huang J, Cui K, Liang L, Lin F, Lu Z, S.S. (2023) “Research Note: Therapeutic effect of a *Salmonella* phage combination on chicks infected with *Salmonella* Typhimurium,” *Poult Sci*, 102(7), 102715 .
  22. Hossain MJ, Attia Y, Ballah FM, Islam MS, Sobur MA, Islam MA, Ievy S, Rahman A, Nishiyama A, Islam MS, H.J. (2021) “Zoonotic significance and antimicrobial resistance in *Salmonella* in poultry in Bangladesh for the period of 2011–2021,” *Zoonoticdis*, 1(1) , 24\_3 .
  23. Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, A. (2012) “Prevalence of *Salmonella* spp. in the quail egg interior contents: A provincial study,” *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(3), 196\_191 .
  24. Jibril AH, Okeke IN, Dalgaard A, Menéndez VG, O.J. (2021) “Genomic analysis of antimicrobial resistance and resistance plasmids in *Salmonella* serovars from poultry in Nigeria,” *Antibiotics*, 10(2), 99 .
  25. Kaeidi A, Rahmani M, H.J. (2020) “The Protective Effect of Carvacrol and Thymol as Main Polyphenolic Compounds of Thyme on Some Biologic Systems in Disease Condition: A Narrative Review,” *JRUMS*, 19(1), 96\_81 .
  26. Liu N, Lin L, Wang JQ, Zhang FK, W.J. (2019) “Tetramethylpyrazine supplementation reduced *Salmonella* Typhimurium load and inflammatory response in broilers,” *Poultry Science*, 98(8), 64\_3158 .
  27. Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, et al (2016) “Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of

- systematic review and meta-analysis,” *Antibiotics*, 11(4), 532 .
42. Raheem MA, Jiangang H, Yin D, Xue M, ur Rehman K, Rahim MA, Gu Y, Fu D, Song X, Tu J, K.I. (2021) “Response of lymphatic tissues to natural feed additives, curcumin (*Curcuma longa*) and black cumin seeds (*Nigella sativa*), in broilers against *Pasteurella multocida*,” *Poultry Science*, 100(5), 164\_152 .
  43. Shen W, Chen H, Geng J, Wu RA, Wang X, D.T. (2022) “Prevalence, serovar distribution, and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated from pork in China: A systematic review and meta-analysis,” *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109473 .
  44. Staji H, Birgani SF, R.B. (2018) “Comparative clustering and genotyping of *Campylobacter jejuni* strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis,” *Annals of microbiology*, 68(11), 62\_755 .
  45. Staji H, Khoshgoftar J, Javaheri Vayeghan A, B.M. (2017) “Phylogenetic grouping and assessment of virulence genotypes, with antibiotic resistance patterns, of *Escherichia coli* strains implicated in female urinary tract infections,” *Int J Enteric Pathog*, 4(1), 7\_1 .
  46. Staji H, Tonelli A, Javaheri-Vayeghan A, Changizi E, S.-B.M. (2015) “Distribution of Shiga toxin genes subtypes in B1 phylotypes of *Escherichia coli* isolated from calves suffering from diarrhea in Tehran suburb using DNA oligonucleotide arrays,” *Iranian journal of microbiology*, 7(4), 197\_191 .
  47. WHO (2019a) *List of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*.
  48. WHO (2019b) *Model List of Essential Medicines*.
  - Phenolic Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts,” *Journal of Food Quality*, 2023.
  35. Monteiro Marques J, Serrano S, Selmi H, Giesteira Cotovio P, S.-L.T. (2023) “Antimicrobial and Antibiofilm Potential of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon flexuosus* Essential Oils against Pure and Mixed Cultures of Foodborne Bacteria,” *Antibiotics*, 12(3), 565 .
  36. Moussii IM, Nayme K, Timinouni M, Jamaledine J, Filali H, H.F. (2020) “Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils,” *Synergy*, 10(1).
  37. Owuama CI (2017) “Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method,” *African journal of microbiology research*, 11(23), 80\_977 .
  38. Pan, H., Paudyal, N., Li, X., Fang, W. and Yue, M. (2018) “Multiple food-animal-borne route in transmission of antibiotic-resistant *Salmonella* Newport to humans,” *Front. Microbiol*, 9,10\_1 .
  39. Pausan MR (2022) “Marshmallow and its action on inflamed 3D skin model mimicking atopic dermatitis,” *Planta Medica*, 88(15), 80\_1474 .
  40. Pouyan S, Kafshdouzan K, J.A. (2021) “Synergistic Effect of *Cinnamomum camphora* and *Origanum vulgare* Essential Oils against bla CTX-M Producing *Escherichia coli* Isolated from Poultry Colibacillosis,” *Journal of Medical Bacteriology*, 10(1), 9\_20 .
  41. Qin X, Yang M, Cai H, Liu Y, Gorris L, Aslam MZ, Jia K, Sun T, Wang X, D.Q. (2022) “Antibiotic resistance of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant 1, 4,[5], 12: I: -in China: a



- C.J. (2023) "Why traditional herbal medicine promotes wound healing: research from immune response, wound microbiome to controlled delivery," *Adv Drug Deliv Rev*, 195(114764).
54. Zahedi B , Eghbal J, Zartoshti M, H.J.N. (2015) "Evaluation of the synergistic effect of phosphomycin and citrus aurantifolia's essential oil on methicilin resistant *Staphylococcus aureus* isolates," *Studies in Medical Sciences*, 26(4), 327\_333 .
- 55.
56. Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, E.S. (2014) "Antibacterial Effects of Plant Extracts of *Alcea Digitata* L., *Satureja Bachtiarica* L. and *Ferulago Angulata* L," *J Babol Univ Med Sci*, 16(1), 37\_31 .
57. Zhou Z, Pan C, Lu Y, Gao Y, Liu W, Yin P, Y.X. (2017) "Combination of erythromycin and curcumin alleviates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis in rats," *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 389\_379 .
49. Wibisono FM, Wibison FJ, Effendi MH, Plumeriastuti H, Hidayatullah AR, Hartadi EB, S.E. (2020) "A review of salmonellosis on poultry farms: Public health importance," *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 6\_481 .
50. Wu LJ, Luo Y, Shi GL, L.Z. (2021) "Prevalence, clinical characteristics and changes of antibiotic resistance in children with nontyphoidal *Salmonella* infections from 2009–2018 in Chongqing, China," *Infection and Drug Resistance*, 13, 13\_1403 .
51. Wu Y, Luo L, Wang Y, Chen X, Mo D, Xie L, S.A. (2023) "Strengthened public awareness of one health to prevent zoonosis spillover to humans," *Science of The Total Environment*, 879(163200).
52. Xiong L, Wang S, Dean JW, Oliff KN, Jobin C, Curtiss III R, Z.L. (2022) "Group 3 innate lymphoid cell pyroptosis represents a host defence mechanism against *Salmonella* infection," *Nature microbiology*, 7(7), 99\_1087 .
53. Xu Z, Dong M, Yin S, Dong J, Zhang M, Tian R, Min W, Zeng L, Qiao H,



## Stady of the effect of Tymasin Plus<sup>®</sup> herbal medicine on experimental oral infection of *Salmonella typhimurium* in broilers.

Zahra Davoodi<sup>1</sup>, Hamid Staji<sup>2\*</sup>, Sahar Ghaffari Khaligh<sup>3</sup>, Hesameddin Emadi Chashmi<sup>4</sup>

1. Master's student, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of New Technology, Semnan

University, Semnan, Iran.

2. Associate professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan

University, Semnan, Iran.

3. Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan

University, Semnan, Iran.

4. Assistant professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan

University, Semnan, Iran.

Received: 18 July 2023

Accepted: 9 November 2023

### Abstract

*Salmonella typhimurium* is one of the most important and pathogenic salmonellas that lead to infection in humans, livestock and poultry, and it causes a reduction in production and subsequent economic losses in the poultry industry. Using antibiotics to reduce side effects and kill bacteria in different doses leads to the development of resistance. In plants, the antimicrobial property is inherent in the constituent elements, so they do not accumulate in the body and do not cause the side effects of antibiotics, such as antibiotic resistance, allergic reactions, stomach problems, etc. The present study was conducted to investigate the antimicrobial effect of the herbal medicine Tymasin Plus<sup>®</sup> and the synergistic effect of this medicine with the antibiotic erythromycin on *Salmonella Typhimurium* infection in one-day-old chickens Ras 308. For this purpose, 40 one-day-old chickens of Ras 308 breed were used in four groups of ten. An amount of 2 ml of suspension containing 10<sup>6</sup> CFU of *Salmonella typhimurium* bacteria was experimentally induced to all chickens by gastric tube by layer gavage method. The experimental treatments included negative control (induction of infection but without therapeutic interventions), treatment with erythromycin antibiotic, treatment with Tymasin Plus<sup>®</sup> syrup (containing *Thymus Vulgaris* and *Althea Officinalis* extract), and treatment with the combination of erythromycin antibiotic and Tymasin Plus<sup>®</sup> syrup. The treatment started 24 hours after the induction of infection and continued until one day before sampling. On the fourth and twelfth days, after death, the liver and spleen tissues were separated for microbial investigations, including colony counting, Real-time PCR test, and tissue damage. The results of real-time PCR test and colony count confirmed that Tymasin Plus<sup>®</sup> syrup has an antimicrobial effect on *Salmonella Typhimurium* bacteria. In this study, the highest number of bacteria was specific to the control group and the lowest amount was related to the group treated with erythromycin and Tymasin Plus<sup>®</sup>; Also, in the study of histopathology results of liver and spleen tissue, a significant difference was observed between the control group and other groups. According to this research, it was found that the herbal medicine Tymasin Plus<sup>®</sup> has the same function as erythromycin and is effective in reducing the population of *Salmonella Typhimurium* bacteria synergistically with erythromycin. Considering the phenomenon of antibiotic resistance, it is better to use herbal medicines or a combination of herbal medicine and antibiotic instead of using chemicals.

**Keywords:** *Salmonella Typhimurium*, Tymasin Plus<sup>®</sup> Syrup, Real-time PCR, *Thymus vulgaris*, *Althea officinalis*.

\*Corresponding author: Hamid Staji

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

E. mail: hstaji@semnan.ac.ir

## بررسی فراوانی دیروفیلاریا ایمیتیس در گربه های مراجعه کننده به کلینیک های اصفهان به روش های مولکولی و نات

سید رضا حسینی<sup>۱\*</sup>، علی اصغر شیرازی<sup>۲</sup>

۱- دانشیار گروه آموزشی پاتوبیولوژی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

۲- دانش آموخته رشته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

### چکیده

بیماری کرم قلب (دیروفیلاریازیس) به وسیله دیروفیلاریا ایمیتیس ایجاد می شود که به طور اولیه سگ سانان و گربه ها را مبتلا می سازد و میزبان اصلی آن سگ، گربه، روباه و سگ سانان وحشی و انسان است. با توجه به اهمیت گربه به عنوان میزبان و انتقال احتمالی به انسان بررسی آن ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه از ورید و داج ۳۸۶ گربه مراجعه کننده به کلینیک های اصفهان خونگیری انجام گردید. بررسی نتایج این مطالعه نشان داد فراوانی دیروفیلاریا ایمیتیس در گربه های مراجعه کننده به کلینیک های اصفهان به روش نات و مولکولی در مطالعه به ترتیب برابر با ۱/۰۳ و ۳/۱۰ درصد بود که بیشتر نمونه های مثبت در گربه های بالای سه سال بودند. نرها سه برابر ماده ها مبتلا بودند همچنین در گربه هایی که درمان ضد انگلی منظمی دریافت نکرده بودند ۲ برابر میزان شیوع بیشتر بود، اما با توجه به میزان شیوع پایین این انگل تفاوت معنادار آماری در هیچ کدام از این پارامترها مشاهده نگردید. با توجه به اینکه تشخیص بالینی این بیماری دشوار است و علائم بالینی در گربه ها نسبت به سگ ها کمتر بروز میکند و از طرفی پروتکل های درمانی نسبتا سخت و لزوم دقت در درمان بیماری دیروفیلاریازیس همراه با سایر انگل های کرمی پیشگیری، کنترل و درمان مناسب برای این انگل بدلیل خطر آن برای سلامت عمومی ضروریست.

**واژه های کلیدی: بیماری کرم قلب، دیروفیلاریا ایمیتیس، گربه، اصفهان، روش نات، روش مولکولی**

\*نویسنده مسئول: سید رضا حسینی

آدرس: گروه دامپزشکی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

پست الکترونیکی: dr.s.reza@gmail.com

## مقدمه

بیماری کرم قلب (دیروفیلاریازیس) به وسیله دیروفیلاریا ایمی تیس ایجاد می شود که به طور اولیه سگ سانان و گربه ها را مبتلا می سازد و میزبان اصلی آن سگ، گربه، روباه و سگ سانان وحشی بوده و گاهی انسان ها نیز می تواند به صورت تصادفی به انگل مبتلا می شود. بیماری کرم قلب سگ و گربه یا دیروفیلاریازیس بیماری متازونوزی است که سیر تکاملی غیر مستقیم دارد و به وسیله گونه های به خصوصی از پشه ها شامل آندس، کولکس و آنوفلس منتقل می شود (Simón, 2012). مخزن آن غالباً سگ سانان بوده و بیماری انتشار جهانی دارد (Hou, 2011). سیر تکاملی انگل غیر مستقیم می باشد و جنس ماده این کرم، میکروفیلرهای خود را در جریان خون آزاد می کند و میکروفیلرها توسط گردش خون در سراسر بدن پخش می شوند. پشه ها با خونخواری از عروق سطحی بدن سگ های آلوده، میکروفیلرها را وارد بدن خود می کنند و در بدن پشه، میکروفیلرها با طی مراحل تکاملی تبدیل به لارو عفونی می شوند (Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L., 2016, Tarello, W. 2011) علائم بالینی در گربه ها نسبت به سگ ها کمتر بروز می کند و به صورت کلی بسیار متغیر است که از مرحله بدون علامت تا علائم خفیف مانند لاغری و کاهش وزن تدریجی، سرفه، کم تحرکی و خستگی زودرس ضمن فعالیت، شروع و به علائم شدید مانند دیس پنه، افزایش درجه حرارت، آسیب غشاءهای مخاطی (سیانوز)، کم خونی، عوارض قلبی و مرگ ختم را در بردارد. در ایران گزارش های مختلفی از این انگل در گربه از جمله جنبه های بالینی دیروفیلاریازیس، اولین گزارش بالینی بیماری، روش های مختلف تشخیص بیماری در سگ، انسان و

گربه علائم بالینی و درمان موجود می باشد (Litster, Noack. 2021, A.L. & Atwell, R.B. 2008). درمان در مبتلایان طولانی مدت و زمان بر است و ماه ها به طول می انجامد از طرفی پروتکل های درمانی پیچیده است و این بیماری کیفیت زندگی حیوانات را کاهش میدهد، در بسیاری از موارد با انجام اکوکاردیوگرافی قلبی به عنوان روش تشخیصی رایج تشخیص در حیوانات مبتلا تشخیص صورت نمیگیرد (Litster, A.L. & Atwell, R.B., 2008). Noack. 2021).

در سال های اخیر مطالعات گوناگونی در مورد این انگل در داخل و خارج از کشورمان صورت گرفته است و با عنایت به این که این مطالعات در کشور ما به صورت محدود انجام شده است و در مورد گربه در منطقه اصفهان مطالعه ای موجود نمی باشد و با توجه به اهمیت گربه ها به عنوان میزبان و انتقال احتمالی به انسان بررسی آن ضروری به نظر می رسد و همچنین بررسی اطلاعات حاصل از انجام این مطالعه مانند سن حیوانات آلوده، جنسیت، میزان سلامتی و نحوه نگه داری باعث خواهد شد که علاوه بر بررسی ارتباط موجود بین موارد ذکر شده و ابتلا به این کرم بتوان برخورد منطقی و صحیحی با این انگل و کاهش موارد ابتلا به آن داشت.

## مواد و روش ها

شهرستان اصفهان در بخش مرکزی کشور قرار دارد و از نظر جمعیت سومین کلانشهر پرجمعیت ایران است. این شهرستان از مراکز گردشگری، فرهنگی و اقتصادی کشور می باشد.

این مطالعه در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۹ با اخذ ۳ سی سی خون از وردی و داج ۳۸۶ گربه های مراجعه کننده به کلینیک های سطح شهر اصفهان (دارای صاحب و

حمایتی) انجام گردید. نمونه گیری به روش خوشه ای تصادفی ساده صورت پذیرفت و اطلاعات هر حیوان شامل سن، جنس، نژاد و وضعیت مالکیت در دفترچه مجزا یادداشت گردید و نمونه ها جهت انجام تست های رنگ آمیزی و مولکولی به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی آزاد اسلامی شهر کرد ارسال شد.

در آزمایشگاه ابتدا به روش نات حضور یا عدم حضور میکروفلیر بررسی گردید، روش نات مورد استفاده به شرح زیر می باشد:

ابتدا ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۲٪ به همراه ۱ میلی لیتر خون حاوی ماده ضد انعقاد مخلوط شده و با سرعت ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد پس از سانتریفوژ، مایع رویی دور ریخته شده و یک قطره رنگ نیومتیلن بلو به رسوب اضافه و مخلوط گردید و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ جهت حضور یا عدم حضور میکروفلیر بررسی گردید.

سپس نمونه ها مورد آزمایش مولکولی قرار گرفتند که شرح آن در ذیل بیان شده است:

مرحله اول: استخراج DNA از نمونه خون  
استخراج DNA از نمونه های جمع آوری شده با استفاده از DNA Extraction Kit (Cinagene, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت.

مرحله دوم: ارزیابی DNA استخراج شده  
بررسی حضور دیروفلاریا / ایمی تیس در DNA های استخراج شده به وسیله ی پرایمر طراحی شده توسط Casiraghi و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت پذیرفت که توالی پلیمری آن بدین صورت جدول شماره ۱ می باشد (Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E. and Genchi, C. 2006).

جدول ۱- توالی نوکلئیدی طراحی شده توسط Casiraghi و همکاران در سال ۲۰۰۶

### توالی نوکلئیدی

F GTTCCAGAATAATCGGCTA-3'-'۵  
ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3'R-'۵

مرحله سوم: واکنش نهایی PCR

واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، 1 میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTPS، 2 میلی مول MgCl2 و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس - لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه، در نهایت محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلوباز و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات مرتبط با هر گربه ابتدا به وسیله نرم افزار Excel 2010 جمع آوری و طبقه بندی شد و سپس با نرم افزار SPSS با شماره ویرایش ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. ابتدا فراوانی آلودگی در گروه های مختلف محاسبه شد، سپس با استفاده از آزمون مربع کای مقایسه آماری بین فراوانی آلودگی در گروه های مختلف سنی، جنسی، نژادی و فعالیت

حمایتی و بدون سرپرست سابقه ی در دسترس نبود اما در کیس های دارای صاحب ۴ مورد (۴ مورد در روش مولکولی و ۲ مورد در روش نات) به صورت منظم از قرص های ضدانگل استفاده کرده بودند و ۸ مورد (۸ مورد در روش مولکولی و ۲ مورد در روش نات) داروی ضدانگل دریافت نکرده بودند یا به صورت منظم درمان ضد انگلی در آن ها انجام نشده بود، نتایج حاصله نشان دهنده ی حساسیت بالای و ویژگی مناسب تست PCR نسبت به روش رنگ آمیزی و لزوم استفاده از این روش در مطالعات آتی را نشان می دهد.

بدنی و نوع نگهداری انجام پذیرفت و نتایج حاصل از روش مولکولی با نتایج حاصل از روش رنگ آمیزی مقایسه گردید.

### نتایج

در این مطالعه از ۳۸۶ نمونه از گربه مجموعاً ۱۲ نمونه در روش مولکولی و ۴ نمونه در روش نات مثبت بودند که ۴ مورد در هر دو تست مثبت بودند، که ۸ مورد صاحبدار (۸ مورد در روش مولکولی و ۲ مورد در نات) و ۴ مورد بی صاحب بودند (۴ مورد در روش مولکولی و ۲ مورد نات)، ۹ نر مورد (۹ مورد مولکولی و ۲ مورد نات) و ماده ۳ مورد (۳ مورد مولکولی و ۱ مورد نات)، در رده سنی بالای ۵ سال ۸ مورد (۸ مورد مولکولی و ۴ مورد نات) و در رده سنی ۳-۵ سال ۴ مورد (هر ۴ مورد در روش مولکولی) همچنین در رده سنی زیر یکسال و ۱-۳ سال هیچ مورد مثبتی وجود نداشت، در مورد مصرف و عدم مصرف داروهای ضدانگل در اکثر گربه های

### جدول (۱) - بررسی میزان فراوانی دیروویلا/ایمیتیس با روش نات و مولکولی در گربه های نر و ماده

بررسی با روش نات و مولکولی در گربه	تعداد نمونه	موارد مثبت در روش نات (درصد آلودگی)	موارد مثبت در روش مولکولی (درصد آلودگی)
ماده	۱۹۰	۱۰ (۵۲٪)	۳ (۱۷٪)
نر	۱۹۶	۳ (۱۵٪)	۹ (۴۵٪)
مجموع	۳۸۶	۴ (۱۰٪)	۱۲ (۳۱٪)

### جدول (۲) - بررسی میزان فراوانی دیروویلا/ایمیتیس با روش نات و مولکولی در گربه ها در رده های سنی مختلف

بررسی با روش نات و مولکولی در گربه	تعداد نمونه	موارد مثبت	درصد آلودگی
زیر ۱ سال	۴۵	۰	۰
۱-۳ سال	۷۸	۰	۰
۳-۵ سال	۱۱۵	۰	۰ (۴۷٪)
بالای ۵ سال	۱۴۸	۴ (۲۷٪)	۸ (۴۰٪)
مجموع	۳۸۶	۴ (۱۰٪)	۱۲ (۳۱٪)

جدول (۳) - بررسی میزان فراوانی *دیروزیلاریا ایمیتیس* با روش نات و مولکولی در گربه های دارای سرپرست و فاقد سرپرست

بررسی با روش نات و مولکولی در گربه	تعداد نمونه	موارد مثبت در روش نات (درصد آلودگی)	موارد مثبت در روش مولکولی (درصد آلودگی)
دارای سرپرست	۲۰۱	۲ (۱٪)	۵ (۲٪/۴۸)
فاقد سرپرست	۱۸۵	۲ (۱٪/۰۸)	۷ (۳٪/۷۸)
مجموع	۳۸۶	۴ (۱٪/۰۳)	۱۲ (۳٪/۱۰)

جدول (۴) - بررسی میزان فراوانی *دیروزیلاریا ایمیتیس* با روش نات و مولکولی در گربه های دارای سابقه منظم مصرف داروی

ضد انگل و فاقد سابقه منظم مصرف داروی ضد انگل

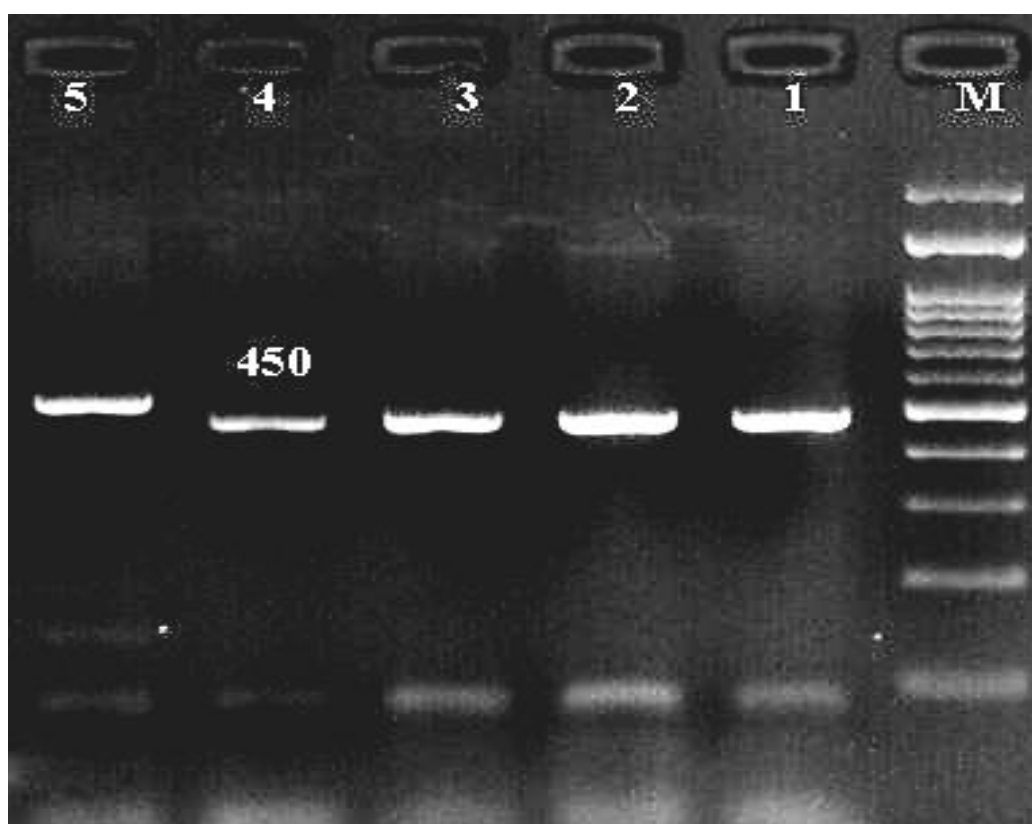
بررسی با روش نات و مولکولی در گربه	تعداد نمونه	موارد مثبت در روش نات (درصد آلودگی)	موارد مثبت در روش مولکولی (درصد آلودگی)
دارای سابقه منظم مصرف داروی ضد انگل	۲۰۶	۲ (۰٪/۹۷)	۴ (۲٪/۰۴)
فاقد سابقه منظم مصرف داروی ضد انگل	۱۸۰	۲ (۱٪/۱۱)	۸ (۴٪/۲۱)
مجموع	۳۸۶	۴ (۱٪/۰۳)	۱۲ (۳٪/۱۰)



بررسی فراوانی دیروفیلاریا ایمیتیس در گربه های مراجعه کننده به کلینیک های... (حسینی و همکاران)..... ۳۱.



تصویر ۱- تصویر دیروفیلاریا ایمیتیس اخذ شده از نمونه اصلی رنگ آمیزی شده در روش نات با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر



**تصویر ۲- باند bp ۴۵۰ مربوط به نمونه مثبت دیروفیلاریا ایمیتیس در روش مولکولی - ستون M مارکر اکیلو بازی DNA - ستون های ۱-۴ نمونه های مورد مطالعه واجد قطعه ۴۵۰ جفت بازی - ستون ۵ NC نمونه کنترل منفی**

**بحث و نتیجه گیری**

دیروفیلاریازیس یا کرم قلب یک بیماری جهان شمول است که از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. وضعیت اپیدمیولوژیک بیماری به سرعت در حال تغییر است. سرعت رشد و تغییرات به قدری زیاد است که حتی با اقدامات کنترلی و پیشگیرانه، میزان بروز آلودگی در مناطق اندمیک رو به افزایش است و در برخی نقاط که تا کنون گزارشی مبنی بر آلودگی وجود نداشت، انگل گزارش شده است. از دیگر سو مطالعات حاکی از مشترک بودن بیماری بین انسان و حیوانات می باشد و بر اساس گزارشات منتشر شده در ده سال گذشته موارد انسانی در اروپا و خاورمیانه مشاهده شده است، افزون بر این تعداد موارد گزارش شده مبنی بر آلودگی انسانی و همچنین آلودگی گربه ها در مناطق اندمیک و مناطق مجاور آن روندی صعودی داشته است (Salahi- Noack, 2021; Moghadam, A., Moobedi, A. & Bani Hashemi, S.J. 2000).

عوامل مختلفی مسبب افزایش و تغییر در گسترش دیروفیلاریازیس هستند. یکی از این عوامل انتشار بیماری به مناطقی است که سابق بر این عاری از آلودگی بوده اند، این امر ممکن است به دلیل تغییرات آب و هوایی در مناطق جغرافیایی باشد که باعث شده پشه های میزبان واسط بتوانند در مناطق جغرافیایی جدید استقرار و گسترش یابند. نکته مهم دیگر نقش حیوانات وحشی می باشد، این حیوانات می توانند به عنوان مخزن انگل برای سگ و گربه های دارای سرپرست و فاقد سرپرست محسوب شوند و به گسترش این بیماری کمک کنند. دلیل اثبات این ادعا نیز گزارش های مربوط به آلودگی شغال، روباه و گرگ

در مناطق مختلف ایران به انگل دیروفیلاریا ایمیتیس می باشد. این حیوانات می توانند منبع همیشگی آلودگی برای انسان، سگ و گربه ها باشند (Noack, 2021, Ranjbar, B.S. & ESLAMI, A. 2007).

بر اساس گزارشات توافق نسبی میان روش های سرولوژی و آزمایشات وجود دارد اما باید خاطر نشان کرد که روش نات در شناسایی انگل دیروفیلاریا ایمیتیس از اهمیت بالینی کمتری برخوردار است. پایین بودن ارزش تشخیصی این روش به دو دلیل عمده می باشد دلیل اول مربوط به وجود میکروفیلر های غیربیماریزا دیروفیلاریا رینس است که تفریق آن از میکروفیلر دیروفیلاریا ایمیتیس در زیر میکروسکوپ بسیار مشکل است و دلیل دوم امکان وجود آلودگی با یک جنس و یا عدم وجود میکروفیلر است. هر چند روش های سرولوژی به دلیل وجود آمدن پاسخ سیستم ایمنی در برابر کرم و وجود آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های انگل از کارایی مناسب تری برخوردار است ولی روش مولکولی نسبت به روش های سرولوژیک کارایی بیشتری داشته و ارزش آن در تشخیص بیماری نسبت به سایر روش ها بیشتر است (Khedri, 2014).

علازغم وجود تفاوت ها در میزان ابتلا در جنس، رده های سنی و درمان ضد انگلی منظم هیچ تفاوت معنادار آماری در این مطالعه مشاهده نگردید که میزان شیوع پایین این انگل عدم تفاوت معنادار آماری را توجیه می نماید، در مطالعاتی مانند: لو و همکاران در تایوان، کرامر در ایتالیا و ویرا در پرتغال هیچ ارتباط معناداری بین سن، جنس و محل نگهداری حیوان خانگی با میزان شیوع مشاهده نکردند (Kramer, L. &

مطالعه دیاکو و همکاران در یونان ۱۸۰ حیوان بدون سرپرست (۱۴۸ سگ و ۳۲ گربه) را مورد ارزیابی با سه روش نات، سروولوژی و اکوکاردیوگرافی قرار دادند، در این مطالعه نیز مانند مطالعه ما خطر بالای آلودگی در گربه ها و نیز بر ضرورت انجام اقدامات پیشگیرانه جدی برای کنترل آلودگی در گربه تاکید داشتند (Diakou. 2019). بالاتر بودن میزان ابتلا در حیوانات بدون سرپرست می تواند به این دلیل باشد که گربه های خانگی در محیط سر بسته و همراه با انسان ها زندگی می کنند و کمتر در معرض گزش پشه هستند، اما گربه های بدون سرپرست به دلیل زندگی در محیط بیرون و جابجایی های متعدد برای پیدا کردن غذا یا جفت و نیز عادت زباله گردی که احتمال گزش توسط پشه را افزایش می دهد، بیشتر به این انگل الوده می شوند. به نظر می رسد علاوه بر عوامل مرتبط با آب و هوا و میزبان های واسطه میزان شیوع در گربه ها به علت شرایط ژنتیکی این میزبان باشد.

خانگی و دارای سرپرست دارد، باید از تست های آزمایشگاهی و تحت بالینی در گربه ها استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

از تمامی عزیزان و همکارانی که در تهیه نمونه ها از شهرستان اصفهان و نیز انجام تست نات و مولکولی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد با ما همکاری داشتند کمال تقدیر و تشکر را به عمل می آوریم.

Lu, T.L., Wong, J.Y., Genchi, C. 2002  
Traversa, Tan, T.L. & Hung, Y.W. 2017  
(D. 2010). اما در برخی گزارشات اعلام شده که رابطه معنی داری میان سن و میزان آلودگی وجود دارد در مطالعه حاضر همه موارد مثبت گربه ها سه سال بودند، به نظر می رسد که با افزایش سن امکان گزش توسط پشه آلوده و آلوده شدن حیوانات افزایش می یابد و در سنین بالا به دلیل عدم کارایی سیستم ایمنی، احتمال آلوده شدن افزایش می یابد (Anvari, D., Saadati, D., Siyadatpanah, A. & Gholami, S., 2019). در این مطالعه میزان شیوع انگل در گربه های نر سه برابر ماده ها بود که در دوناتی تراورسا و همکاران نیز این نسبت مشاهده گردیده بود و به نظر می رسد نر بودن شانس ابتلا به دیروفیلاریازیس را در گربه افزایش می دهد (۵۱).  
۵ گربه های بدون سرپرست نسبت به گربه های خانگی میزان شیوع دو برابر بود، در مطالعه دوناتی تراورسا و همکاران نیز حیواناتی که در فضای باز زندگی میکردند، آلودگی بیشتری داشتند که با مطالعه ما همخوانی دارد (Anvari. 2019). در

### نتیجه گیری نهایی

بررسی میزان فراوانی این انگل در گربه ها در اغلب مطالعات داخلی مورد بررسی قرار نگرفته بود که با توجه به میزان شیوع ۳/۱۰ درصدی در گربه های استان اصفهان و ملاحظات بهداشت عمومی این انگل به نظر می رسد که در مطالعات آتی پژوهشگران باید به آن توجه ویژه ای کنند. از طرفی شانس تشخیص بالینی این انگل پایین است از طرفی این شانس با توجه به فعالیت بدنی پایین تر در گربه ها پایین تر از سگ هاست، لذا با توجه به میزان شیوع بالایی این انگل در بین گربه های

- heartworm infection in Taiwan. *Parasites & vectors*, 10(2), pp.7-15.
8. Noack, S., Harrington, J., Carithers, D.S., Kaminsky, R. and Selzer, P.M., 2021. Heartworm disease—Overview, intervention, and industry perspective. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 16, pp.65-89.
  9. Ranjbar, B.S. and ESLAMI, A., 2007. Prevalence of blood *Filaria* in dogs in Golestan Province (North of Iran) using Modified Knott Method and determination of its periodicity.
  10. Salahi-Moghadam, A., Moobedi, A. and Bani Hashemi, S.J., 2000. Case report of *Dirofilaria* in Hydrocoel of a child with 5 years old age. In 3<sup>rd</sup> National Congress of Parasitology, sari, Iran. Mazandaran medical sciences university Publication.
  11. Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. and Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical microbiology reviews*, 25(3), pp.507-544.
  12. Tarello, W., 2011. Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets: a review of 100 canine and 31 feline cases (1990–2010) and a report of a new clinic case imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*, 2011.
  13. Taylor, M.A., Coop, R.L. and Wall, R.L., 2016. *Veterinary Parasitology*, 4<sup>th</sup> Edition.
  14. Traversa, D., Aste, G., Milillo, P., Capelli, G., Pampurini, F., Tunesi, C., Santori, D., Paoletti, B. and Boari, A., 2010. Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. *Veterinary parasitology*, 169(1-2), pp.128-132.
- منابع
1. Anvari, D., Saadati, D., Siyadatpanah, A. and Gholami, S., 2019. Prevalence of dirofilariasis in shepherd and stray dogs in Iranshahr, southeast of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 43, pp.319-323.
  2. Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E. and Genchi, C., 2006. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology*, 141(3-4), pp.368-372.
  3. Diakou, A., Soubasis, N., Chochlios, T., Oikonomidis, I.L., Tseleki, D., Koutinas, C., Karaiosif, R., Psaralexi, E., Tsouloufi, T.K., Brellou, G. and Kritsepi-Konstantinou, M., 2019. Canine and feline dirofilariosis in a highly enzootic area: first report of feline dirofilariosis in Greece. *Parasitology research*, 118, pp.677-682.
  4. Hou, H., Shen, G., Wu, W., Gong, P., Liu, Q., You, J., Cai, Y., Li, J. and Zhang, X., 2011. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Dandong, China. *Veterinary parasitology*, 183(1-2), pp.189-193.
  5. Khedri, J., Radfar, M.H., Borji, H., Azizzadeh, M. and Akhtardanesh, B., 2014. Canine heartworm in southeastern of Iran with review of disease distribution. *Iranian journal of parasitology*, 9(4), p.560.
  6. Kramer, L. and Genchi, C., 2002. Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary parasitology*, 104(1), pp.43-50. Litster, A.L. and Atwell, R.B., 2008. Feline heartworm disease: a clinical review. *Journal of feline medicine and surgery*, 10(2), pp.137-144.
  7. Lu, T.L., Wong, J.Y., Tan, T.L. and Hung, Y.W., 2017. Prevalence and epidemiology of canine and feline

## **Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats referred to Isfahan clinics by molecular and Knott methods**

**Seyed Reza Hosseini<sup>1\*</sup>, Ali Asghar Shirazi<sup>2</sup>**

1. Associate professor of Department of Pathobiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Faculty of Veterinary Medicine, karaj branch, Islamic Azad University, karaj, Iran.

Accepted: 12 October 2023

Received: 9 April 2022

---

### **Abstract**

Heartworm disease (*Dirofilariasis*) is caused by *Dirofilaria immitis*, which primarily affects canines and cats, and its main hosts are dogs, cats, foxes, and wild dogs and humans. Due to the importance of cats as hosts and possible transmission to humans, it was necessary to study it. In this study, blood samples were taken from 386 cats referred to Isfahan clinics.

The results of this study showed that the frequency of *Dirofilaria immitis* in cats referred to Isfahan clinics by Knott and molecular methods in the study was 1.03 and 3.10%, respectively, which were mostly positive samples in cats over three years old. Males were three times more likely to be infected than females. It was also twice as common in cats that did not receive regular antiparasitic treatment. However, due to the low prevalence of this parasite, no statistically significant difference was observed in any of these parameters. Due to the fact that the clinical diagnosis of the disease is difficult and the clinical symptoms in cats are less frequent than in dogs, and on the other hand relatively strict treatment protocols and the need for careful treatment of *dirofilariasis* along with other worm parasites, prevention, control and appropriate treatment for this parasite is necessary because of its risk to public health.

**Keywords:** Heartworm disease, *Dirofilaria immitis*, cat, Isfahan, Knott method, molecular method.

**Keywords:** Heartworm disease, *Dirofilaria immitis*, cat, Isfahan, Knott method, molecular method

---

\* Corresponding author: Seyed Reza Hoseini

Address: Department of veterinary, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: dr.s.reza@gmail.com

## گزارش اولین جداسازی و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به روش مولکولی از ماهیان خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی در

### استان فارس، ایران

رضا سلیقه زاده<sup>۱\*</sup>، امین غلامحسینی<sup>۲</sup>، حسن شریفی یزدی<sup>۳</sup>، محمدرضا خیراندیش<sup>۴</sup>، وحید دیانت پور<sup>۵</sup>، نرگس ساکی<sup>۶</sup>، سمیرا رشیدی منفرد<sup>۶</sup>

۱- استادیار، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴- دانش آموخته گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۵- دانش آموخته گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۶- دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

### چکیده

طی تابستان سال ۱۴۰۱، یک عفونت در تاس ماهیان سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی در سیستم های ریس وی استان فارس ظاهر گردید. ۳۰ قطعه ماهی که دارای علائم بالینی بودند از استخرها جمع آوری شد. نمونه های باکتریایی به روش استاندارد از بافت کلیه ماهیان و در محیط برین هارت آگار کشت شدند. رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیولوژیکی و بیوشیمیایی روی باکتری های جداسازی شده از نمونه ها انجام شد؛ علاوه بر این واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) روی ژن ۱۶SrDNA انجام شد. جداسازی اولیه کلونی های کشت باکتریایی و آزمایشات بیولوژیکی و بیوشیمیایی بر روی باکتری های جداسازی شده نشان داد که ایزوله های جداسازی شده با جنس استافیلوکوک مطابقت دارند. نتایج آزمون PCR روی ژن ۱۶SrDNA با پرایمری های اختصاصی با شماره دسترسی MK ۳۴۸۰۶۳ در بانک ژن یک باند ۱۵۰۰ جفت باز (bp) را ایجاد نمود؛ نتایج آنالیزها نشان داد که توالی ایجاد شده با ۱۰۰ درصد تشابه متعلق به گونه ی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می باشد. این اولین گزارش از جداسازی گونه ی استافیلوکوکوس اورئوس از ماهیان خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی در جنوب غربی ایران است. از این مطالعه نتیجه گیری شد که انجام تحقیقات بیشتر روی بیماریزایی این گونه ی باکتریایی و اثرات آن بر ماهیان خاویاری سیبری و سایر گونه های ماهیان خاویاری ضروری است.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، تاس ماهی سیبری، استافیلوکوکوس، ماهیان خاویاری، ایران

\*نویسنده مسئول: رضا سلیقه زاده

آدرس: گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

پست الکترونیکی: rezasalighehzadeh@yahoo.com

## مقدمه

تاس ماهیان از جمله ماهیان غضروفی استخوانی بسیار قدیمی بوده که تحت عنوان فسیل زنده نیز نامیده می شوند (Williot et al., 2018). امروزه به دلایل مختلفی همچون صید بی رویه، آلودگی، کاهش زیستگاه و احداث سدها، جمعیت این ماهیان در حال کاهش می باشد (Williot et al., 2018). ماهیان خانواده Acipenseridae دارای ارزش اقتصادی بسیاری بوده که از آن جمله می توان به تولید خاویار گران قیمت اشاره نمود. به همین دلیل از نقطه نظر آبرزی پروری، پرورش جمعیت تمام ماده این ماهیان بسیار سودآورتر از جمعیت مخلوط می باشد (Williot et al., 2018). در این میان یکی از گونه های این خانواده، تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) بوده که گونه بومی رودخانه های بزرگ سیبری و دریاچه های اروپا و به عنوان گونه پرورشی مطرح در اروپاست که از آن برای تولید گوشت و استحصال خاویار استفاده می شود (Williot et al., 2018). علیرغم وارداتی بودن این ماهی، می توان به مزیت هایی همچون سازگاری راحت با شرایط پرورشی، مقاوم بودن به تغییرات محیطی، سرعت رشد بالا، سن بلوغ کم و خاویاردهی سریع اشاره نمود و یکی از گونه هایی است که در آیندهای نزدیک مناطق معتدله توسعه خواهد یافت (Mirzakhani et al., 2020). با توجه به موفقیت های بدست آمده به منظور سازگاری و پرورش این ماهی در آب شیرین و رسیدن به توجیه اقتصادی عرضه ماهی خاویاری گوشتی به بازارهای داخلی و خارجی کشور موجبات توجه بخش خصوصی به پرورش این گونه ارزشمند فراهم شده است (Mirzakhani et al., 2020). از سوی دیگر، پرورش این گونه با ارزش در آب های شیرین به صورت متراکم، عدم کنترل دقیق

عوامل فیزیکی و شیمیایی آب و غذای مصرفی و نیز عدم استقرار امنیت زیستی از منظر بهداشتی، زمینه بروز استرس و بیماری در ماهیان بوجود آمده است (Gholizadeh Zare Tavana et al., 2018). باکتری های گرم مثبت عامل برخی از عوامل عفونی ماهیان هستند که برخی از آنها مانند گونه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اورئوس، وارنری و هومینیس توسط محققان مختلفی در ماهی (Huang, 1999; Gil et al., 2000; Kubilay, A. Ulukoy, 2004; Abraham et al., 2010; Atyah, 2010; Ali, 2014; Bujjamma and Padmavathi, 2015; Korun et al., 2019) گزارش شده اند. استافیلوکوکوزیس توسط گونه های استافیلوکوکوس ایجاد می شود. باکتری استافیلوکوکوس جزو پاتوژن های فرصت طلب بوده و عامل اصلی انواع زیادی از بیماری ها در انسان و حیوانات هستند (Pridgeon, J.W., Klesius, 2011; Mlynarczyk-Bonikowska et al., 2022). سه گونه ی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس وارنری به عنوان عامل ایجاد استافیلوکوکوزیس در ماهیان شناخته شده اند. بیماری چشمی با گونه ی استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط بود و کشنده بودن این بیماری برای کپور نقره ای در مزرعه ای در هند تایید شد (Gil et al., 2000) که در نتیجه ی این بیماری قرنیه کدر شده و نور از آن عبور نمی کند و به دنبال آن بافت های چشم تحلیل رفته و اعصاب مغز و چشم نیز تغییر می یابد؛ ماهی های مبتلا بی حال و راکد شده و رنگ آن ها تیره تر از دیگر ماهیان بود؛ با این وجود به نظر می رسد که اندام های حیاتی تحت تاثیر عفونت قرار ننگرفته اند. احتمالاً آب حوضچه پرورشی مخزن بیماری باشد. بیماری هایی که در زیر به آن ها اشاره شده است شیوع اپی زوتیک جدی در مزارع پرورش ماهی داشته اند که در



محدود به فلور باکتریایی آن‌ها بوده است و گزارش‌های محدودی از بروز تلفات و بیماری در این ماهیان گزارش شده است (Babaalian Amiri et al., 2019).  
 Babaalian Amiri و همکاران باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را از ماهیان خاویاری گونه‌ی سبیری پرورشی در ایران گزارش کردند و علائم بیحالی، کاهش اشتها، عدم تحرک و شنای وارونه، خونریزی و پرخونی در اندامهای داخلی، خونریزی پتشی و پرخونی در کبد، طحال و آبشش‌ها را مشاهده کردند (Babaalian Amiri et al., 2019). با توجه به اهمیت گونه‌ی تاس ماهی سبیری و به دلیل کاهش شدید ذخایر طبیعی این ماهی، شناخت علل تلفات این ماهیان به منظور اجرای راهکار مناسب جهت مقابله با عوامل احتمالی بروز تلفات ضروری به نظر می‌رسد لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تلفات تاس ماهیان سبیری پرورشی در یک سیستم پرورشی استان فارس، انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

در تیر ماه سال ۱۴۰۱ به دنبال بروز تلفات در ماهیان خاویاری گونه‌ی سبیری در یک سیستم پرورشی ماهیان خاویاری واقع در استان فارس، پس از بازدید از مزرعه و اخذ فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تعداد ۳۰ نمونه ماهی زنده (با میانگین وزنی ۱۸,۱۵±۲۳۵ گرم) با علائم بالینی از قبیل بی‌حالی، بی‌اشتهایی، عدم تحرک و شنای وارونه (شکل ۱) به طور تصادفی انتخاب شده و به بخش آبیاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند. مشاهدات بالینی و مشاهدات حاصل از کالبدشکافی برای هر نمونه به صورت جداگانه ثبت شد. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل اکسیژن محلول و pH به صورت

اینجا به جدیدترین موارد اشاره شده است که عبارتند از: ماهی سیم سرطایی در ترکیه (Kubilay and Ulukoy, 2004)، سیم دریایی و باس دریایی در مزارع مختلف یونان (Varvarigos, 2001)، ماهی سوف دریایی، کپور علفخوار و تیلپا در تایوان (Kubilay and Ulukoy, 2004)، ماهی قرمز و دم زرد در ژاپن (Gil et al., 2000).

یافته‌های حاصل از مطالعات اکولوژیکی به فرضیه‌ی این مطالعه اعتبار می‌بخشد زیرا اینگونه مطالعات اکولوژیکی وجود گونه‌ی *S.epidermis* در محیط‌های آبی را تایید می‌نمایند (Kubilay and Ulukoy, 2004). ماهی ممکن است در تمام طول سال باکتری استافیلوکوک را بدون بروز علائم بیماری همراه داشته باشد و عموماً بیماری به دنبال افزایش سریع و غیر منتظره‌ی دمای آب و یا وجود سایر عوامل استرس‌زا اتفاق می‌افتد. این پدیده معمولاً در فصل بهار اتفاق افتاده و در تمام طول تابستان منجر به ایجاد مشکلاتی می‌گردد (Varvarigos, 2001; Kubilay and Ulukoy, 2004). مطالعه‌ی فرایر و روهووک (Kubilay and Ulukoy, 2004) نیز تایید کرد که باکتری استافیلوکوک منجر به ایجاد بیماری می‌گردد؛ همچنین این بیماری زمانی رخ می‌دهد که ماهی در معرض برخی عوامل استرس‌زای محیطی قرار می‌گیرند. عفونت‌های استافیلوکوک در ماهی علائم مشترکی دارند که عبارتند از: اگر و فتالمی، ایجاد زخم در ناحیه‌ی دم و احتقان (Gil et al., 2000). همچنین عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک منجر به اختلالات سیستمیک می‌شود که کل بدن را تحت تاثیر قرار داده که به صورت سپتی سمی نمایان می‌گردد (Varvarigos, 2001). مطالعات صورت گرفته در مورد عوامل بیماری‌زای ماهیان خاویاری در ایران، بیشتر

کنند (Abdelsalamet al., 2023). هر مخلوط واکنش PCR (مجموع ۵۰ میکرولیتر) شامل ۴ میکرولیتر از DNA نمونه (۴۰ نانوگرم)، دو میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ pmol)، ۲۵ میکرولیتر از مخلوط  $\times 2$  Master Mix (PCR mixture) (Ampliqon, Denmark) و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه ی حرارتی دستگاه ترموسایکلر (MJ mini, BioRad, آمریکا) به شرح زیر بود: واسرشت سازی اولیه ی دو رشته ی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۷ سیکل حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله ی گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. در پایان ۵ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید و باندهای حاصله پس از رنگ آمیزی با (RedSafe Intron Biotechnology، کره جنوبی) توسط دستگاه در مقایسه با یک نردبان با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (K-Plus DNA Ladder، هند) قرائت گردید. تعیین توالی محصولات PCR از S DNA ۱۶r برای هر ده جدایه به صورت مستقیم انجام شد. برای تعیین توالی محصولات PCR از یک آنالایزر DNA ۳۷۳۰ استفاده شد (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). توالی های قابل دسترس قبلی در NCBI (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی)، که از طریق BLAST در دسترس قرار گرفته بودند، برای مقایسه عمیق تر توالی های پیوسته مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل تراز چند دنباله ای با استفاده از

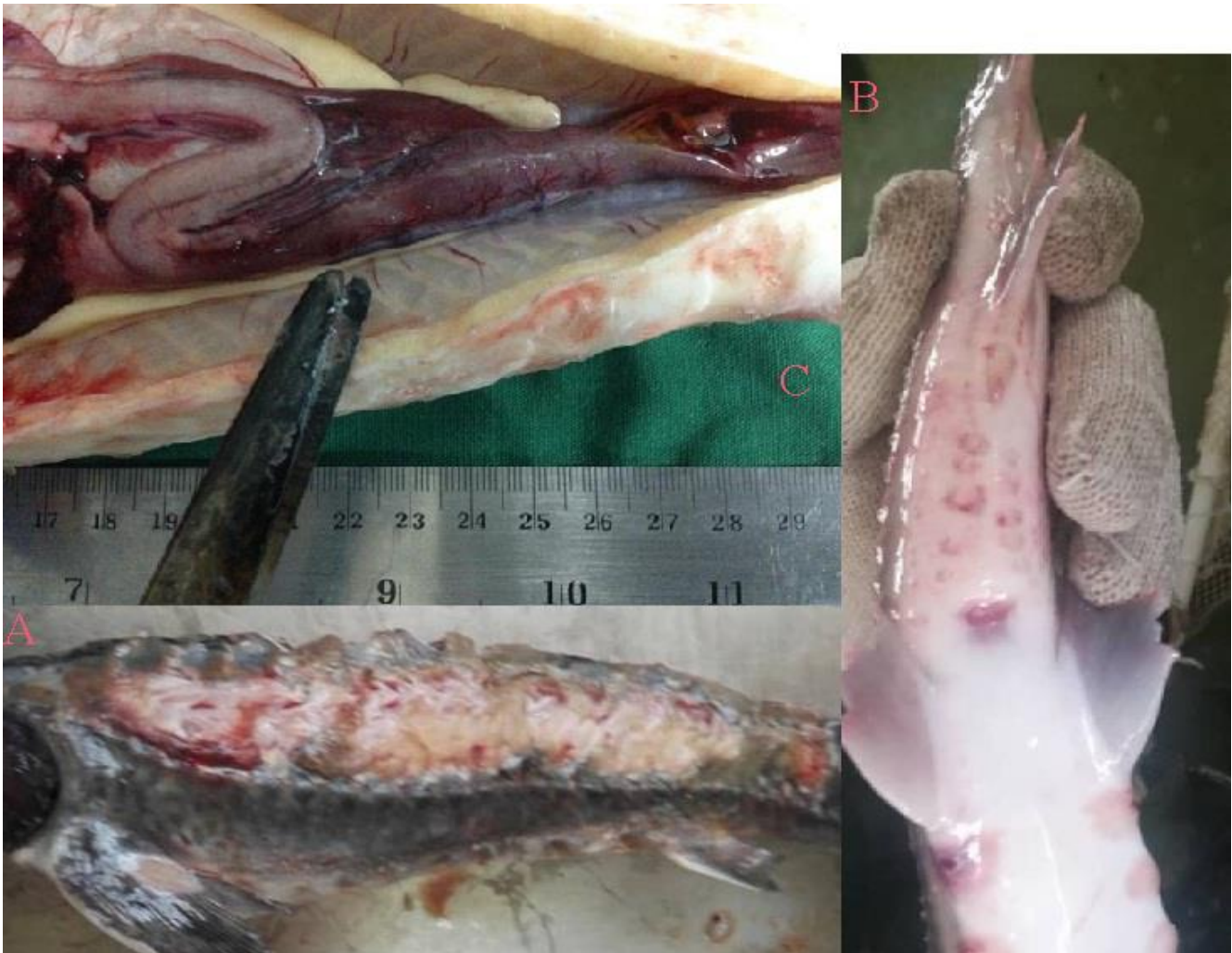
روزانه اندازه گیری گردید. این شاخص ها با استفاده از روش های استاندارد اندازه گیری شدند. میزان اکسیژن محلول به روش وینکلر اندازه گیری شد. میزان اسیدیته ی آب، به کمک pH متر پرتابل با الکترو د حساس (مدل ۳۲۰-WTW ساخت کشور آمریکا) اندازه گیری شد. سطح نیتريت، نترات و آمونیاک نیز به وسیله ی دستگاه دیجیتالی HACH (ساخت کشور آمریکا) به صورت هفتگی اندازه گیری شد (Assefa and Abunna, 2018; Lkr et al., 2020).

### نمونه برداری بافتی و کشت میکروبی

نمونه های کلیه استحصال شده از ماهی ها به صورت رگه ای در محیط کشت عصاره ی قلب و مغز آگار (BHIA) کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پرگنه های رشد یافته خالص سازی شده و رنگ آمیزی گردید و به منظور شناسایی باکتری ها در حد جنس از آزمایش های باکتری شناسی رایج توصیه شده استفاده شد (Jansson et al., 2020). آزمایشات بیوشیمیایی صورت گرفته در جدول ۲ نشان داده شد.

### استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیک

DNA باکتری هایی که با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی با جنس استافیلوکوک مطابقت داشتند، استخراج گردید؛ به منظور استخراج DNA ژنومی جدایه های باکتری از روش جوشاندن استفاده شد (Abdelsalamet al., 2023). به منظور تشخیص قطعی جدایه ها از تکثیر ژن DNA ۱۶Sr از پرایمرهای اختصاصی  $5'$  (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و  $3'$  (ACGGCTACCTTGTACGACTT) استفاده شد که محصول نهایی به طول ۱۵۰۰ جفت باز تولید می



از نظر بالینی ماهیان مبتلا دارای علائمی از جمله: بی اشتها، شنای غیر طبیعی، زخم و خونریزی پتشی در سطح بدن و یا قاعده‌ای باله‌ها بودند؛ همچنین در کالبدگشایی این ماهیان خونریزی احشایی، مایع آسیتی در حفره شکمی و کیسه‌ی شنا مشاهده گردید (شکل ۱).

برنامه ۶MEGA از طریق الگوریتم‌های FASTA انجام شد.

### نتایج مشاهدات بالینی

شکل ۱: علائم بالینی تاس ماهیان سبیری بیمار

### آزمایشات میکروب شناسی و بیوشیمیایی

پس از بررسی محیط‌های کشت، پرگنه‌های صاف و مدور به رنگ سفید مشاهده شد که تحت آزمایش‌های میکروب شناسی و بیوشیمیایی قرار گرفتند (جدول ۲).

### کیفیت آب

بر اساس نتایج حاصله، متغیرهای فیزیکی و شیمیایی آب مزارع پرورشی همگی در محدوده‌ی استاندارد بوده و تاثیری بر شیوع بیماری نداشت (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در واحد پرورش آب شیرین ماهیان خاویاری گونه ی سبیری

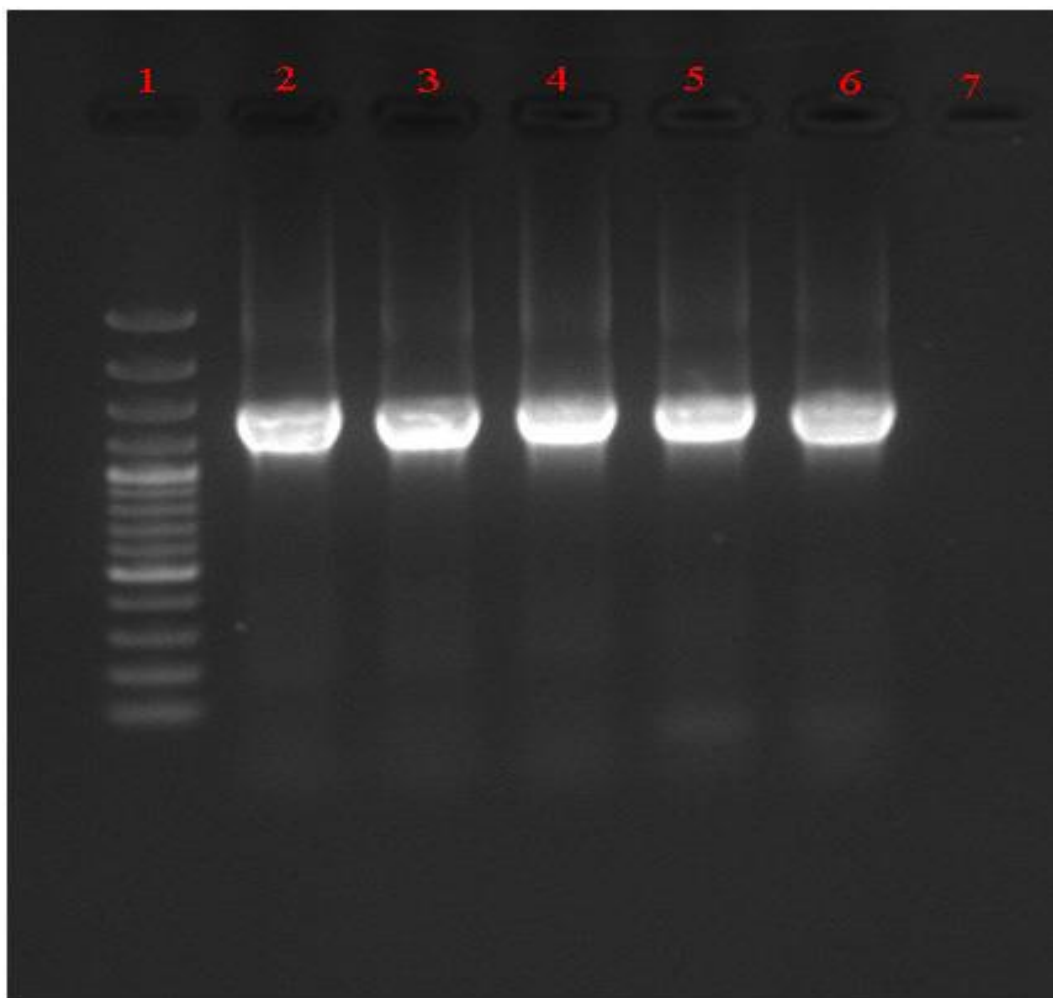
نتایج	شاخص
۱۷	دما (درجه سانتی گراد)
۷/۲	اکسیژن محلول (میلی گرم /لیتر)
۰	سولفید هیدروژن (میلی گرم /لیتر)
۷/۹	pH
۰/۳	آهن کل (میلی گرم /لیتر)
۰/۴	آمونیاک
۰/۰۰۵	نیتريت (میلی گرم /لیتر)
۱/۳	نیترات (میلی گرم /لیتر)

جدول ۲: نتایج مطالعات باکتری شناسی جدایه های گرم مثبت حاصله از ماهیان بیمار تاس ماهی سبیری

نتایج برای جدایه های حاصله	شاخص
سفید	رنگ کلونی
کروی	شکل
+	رنگ آمیزی گرم
-	تحرك
-	اکسیداز
+	کاتالاز
-	اندول
+	متیل رد
+	واکنش وگس-پروکسور
F	O/F
+	کاهش نیترات
-	تولید H <sub>2</sub> S
-	آرژنین دهیدرولاز
-	اورنیتین دکربوکسیلاز
+	اوره
(+)	تولید اسید از گلوکز
-	مانیتول
-	اینوزیتول
-	سوربیتول
+	ساکارز
-	سوربیتول
بتا	همولیز
-	سیمون سیترات

ژن را نشان داد. نتیجه ی توالی یابی ژن rDNA ۱۶S حاصله در جدایه های حاصل از این مطالعه به عنوان سویه ی ایرانی با شماره دسترسی MK ۳۴۸۰۶۳ در بانک ژن ثبت گردید.

**نتایج و اکنش زنجیره ای پلیمرز و توالی یابی**  
پس از انجام واکنش PCR ژن rDNA ۱۶S روی جدایه ها، تمامی جدایه ها با قطعه ی مورد انتظار ۱۵۰۰ جفت باز (bp)، با باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مطابقت داشتند (شکل ۲). توالی ژن rDNA ۱۶S این سویه ها شباهت ۱۰۰ درصدی با توالی های ثبت شده برای گونه ی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در بانک



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٫۵ درصد. (۱) نردبان ژنی ۱۰۰ جفت باز، (۲-۶) جدایه-های استافیلوکوکوس، (۷) کنترل منفی

## بحث و نتیجه گیری

استافیلو کوس اپیدرمیدیس مهم ترین عضو گروه استافیلو کوک های کوآگولاز منفی و عامل ۷۵٪ از عفونت های این گروه می باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکرو فلور طبیعی پوست انسان بوده و در مخاط بینی و بخش فوقانی مجاری تنفسی مستقر می باشد (Najar Peerayeh et al., 2016). استافیلو کوس اپیدرمیدیس تا مدت ها به خاطر طبیعت همه جایی و بیماریزایی نسبتا ضعیف به عنوان ساپروفیت معرفی می شد و در افرادی که سیستم ایمنی آنها ضعیف یا سرکوب شده بود قادر به ایجاد عفونت بود (Mathur et al., 2006; Halverson et al., 2013; Goudarzi et al., 2018). عامل بیماری زایی مهم در استافیلو کوس اپیدرمیدیس به واسطه تشکیل بیوفیلم توسط یک آدهسین بین سلولی پلی ساکاریدی می باشد (Eftekhar and Mirmohamadi, 2009; Brown and Horswill, 2020).

اولین گزارش مرتبط با وقوع بیماری استافیلو کوزیس در سال ۱۹۸۶ در یکی از مزارع پرورش ماهی کپور نقره ای کشور هند با عوارض چشمی مشاهده شد و عامل تلفات به باکتری استافیلو کوس اورئوس نسبت داده شد (Gil et al., 2000). در سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۹۱ گونه های استافیلو کوس اپیدرمیدیس، استافیلو کوس کوهنی، استافیلو کوس وارنری و استافیلو کوس کروموجنز را محققان ایرانی از ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان پرورشی مازنداران جدا کردند (Babaalian Amiri et al., 2019). Amiri و همکاران باکتری استافیلو کوس اورئوس را از ماهیان خاویاری گونه ی سیبری پرورشی در ایران گزارش کردند (Babaalian Amiri et al., 2019).

علائم بالینی بیماری استافیلو کوزیس با توجه به گونه ماهی متفاوت است، اما شنای عمودی، تیره شدن رنگ بدن، آگزوفتالمی یک طرفه یا دو طرفه، کدورت قرنيه چشم، خونریزی پتشی روی سرپوش آبششی و قاعده باله ها، پیدایش زخم های سطحی، آسیت هموراژیک، ضایعات چشمی و آبششی از جمله متداول ترین علائم بالینی در بسیاری از گونه ها می باشد (Jansson et al., 2020)، که با علائم بالینی مشاهده شده در این مطالعه همخوانی دارد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ماهیان خاویاری سیبری با بیماری استافیلو کوزیس درگیر بودند، زیرا عامل مذکور از بافت کلیه ماهیان بیمار با علائم بالینی جداسازی گردید و با روش های کشت باکتریایی، آزمایش های بیوشیمیایی و مولکولی مورد تشخیص قرار گرفت. در مطالعات قبلی صورت گرفته، وجود بیماری های گوناگون از قبیل استرپتوکوزیس، یرسینیوزیس، آثروموناس و سودوموناس در گونه های مختلف ماهیان خاویاری گزارش شده است (Babaalian Amiri et al., 2019). ولی مورد جدا شده اخیر به عنوان یک مورد نادر ولی قابل توجه دست اندرکاران صنعت آبی پروری کشور می باشد که رعایت نکات بهداشتی، امنیت زیستی، پیشگیری از شرایط استرس زا، نمونه گیری های دوره ای از مزارع و تشخیص بموقع بیماری های درگیر را گوشزد می نماید. مواردی از قبیل عدم انجام آزمایش های میکروبی آب و غذای مصرفی در مزارع، بی توجهی کارگران به اصول بهداشتی شخصی و فردی، استفاده از ظروف مشترک غذاهای، عدم استفاده از ضد عفونی کننده موثر در ورودی سالن ها و ماشین های حمل ماهی، تردد نابجای افراد متفرقه و حیوانات از جمله عوامل ورود عوامل بیماری زا می باشند



- international. *Veterinary Medicine International* **2018**:5432497.
5. Atyah, M.A.S. Zamri-Saad, M. Siti-Zahrah, A. (2010). First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary microbiology* **144**:502-504.
  6. Babaalian Amiri, B. Adel, M. Zorriehzakra, J. Ghajari, A. Shohre, P. Rasoolizadeh, H. Zabihi, L. (2019). The first isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) cultured in Iran. *Iranian Scientific Fisheries Journal* **28**:121-131. (In Persian)
  7. Brown, M.M. Horswill, A.R. (2020). *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe?. *PLoS pathogens* **16**:p.e1009026.
  8. Bujjamma, P. Padmavathi, P. (2015). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in fish samples of local domestic fish market. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**:427-433.
  9. Eftekhari, F. Mirmohamadi, Z. (2009). Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **1**:438-441.
  10. Gil, P. Vivas, J. Gallardo, C.S. Rodriguez, L.A. (2000). First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. *Journal of Fish Diseases* **23**:295-298.
  11. Gholizadeh Zare Tavana, B. Banaee, M. Yousefi Jourdehi, A. Nematdoost Haghi, B. Seyed Hassani, M.H. (2018). Effects of selenium (Sel-Plex) supplement on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **17**:300-312.
- (Babaalian Amiri et al., 2019). با توجه به اینکه ۱۰-۲۵ درصد افراد، حامل باکتری های استافیلوکوکوس در مجاری فوقانی تنفسی خود می باشند، به منظور حفظ و کنترل آلودگی های میکروبی، کاهش عفونت ها و کاهش مشکلات بهداشتی کلیه پرسنل ملزم به رعایت موارد بهداشتی و امنیت زیستی گردند (Babaalian Amiri et al., 2019).
- نتیجه گیری
- به عنوان نتیجه گیری نهایی شایان ذکر است که یافته های مطالعه ی حاضر از این جهت حائز اهمیت است که این اولین گزارش باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از ماهیان خاویاری سیبری پرورشی در جنوب غرب ایران تا سال ۱۴۰۱ می باشد.

#### منابع

1. Abdelsalam, M. Elgendy, M.Y. Elfadadny, M.R. Ali, S.S. Sherif, A.H. Abolghait, S.K. (2023). A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases. *Aquaculture International* **31**:417-434.
2. Abraham, A. Sergelidis, D. Kirkoudis, I. Anagnostou, V. Kaitsa-Tsiopoulou, E. Kazila, P. Papa, A. (2010). Isolation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in freshwater fish and Greek marketplaces. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **19**:93-102.
3. Ali, H.H. (2014). Isolation and identification of *Staphylococcus* bacteria from fish of fresh water and its antibiotics sensitivity in Mosul city. *Basrah Journal of Veterinary Research* **1**:33-42.
4. Assefa, A. Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine*

- Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**:25-26.
20. Mirzakhani, M.K. Abedian Kenari, A. Motamedzadegan, A. Banavreh, A. (2020). Apparent digestibility coefficients of crude protein, amino acids, crude lipid, dry matter and gross energy of ten feedstuffs for yearling Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **19**:1500-1516.
  21. Mlynarczyk-Bonikowska, B. Kowalewski, C. Krolak-Ulinska, A. Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences* **23**:8088.
  22. Najar Peerayeh, S.h. Jazayeri, M. Behmanesh, M. (2016). Prevalence of virulence related determinants in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Jundishapur Journal of Microbiology* **9**:e30593.
  23. Pridgeon, J.W. Klesius, P.H. (2011). Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Diseases of Aquatic Organisms* **94**:249-253.
  24. Varvarigos, P. (2001). Gram-positive coccobacteria (Micrococcaceae, streptococcaceae) causing systemic disease in intensively farmed fish. *Vetcare Veterinary Services to Aquaculture and Distribution of Fish Health Products*.
  25. Williot, P. Nonnotte, G. Chebanov, M. (2018). The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 2-Farming. Springer International Publishing.
  12. Goudarzi, M. Mehrabi, M. Mirzaee, M. (2018). Investigating the Prevalence of IS256 Insertion Sequence and Biofilm Formation in *Staphylococcus Epidermidis* Isolated from Healthy Human Skin. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* **26**:85-93. (In Persian)
  13. Halverson, S. Malani, P. Newton, D.W. Habicht, A. Younger, G. (2013). Impact of hourly emergency department patient volume on blood culture contamination and diagnostic yield. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:1721-1726.
  14. Huang, S.L. Chen, W.C. Shei, M.C. Liao, I.C. Chen, S.N. (1999). Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Taiwan. *Zoological Studies* **38**:178-188.
  15. Jansson, E. Haenen, O. Nonnemann, B. Madsen, L. Van Gelderen, E. Aspán, A. Dalsgaard, I. (2020). MALDI-TOF MS: A diagnostic tool for identification of bacterial fish pathogens. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **40**:240-248.
  16. Lkr, A. Singh, M.R. Puro, N. (2020). Assessment of water quality status of Doyang river, Nagaland, India, using water quality index. *Applied water science* **10**:1-13.
  17. Korun, J. Yilmaz, M. Gökoğlu, M. Çelik, Y. (2019). Isolation of *Staphylococcus hominis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Antalya Bay, Turkey. *Journal of Agricultural Sciences* **25**:123-128.
  18. Kubilay, A. Ulukoy, G. (2004). First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **24**:137-143.
  19. Mathur, T. Singhal, S. Khan, S. Upadhyay, D.J. Rattan, A. (2006).

**Report of the first isolation and identification of Staphylococcus epidermidis by molecular method from cultured Siberian Sturgeon (Acipenser baerii) in Fars province**

Reza Salighehzadeh<sup>1\*</sup>, Amin Gholamhosseini<sup>2</sup>, Hassan Sharifiyazdi<sup>3</sup>, Mohammadreza Kheirandish<sup>4</sup>, Vahid Dianatpur<sup>5</sup>, Narges Saki<sup>6</sup>, Samira Rashidi Monfared<sup>4</sup>

1. Assistant Professor, Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

2. Associate professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

3. Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

4. PhD Graduated of Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

5. PhD Graduated of Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

6. Graduate of Veterinary medicine, Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

Received: 21 June 2023

Accepted: 6 September 2023

---

**Abstract**

During the summer of 2022, an infection appeared in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) reared in raceway system of Fars province. 30 pieces of fish with clinical symptoms were collected from the ponds. Bacterial samples were cultured from kidney tissue of fish using brain heart infusion (BHI) agar according to standard method. Gram staining, biological and biochemical tests were performed on the bacteria isolated from the samples; In addition, polymerase chain reaction (PCR) was performed on SrDNA16 gene. Initial isolation of bacterial culture colonies and biological and biochemical tests on the isolated bacteria showed that the isolates corresponded to the genus *Staphylococcus*. The results of the PCR test on the SrDNA16 gene with specific primers with accession number MK348063 in the gene bank created a band of 1500 base pairs (bp). The results of the analysis showed that the sequences belonged to *Staphylococcus epidermidis* with 100.00% similarity. This is the first report of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* species from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) farmed in southwest Iran. It was concluded from this study that further studies are necessary to investigate the pathogenicity of these organisms and their effects on Siberian sturgeon and other strains of sturgeon.

**Keywords:** : *Staphylococcus epidermidis*, *Acipenser baerii*, *Staphylococcosis*, *Sturgeon*, *Iran*

---

\*Corresponding author: Reza Salighehzadeh

Address: Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

E. mail: rezasalighehzadeh@yahoo.com

## الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشیشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی در اصفهان

شایان ارباب زاده<sup>۱</sup>، مجید غلامی آهنگران<sup>۲\*</sup>، آسیه احمدی دستگردی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۴

### چکیده

بیماری کلی باسیلوز با عامل اشیشیاکلی یکی از بیماری های شایع عفونی در پرندگان است. فلوروکینولون ها و سولفونامیدها به طور عمده در درمان بیماری های عفونی و از جمله کلی باسیلوز در طیور و پرندگان زینتی استفاده می شوند و از نظر بهداشت عمومی نیز واجد اهمیت هستند. به منظور ارزیابی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن های اصلی دخیل در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی علیه سولفونامیدها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها، ۵۰ سویه اشیشیاکلی جدا شده از کبد و قلب پرندگان زینتی جمع آوری شد. پرگنه های جدا شده با تست های تکمیلی میکروبی و بیوشیمیایی تایید و خالص سازی شد. کلنی های خالص بر روی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شد و با آنتی بیوتیک های تجاری دیسک گذاری شد. در مرحله بعد، از باکتری های خالص شده DNA استخراج شد و با پرایمر های اختصاصی به تکثیر ژن های *SulI* و *qnrA*، *Aac(3)-IV* پرداخته شد. نتایج نشان داد ۸۰ درصد باکتری های جدا شده به حداقل ۲ آنتی بیوتیک مقاوم هستند و ۱۲ درصد سویه ها به ۱۳ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاوم هستند. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین و انروفلوکساسین و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و لینکوسامپکین مشاهده شد. بررسی ژن های مقاومت نشان داد که حدود ۷۱ درصد سویه های مقاوم علیه انروفلوکساسین واجد ژن *qnrA* و ۶۴ درصد سویه های مقاوم علیه سولفونامیدها بعلاوه تری متوپریم حاوی ژن *SulI* بودند. همچنین، ۳۳ درصد سویه های مقاوم علیه جنتامایسین حامل ژن *Aac(3)-IV* بودند. در این بررسی سویه های مقاوم فاقد ژن های مقاومت نیز یافت شد که نشان از اهمیت سایر ژن های مقاومت در بروز مقاومت علیه سولفونامیدها و فلوروکینولون ها است. لذا با توجه به درصد بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشیشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی در تست های معمول آنتی بیوگرام و با روش مولکولی، می توان نتیجه گیری کرد که عدم موفقیت درمان بیماری های عفونی در این پرندگان ممکن است به دلیل وجود مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده و احتمال انتشار ژن های مقاومت باشد.

### واژه های کلیدی: اشیشیاکلی، پرندگان زینتی، ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی

\* نویسنده مسئول: مجید غلامی آهنگران

آدرس: دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیکی: [mgholami6@gmail.com](mailto:mgholami6@gmail.com)

## مقدمه

جنس اشرشیا، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان جزئی از فلور طبیعی در روده بزرگ انسان و حیوانات وجود دارد. اشرشیا کلی، یک باسیل گرم منفی تاژک دار و متحرک است که بعضی از سویه های آن کپسول دارند (Nolan et al., 2020). این باکتری به عنوان عضو مهم فلور طبیعی روده، در طول عمر حضور دارد. این باکتری علاوه بر مشکلات گوارشی، می تواند به صورت فرصت طلب در خارج از دستگاه گوارش سبب بیماری هایی مانند بیماری های دستگاه ادراری گردند و به عنوان یک باکتری فرصت طلب سبب عفونت های زخم، پنومونی، مننژیت و سپتی سمی در انسان شوند. در بررسی میکروبی، حضور اشرشیا کلی شاخص قابل اطمینان از آلودگی مدفوعی آب است و خطر ابتلا به بیماری های منتقله از طریق آب را نشان میدهد (Shahiri et al., 2018).

کلی باسیلوز یکی از مهم ترین بیماری های ماکیان است که توسط سویه های مختلف اشرشیا کلی ایجاد می شود. این بیماری در پرندگان عمدتاً با وجود ضایعات پری کاردیت، پری هپاتیت، پری تونیت و سپتی سمی مشخص می شود. تلفات، دارو درمانی، کاهش رشد و ضریب تبدیل غذایی و نیز افزایش استعداد به سایر بیماری های عفونی از دیگر مشخصه های این بیماری است (Kashif et al., 2013; Nolan et al., 2020). آنتی بیوتیک ها به طور وسیع برای درمان و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در بیماری کلی باسیلوز، در پرندگان استفاده می شوند. علاوه بر آن، آنتی بیوتیک ها به عنوان محرک رشد و پیشگیری از بیماری های عفونی استفاده می شوند. مصرف گسترده و بعضاً طولانی مدت با عدم رعایت دوزهای موثر می تواند باعث مقاومت پیش رونده علیه آنتی بیوتیک ها

شود. مبنای ژنتیکی بروز مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص است و بیشتر بین یک گونه یا بین انواع مختلف باکتری ها توسط اجزای ژنتیکی پلاسمید، اینتگرون و ترانسپوزون قابل انتقال است (Miles et al., 2006). پلاسمیدها اجزای خارج کروموزومی هستند که می توانند به طور مستقل تکثیر کنند. ترانسپوزون ها توالی کوتاهی از مولکول DNA موجود در پلاسمید هستند که از طریق ترانسپوزیشن به سایر پلاسمیدها و یا کروموزوم ها منتقل می شوند (Suarez-Perez et al., 2021). فاکتورهای انتقال مقاومت می توانند مسئول مقاومت نسبت به یک یا چند آنتی بیوتیک باشند. به طور کلی برای انتقال افقی مواد ژنتیکی و پلاسمیدها از یک باکتری به باکتری دیگر و ایجاد مقاومت روش های مختلفی مانند القا یا جابه جایی، الحاق، تغییر شکل و تغییر محل وجود دارد که در نهایت می تواند باعث تولید یک آنزیم خاص، تغییر در نفوذ پذیری میکروارگانیسم نسبت به دارو، انتقال فعال دارو به خارج، تغییر در گیرنده های دارویی و تغییر مسیر متابولیکی در باکتری مقاوم و تغییر در آنزیم هدف شود (Jacoby et al., 2015; Gholami-Ahangran & Zia-Jahromi, 2014).

مقاومت به آنتی بیوتیک ها به خصوص مقاومت چند دارویی و پتانسیل دریافت فاکتورهای مقاومت توسط باکتری های انسانی یک نگرانی بهداشتی در تمام کشورها است. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های متنوع در طول دوره پرورش پرندگان زینتی به منظور کنترل بیماری های عفونی زمینه را برای بروز مقاومت میکروبی چندگانه فراهم کرده است (Gholami-Ahangran & Zia-Jahromi, 2014). از طرفی انتقال پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت ممکن است حامل چند ژن مقاومت باشد یا اینکه یک ژن، پروتئین های

مقاومت در برابر سولفونامیدها توسط ۳ ژن کنترل می شود. ژن *Sul1* قسمتی از اینتگرون کلاس یک هست که شایع ترین اینتگرون جدا شده از آنتروباکتریاسه ها هست به همین علت *Sul1* بارزترین نقش را در ایجاد مقاومت نسبت به سولفونامیدها دارد (Horri & Gholami-Ahangaran, 2022). مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها نیز با ژن های مختلفی مانند *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* و *qnrV* و چندین نوع دیگر ایجاد می شود. ژن های مقاوم نسبت به کینولون ها در جدایه های مختلف آنتروباکتریاسه در سراسر جهان یافت شده اند که بیشترین آن در اشریشیاکلی عنوان شده است (Horn et al., 2017). پروتئین خالص شده *qnr* به دو آنزیم *DNA* ژیراز و توپوایزومراز ۴ به منظور ممانعت از عمل آنتی بیوتیک های کینولون باند شده و از آن ها محافظت می کند و باعث ایجاد مقاومت می شود (Tran et al., 2005).

هدف از این پژوهش بررسی و تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی تلف شده در اصفهان است.

### مواد و روش ها

#### جمع آوری نمونه

در این پژوهش مقطعی طی مدت یک سال، از فروردین ۱۴۰۰ تا فروردین ۱۴۰۱ از بین مجموع سویه های اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی تلف شده و ارجاع شده به آزمایشگاه ها و کلینیک های خصوصی دامپزشکی، ۵۰ سویه به طور تصادفی انتخاب شد. سویه های انتخاب شده از سطح قلب و کبد با علایم پرخونی، پری هپاتیت و پری کاردیت جدا سازی شده بودند. پرندگان زینتی نمونه گیری شده از خانواده طوطی سانان شامل مرغ عشق، کاسکو، طوطی سبز، عروس

مختلفی را کد کند که عملکرد چند گانه داشته باشند و به طور همزمان باکتری، تحمل بالایی را نسبت به چند آنتی بیوتیک نشان دهد. به عنوان مثال ممکن است ژن های مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در پلاسمیدهای حاوی چند ژن مقاومتی یافت می شوند. این ژن ها شامل بتالاکتامازهای وسیع الطیف، آنزیم های *ampc* و کارباپنم ها می باشد (Omidvar Panah et al., 2018). همچنین ژن کد کننده واریته ای از آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز به نام *acc(6)-Ib-cr* دارای عملکرد دو گانه است و علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در ایجاد مقاومت علیه فلوروکینولون ها نیز اثر دارد (Omidvar Panah et al., 2018). این ژن درون کاست های ژنی مرتبط با انتگرون های واقع در پلاسمیدهای دارای مقاومت چند گانه یافت می شود که انتقال این ژن ها به محصولات غذایی انسان می تواند باعث بروز مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده علیه آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در درمان بیماری های عفونی انسان مانند فلوروکینولون ها شود. قبلا نشان داده شده که مقاومت های چند گانه در اشریشیاکلی امکان پذیر است و گزارش های متفاوتی در اشریشیاکلی جدا شده از موارد بیماری پرندگان و گوشت طیور از ایران و سراسر جهان وجود دارد (Costa et al., 2009; Jafari et al., 2015) که نشان دهنده فراگیر بودن این خطر جدی است.

مقاومت باکتری نسبت به سولفامیدها معمولا توسط ژن های *Sul1*، *Sul2* و *Sul3* ایجاد می شود که در باکتری های گرم منفی مانند اشریشیاکلی در انسان و حیوان وجود دارد. این ژن ها از طریق ترانسپوزون و پلاسمید های بزرگ قابل انتقال هستند (Mojaver Rostami et al., 2018). در خانواده آنتروباکتریاسه



هلندی، و طوطی کوتوله برزیلی و از خانواده گنجشک سانان شامل قناری و فنچ بودند.

شناسایی اشریشیا کلی

به منظور شناسایی باکتری اشریشیا کلی در نمونه مورد نظر با سواب یا انس استریل در کنار شعله با تلقیح بر روی نمونه مورد نظر، بر روی محیط کشت مک کانکی بصورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در صورت رویت شدن پرگنه های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ)، با رنگ آمیزی گرم، باسیل های گرم منفی تایید شد. از پرگنه های مشکوک بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (Eosin methylene blue) بصورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی کردند به صورت اولیه به عنوان باکتری اشریشیا کلی شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه ها تستهای افتراقی IMVIC انجام شد. پرگنه هایی که از لحاظ تست های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی باشند به عنوان اشریشیا کلی شناسایی می شوند (Gholami-Ahangaran and Zia-Jahromi, 2014).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری جدا شده نسبت به داروهای آنتی بیوتیک های رایج، از روش انتشار دیسکی ساده به روش استاندارد کربی بوئر استفاده شد (Hudzicki, 2009). معمولاً این روش بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری بر روی محیط کشت جامد استوار است.

در این آزمون از محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) و دیسک های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب، ایران) استفاده شد که شامل: انروفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، سولفونامید + تری متوپریم، فلورفنیکل (۳۰ میکرو گرم)، جنتامایسین (۱۰ میکرو گرم)، اکسی تتراسیکلین (۳۰ میکرو گرم)، لینکوسپکتین (۱۵/۲۰۰ میکرو گرم)، داکسی سیکلین (۳۰ میکرو گرم)، دیفلوکساسین (۱۰ میکرو گرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکرو گرم)، نئومایسین (۳۰ میکرو گرم)، کلستین (۱۰ میکرو گرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکرو گرم)، آموکسی سیلین (۲۵ میکرو گرم) است.

برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری را بر روی محیط مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی TSB منتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای تهیه کدورت نیم مک فارلند انکوبه شدند.

پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند روی محیط مولر هیتون آگار کشت خطی داده شد. پس از گذشت تقریباً ۱۰ دقیقه، دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولر هیتون تلقیح شده قرار داده شد و پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک اندازه گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی قرائت شد (CLSI).

**شناسایی ژن های مقاومت علیه آنتی بیوتیک ها**

## استخراج DNA

در این بررسی استخراج DNA از جدایه های مورد نظر به روش جوشاندن طبق دستورالعمل زیر انجام شد (۱). ۵۰۰ میکرولیتر PBS را در داخل میکروتیوب یک و نیم میلی لیتری ریخته و سپس چند لوپ از کشت جامد (محیط لوریا برتانی ۲۴ ساعته) جدایه های مورد نظر به میکروتیوب اضافه و سوسپانسیون یکنواختی از آن تهیه گردید.

میکروتیوبهای حاوی سوسپانسیون در سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و بعد از این مرحله مایع رویی دور ریخته شد. مراحل یک و دو تکرار گردید.

به میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس ادتا (-Tris; EDTA) اضافه شد و سپس سوسپانسیون یکنواخت گردید.

میکروتیوب حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد.

بعد از عمل لیز باکتری به وسیله جوشاندن، میکروتیوب در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از میکروتیوب برداشته و به میکروتیوب جدید منتقل و سپس این میکروتیوب در یخچال ۲۰- درجه سانتیگراد برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری گردید.

## مراحل انجام PCR

به منظور شناسایی وضعیت مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیکهای دسته فلوروکینولونها، سولفونامیدها و

جتتامایسین، ژن های مربوط به مقاومت نسبت به کینولون ها (qnr)، سولفونامیدها (Su1) و جتتامایسین (Aac-3-IV) در نمونه های مورد بررسی مورد تکثیر قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر X10، 5/1 میلی مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مول dNTP، 100 نانوگرم DNA الگو، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq Polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده سازی شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر اپندورف آلمان انجام شد.

برنامه دمایی واکنش PCR به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، و ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه، همسرشت سازی در دمای ۵۰ برای تکثیر ژن (qnrA)، ۴۷ (برای تکثیر ژن Su1) و ۵۵ (برای تکثیر ژن Aac(3)-IV) درجه سانتی گراد برای ۹۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه به همراه گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصول PCR رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (۰/۳ گرم آگارز در ۲۵ میلی لیتر بافر ۱ X TBE حل شد) الکتروفورز شد و با UV doc مشاهده و ثبت شد.

جدول شماره ۱- اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی

منبع	اندازه محصول	توالی (۵' به ۳')	ژن مقاومت	آنتی بیوتیک
Horn et al., 2015	۶۷۰	F:GGGTATGGATATTATTGATAAAG R:CTAATCCGGCAGCACTATTTA	<i>qnrA</i>	کینولون ها
Van et al., 2008	۸۲۲	F:TTCGGCATTCTGAATCTCAC R:ATGATCTAACCTCGGTCTC	<i>SulI</i>	سولفونامیدها ۱
	۲۸۶	F:CTTCAGGATGGCAAGTTGGT R:TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	<i>Aac(3)-IV</i>	جتتامایسین

### مقاومت آنتی بیوتیکی

پس از انجام آنتی بیوگرام، سویه های مورد نظر کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به جنتامایسین (۶ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۷۸ درصد) نشان دادند. در این بررسی ۸۰ درصد سویه ها حداقل به دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۱۲ درصد سویه ها به تمامی ۱۳ آنتی بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی بیوگرام، مقاومت نشان دادند. نتایج آنتی بیوگرام در جدول ۲ آمده است.

### بحث و نتیجه گیری

شناسایی اشریشیاکلی

سویه های مورد بررسی از جهت خصوصیات میکروسکوپی، کشت بر روی محیط مک کانکی و EMB مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تایید، تست های بیوشیمیایی IMVIC در مورد آنها انجام شد. تمامی ۵۰ سویه مورد بررسی به صورت باسیل گرم منفی، با ایجاد رنگ ارغوانی بر روی محیط کشت مک کانکی و ایجاد جلای سبز فلزی بر روی EMB تایید اولیه شدند و تست IMVIC را به صورت ایندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیرتات منفی نشان دادند.

جدول ۲- فراوانی (درصد) مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از تلفات پرندگان زینتی در اصفهان

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
انروفلوکساسین	۳۸ (۷۶)*	۷ (۱۴)	۵ (۱۰)
سولفونامید + تری متوپریم	۲۸ (۵۶)	۷ (۱۴)	۱۵ (۳۰)
فلورفینیکل	۲۷ (۵۴)	۴ (۸)	۱۹ (۳۸)
تتراسایکلین	۳۹ (۷۸)	۶ (۱۲)	۵ (۱۰)
آمپی سیلین	۲۷ (۵۴)	۳ (۶)	۱۰ (۲۰)
جتتامایسین	۳ (۶)	۱ (۲)	۴۶ (۹۲)
نئومایسین	۳۰ (۶۰)	۱۰ (۲۰)	۱۰ (۲۰)
لینکوسپکتین	۱۹ (۳۸)	۶ (۱۲)	۲۵ (۵۰)
اکسی تتراسایکلین	۳۷ (۷۴)	۳ (۶)	۱۰ (۲۰)
کلرامفنیکل	۲۲ (۴۴)	۸ (۱۶)	۲۰ (۴۰)
کلستین	۲۷ (۵۴)	۱۲ (۲۴)	۱۱ (۲۲)
دیفلوکساسین	۲۳ (۴۶)	۷ (۱۴)	۲۰ (۴۰)
داکسی سیکلین	۲۰ (۴۰)	۵ (۱۰)	۲۵ (۵۰)

### ردیابی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی

در الکتروفورز محصول PCR قطعات ژنومی ۸۲۲ (شکل ۱)، ۶۷۰ (شکل ۲) و ۲۸۶ (شکل ۳) جفت بازی مربوط به ژن های *Sul1*، *qnrA* و *Act(3)-IV* تکثیر شد.

الکتروفورز محصول PCR نشان می دهد از مجموع ۵۰ سویه اشریشیاکلی مورد بررسی، ۳۶ درصد سویه ها (۱۸ سویه) حاوی ژن *Sul1*، ۵۴ درصد سویه ها (۲۷ سویه) حاوی ژن *qnrA* و ۲ درصد سویه ها (یک سویه) حامل ژن *Act(3)-IV* بودند (جدول ۳). در این بررسی ۶۴/۲۸ درصد سویه های مقاوم به سولفونامید بعلاوه تری متوپریم (۱۸ سویه از ۲۸ سویه) حامل ژن *Sul1* و

۷۱ درصد سویه های مقاوم به انروفلوکساسین (۲۷ سویه از ۳۸ سویه) حامل *qnrA* و ۳۳ درصد سویه های مقاوم به جنتامایسین (یک سویه از سه سویه) حامل *Act(3)-IV* بودند. ۱۰ سویه از ۲۸ سویه اشریشیاکلی مقاوم به سولفونامیدها (۳۵/۷۱ درصد) حامل ژن *Sul1* و ۱۰ سویه از ۳۸ سویه مقاوم به انروفلوکساسین (۲۶/۳۱ درصد) حامل ژن *qnrA* نبودند. همچنین ۲ سویه از ۳ سویه اشریشیاکلی مقاوم به جنتامایسین حامل ژن *Act(3)-IV* نبودند.

جدول ۳- ارزیابی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی

دسته آنتی بیوتیکی	فنوتیپ / ژنوتیپ	فراوانی (درصد)
فلوروکینولون	فنوتیپ (انروفلوکساسین)	۳۸ (۷۶)
	ژنوتیپ ( <i>qnrA</i> )	۲۷ (۵۴)
سولفونامید	فنوتیپ (سولفونامید)	۲۸ (۵۶)
	ژنوتیپ ( <i>Sul1</i> )	۱۸ (۳۶)
آمینوگلیکوزید	فنوتیپ (جنتامایسین)	۳ (۶)
	ژنوتیپ ( <i>Act(3)-IV</i> )	۱ (۲)

## بحث

نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد تلفات پرندگان زینتی در اصفهان نشان می‌دهد که درصد بالایی از جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌های معمول و رایج در درمان بیماری‌های عفونی پرندگان و بعضاً دسته آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در کنترل بیماری‌های عفونی انسان مقاومت نشان می‌دهند. مقاومت بالای ۷۰ درصدی در تراسایکلین و انروفلوکساسین و نیز مقاومت بالای ۵۰ درصدی در برابر سولفونامید به همراه تری متوپریم نشان دهنده مقاومت بالای جدایه‌های اشریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف پر کاربرد است. برای مقایسه داده‌های بدست آمده با سایر مطالعات مشابه بر روی پرندگان زینتی مطالعه جامعی در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی در پرندگان زینتی در ایران یافت نشد اما مطالعات دیگری در خصوص پرندگان صنعتی موجود است ( Jacob et al., 2014; Jafari et al., 2015; Rafie & Nasirian, 2003; Zahraei Salehi et al., 2006) که تا حدودی از الگوی مشابه تبعیت می‌کند و نشان از توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های اشریشیاکلی دارد. مصرف گسترده انروفلوکساسین به تنهایی و مصرف همزمان با برخی از خانواده‌های آنتی بیوتیکی می‌تواند دلیل این مقاومت بالا باشد که در درمان بیماری‌های عفونی پرندگان زینتی در سراسر ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، مطالعات خارج از کشور نیز نشان می‌دهد که این آنتی بیوتیک در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است ( Horn et al., 2015; Sigirci et al., 2020; Suarez-Perez et al., 2021).

در مطالعه حاضر کمترین مقاومت نسبت به جنتامایسین (۶ درصد) و بعد از آن نسبت به لینکواسپکین (۳۸ درصد) مشاهده شده است. در سایر مطالعات در داخل کشور نیز کمترین مقاومت نسبت به لینکواسپکین گزارش شده است ( Bozorgmehri Fard et al., 2007; Jafari et al., 2015; Saberfar et al., 2008; Zahraei-Salehi et al., 2006). کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین در مطالعه اخیر می‌تواند به دلیل مصرف کمتر جنتامایسین در پرندگان باشد چرا که این دارو به شکل تزریقی است و کمتر در پرندگان استفاده می‌شود. بهرحال، وجود مقاومت بالای آنتی بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، سولفونامید به همراه متوپریم، آمپی سیلین و داکسی سایکلین می‌تواند به دلیل استفاده متداول از این آنتی بیوتیک‌ها در درمان پرندگان زینتی باشد که تجویز پی در پی این آنتی بیوتیک‌ها، بعضاً بدون انجام تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی باعث ظهور و گسترش میکروارگانیزم‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها شده است.

از آنجاییکه که ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در گسترش مقاومت در بین میکروارگانیزم‌ها نقش عمده‌ای دارند در مطالعه اخیر به پیش ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های فلورو کینولون، سولفونامید و جنتامایسین که از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت هستند پرداخته شد. در مطالعه اخیر نیز میزان مقاومت نسبت به سولفونامیدها در تست آنتی بیوگرام ۵۰ درصد بوده است که از مجموع ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده ۱۸ سویه یا به عبارتی ۳۶ درصد واجد ژن *Sul1* بودند. در این مطالعه ۶۴ درصد سویه‌های با فنوتیپ مقاومت علیه سولفونامیدها (۱۸ سویه از ۲۸ سویه) واجد ژن *Sul1* بودند. وجود ژن *Sul1* در ۶۴ درصد سویه‌های مقاوم علیه سولفونامیدها نشان می‌دهد

مقاومت دارویی نشان دادند که ۶۷ درصد سویه های اشیریشیاکلی نسبت به ۳ آنتی بیوتیک یا بیشتر مقاومت داشتند (Sigirci et al., 2020). علاوه بر آن، Sauarez Perez در ۱۰۳ سویه اشیریشیاکلی جدا شده از قناری به مقاومت چندگانه پرداخت و نشان داد ۳۹/۸ درصد حداقل به ۳ آنتی بیوتیک مقاومت داشته اند (Suarez et al., 2021). Horn و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز در ۵۵/۷ درصد سویه های اشیریشیاکلی جدا شده از سواب کلواک و کالبدگشایی قناری های تلف شده مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه را گزارش نمودند (Horn et al., 2015).

### نتیجه گیری

بطور کلی براساس یافته های این مطالعه می توان نتیجه گرفت که مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جدا شده از تلفات پرندگان بسیار گسترده است و در واقع مقاومت های بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های متداول وجود دارد. مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع دو نگرانی را به وجود می آورد اول اینکه مقاومت بالای آنتی بیوتیکی باعث عدم کارایی آنتی بیوتیک ها در کنترل بیماری های عفونی پرندگان می شود که منجر به تلفات و هزینه های بالای دارو درمانی می گردد و از طرفی دیگر، انتقال ژن های مقاومت به پاتوژن های انسانی، درمان بیماری های عفونی را در انسان پیچیده می کند و نگرانی های جدی برای بهداشت عمومی ایجاد می کند. لذا توصیه بر این است که حتما در موارد بیماری های عفونی حساسیت آنتی بیوتیکی سنجیده شود و براساس حساسیت آنتی بیوتیکی داروی مناسب انتخاب شود. علاوه بر آن با رعایت دوز و دوره مصرف، الزامات موجود در خصوص تجویز آنتی بیوتیک ها رعایت شود و تا حد امکان از داروهایی که در پزشکی استفاده می شود استفاده نگردد.

که تنها وجود Sul1 برای بروز مقاومت کافی نیست و ممکن سایر ژن ها مثل Sul2 و Sul3 نیز نقش داشته باشند. بهر حال مطالعات گذشته نشان می دهد که در بین ژن های مقاومت به سولفونامیدها Sul1 از فراوانی بالاتری برخوردار هست و قبلا نیز اهمیت ژن Sul1 در ایجاد مقاومت علیه سولفونامیدها در اشیریشیاکلی نشان داده شده است که حاکی از اهمیت و فراوانی بالاتر این ژن نسبت به سایر ژن های مقاومت در برابر سولفونامیدها بوده است (Costa et al., 2009). قدمت استفاده از سولفونامیدها در درمان بیماری های پرندگان و امکان مصرف همزمان این آنتی بیوتیک با سایر آنتی بیوتیک های متداول می تواند دلیل گسترده گی ژن های مقاومت در بین سویه های اشیریشیاکلی باشد.

از طرفی، درصد های بالای ردیابی ژن های مقاومت در مطالعه اخیر دلالت بر گسترش و توسعه مقاومت در اشیریشیاکلی دارد که وجود ژن های مقاومت و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این میکروارگانیسم به عنوان شاخصی برای ارزیابی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در انسان و حیوانات به کار برده می شود به طوری که سویه های حامل ژن های مقاومت و بیماری زا می توانند به عنوان مخزن ژن های مقاومت در محصولات طیور و مصرف کننده نهایی یعنی انسان باشند (Gholami-Ahangaran & Zia-Jahromi, 2014).

یکی از چالش های مهم در کنترل بیماری های عفونی در انسان و حیوانات مقاومت های چند دارویی هست که در مطالعه اخیر ۸۰ درصد سویه ها حداقل به دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۱۲ درصد سویه ها به تمامی ۱۳ آنتی بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی بیوگرام، مقاومت نشان دادند. در همین رابطه، Sigirci و همکاران در سال ۲۰۲۰ با بررسی ۲۰ سواب کلواک از پرندگان زینتی به ظاهر سالم و بررسی الگوی



- from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 552-556.
8. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, **15**: 55-63.
  9. Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., & Hooper, D.C., (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, **2**:100-110.
  10. Jafari, R., Ghanbarpour, R., Ghorbanpour Najaf Abadi, M., Mayahi, M., & Amani, A., (2015). Determination of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from healthy and colisepticemic broiler chickens in Ahvaz. *Iran Journal of Veterinary Microbiology*, **11**: 109-117.
  11. Kashif, J., Buriro, R., Memon, J., Yaqoob, M., Soomro, J., & Dongxue, D., (2013). Detection of class 1 and 2 integrons,  $\beta$ -lactamase genes and molecular characterization of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from poultry in China. *Pakistan Veterinary Journal*, **33**: 321-324.
  12. Mooljunttee, S., Chansiripornchai, P., & Chansiripornchai, N., (2010). Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against *E. coli* isolated from Thai broilers. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, **40**: 311-315.
  13. Mojaver Rostami, S., Ghaniei, A., & Mohammadi, V., (2018). Phenotypic and genotypic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens of Urmia to sulfonamides. *Iranian Veterinary Journal*, **13**: 86-91.
  14. Miles, T., McLaughlin, W., & Brown, P. (2006). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, **2**: 2-7.
- منابع**
1. Ahmed, O. B., & Dablood, A. S. (2017). Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. *International Journal of Bioassays*, **6**: 5347-5349.
  2. Bozorgmehri Fard, M.H., Karimi, V., Fathi, E., & Behmanesh, R., (2007). Bacteriologic survey on infectious cellulitis in broiler chickens in Masjid Soleiman slaughterhouse, Iran. *Archives of Razi Institute*, **62**: 91-95.
  3. Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., & Saenz, Y. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, **138**: 339-344.
  4. Ghaniei, A., Mojaverrostami, S., Lotfallahzadeh, B., Darzi Lemraski, M., Sepehrnia, P., & Imani Jajarmi, A., (2014). Geographical and seasonal variation in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken carcasses in Iran. *European Journal of Experimental Biology*, **4**: 173-177.
  5. Gholami-Ahangaran, M., and Zia-Jahromi, N., (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). *Toxicology and industrial health*, **30**: 724-727.
  6. Horri, M. and Gholami-Ahangaran, M., 2022. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Suspected Colibacillosis in Isfahan Province, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, **8**(3):193-201.
  7. Horn, R.V., Cardoso, W.M., Lopes, E.S., Teixeira, R.S., Albuquerque, Á.H., Rocha-e-Silva, R.C., & Bezerra, W.G., (2015). Identification and antimicrobial resistance of members

- of antibiotic resistance pattern in *Escherichia coli* isolates from chicken meat that reared under conventional and without antibiotic condition. *Iran Journal of Food Microbiology*, **5**: 11-18.
22. Sigirci, B.D., Celik, B., Halac, B., Adiguzel, M.C., Kekec, I., Metiner, K., & Kahraman, B.B., (2020). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from companion birds. *Journal of King Saud University-Science*, **32**: 1069-1073.
23. Suárez-Pérez, A., Corbera, J.A., González-Martín, M., Tejedor-& Junco, M.T., (2021). Multidrug-Resistant Phenotypes of *Escherichia coli* Isolates in Wild Canary Egyptian Vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). *Animals*, **11**: 1692.
24. Tran, J.H., Jacoby, G.A., & Hooper, D.C., (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein *qnr* with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 118-125.
25. Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L.T., & Coloe, P.J., (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, **124**: 217-223.
26. Zahraei Salehi, T., & Farashi Bonab, S., (2006). Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *International Journal of Poultry Science*, **5**: 677-84.
15. Nolan, L.K., Vaillancourt, J., Barbieri, N.L., Logue, C.M. (2020). Colibacillosis. In: Swayne, DE; Boulianne, M; Logue, CM; McDougald, LR; Nair, V & Suarez, DL (Eds.), *Disease of Poultry*. (14<sup>th</sup> Edn.), Massachusetts, W.B. Publishing. PP. 770-790.
16. Omidvar Panah, M., Najafi, M., & Peymani, A., (2018). Plasmid-mediated quinolones resistance in clinically important bacteria. *Journal of Qazvin University of Medical Science*, **22**: 90-99.
17. Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K.E., Catry, B., Van, D., & Sanders, P., (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfers from companion animals. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **72**: 957-968.
18. Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M. E., & Khan, A.A., (2012). Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 5444-5447.
19. Rafiei Tabatabaei, R., & Nasirian, A., (2003). Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from chicken flocks. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* **2**: 39-42.
20. Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K., & Dolatshahi, F.T., (2008). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken flocks, 2005-2006. *Journal of Applied Poultry Research*, **17**: 302-304.
21. Shahiri, M., Gholami-Ahangaran, M., & Rahimi, E., (2018). The comparing

## **The phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from companion birds in Isfahan**

**Shayan Arbabzadeh<sup>1</sup>, Majid Gholami-Ahangaran<sup>2</sup>, Asiye Ahmadi-Dastgerdi<sup>3</sup>**

1. Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University,  
Shahrekord, Iran.

2. Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord  
Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Assistance Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch,

Received: 6 October 2022

Accepted: 29 May 2023

---

### **Abstract**

Fluoroquinolones and sulfonamides are mainly used in the treatment of infectious diseases of poultry and pet birds and are also important in public health. To evaluating the level of antibiotic resistance and the main genes involved in antibiotic resistance against sulfonamides, aminoglycosides and fluoroquinolones, 50 strains of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from the liver and heart of pet birds were collected. The isolates were confirmed and purified with additional microbial and biochemical tests. After that, the pure colonies were cultured on Mueller Hinton's medium and disked with commercial antibiotics. In the next step, DNA was extracted from the purified bacteria and *Aac* (3)-IV, *qnrA* and *Sul1* genes were amplified with specific primers. The results showed that 80% of the isolated bacteria are resistant to at least 2 antibiotics and 12% of the strains are resistant to 13 antibiotics. In this study, the highest antibiotic resistance to tetracycline and enrofloxacin and the lowest antibiotic resistance to gentamicin and lincospectin were observed. Examination of resistance genes showed that about 71% of the strains resistant to enrofloxacin contained the *qnrA* gene and 64% of the strains resistant to sulfonamides and trimethoprim contained the *Sul1* gene. Also, 33% of gentamicin resistant strains carried the *Aac*(3)-IV gene. In this study, resistant strains without resistance genes were also found, which shows the importance of other resistance genes in the occurrence of resistance against sulfonamides and fluoroquinolones. Therefore, it concluded that the failure to treat infectious diseases in pet birds may be due to the presence of widespread antibiotic resistance and the possibility of the spread of resistance genes.

**Keywords: *Escherichia coli*, Pet birds, Antibiotic resistance genes**

---

\* Corresponding author: Majid Gholami-Ahangaran

Address: Department of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: mgholami6@gmail.com

## مطالعه هیستوپاتولوژیک اثرات محافظ کنندگی مخلوط پروبیوتیک در مقابل آسیبهای القایی سولفات مس در بافت روده باریک موشهای صحرائی نر

سمانه صیادی<sup>۱</sup>، زهرا کشتمند\*<sup>۲</sup>، سیده معصومه میرنوراللهی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱

### چکیده

سموم مختلف محیطی به ویژه فلزات سنگین در خاک، آب و هوا اثرات سمی بر انسان، حیوان و گیاه دارند. این عناصر سمی در محیط گسترده هستند و باعث ایجاد اختلالات مختلف در سیستم‌های بیولوژیکی می‌شوند. اخیراً استراتژی‌های متعددی برای کاهش آلودگی فلزات سنگین به کار گرفته شده است. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر مخلوط پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (بر آسیبهای القایی سولفات مس در بافت روده باریک موش‌های صحرائی نر می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ۲۱ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به ۳ گروه ۷ تایی: کنترل، دریافت کننده سولفات مس، سولفات مس + مخلوط پروبیوتیک تقسیم شدند. سولفات مس (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و پروبیوتیک ( $10^9$  CFU /MI) به مدت ۳۵ روز به موش‌ها گاوآژ شد. در پایان آزمایش، موش‌های صحرائی یوتانایز شده، سپس از روده باریک مقاطع بافتی تهیه، نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری عکس برداری و مورد مطالعه قرار گرفتند. بررسی تغییرات مورفولوژیک بافت روده باریک در گروه تیمار با پروبیوتیک کاهش آسیب بافتی (تعداد سلول‌های تکرزده، سلول‌های التهابی، پرخونی، تغییر در اندازه پرزها و ضخامت لایه عضلانی) را در مقایسه با گروه سولفات مس نشان داد. از این مطالعه نتیجه گیری شد که احتمالاً پروبیوتیک‌ها را می‌توان به عنوان کاربردی نوین در طیف وسیعی از محصولات دارویی جهت اهداف پیشگیری یا بهبود روش‌های درمانی به کار گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** پروبیوتیک، سولفات مس، بافت روده باریک، موش صحرائی

\*نویسنده مسئول: زهرا کشتمند

آدرس: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: zkeshtmand2001@gmail.com

## مقدمه

امروزه آلودگی به یکی از چالش های اصلی مدیریتی کشورها تبدیل شده است؛ به گونه ای که کشورها علاوه بر سیاست ها و اقدامات درون مرزهای خود، سامان دهی آلودگی را در حوزه بین المللی نیز دنبال می کنند (Arya, et al 2021). وجود عوامل محیطی نظیر آلودگی محیط زیستی، فلزات سنگین و غیره بر اندام های مختلف اثرات مخربی دارد. در برخی از مطالعات، فلزات سنگین را به عنوان آلاینده های زیست محیطی معرفی می کنند (Pulliero et al., 2021).

زمانی که انسان غذا یا آب آلوده به فلزات سنگین را مصرف می کند این فلزات سنگین، محیط اسیدی معده را اسیدی تر کرده، علاوه بر این فلزات سنگین به حالت های اکسیداتیو متعدد خود اکسید می شوند، که این رادیکال ها می توانند در بیوسیستم به مولکول های مختلف مانند پروتئین ها و آنزیم ها به ویژه گروه های عاملی تیو، گروه SH سیستئین و گروه SCH3 متیونین متصل شوند (Tagliazucchi et al., 2019). همچنین، رادیکال های آزاد به غشای لیپیدی حمله کرده و باعث آسیب مولکول های لیپید می شوند. مطالعات نشان داده است سولفات مس از طریق پراکسیداسیون لیپیدی در تشکیل گونه های فعال اکسیژن شرکت داشته و از این طریق سبب القا آسیب در سلول ها و بافت های مختلف می شود (Martinez-Villaluenga et al., 2017).

فلزات سنگین با هدف قرار دادن پروتئین های مسئول آپوپتوز، تنظیم چرخه سلولی و DNA، متیلاسیون، ترمیم DNA، اختلال در رشد سلولی و تمایز، سبب القا آسیب در بافت های مختلف می شوند (Rin et al., 1995; Crans et al., 2004). همچنین برخی از فلزات سنگین از طریق کاهش انتقال دهنده های عصبی یا تجمع در

میتوکندری باعث ایجاد سمیت عصبی شده و سنتز ATP را مختل می کنند (Jaishankar, et al 2014). سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های محیطی است که توانایی تولید رادیکال های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو و اثرگذاری بر مسیر آپوپتوز، توانایی القای سمیت ژنتیکی و آسیب به DNA سلولی را دارد (Erfanizadeh et al., 2021).

موجودات زنده در طول زندگی خود در معرض مس و مشتقات صنعتی آن از طریق مواد غذایی یا آلودگی های زیست محیطی قرار می گیرند. تظاهرات بالینی مرتبط با مسمومیت مس در قسمت های مختلف بدن شامل کبد، کلیه، طحال، ریه و روده مشاهده شده است (Domingo & Rovira 2020). جذب مس از طریق دستگاه گوارش تحت تأثیر تعدادی از ترکیبات نظیر اکسیدها، هیدروکسیدها، سیترات ها و سولفات ها انجام می شود. سولفات مس متداول ترین نمک مس می باشد؛ با این حال، دیگر نمک های مس شامل کربنات، سیانید، اکسید و سولفید نیز وجود دارند (Piroozmanesh., 2020). استراتژی های مرسوم مورد استفاده برای سم زدایی یا پاک سازی فلزات سنگین معمولاً هزینه زیادی دارند و عوارض جانبی متفاوتی بر سلامتی دارند (Tarekegn et al., 2020).

یکی از روش های نوظهور و ارزان، استفاده از پروبیوتیک ها جهت حذف فلزات سنگین به روش بیوشیمیایی است (Rajkumar, et al 2010, Huang, et al 2013). پروبیوتیک ها باکتری های غیر بیماری زا، غیر سمی و تخمیری هستند که در بسیاری از محصولات مختلف مانند غذاها، داروها و مکمل های غذایی یافت می شوند، از جمله آنها لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، رایج ترین پروبیوتیک ها هستند (Vogel et al 2018). سویه های مختلف پروبیوتیکی که در

در این مطالعه تحقیقاتی از نوع تجربی، تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه و یک هفته پیش از شروع آزمایشات موش ها به منظور سازش با محیط آزمایشگاه به حیوان خانه‌ی دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی منتقل و پس از نگهداری حیوانات و سازش با شرایط محیط جدید تمامی آزمایشات انجام شد. موش ها در شرایط کنترل با سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، با درجه حرارت  $3 \pm 22$  سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایشات در بازه‌ی زمانی مشخصی ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و در کلیه روش ها، اصول اخلاقی مورد تایید دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی رعایت گردید (IR.IAU.CTB.REC.1401.032).

#### گروه بندی حیوانات

۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) که در شرایط ذکر شده نگهداری شدند، به طور تصادفی در ۳ گروه هفت تایی تقسیم شدند.

گروه ۱: موش های این گروه فقط آب و غذای پلیت شده را به صورت روزانه دریافت کردند و به منظور تحمیل استرس گاوآژ، موش های صحرایی این گروه به صورت یک روز در میان با آب مقطر نیز گاوآژ شدند.

گروه ۲: موش هایی که جهت القا آسیب، سولفات مس (۲۰۰ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن) دریافت کردند (Fatemi et al., 2021).

گروه ۳: موش هایی که دریافت کننده سولفات مس + مخلوط پروبیوتیک بومی (لاکتوباسیلوس رامنوسوس،

روده وجود دارند با وعده‌های غذایی مکمل شده و ترکیب میکروبی مضر را تغییر می دهند (Silbergeld et al., 2000 ; Milatovic et al., 2017). سویه‌های لاکتوباسیلوس پروبیوتیک ها قادر به اتصال با فلزات سنگین هستند و برای سم زدایی فلزات مفید هستند (Larsen et al., 2013). امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان یک نسل امیدوارکننده برای کاهش سمیت فلزات سنگین در نظر گرفته می‌شوند (Oyarzun et al., 2022). علاوه بر این، ارتباط متقابل بین قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و میکروبیوتای روده قبلا تایید شده بود. قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین، متابولیسم میکروبیوتای روده و عملکرد آنها را تغییر می‌دهند (George et al., 2021). از سوی دیگر، میکروبیوتای روده جذب و متابولیسم فلزات سنگین را اصلاح می کنند (Coryell et al., 2018).

علاوه بر اصلاح، به عنوان یک مانع فیزیکی عمل کرده و میزان استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم های سم زدا، بیان پروتئین و تعدیل pH را نیز تنظیم می کنند (Fan et al., 2021 ; Singh et al., 2022).

با توجه به اینکه سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های زیست محیطی است که قادر به تولید رادیکال های آزاد و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد از این رو، احتمالاً استفاده از محرک های ایمنی نظیر پروبیوتیک ها در جهت کاهش آسیب القایی سولفات مس در بافت های مختلف ضروری به نظر می رسد. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مخلوط پروبیوتیک های (لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب های القایی سولفات مس در بافت روده باریک موش صحرایی نر می باشد.

#### مواد و روش ها





شدند. پس از پارافین دهی و آب گیری، نمونه ها به وسیله پ دستگاه پردازش گر بافت، آب گیری و قالب های پارافینی تهیه شدند. با استفاده از دستگاه میکروتوم از نمونه ها، مقاطع بافتی به ضخامت پنج میکرومتر تهیه و برش های بافتی آماده شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد (Dashtbanei et al., 2023).

برای بررسی لام ها و اندازه گیری طول، عرض و عمق پرز، ضخامت لایه ماهیچه تعداد سلول های التهابی و نکروزی در بافت روده باریک از عدسی چشمی مجهز به خط کش اندازه گیری با مقیاس میکرومتر مخصوص میکروسکوپ های ژاپنی (Olympus) استفاده شد (Dashtbanei et al., 2023). با توجه به اینکه از هر نمونه اخذ شده از هر قسمت روده (دوازدهه، تهی روده، دراز روده)، سه برش ایجاد شد، هر کدام از پارامترهای ذکر شده در هر برش، از چندین محل اندازه گیری شدند و سپس اعداد میانگین برش های مختلف هر نمونه به عنوان عدد نهایی، در نظر گرفته شد.

تحلیل داده ها:

طبیعی بودن توزیع داده های به دست آمده با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد ( $P > 0.05$ ). برای آنالیز از واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده و سطح معناداری نیز  $P \geq 0.05$  در نظر گرفته و نتایج در هر مورد به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد.

ملاحظات اخلاقی:

مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی انجام گرفته است و سعی شده که تمام موازین اخلاقی کار با حیوان مورد توجه باشد و الزامات معاهده هلسینکی رعایت گردد (IR.IAU.CTB.REC.1401.032).

لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلو تیکوس) بودند.

سولفات مس به میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و مخلوط پروبیوتیک ها با غلظت  $10^9$  cfu/ml از طریق گاواژ به موش ها داده شد.

تهیه غلظت پروبیوتیک

یک گرم پروبیوتیک در ۹ سی سی آب مقطر حل گردید و به هر موش از این محلول، ۱ سی سی مخلوط پروبیوتیک با غلظت ( $10^9$  cfu/ml) به مدت ۳۵ روز گاواژ شد (Dashtbanei et al., 2023).

تهیه سولفات مس

به منظور آلوده نمودن نمونه های مورد آزمایش با سولفات مس ( $Cu SO_4.5H_2O$ )، این ماده شیمیایی با کد ۱۰۲۷۹۰ از شرکت آزمیران خریداری شد.

تهیه مخلوط پروبیوتیک های بومی ایران

مخلوط پروبیوتیک های بومی ایران شامل باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوسوس (IBRC-M11322)، لاکتوباسیلوس هلو تیکوس (TG-35) و لاکتوباسیلوس کازئی (IBC-M10784) به صورت پودر و با  $10^{10}$  از شرکت تک ژن زیست تهیه شد.

نمونه گیری

پس از یک دوره تیمار ۳۵ روزه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی (IR.IAU.CTB.REC.1401.032)، حیوانات توسط کتامین زایلازین ۱٪ (۱۰ میلی گرم زایلازین ۱۰۰۰ میلی گرم کتامین) یوتانایز شده، بافت روده باریک خارج و در نرمال سالین شستشو داده شد.

جهت تثبیت بافت مذکور، نمونه هایی از بخش های مختلف بافت روده باریک (بخش های دوازدهه، تهی روده و دراز روده) در فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ قرار گرفته و به مدت ۷۲ ساعت داخل ظرف نگهداری

### نتایج

در گروه سولفات مس (200mg/kg) + مخلوط پروبیوتیک  $10^9$  (cfu/ml) در مقایسه با گروه کنترل بهبودی در آسیب های ایجاد شده به صورت معنا دار در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس (200mg/kg) نشان داده شد.

طبق جدول ۱ بررسی تصاویر مربوط به گروه دریافت کننده سولفات مس (200mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل کاهش عرض، ارتفاع و عمق پرز و ضخامت لایه عضلانی در قسمت های مختلف روده باریک (دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم)، افزایش سلول های التهابی و نکروز در بافت روده باریک (شکل ۱) گزارش شد.

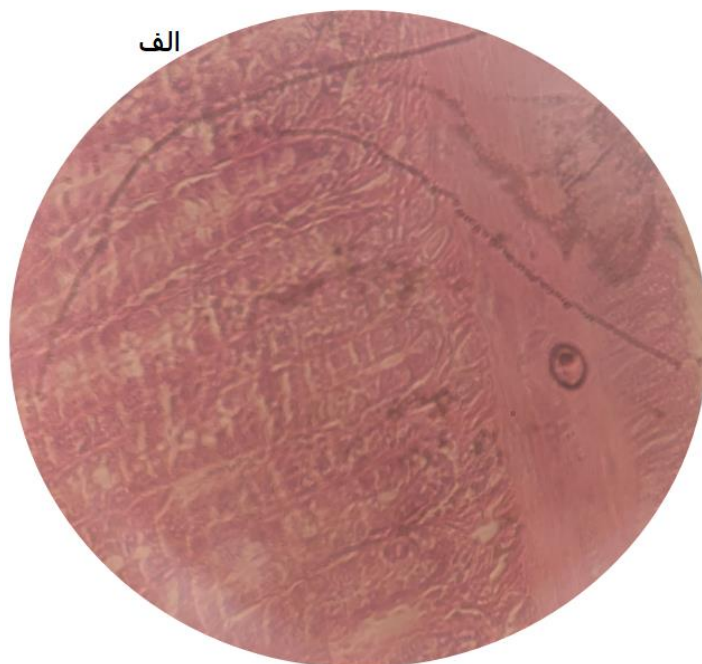
جدول ۱. مقایسه پارامترهای هیستومورفومتری (میکرومتر) در گروه های آزمایش

پارامترها	قسمت روده باریک	گروه کنترل	گروه سولفات مس (200mg/kg)	دریافت کننده سولفات مس (200mg/kg) + مخلوط پروبیوتیک $10^9$ (CFU/MI)
طول پرز ( $\mu\text{m}$ )	دئودنوم	$15/31 \pm 376/43$	$286/11 \pm 13/24$	$312/23 \pm 11/56$
	ژژنوم	$43/53 \pm 9/64$	$247/26 \pm 12/05$	$260/65 \pm 2/67$
عمق پرز ( $\mu\text{m}$ )	ایلئوم	$189/31 \pm 4/11$	$123/83 \pm 6/05$	$166/32 \pm 2/48$
	دئودنوم	$88/2 \pm 9/19$	$40/2 \pm 3/16$	$73/53 \pm 3/52$
	ژژنوم	$86/41 \pm 3/41$	$42/2 \pm 8/01$	$69/91 \pm 5/39$
	ایلئوم	$71/13 \pm 4/30$	$56/01 \pm 4/74$	$67/0 \pm 4/02$
عرض پرز ( $\mu\text{m}$ )	دئودنوم	$78/37 \pm 3/21$	$51/16 \pm 6/14$	$68/48 \pm 4/73$
	ژژنوم	$81/16 \pm 2/87$	$68/38 \pm 6/09$	$75/54 \pm 4/15$
	ایلئوم	$91/53 \pm 2/23$	$74/06 \pm 3/51$	$82/89 \pm 4/67$
ضخامت لایه عضلانی ( $\mu\text{m}$ )	دئودنوم	$79/43 \pm 5/28$	$56/17 \pm 3/19$	$69/14 \pm 2/89$
	ژژنوم	$65/16 \pm 4/34$	$38/51 \pm 2/41$	$45/16 \pm 5/78$
	ایلئوم	$55/11 \pm 2/45$	$31/66 \pm 1/38$	$43/04 \pm 1/24$
تعداد سلول های التهابی لنفوسیتی	روده باریک	$1/03 \pm 0/23$	$6/11 \pm 1/02$	$2/46 \pm 0/41$
	روده باریک	$0/87 \pm 0/01$	$4/23 \pm 0/02$	$2/46 \pm 0/41$

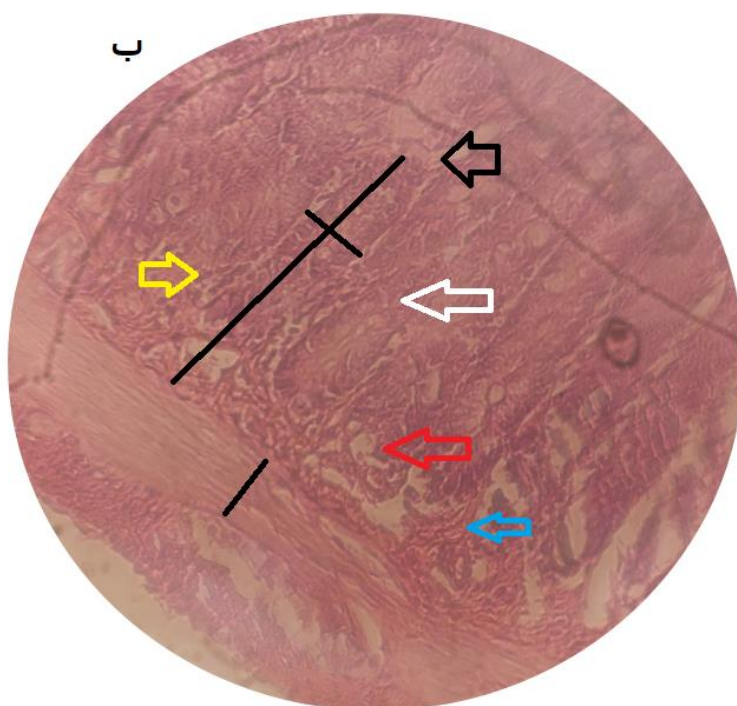
گروه کنترل،  $P < 0/05$ : d > مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس،  $P < 0/01$ : e > مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس

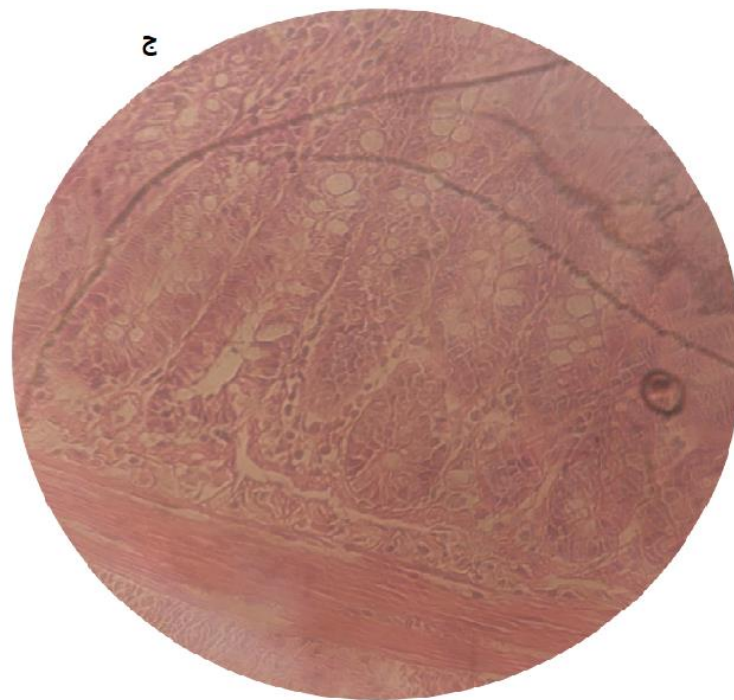
نتایج براساس میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار،  $P < 0/05$ : a > مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0/01$ : b > مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0/001$ : c > مقایسه با

الف



ب.





شکل ۱. مقطع میکروسکوپی بافت روده باریک در گروههای آزمایش . الف) گروه کنترل، ب) گروه دریافت کننده سولفات مس، ج) گروه دریافت کننده سولفات مس و مخلوط پروبیوتیک. با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین ( بزرگنمایی ۴۰۰). در گروه دریافت کننده آلاینده سولفات مس آسیب بافتی از جمله افزایش تعداد سلولهای التهابی به ویژه لنفوسیتها (فلش زرد رتک)، واکوئله شدن (فلش قرمز)، نکروزی شدن بافت (فلش سفید)، پر خونی شدن (فلش آبی)، تخریب بافت اپی تلیوم (فلش مشکی) و تغییر در طول و عرض پرزها و ضخامت لایه عضلاتی (خط مشکی) کاملاً قابل رویت است.

اثرات سمی را بر موجودات زنده وارد کرده است  
(Sayqal et al., 2021).

اگر چه به طور طبیعی حضور برخی از فلزات به منظور انجام فعالیت های بیولوژیکی موجودات زنده ضروری هستند اما انتشار آلاینده ها از منابع مختلف منجر به

#### بحث

مشکل آلودگی محیط زیست در نتیجه صنعتی شدن سریع جوامع شامل آلاینده های آب و مواد غذایی، تعادل اکولوژیکی را در محیط زیست مختل کرده و

سلولهای آماسی به شکل آنتریت حاد به همراه پرخونی در بافت روده مشاهده گردید (Shaloui et al., 2021). در مطالعات آسیب شناسی تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید که سولفات مس بطور معنی داری باعث آسیب به بافت روده باریک می شود.

بررسی بافت روده باریک در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک، کاهش آسیب در بخش های مختلف روده باریک را در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس نشان داد. مطالعات برون تنی و درون تنی نشان داده اند که میکروارگانیسم های پروبیوتیک می توانند به آلاینده های شیمیایی مختلف و فلزات سنگین متصل شوند و یا آنها را متابولیزه کنند (Feng et al., 2019).

تایید شده است که مکمل های پروبیوتیک خوراکی می توانند اثرات منفی قرار گرفتن در معرض آلاینده های مواد غذایی را با تعدیل ترکیب میکرو فلور روده کاهش دهند (Abdel-Megeed et al., 2021). در پژوهش انجام شده توسط Judkins و همکاران نشان داده شد که مکمل ماست با لاکتوباسیلوس رامنوسوس (L. rhamnosus GR-1) غلظت فلزات سنگین را در زنان باردار کاهش داد (Judkins et al., 2020).

گزارش شده است که لاکتوباسیلوس با تغییر عملکرد و ساختار جامعه میکروبی روده، سمیت فلزات سنگین را کاهش می دهد (Capurso et al., 2019).

در پژوهش Zhai و همکاران در سال ۲۰۱۹ در موش های در معرض سرب مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 گزارش داده شد که این سویه ها از طریق افزایش جذب فلزات سنگین روده ای و از طریق تحریک پریستالیز روده

افزایش غلظت عناصر در سطوح خطرناک در محیط زیست برای موجودات زنده شده است (Dai et al., 2020). فلزات سنگین ترکیبات غیر قابل تجزیه ای هستند که در اشکال آلی و معدنی متعددی باقی می مانند. برخی از فلزات سنگین مانند آهن، مس و روی عناصر کمیاب ضروری هستند، اما برخی دیگر مانند کادمیوم، سرب، جیوه حتی به مقدار اندک اثرات سمی را القا می کنند. تجمع فلزات سنگین در اندام های انسان تأثیر نامطلوبی بر سلامت انسان دارد. ماهیت تجزیه ناپذیر فلزات سنگین بر طول عمر و در دسترس بودن آنها در خاک تأثیر می گذارد و سبب جهش زایی، القا سرطان و آسیب در اندام ها می شود و یا در محیط ما باقی می ماند (Jeyakumar et al., 2023).

در تحقیق حاضر اثر مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازائی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب های القایی سولفات مس در بافت روده باریک موشهای صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش در گروه دریافت کننده سولفات مس، تغییرات مورفولوژیک در بافت روده باریک مشاهده شد. نتایج بررسی در گروه موش های آلوده شده با سولفات مس تغییر در طول، عرض و عمق پرز، ضخامت لایه ماهیچه، تعداد سلول های التهابی و نکروزه شدن بافت روده باریک در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری نشان داده شد. مطالعات مختلف انجام شده نیز افزایش تخریب در بافت روده باریک در حضور فلزات سنگین را گزارش داده اند (Salaret et al., 2022; Barzin et al., 2022).

در پژوهش انجام شده توسط Shaloui و همکاران در سال ۲۰۲۱ با بررسی اثر سولفات مس بر روده ماهی قرمز آسیبهای بافتی همچون التهاب و نفوذ فراوان

همچنین توانایی افزایش دفع فلزات سنگین برخی سویه ها در مدفوع از جمله عملکردهای پروبیوتیک ها در برابر فلزات سنگین می باشد. برخی از سویه های پروبیوتیک از طریق افزایش سنتز اسید صفراوی کبدی و افزایش دفع اسیدهای صفراوی در مدفوع سبب کاهش سطح آلاینده ها در بدن می شوند. مشخص شده است که سویه های پروبیوتیک نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی میزبان نیز دارند. وجود این میکروارگانیسم ها در روده باعث می شود که تحمل ایمنی نسبت به آنتی ژن های محیطی حفظ شود و همچنین از آلرژی ها و واکنش های خود تهاجمی جلوگیری می کند (Njoku et al., 2020).

پژوهش های انجام شده پیشنهاد داده اند، احتمالاً نقش بالقوه سویه های پروبیوتیک در بهبود اثرات سمی فلزات سنگین به دلیل توانایی قوی آن ها برای اتصال، تحمل یا سم زدایی فلزات سنگین، تحمل بالا به شرایط اسیدی معده و صفرا و باقی ماندن در دستگاه گوارش، توانایی چسبیدن و اتصال در روده می باشد، همچنین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و دارای پاسخ تنظیمی ایمنی قوی نیز عمل می کنند (Ayangbenro et al., 2022 ; Balíková et al., 2017).

از سویی مکانیسم پیشنهادی دیگر برای عملکرد پروبیوتیک جهت سم زدایی فلزات سنگین از طریق اتصال یون های فلزی به دیواره سلولی باکتری ها و به دنبال آن تجمع در داخل باکتری از طریق عبور از غشای سلولی است که به عنوان تجمع زیستی تعریف می شود (Ontañon et al., 2018). علاوه بر این، باکتری های پروبیوتیک شکل های سمی تر را تغییر داده و به شکل هایی با خاصیت سمیت کمتر تغییر می دهند (Gupta et al., 2016). همچنین برخی اسیدهای تولید شده توسط میکروبیوت های روده،

باعث کاهش جذب آن ها در روده و افزایش دفع از طریق مدفوع می شوند (Zhai et al., 2019).

پروبیوتیک ها به دلیل ویژگی ساختمانی خود توسط آنزیم های هضمی دستگاه گوارش هیدرولیز نشده و در روده کور تحت تأثیر آنزیم های باکتریایی هیدرولیز و تخمیر نمی شوند و در نهایت تولید اسیدهای چرب فرار می نماید. این اسیدهای چرب فرار منجر به کاهش pH و با تبدیل به فرم یونیزه در داخل سلول های باکتری های بیماری زا اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می نمایند و از این طریق منجر به کاهش رشد پاتوژن ها و افزایش شمار باکتری های تولید کننده لاکتات می شوند (Chichlowski et al., 2007).

از طرف دیگر منجر به تحریک پاسخ های ایمنی و افزایش مقاومت در مقابل عوامل بیماری زا می گردند و از این طریق اثرات محرک رشد خود را اعمال می نماید (Milatovic et al., 2017).

مکانیسم های احتمالی موثر دیگر پروبیوتیک ها بر بافت های مختلف از طریق تولید مواد آنتی بیوتیکی، مهار رشد پاتوژن ها، تغییر متابولیسم میکروبی، کاهش pH در روده و تحریک سیستم ایمنی بدن است (Patel et al., 2015).

لاکتوباسیل ها توانایی زنده ماندن و اتصال به بافت اپیتلیوم روده را دارند و با اثر مثبت روی غشای مخاطی مجرای گوارشی سبب افزایش عملکرد حیوان می شوند. گزارش های متعددی در مطابقت با این نتایج ارائه شده است (Jung et al., 2008).

مطالعات متعدد در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که پروبیوتیک ها به عنوان کاندید اتصال فلزات سنگین دارای خاصیت سم زدایی نیز می باشند. چسبیدن قوی به مخاط روده، قابلیت آنتی اکسیدانی قوی و تنظیم کننده ایمنی، تحمل مایعات گوارشی و سرکوب رشد پاتوژن،



جذب متابولیت های فلزات سنگین را تسریع می کنند (Orji et al., 2021).

گزارش داده شده است که پروبیوتیک ها با کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش عملکرد سد روده، مهار چسبندگی پاتوژن باعث کاهش سموم باکتریایی، سنتز مواد ضد باکتریایی (باکتریوسین ها، آنتی بیوتیک ها) و همچنین ویتامین ها می شوند علاوه بر این، متابولیت های پروبیوتیک نقش مهمی در حفظ هوموستاز روده و ارتقای سلامت روده ایفا می کنند به نظر می رسد بسیاری از این پاسخ ها ناشی از تحریک پروبیوتیک از طریق مسیرهای سیگنال دهی داخل سلولی خاص در سلول های اپیتلیال است. به عنوان مثال، مطالعات نشان داده اند که اسیدهای چرب اشباع فعال متابولیسمی، مانند اسیدهای استیک، بوتیریک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس CRL 1014 در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی که منابع انرژی متابولیسمی را برای سلول های اپی تلیال کولون انسان فراهم می کنند، دخیل هستند (Markowiak-Kopec et al., 2020).

### نتیجه گیری:

در این مطالعه اثربخشی مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازائی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب های القایی آلاینده سولفات مس در بافت روده باریک نشان داده شده است.

پروبیوتیک ها در مطالعات متعددی برای بهبود سلامت انسان، گیاه و حیوان مورد بررسی قرار گرفته اند و سویه های مختلف آن ها دارای خواص ضد التهابی و ضد حساسیت هستند. علاوه بر این اثربخشی مثبت و موثری را در برابر انواع بیماری ها، حذف زیستی سموم و فلزات و دفع آن ها از بدن را نشان داده اند. بررسی ها

نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک ها ممکن است. رویکرد خوبی برای مقابله با کاهش آسیب های القایی فلزات سنگین در انواع مختلف بافت ها باشد و می تواند یک کاندیدای امیدوار کننده برای زیست پالایی و حذف آلاینده های مختلف زیستی در بدن باشند. از این رو مصرف پروبیوتیک ها یک راه ساده و موثر برای کاهش میزان آلاینده های جذب شده می باشد.

با صنعتی شدن جوامع، قرار گرفتن انسان در معرض آلاینده ها، بیشتر افزایش یافته، بنابراین دانش در مورد فعل و انفعالات متقابل بین آلاینده ها و پروبیوتیک ها و تأثیر آن ها بر میکروبیوم روده و مسیرهای متابولیک در تخمین خطر واقعی سلامت مرتبط با قرار گرفتن در معرض این ترکیبات بسیار مهم است. از آنجایی که توانایی حذف و به دام انداختن آلاینده ها توسط برخی از پروبیوتیک ها امکان پذیر است از این رو شناسایی و معرفی این سویه های پروبیوتیک نیازمند مطالعات بیشتر و دقیق تر می باشد.

سپاس و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه دانشجوی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی با کد پایان نامه ۱۰۱۶۲۶۱۰۰۴۸ در گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد تهران مرکزی انجام شد و از شرکت پروبیوتیک تک ژن تشکر و قدردانی می شود.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

- Havenstein, G. B., & Koci, M. D. 2007. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. *Poult Sci*, **86**(6), 1121–1132. DOI:10.1093/ps/86.6.1121 PMID: 17495082
8. Coryell, M., McalpinE, M., Pinkham, N., Mcdermott, T. & Walk, S. 2018. The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. *Nat Commun*, **9**, 5424. DOI: 10.1038/s41467-018-07803-9
  9. Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., & Yang, L. 2004. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.*, **104**(2), 849-902. DOI: 10.1021/cr020607t
  10. Dai, C., Liu, Q., Li, D., Sharma, G., Xiong, J., & Xiao, X. 2020. Molecular Insights of Copper Sulfate Exposure-Induced Nephrotoxicity: Involvement of Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways. *Biomolecules*, **10**(7), 1010. DOI: 10.3390/biom10071010 PMID: 32650488
  11. Dashtbani, S., & Keshtmand, Z. 2023. A Mixture of Multi-Strain Probiotics (Lactobacillus Rhamnosus, Lactobacillus Helveticus, and Lactobacillus Casei) had Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Anti-Oxidative Effects in Oxidative Injuries Induced by Cadmium in Small Intestine and Lung. *Probiotics Antimicrob Proteins.*, **15**(2), 226–238. DOI: 10.1007/s12602-022-09946-0 PMID: 35819625
  12. Domingo, J. L., & Rovira, J. 2020. Effects of air pollutants on the transmission and severity of respiratory viral infections. *Environ.*
  1. Abdel-Megeed R. M. 2021. Probiotics: a Promising Generation of Heavy Metal Detoxification. *Biol Trace Elem Res.*, **199**(6), 2406–2413. DOI: 10.1007/s12011-020-02350-1 PMID: 32821997
  2. Aryal, A., Harmon, A. & Dugas, T. 2021. Particulate matter air pollutants and cardiovascular disease: Strategies for intervention. *Pharmacol Ther*, **223**, 107890. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107890. PMID: 33992684
  3. Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health.*, **14**(1), 94. DOI: 10.3390/ijerph14010094 PMID: 28106848
  4. Balíková, K., Vojtková, H., Duborská, E., Kim, H., Matúš, P., & Urík, M. 2022. Role of Exopolysaccharides of Pseudomonas in Heavy Metal Removal and Other Remediation Strategies. *Polymers*, **14**(20), 4253. DOI: 10.3390/polym14204253 PMID: 36297831
  5. Barzin A.R., Keshtmand Z. & Smadilkhah H.R. 2022. Protective effect of mixture of Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus helveticus on small intestinal tissue of male poisoned rats lead acetate. *Iranian Journal of Biological Sciences*, **16**, 71-80. (In Persian)
  6. Capurso L. 2019. Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG: A Review. *J Clin Gastroenterol.*, **53** Suppl 1, S1–S41. DOI: 10.1097/MCG.0000000000001170 PMID: 30741841
  7. Chichlowski, M., Croom, W. J., Edens, F. W., McBride, B. W., Qiu, R., Chiang, C. C., Daniel, L. R.,

18. Gupta, P., & Diwan, B. 2016. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies, *Biotechnol Rep (Amst)*, **13**, 58–71. DOI: 10.1016/j.btre.2016.12.006 PMID: 28352564
19. Huang, L., Xie, J., Lv, B. Y., Shi, X. F., Li, G. Q., Liang, F. L., & Lian, J. Y. 2013. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. *Mar. Pollut. Bull.*, **76**(1-2), 325–332. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.037 PMID: 24070455
20. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.*, **7**(2), 60-72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009
21. Jeyakumar, P., Debnath, C., Vijayaraghavan, R., & Muthuraj, M. 2023. Trends in bioremediation of heavy metal contaminations. *Environ. Eng. Res.*, **28**(4). DOI: 10.4491/eer.2021.631
22. Judkins, T. C., Archer, D. L., Kramer, D. C., & Solch, R. J. 2020. Probiotics, Nutrition, and the Small Intestine. *Curr Gastroenterol Rep.*, **22**(1), 2. DOI: 10.1007/s11894-019-0740-3 PMID: 31930437
23. Jung, S. J., Houde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., & Lee, B. H. 2008. Effects of galacto-oligosaccharides and a *Bifidobacteria lactis*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poult Sci*, **87**(9), 1694–1699. DOI: 10.3382/ps.2007-00489 PMID: 18753434
- Res., **187**, 109650. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109650
13. Erfanzadeh, M., Noorafshan, A., Naseh, M., & Karbalay-Doust, S. 2021. The effects of copper sulfate on the structure and function of the rat cerebellum: A stereological and behavioral study. *IBRO Neuroscience Reports*, **11**, 119-127. DOI: 10.1016/j.ibneur.2021.09.001
14. Fan, Y., & Pedersen, O. 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.*, **19**(1), 55–71. DOI: 10.1038/s41579-020-0433-9
15. Fatemi, I., Hassanshahi, Z., Eslammanesh, T., SADEGHI, M., SALARI Sedigh, S. & Hakimzadeh, E. 2021. Microscopic evaluation of the effect of copper sulfate on soft and hard oral tissues in male rats. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences*, **7**, 525-531. (In Persian)
16. Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., Virk, A. K., Li, X., & Liu, P. 2018. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota. *Nutrients*, **11**(1), 22. DOI: 10.3390/nu11010022 PMID: 30577661
17. George, F., Mahieux, S., Daniel, C., Titécat, M., Beauval, N., Houcke, I., Neut, C., Allorge, D., Borges, F., Jan, G., Foligné, B., & Garat, A. 2021. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) Removal Capacity of Bacteria from Food and Gut Ecological Niches: Insights into Biodiversity to Limit Intestinal Biodisponibility of Toxic Metals. *Microorganisms*, **9**(2), 456. DOI: 10.3390/microorganisms9020456 PMID: 33671764

- Res Int.*, **25**(16), 16111–16120. DOI: 10.1007/s11356-018-1764-1 PMID: 29594905
30. Orji, O. U., Awoke, J. N., Aja, P. M., Aloke, C., Obasi, O. D., Alum, E. U., Udu-Ibiam, O. E., & Oka, G. O. 2021. Halotolerant and metalotolerant bacteria strains with heavy metals bioremediation possibilities isolated from Uburu Salt Lake, Southeastern, Nigeria. *Heliyon*, **7**(7), e07512. DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e07512 PMID: 34355076
  31. Oyarzun, I., Le Nevé, B., Yañez, F., Xie, Z., Pichaud, M., Serrano-Gómez, G., Roca, J., Veiga, P., Azpiroz, F., Tap, J., & Manichanh, C. 2022. Human gut metatranscriptome changes induced by a fermented milk product are associated with improved tolerance to a flatulogenic diet. *CSBJ*, **20**, 1632–1641. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.04.001 PMID: PMC9014321
  32. Patel, R., & DuPont, H. L. 2015. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis.*, 60 Suppl 2(Suppl 2), S108–S121. DOI:10.1093/cid/civ177 PMID: 25922396
  33. Pirozmanesh, H., Janatifar, R., & Naserpour, L. 2020. The Effects of Copper Sulfate on Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation Rate and Testicular Tissue of Adult Wistar Rats. *J animal physiology and development (quarterly journal of biological sciences)*, **13**(4), 13-24. (In Persian)22. Je
  34. Pulliero, A., Traversi, D., Franchitti, E., Barchitta, M., Izzotti, A. & AGODI, A. 2021. The Interaction among Microbiota, Epigenetic Regulation, and Air Pollutants in
  24. Larsen, N., Vogensen, F. K., Gøbel, R. J., Michaelsen, K. F., Forssten, S. D., Lahtinen, S. J., & Jakobsen, M. 2013. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clin Nutr.*, **32**(6),935–940. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.02.007
  25. Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Frias, J. 2017. Bioactive peptides in fermented foods: Production and evidence for health effects. *In Fermented foods in health and disease prevention Academic Press*. pp. 23-47. DOI:10.1016/B978-0-12-802309-9.00002-9
  26. Markowiak-Kopec, P., & Śliżewska, K. 2020. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, **12**(4), 1107. DOI: 10.3390/nu12041107 PMID: 32316181
  27. Milatovic, D, Gupta, RC, Yin, Z, Zaja-Milatovic, S & Aschner, M 2017, Manganese. *in Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier, pp. 567-581. DOI:10.1016/B978-0-12-804239-7.00032-9
  28. Njoku, K. L., Akinyede, O. R. & OBIDI, O. F. 2020. Microbial Remediation of Heavy Metals Contaminated Media by *Bacillus megaterium* and *Rhizopus stolonifer*. *Scientific African*, **10**, e00545. DOI: 10.1016/j.sciaf.2020.e00545
  29. Ontañon, O. M., Fernandez, M., Agostini, E., & González, P. S. 2018. Identification of the main mechanisms involved in the tolerance and bioremediation of Cr(VI) by *Bacillus* sp. SFC 500-1E. *Environ Sci Pollut*

- carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med.*, **38**(3), 316–323. DOI:10.1002/10970274(200009)38:3<316::aid-ajim11>3.0.co;2-p
41. Singh, S., Sharma, P., Pal, N., Kumawat, M., Shubham, S., Sarma, D. K., Tiwari, R. R., Kumar, M., & Nagpal, R. 2022. Impact of Environmental Pollutants on Gut Microbiome and Mental Health via the Gut-Brain Axis. *Microorganisms*, **10**(7), 1457. DOI: 10.3390/microorganisms10071457 PMID: 35889175
42. Tagliazucchi, D., MARTINI, S. & SOLIERI, L. 2019. Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation*, **5**(4), 96. DOI:10.3390/fermentation5040096
43. Tarekegn, M., Zewdu, F., & Ishetu, A. 2020. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent food agric.*, **6**(1), 1783174. DOI:10.1080/23311932.2020.1783174
44. Vogel, M., Fischer, S., Maffert, A., Hübner, R., Scheinost, A. C., Franzen, C., & Steudtner, R. 2018. Biotransformation and detoxification of selenite by microbial biogenesis of selenium-sulfur nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, **344**, 749–757. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.03445
45. Zhai, Q., Liu, Y., Wang, C., Qu, D., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F. & Chen, W. 2019. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 modulates bile acid enterohepatic circulation and increases lead excretion in mice. *Food & Func.*, **10**, 1455-1464. DOI:10.1039/C8FO02554A
- Disease Prevention. *J Pers Med*, **12**(1), 14. DOI: 10.3390/jpm12010014. PMID: 350553303.
35. Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N., & Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.*, **28**(3),142–149. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002
36. Rin, K., Kawaguchi, K., Yamanaka, K., Tezuka, M., Oku, N., & Okada, S. 1995. DNA-strand breaks induced by dimethylarsinic acid, a metabolite of inorganic arsenics, are strongly enhanced by superoxide anion radicals. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(1), 45-48. DOI: 10.1248/bpb.18.45
37. Salar, S. & Keshtmand, Z. 2022. Effect of a Mixture of Native Iranian Probiotics on Biochemical Factors and Kidney Tissue of Male Rats Exposed to Cadmium Chloride. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, **30**(8),1531-5140. (In Persian)
38. Sayqal, A., & Ahmed, O. B. 2021. Advances in Heavy Metal Bioremediation: An Overview. *Appl Bionics Biomech.* ,**2021**, 1609149. DOI: 10.1155/2021/1609149 PMID: 34804199
39. Shaloui, F., Shadakhtah, M. & Arab Markadeh, M. 2021. Effect of dietary copper sulfate replacement with copper oxide nanoparticles on digestive enzymes activity and intestinal histopathology in Gold fish (*Carassius auratus*). *Journal of Aquaculture Development*, **15**, 115-128. (In Persian)
40. Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. 2000. Lead as a

## **Histopathological study of the protective effects of probiotic mixture against copper sulfate-induced damage in the small intestine tissue of male rats**

**Samaneh Sayadi<sup>1</sup>, Zahra Keshmand<sup>2\*</sup>, Seyyedeh Masoumeh Mirnourallahi<sup>3</sup>**

1. Master student of Biotechnology, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 21 April 2023

Accepted: 19 September 2023

---

### **Abstract**

Various environmental toxins, especially heavy metals in the soil, water and air, have toxic effects on humans, animals and plants. These toxic elements are widespread in the environment and cause various disorders in biological systems. Recently, several strategies have been applied to reduce heavy metal pollution. The purpose of this research is to investigate the effect of the probiotic mixture of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on copper sulfate-induced damage in the small intestine tissue of male rats. In this experimental study, 21 adult male Wistar rats were divided in 3 as : control, recipient of copper sulfate, copper sulfate + probiotic mixture. Copper sulfate (200mg/kg) and probiotics ( $10^9$  CFU/MI) were gavaged to rat for 35 days. At the end of the experiment, the rats were euthanized, then tissue sections were prepared from the small intestine, the samples were stained with hematoxylin-eosin method and photographed and studied by a light microscope. Investigating the morphological changes of the small intestine tissue in the treatment group with probiotics to reduce damage. tissue (the number of necrotic cells, inflammatory cells, hyperemia, changes in the size of the villi and the thickness of the muscle layer) compared to the copper sulfate group. It was concluded from this study that, probiotics can probably be used as a new application in a wide range of medicinal products for the purposes of prevention or improvement of treatment methods.

**Keywords: probiotics, copper sulfate, small intestine tissue, rat**

---

\*Corresponding author,s: Zahra Keshmand,

Address: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: zkeshtmand2001@gmail.com





## مقدمه

بیماری بورس عفونی Infectious bursal disease (IBD) (گامبورو) یک عفونت ویروسی بسیار مسری در ماکیان نابالغ است که عامل آن IBD virus از خانواده بیرناویریده (Birnaviridae) و جنس آوی بیرناویروس (Avibirnavirus) می باشد. دو سروتیپ برای ویروس بیماری بورس عفونی شناسایی شده است. بین این دو سروتیپ ۳۰ درصد اشتراک ژنتیکی وجود دارد. هر دو سروتیپ در ماکیان، بوقلمون، اردک، مرغ دریایی و شترمرغ شناسایی شده اما فقط سروتیپ یک در ماکیان بیماریزایی ایجاد می کند (McFerran et al 1980; Homer et al 1992; Tacken et al 2004; Najafi et al 2018; Ali Khan et al 2019; Fan et al 2019). ژنوم ویروس از نوع RNA دو رشته ای می باشد که از ۲ قطعه A و B تشکیل شده است. ژنوم دارای پنج قسمت کد کننده پروتئین های VP۱-۵ می باشد. ۲VP و ۳VP پروتئین های ساختاری ویروس اند. ۱VP، RNA پلیمراز ویروس و ۲VP پروتئین کسپید و ایمنوژن اصلی ویروس بورس عفونی است که با حدت، تروپیسیم سلولی و تنوع آنتی ژنی ویروس مرتبط است. ۳VP در مورفوژنز و تکثیر ویروس دخالت دارد و پادگن خاص گروهی هر دو سروتیپ است. ۴VP یک پروتئاز ویروسی و ۵VP نیز در آزادسازی، تکثیر و فعالیت ضد آپوپتوزی ویروس دخیل است. قطعه A پروتئین های ویروسی (۲VP، ۳VP، ۴VP و ۵VP) ناحیه اصلی پادگنی IBDV را کد می کند، در حالی که قطعه B پروتئین ویروسی (۱VP) را کد می کند (Swayne et al 2020).

Jackwood و Michel طبقه بندی جدیدی از IBDV براساس اطلاعات ژنتیکی آن معرفی کردند (Michel and Jackwood 2017). بر پایه آن طبقه بندی و بر اساس حدت، ویروس سروتیپ ۱ به ۳ گروه طبقه بندی

شده است که شامل گروه های تحت بالینی (Sub Clinical)، حاد کلاسیک (Classical Virulent) و بسیار حاد (Very Virulent) می باشد. بر اساس ساختار آنتی ژنی سروتیپ ۱ به دو گروه کلاسیکال/استاندارد و واریانت (Variant) تقسیم می شود. با این حال جهش های در یافت پادگنی منجر به شکل گرفتن ساب تایپ های مختلف در این گروه ها شده است (Michel and Jackwood 2017). اقدامات پیشگیری در خصوص کنترل این ویروس بسیار پیچیده است به این دلیل که این عامل عفونی مرتباً دچار جهش، Reassortment در قطعات ژنومی و نوترکیبی میشود. همین عوامل میتوانند حدت ویروس را افزایش دهند و منجر به تغییرات در ساختار پادگنی و کاهش تاثیرات واکسن ها شوند (Michel and Jackwood 2017).

ویروس واریانت علی رغم عدم وجود علائم بالینی و تلفات، ولی ضایعات بورسی مشخصی ایجاد میکند. ماکیان تنها گونه ای هستند که علائم بالینی و ضایعات مشخص را هنگام مواجهه با این ویروس نشان میدهند (OIE 2004; Fan et al 2019; Xu et al 2020). نژادهای سبک و تخم گذار مانند لگهورن سفید شدیدترین ضایعات و علائم بالینی و بیشترین میزان تلفات را بروز می دهند. ویروس های دارای حدت کلاسیک (CV) حدوداً ۱۰ تا ۵۰ درصد تلفات همراه با علائم و ضایعات و ویروس بورس عفونی فوق حاد (VV) در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ درصد تلفات همراه با علائم و ضایعات تیبیک ایجاد می کند (OIE 2004; Day et al 2019). ویروس تیپ ۱ بیماری بورس عفونی، گسترش جهانی دارد. اندام هدف ویروس این بیماری بورس فابریسیوس بخصوص لنفوسیت های B در حال تکثیر می باشد (Armstrong et al 1981; Michel and Jackwood 2017; Dey et

بوس عفونی را دریافت نکرده اند می باشد. نتایج این مطالعه میتواند در چگونگی اتخاذ سیاستهای موثر برای مقابله با این ویروس مفید باشد.

### مواد و روش ها

در این مطالعه، ۳۰ گله گوشتی شهرستان اهواز که واکسن بیماری بوس عفونی را دریافت نکرده بودند، پس از ثبت مشخصات لازم (از قبیل نام فارم، تاریخ جوجه ریزی، تعداد جوجه های گله، سن، وزن نهایی و میزان تلفات) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ جوجه های موجود در فارم نمونه گیری شد. بدین منظور بوس جوجه ها در سن ۱۰ تا ۲۰ روزگی به منظور ردیابی ویروس پس از آسان کشی، توسط پنس و قیچی استریل جداسازی و درون میکروتیوپ ۵ سی سی استریل در کنار یخ جهت انجام آزمایش RT-PCR به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز ارسال گردید. در مجموع ۳۴۴ نمونه بوسی از مجموع ۳۰ گله جمع آوری شد. در انتهای دوره پرورش و در کشتارگاه بمنظور بررسی سرولوژیک بیماری بوس عفونی به روش الایزا، ۴۲۰ نمونه خون از گله های مورد بررسی اخذ شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت استخراج RNA از نمونه های بوس، از کیت تجاری (SinaPure Viral (Sinaclon; Iran) استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میلی گرم از هر نمونه بوس جدا و به طور کامل له و همگن شد. سپس هر سه نمونه از یک گله با هم مخلوط شدند و مطابق دستورالعمل کیت، RNA آنها استخراج شد. در نهایت RNA استخراج شده در فریزر منفی هفتاد درجه سانتی گراد تا زمان انجام مراحل بعدی کار ذخیره شد. جهت سنتز cDNA از کیت شرکت سیناکلون (Sinaclon; Iran) استفاده شد و مطابق دستورالعمل کیت، cDNA سنتز شد.

IBD عفونت تحت بالینی (al 2019; Xu et al 2020) در مرغان آلوده با سن کمتر از ۳ هفتگی و مسن بروز پیدا می کند که با علائم آتروفی بوس قابل تشخیص است (Homer et al 1992; Dey et al 2019). گرچه عفونت تحت بالینی هیچ مرگ و میر ایجاد نمی کند، اما منجر به اختلال در وزن گیری گله، سرکوب سیستم ایمنی و عدم موفقیت آمیز بودن واکسیناسیون علیه دیگر بیماری ها می شود، همچنین شیوع عفونت های دیگر مانند کلی باسیلوز، سالمونلوز، کوکسیدیوز و هپاتیت تجمع گنجیدگی (IBH) Inclusion Body (Hepatitis) را افزایش می دهد، در نتیجه منجر به مرگ و میر بیشتر، عدم یکنواختی گله و افزایش طول دوره پرورش می شود که از نظر اقتصادی بسیار مهم می باشد (Goodall et al 1989; Homer et al 1992; Fan et al 2019). یکی از مهم ترین راه های پیشگیری از بیماری بوس عفونی واکسیناسیون می باشد ولی در ایران واکسیناسیون به صورت منظم و در همه گله ها انجام نمی شود. شناسایی ویروس در گله های مبتلا عمدتاً بر اساس علائم بالینی، تست های سرولوژی و مولکولی انجام می شود.

در ایران ویروس بوس عفونی در سال ۱۹۸۱ از یک گله گوشتی جدا شد (Razmyar and Peighambari 2008). فرم فوق حاد بوس عفونی نیز در سال ۱۹۹۱ حتی در گله هایی که با واکسن اینترمدیت و اینترمدیت پلاس ایمن شده بودند پدیدار شد (Najafi et al 2018). رزمیار و پیغمبری (۲۰۰۸)، نجفی و همکاران (۲۰۱۸) در ایران مطالعاتی در خصوص شناسایی ویروس در گله های واجد علائم بالینی انجام داده اند (Razmyar and Peighambari 2008; Najafi et al 2018)، اما در مطالعه حاضر، هدف بررسی حضور ویروس در گله های فاقد علائم بالینی که واکسن

## واکنش PCR

جهت بررسی حضور ویروس بورس عفونی ژن VP2 با کمک PCR تکثیر شد. توالی پرایمر رفت 5' GCCCAGAGTCTACACCAT 3' و پرایمر برگشت 5' ATGGCTCCTGGGTCAAATCG 3' بود (Michel and Jackwood 2017). از ویروس تخفیف حدت یافته بیماری بورس عفونی سویه واکسن گامبوآل (CEVAC, Hungry, GAMBO L) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR دناتوراسیون اولیه به مدت ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه (۹۵ درجه سانتی گراد)، اتصال به مدت ۹۰ ثانیه (۵۷ درجه سانتی گراد) و سنتز به مدت ۹۰ ثانیه (۷۲ درجه سانتی گراد) تکرار شد. در نهایت سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت پنج دقیقه انجام شد (Michel and Jackwood 2017). برای انجام واکنش از مستر میکس شرکت امپلیکون (Denmark) با غلظت دو میلی مولار ۲MgCl استفاده شد. در نهایت محصول PCR روی ژل دو درصد برده شد. در صورت مشاهده قطعه به طول ۵۷۹ جفت باز واکنش مثبت در نظر گرفته می شد.

## بررسی سرولوژی به روش الایزا:

خون های اخذ شده در کشتارگاه پس از استحصال سرم در آزمایشگاه، تا زمان انجام آزمایش الیزا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور ردیابی آنتی بادی ضد IBDV از کیت ID.vet (ID.vet; France) استفاده شد و عیار پادتن ها براساس دستورالعمل کیت سنجش شد. جذب نوری نمونه ها پس از انجام آزمایش توسط دستگاه (BioRad; USA) ELISA Reader استخراج و توسط نرم افزار کیت تفسیر شد.

## نتایج

### استخراج RNA و واکنش RT-PCR:

از نمونه های جمع آوری شده به کمک کیت شرکت سیناکلون استخراج RNA صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که RNA از کیفیت مناسب برخوردار است. بعد از استخراج RNA سنتز cDNA انجام شد. در ادامه واکنش PCR به منظور تایید ویروس بورس عفونی انجام شد. نتایج RT-PCR چهار گله از مجموع ۳۰ گله مورد مطالعه دلالت بر وجود یک بانده ۵۷۹ باز در ناحیه متغیر VP2 داشت (عکس ۱).



عکس ۱. واکنش RT-PCR مربوط به نمونه های جمع آوری شده از گله های ماکیان گوشتی جهت شناسایی ویروس بیماری بورس عفونی (گامبورو). از چپ به راست گوده اول لدر 1000bp، گوده ۲ و ۳ و ۵ نمونه های منفی، گوده ۴ کنترل منفی، گوده ۶ کنترل مثبت، گوده ۷ و ۸ نمونه های مثبت

نمونه ها توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. براساس دستورالعمل کیت <math>Titer> 853</math> مثبت قلمداد شد. لذا از مجموع ۴۲۰ نمونه سرم اخذ شده از ۳۰ گله، ۳۷۶ نمونه دارای تیتراژ مثبت (۹۰ درصد) و ۴۴

**نتایج بررسی سرولوژی به روش الایزا:**  
سرم های جدا شده از خون های اخذ شده در کشتارگاه توسط کیت تشخیصی بورس عفونی ID.vet مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام آزمایش الایزا، جذب نوری

بررسی حضور ویروس بیماری بورس عفونی در ماکیان گوشتی فاقد علائم... (جعفری، توفیقی و همکاران)..... ۷۵.

نمونه (۱۰ درصد) که دارای  $\leq \text{Titer } 853$  بودند که از نظر پادتن ضد بورس عفونی منفی قلمداد شدند. به این ترتیب به جز ۳ گله در بقیه گله ها میانگین تیترا مشاهده شده بیش از ۸۵۳ بود. نتایج سرولوژی به تفصیل در جدول شماره ۱ آورده شده است

جدول شماره ۱: نتایج بررسی سرولوژی جهت حضور پادتن ضد ویروس بورس عفونی به روش الایزا

شماره گله	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت	تعداد نمونه منفی	بیشترین تیترا	کمترین تیترا	میانگین تیترا	درصد پراکندگی (CV)	نتیجه PCR
۱	۱۶	۶	۱۰	۱۹۷۵	۱	۸۲۵	۷۵	منفی
۲	۱۲	۱۲	۰	۱۱۲۷۰	۱۰۲۲۳	۱۰۷۵۸	۳	منفی
۳	۱۰	۱۰	۰	۱۳۰۵۳	۵۹۸۲	۹۵۷۴	۲۷	منفی
۴	۱۴	۱۴	۰	۱۱۱۱۶	۳۳۹۹	۷۵۰۱	۳۰	منفی
۵	۱۶	۱۶	۰	۱۳۶۵۶	۳۸۶۷	۸۶۳۲	۳۲	منفی
۶	۱۶	۱۶	۰	۱۰۷۸۹	۵۴۶۵	۸۵۳۸	۲۰	منفی
۷	۱۴	۱۴	۰	۱۲۸۶۱	۷۴۵۶	۱۰۰۹۴	۱۴	منفی
۸	۱۵	۱۵	۰	۱۱۱۹۷	۵۷۸۳	۹۲۵۷	۱۸	منفی
۹	۱۰	۱۰	۰	۸۹۳۹	۴۳۹۸	۷۰۵۷	۲۳	منفی
۱۰	۲۰	۶	۱۴	۲۰۸۸	۱	۶۳۷	۱۰۲	منفی
۱۱	۱۶	۳	۱۳	۱۴۹۶	۱	۵۴۴	۹۰	منفی
۱۲	۱۴	۱۴	۰	۲۷۱۲۵	۴۸۰۹	۱۳۷۸۲	۴۹	منفی
۱۳	۱۵	۱۵	۰	۲۶۸۳۲	۱۶۳۹۱	۲۲۴۷۶	۱۴	منفی
۱۴	۱۰	۱۰	۰	۲۷۵۲۹	۱۰۸۸۱	۲۰۲۷۷	۲۷	منفی
۱۵	۱۳	۱۳	۰	۱۱۴۸۹	۶۱۶۶	۸۸۸۷	۱۴	منفی
۱۶	۱۱	۱۱	۰	۲۷۵۷۷	۶۰۰۱	۱۸۰۶۴	۳۵	منفی
۱۷	۱۴	۹	۵	۲۷۵۶۹	۱	۱۰۲۷۹	۱۱۶	منفی
۱۸	۱۲	۱۲	۰	۱۲۴۱۸	۴۴۵۷	۸۸۴۸	۲۹	منفی
۱۹	۱۶	۱۶	۰	۱۵۴۶۰	۲۳۵۷	۷۸۷۰	۴۱	مثبت
۲۰	۱۵	۱۵	۰	۱۷۱۰۱	۵۸۳۱	۱۲۷۰۸	۲۷	مثبت
۲۱	۱۵	۱۵	۰	۲۸۰۰۶	۲۳۵۷۷	۲۶۶۷۸	۴	منفی
۲۲	۱۴	۱۴	۰	۱۷۱۹۱	۱۵۸۰۲	۱۶۶۸۷	۲	مثبت
۲۳	۱۱	۱۱	۰	۱۶۶۴۹	۱۲۳۲۲	۱۵۹۱۸	۸	منفی
۲۴	۱۷	۱۷	۰	۱۶۱۰۹	۴۷۳۶	۱۲۹۶۱	۲۴	منفی



منفی	۲۴	۷۹۰۷	۴۱۱۵	۱۰۸۲۸	۰	۱۲	۱۲	۲۵
منفی	۸۸	۳۰۲۳	۵۶۷	۱۰۷۸۷	۲	۱۵	۱۷	۲۶
مثبت	۱۷	۱۱۱۷۴	۶۱۰۰	۱۳۱۰۳	۰	۱۷	۱۷	۲۷
منفی	۱۹	۹۱۳۵	۷۱۰۴	۱۲۱۴۴	۰	۱۳	۱۳	۲۸
منفی	۲۱	۹۰۶۷	۵۷۲۹	۱۲۲۵۴	۰	۱۵	۱۵	۲۹
منفی	۲۲	۹۶۲۳	۶۵۲۰	۱۲۵۱۴	۰	۱۰	۱۰	۳۰
۴	-	-	-	-	۴۴	۳۷۶	۴۲۰	مجموع

### بحث و نتیجه گیری

به دنبال اولین ظهور IBDV کلاسیک در آمریکا در سال ۱۹۵۷، یک سویه متفاوت از لحاظ آنتی ژنی در اواخر دهه ۱۹۸۰ در آمریکا گزارش شد که از ایمنی ایجاد شده توسط سویه های IBDV کلاسیک فرار می کرد. این نوع، واریانت نامگذاری شد. در حال حاضر واریانت IBDV به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی در سراسر جهان گزارش شده است، زیرا باعث آسیب شدید به بورس شده و منجر به سرکوب سیستم ایمنی و ایجاد عفونت های تحت بالینی می شود. این عفونت ها، اغلب علت زمینه ای بیماری های تنفسی و روده ای در جوجه ها و همچنین شکست واکسیناسیون می شود. با این حال، در طول ۳۰ سال گذشته، به دلیل پیگیری فقط موارد vvIBDV، واریانت به طور ناخواسته نادیده گرفته شده است.

در ایران، ویروس بیماری بورس عفونی که باعث مرگ و میر کم در یک مزرعه مرغ گوشتی شد، برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ توسط آقاخان و همکاران شناسایی شد. بعداً آنها یک سویه جدید IBDV را شناسایی کردند که باعث مرگ و میر به ترتیب ۷۵٪ و ۲۵٪ در مزارع مرغان تخمگذار و گوشتی شد (Tacken et al, 2004).

در مطالعه حاضر، از مجموع ۳۴۴ نمونه بورس اخذ شده از ۳۰ گله گوشتی که به روش RT-PCR بررسی شدند در مجموع ۴ گله (۱۰ درصد) از نظر ویروس بورس عفونی مثبت شدند. با توجه به اینکه هیچ گونه علائم کلینیکی در این گله ها مشاهده نشده بود لذا ویروس های شناسایی شده از نوع تحت بالینی در نظر گرفته شدند.

Fan و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی سویه های جدید واریانت ویروس بورس عفونی در چین پرداختند. در این مطالعه که به روش RT-PCR روی ۳۵۶ نمونه مشکوک صورت گرفت، ۱۸۷ مورد (۵۲/۵ درصد از نمونه ها) مثبت شدند (Fan et al 2019). رزمیار و پیغمبری (۲۰۰۸) طی مطالعه ای بر روی گله گوشتی و پولت تخمگذار در ایران، به بررسی خصوصیات جدایه های ویروس بورس عفونی به روش RT-PCR/Restriction endonuclease assay پرداختند. طی آن مطالعه از ۴۹ نمونه جمع آوری شده ۳۷ مورد (۷۵/۵ درصد) از نظر IBDV مثبت شدند که ۳ مورد (۸/۱ درصد) الگوی مشابه به سوی کلاسیک و ۳۴ مورد (۹۱/۹ درصد) الگوی مشابه سویه فوق حاد را نشان دادند. لازم بذکر است در مطالعه ذکر شده نمونه

در مطالعه حاضر بر روی گله های مرغان گوشتی شهرستان اهواز علاوه بر بررسی مولکولی از نظر IBD تحت بالینی، همه گله ها از نظر پادتن ضد IBDV با آزمایش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که ۲۷ گله از مجموع ۳۰ گله از نظر پادتن ضد IBDV مثبت بودند.

Homer و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند پادتن های ضد IBDV دو هفته پس از آلودگی قابل ردیابی هستند و ۴ هفته پس از آلودگی به اوج خود می رسند همچنین نشان دادند پادتن های مادری ۳ الی ۴ هفته پس از هیچ شدن جوجه ها از بین می روند (Homer et al 1992)، لذا با توجه به این که گله های مورد مطالعه هیچ گونه واکنش ضد IBD دریافت نکرده بودند گله های با تیتراژ مثبت را علی رغم PCR منفی می توان آلوده به IBD تحت بالینی در نظر گرفت و این فرضیه تقویت می شود که آلودگی در سنین بالاتر و بعد از نمونه گیری از بورس اتفاق افتاده است.

Sing و همکاران (۱۹۹۲) تعداد ۳۲ گله طیور شامل ۱۰ گله گوشتی و ۲۲ گله تخمگذار در منطقه جابالپور هند را از نظر وجود پادتن ضد IBD به روش AGID بررسی کردند. طی این مطالعه از مجموع ۱۱۱۷ سرم بررسی شده ۳۱۴ مورد (۲۶/۷ درصد) از نظر پادتن IBD مثبت بودند. طی این مطالعه ۵۶/۶۱ درصد نمونه های اخذ شده از گله های گوشتی از نظر پادتن ضد IBD مثبت بودند، علی رغم اینکه هیچکدام از این گله ها دارای علائم بالینی بیماری بورس عفونی نبودند (Sing and Dhawedkar 1992).

Xu و همکاران (۲۰۱۹) پاسخ ایمنی میزبان به دو سویه IBDV را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان داد سویه واریانت پاسخ هومورال ضعیف تری در مقایسه با سویه فوق حاد ایجاد می کند، با این حال این

ها از جوجه های واجد علائم بالینی جمع آوری شده بود (Razmyar and Peighambari 2008).

Homer و همکاران (۱۹۹۲) به بررسی میزان شیوع بیماری بورس عفونی تحت بالینی در ۵ مزرعه گوشتی پرداختند و در این مطالعه که حاصل بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی بورس فابریسیوس و همچنین بررسی میزان تیتراژ پادتن جوجه های گوشتی بود، با وجود اینکه هیچ علامت درمانگاهی مبنی بر بیماری IBD در پرندگان مشاهده نشد، همه ۵ گله مورد آزمایش درگیری به عفونت را نشان دادند (Homer et al 1992).

Armstrong و همکاران (۱۹۸۱) در استان ساسکاچوان کانادا ۵ گله گوشتی را از نظر پادتن ضد IBD، وجود ضایعات هیستوپاتولوژیکی و نسبت وزن بورس / بدن بررسی کردند. بر اساس یافته های آنها ۴ گله از ۵ گله مورد مطالعه در زمان کشتار دارای پادتن ضد IBD (بر اساس آزمایش Agar gel immune diffusion ضایعات هیستوپاتولوژیک در بورس و کاهش نسبت وزن بورس / بدن می بودند، علی رغم اینکه در هیچکدام از گله ها علائم بالینی و مرگ و میر ناشی از بیماری مشاهده نشد (Armstrong et al 1981).

نظافتی و همکاران (۱۳۹۲) ۵۰ گله گوشتی در شهرستان اراک را از نظر وجود عفونت تحت بالینی ویروس گامبورو مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه از جوجه های ۹ تا ۱۰ روزه به نسبت ۱ در ۱۰۰۰ از بافتهای بورس، طحال و کلیه نمونه گیری بعمل آمد و به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند همچنین در این مطالعه اندیس بورس نیز بررسی شد که در نهایت هیچ گونه مورد مثبتی گزارش نشد (نظافتی و همکاران ۱۳۸۹).

دوره رشد تیترا بالای پادتن IBDV مشاهده شد. نظر به عدم دریافت واکسن در این گله‌ها و همچنین عدم وجود علائم بالینی، به نظر می‌رسد سویه‌های تحت بالینی ویروس در منطقه در حال گردش هستند و منجر به مثبت شدن نتایج PCR و یا تست‌های سرمی می‌شوند. با توجه به اینکه در برخی از گله‌های سرم مثبت ویروس شناسایی نشد به نظر می‌رسد آلودگی در این گله‌ها در زمانی غیر از زمان نمونه‌گیری برای تست PCR رخ داده است و بنابراین تست‌های سرمی از جمله الیزا می‌توانند ارزیابی دقیق تری از احتمال چرخش ویروس در یک منطقه را داشته باشند. این نتایج می‌تواند اهمیت لزوم واکسیناسیون علیه این ویروس در منطقه را مشخص کند.

#### سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل گرنت شماره ۱۴۰۱، ۶۵۸ SCU.SB انجام شده است.

#### منابع

۱. نظافتی، د. (۱۳۸۹). بررسی فرم تحت بالینی گامبورو به روش مولکولی PCR در مرغداری‌های گوشتی شهرستان اراک. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۹۹۳.
2. Ali Khan, R.S., Habib, M., Ali, W., Shah, M.S., Ashraf, A., Tahir, Z.A., Helal, Z.H., Khan, M.I., Mahboob, Sh., Ghanim, K.A., Al -Misned, F. 2019. Phylogenetic analysis of Infection Bursal Disease viruses according to newly proposed model of classification into geno-groups, *J Infect Public Health*, **12**: 410-418.
3. Armstrong, L.D., Table, H., Ridell, C. (1981). Subclinical IBD in commercial

دو سویه از نظر سرکوب سیستم ایمنی یکسان عمل می‌کنند. سویه‌های واریانت جدا شده در مطالعه فوق به جوجه‌های SPF سه هفته‌ای تزریق شد ولی در هیچ کدام علائم بالینی آشکاری مشاهده نشد، با این حال این ویروس‌ها باعث آتروفی بورس و سرکوب شدید سیستم ایمنی در جوجه‌های آلوده شدند ( Xu et al 2020).

مکانیسم دقیق تاثیر IBD تحت بالینی بر سودآوری صنعت تولید جوجه‌های گوشتی هنوز مشخص نیست. با این حال، تاثیر آن ممکن است ناشی از سرکوب سیستم ایمنی میزبان و عفونت‌های متعاقب آن باشد. عدم مشاهده علائم بالینی احتمالاً به دلیل درجه سرکوب سیستم ایمنی و/یا مقاومت وابسته به سن باشد. سرکوب سیستم ایمنی ناشی از IBD در جوجه‌های گوشتی با انواع سندرم‌های بالینی مانند بیماری مزمن تنفسی، کوکسیدیوز، IBH و قانقاریا مرتبط است. چنین بیماری‌هایی معمولاً در سن ۴ هفته‌گی (زمانی که پادتن‌های مادری IBD از بین رفته‌اند) متعاقب سرکوب سیستم ایمنی ناشی از عفونت‌های ویروسی طبیعی IBD دیده می‌شوند. اگرچه بیشترین تاثیر ویروس روی سیستم ایمنی زمانی است که عفونت ویروس IBD در اوایل زندگی رخ می‌دهد، اما سرکوب سیستم ایمنی همچنان در پرندگانی که در ۴ تا ۶ هفته‌ای آلوده می‌شوند نیز رخ می‌دهد (Goodall et al 1989).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به تاثیر سویه‌های تحت بالینی ویروس عفونی بر بازدهی تولید و عدم موفقیت در واکسیناسیون، ارزیابی حضور این ویروس در گله‌های ماکیان و معرفی واکسن موثر ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر در ۴ گله از ۳۰ گله مورد بررسی ویروس شناسایی قرار گرفت و در ۲۷ گله بعد از پایان

- Mousavi, F., and Galyanchi langeroudi, A. (2018). Molecular Characterization of a very Virulent Infectious Bursal Disease Virus from Iran Demonstrates its Similarity with Recent Isolates from the 11. Middle East. *Iran J Virol*, 12: 1-5
- Razmyar, J., and Peighambari, S.M. (2008). Rapid differentiation between very virulent and classical infection bursal disease viruses isolated in Iran by RT-PCR/REA. *Int J of Vet Res*. 2:111-117.
12. Singh, K.C.P., and Dhawedkar, R.G. (1992). Prevalence of Subclinical infection bursal disease and its significance in India. *Trop Anim Health Prod*, 24: 204-206
13. Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougald, L.R., Nair, V., Suarez, D.L. (2020). Disease of poultry. 14<sup>th</sup> edition, WILEY Blackwell, New Jersey, U. S. A, 258-259.
14. Tacken, M.G., Thomas, A.A., Peeters, BP., Rottier, P.J., Boot, H.J. (2004). VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch Virol*, 149: 2245-2260.
15. World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties). (2004). Chapter 2-1-7 Infection bursal disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6<sup>th</sup> d, OIE, Paris: 817-832.
- 16, Xu, A., Pei, Y., Zhang, K., Xue, J., Ruan, S. and Zhang, G., 2020. Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. *Virus research*, 276, p.197833.
- broilers Flocks in Saskatchewan, *Can J Compart Med*, 45: 26-33.
4. Dey, S., Pathak, D.C., Ramamurthy, N., Maity, H.K., Chellapa, M.M. (2019). Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med*, 10: 85-97.
5. Fan, L., Wu, L., Hussain, L., Gao, L., Zeng, X., Wang, Y., Gao, L., Li, K., Wang, Y., Liu, C., Cui, H., Pan, Q., Zhang, Y., Liu, Y., He, H., Wang, X., Xiaole, Qi., (2019). Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. *Vet Microbiol*, 230: 212-220.
6. Goodall, E. A., McIlroy, S. G., and McCracken, R. M. (1989). Economic effect of subclinical infection bursal disease on broiler production. *Avian Pathol*, 189: 465-480.
7. Homer, B.L., Butcher, G.D., Miles, R.D., and Rossi, A.F. (1992). Subclinical infection bursal disease in an integrated broiler production operation. *J Vet Diagn Invest*, 4: 406-411.
8. McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Conner, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., and Allan, G.M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*. 9: 395-404.
9. Michel, L.O., and Jackwood, D.J. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol* 162: 3661-3670.
10. Najafi, H., Hosseini, H., Kasaei, M., Aghaiyan, L., Ziafati, Z., Hajizamani, N., Rajeoni, A., Modiri Hamdan, A., Sadat

## **Investigation of the presence of infectious bursal disease virus in broiler chicken flocks without disease symptoms in Ahvaz city**

**Reza Taghipour<sup>1</sup> · Ramezan Ali Jafari<sup>\*2</sup> · Seyedeh Elham Rezatofighi<sup>\*\*3</sup> · Forough Talazadeh<sup>4</sup>**

1. Postgraduate student; Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran
2. Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz; Ahvaz; Iran
3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran
4. Associate Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz; Ahvaz; Iran

Received: 28 May 2023

Accepted: 6 September 2023

### **Abstract**

Infectious bursal disease (IBD) (Gumboro) is a contagious disease in immature chickens, which is caused by IBD virus. The disease is observed in three clinical forms of very virulent (VV), classical virulent (CV), and sub-clinical (SC). The VV and CV forms of the disease show specific signs; however, no specific clinical symptoms are observed in the SC form. Although SC infection does not cause any mortality, it leads to flock weighing disorder, suppression of the immune system, and failure to vaccinate against other diseases. The aim of this study was to investigate the presence of infectious bursal virus in broiler flocks without specific clinical signs of the disease. For this purpose, 344 bursal samples were collected from 30 broiler chicken flocks at the age of 10 to 20 days, to identify the VP2 gene of the IBDV by RT-PCR. At the end of the breeding period, 420 serum samples were taken from the studied flocks to investigate the presence of antibodies against IBDV. VP2 gene was detected in four flocks and also high antibody titer of IBDV was observed in 376 (10%) serum samples. According to the lack of vaccination in these flocks and the absence of clinical symptoms, it seems that sub-clinical strains of the virus are circulating in the region. Considering that the virus was not detected in some flocks with positive serum, it seems that the infection occurred at a time other than the time of sampling for RT-PCR and therefore, serological tests, including ELISA, can have a more accurate assessment of the possibility of virus circulation in an area. These results can determine the importance of vaccination against this virus in the region.

**Keywords: Infectious bursal disease virus, Gumboro, ELISA, RT-PCR**

\* Corresponding author: Ramezan Ali Jafari

Address: Department of Livestock, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran university of Ahvaz; Ahvaz; Iran

E. mail: jafari.ramzanali@scu.ac.ir

\*\* Corresponding author: Seyedeh Elham Rezatofighi

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

E. mail: e.tofighi@scu.ac.ir

## جداسازی، شناسایی و الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی اش‌ریشا کلی‌های جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز نسبت به پانزده آنتی‌بیوتیک

### رایج در صنعت طیور ایران

سیده ام‌البنین قاسمیان<sup>۱</sup>، حمید محمودی پور<sup>۲\*</sup>

۱- استادیار گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

۲- استادیار گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷

#### چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی و جداسازی سویه‌های اش‌ریشا کلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۳۰ جدایه اش‌ریشا کلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان بهبهان می‌باشد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی جدایه‌ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران با استفاده از روش انتشار از دیسک تعیین گردید. درصد مقاومت نسبت به دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتراسایکلین، اریتروماکسین، تیلوسین، تیمولین، داکسی‌سایکلین، فلورفنیکل، لینکوماکسین، دانوفلوکساسین، نتوماکسین، کلیستین، آمیکاسین و جنتاماگسین به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۶/۶، ۹۶/۶، ۹۶/۶، ۹۰، ۹۶/۶، ۷۶/۶۶، ۶۶/۶، ۶۳/۳۳، ۶۰، ۵۳/۳۳، ۲۶/۶۶، ۱۰ و ۰ گزارش شد. ۱۷ الگوی مقاومت دارویی در بین ۳۰ جدایه اش‌ریشا کلی نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک بر مصرف در صنعت طیور شناسایی گردید که ۲۶ جدایه (۸۶/۶۷٪) به بیش از یک الگو تعلق داشتند، در حالیکه ۴ جدایه دیگر (۱۳/۳۳٪) هر کدام فقط به یک الگو تعلق داشتند. از این مقاله نتیجه‌گیری شد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای رایج در صنعت طیور ایران بالاست که بر لزوم اجرای طرح پایش ملی برای مقاومت ضد میکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها تاکید می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اش‌ریشا کلی، جوجه‌های گوشتی، کلی‌باسیلوز

\*نویسنده مسئول: حمید محمودی پور

آدرس: گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

پست الکترونیکی: hamidmahmoudipoor@yahoo.com

## مقدمه

اشریشیاکلی یکی از شایع ترین پاتوژن های مسئول کلی باسیلوز موضعی یا سیستمیک در طیور است (Jassim and M Shareef, 2023). این پاتوژن در طیور باعث بیماری مزمن تنفسی، امفالیست، سینوویت، کولی گرانولوماتوز و سالپنژیت می شود که همگی به عنوان بیماری های ناشی از اشریشیاکلی بیماری زای پرندگان طبقه بندی می گردد (Nolan et al., 2013, (Panth, 2019).

بسیاری از داروهای ضد میکروبی در صنعت تولید طیور به منظور کاهش عوارض و مرگ و میر ناشی از کلی باسیلوز استفاده می شود، با این حال، استفاده بیش از حد از این آنتی بیوتیک ها به عنوان عوامل پیشگیری کننده و درمانی عفونت و همچنین تقویت کننده رشد در طیور، منجر به ظهور و انتقال ژن های مقاومت شده است (Sciberras et al., 2019).

فاکتورهای چسبندگی، سموم، فاکتورهای اکتساب آهن، لیپوپلی ساکاریدها، کپسول پلی ساکاریدی و عوامل دخیل در تهاجم، تنها تعدادی از عوامل بیماری زای موجود در اشریشیاکلی هستند (Sarowska et al., 2019). وجود برخی از عوامل ویروالانس اشریشیاکلی برای بیماری زایی آنها ضروری است. این عوامل ویروالانس به آنها قدرت ایجاد بیماری در پرندگان را می دهد (Oliveira et al., 2019) ثابت شده است که بسیاری از عوامل ویروالانس تأثیر مهمی در بیماری زایی اشریشیاکلی دارند (Rueter and Bielaszewska, 2020). تشخیص بیماری را می توان با ترکیبی از علائم بالینی، ویژگی های پاتولوژیک و همچنین جداسازی و شناسایی عامل ایجاد کننده انجام داد (Abalaka et al., 2017).

کلی باسیلوز به عنوان یکی از شایع ترین بیماری های تشخیص داده شده در صنعت تولید طیور، یکی از مشکلات کلیدی برای بهره وری صنعت تولید طیور می باشد. صنعت تولید طیور شهرستان بهبهان اخیراً تمهیداتی را در جهت توسعه سریع تجارت مرغ محلی، با توجه به نگرانی در خصوص بیماری های عفونی طیور مانند کلی باسیلوز، اندیشیده است. در همین راستا مطالعه حاضر تعیین شیوع، مقاومت باکتریولوژیکی و ضد میکروبی کلی باسیلوز در جوجه های گوشتی شهرستان بهبهان می باشد.

## مواد و روش ها

### جمع آوری نمونه

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از مهرماه ۱۴۰۱ الی اسفندماه ۱۴۰۱ در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان انجام شد. در این تحقیق، ۳۰ جدایه اشریشیاکلی از ۳۵ گله جوجه گوشتی با سن ۶-۲ هفتهگی از نقاط مختلف شهرستان بهبهان جداسازی شدند. نمونه گیری براساس جدول گرجسی مورگان صورت گرفت. از هر گله با علایم بالینی و جراحات کالبدگشایی مشکوک به بیماری به طور تصادفی تعداد ۵ جوجه انتخاب و بعد از کالبدگشایی و تشخیص اولیه بیماری، از کبد و قلب نمونه برداری به عمل آمد.

### جداسازی و تشخیص باکتری اشریشیاکلی

برای جداسازی و تشخیص باکتری اشریشیاکلی از روش کشت خطی از روش چهار مرحله ای (Quadrant Streak Pattern) استفاده شد. از هر پلیت مک کانکی، بیش از سه کلنی صاف لاکتوز مثبت اشریشیاکلی برداشته شد، سپس این تک کلنی به منظور ایجاد کشت خالص دوباره بر روی محیط مک کانکی کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷



جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز بر اساس توالی یابی ژن SrRNA ۱۶ در جدول ۳ نمایش داده شده است.

### آزمون آنتی بیوگرام

برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه نسبت به ۱۵ داروی پر مصرف در صنعت طیور ایران از روش کیفی انتشار از دیسک (Disk diffusion test) و به روش کربی بائر (Kirby-Bauer)، بر طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) سال ۲۰۰۶ استفاده گردید (MA, 2006). جهت انجام این تحقیق دیسکهای آنتی‌بیوتیک (غلظت بر حسب میکروگرم) کلیستین (۱۰)، دیفلوکساسین (۱۰)، دانوفلوکساسین (۱۰)، جنتامایسین (۱۰) و تیلوسین (۱۰)، انروفلوکساسین (۵)، متوپریم (۵)، لینکومایسین (۲۰۰/۱۵)، تری کلترتراسیکلین (۳۰)، اریترومایسین (۱۵)، فلورفنیکل (۳۰)، داکسی‌سیکلین (۳۰)، آمیکاسین (۳۰)، تیامولین (۳۰) و نئومایسین (۳۰) از شرکت پادتن طب ایران تهیه شد. برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد خارج و بر روی محیط کشت مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط کشت مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی تریپتیک سوی براث (TSB) با کدورت ۰/۵ مک فارلند انکوبه شدند. پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک‌فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سفره ای داده شد. پس از گذشت تقریباً ۱۰ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار دادند و

درجه سانتیگراد قرار گرفت. برای جداسازی باکتری اشریشیاکلی، جدایه‌ها از نظر مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی (تولید اندول، تخمیر گلوکز، تولید سولفید هیدروژن، مصرف سترات، دکربوکسیلاسیون اورنیتین، دکربوکسیلاسیون لیزین، تولید اوره و واکنش ووگس-پروسکوئر) بررسی شدند.

### مخلوط واکنش و سیکل‌های PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس شامل بافر PCR(X)، ۲MgCl<sub>۱</sub>، ۱/۲ میلی‌مول)، (۰/۰۸dNTPs میلی‌مول)، Taq DNA Polymerase (U، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت (۲۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۲۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر از الگو DNA (۱۵۰ نانوگرم) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. چرخه‌های حرارتی در PCR در سه مرحله واسرشت، طویل شدن و طویل شدن نهایی صورت گرفت

### تشخیص مولکولی اشریشیاکلی توسط PCR

در این مرحله، یک کلنی خالص باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله برای شوک سرمایی بر روی یخ قرار گرفت. سپس، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی جمع آوری و به عنوان الگوی DNA برای PCR استفاده گردید (شکل ۱) یک PCR اختصاصی ژن برای تکثیر SrRNA ۱۶ با استفاده از پرایمرهای منتشر شده قبلی انجام شد (Farhoumand et al., 2020). لیست پرایمر در جدول ۱ ارائه شده است. جدول ۲ شرایط دمایی PCR برای آمپلیفیکیشن ژن SrRNA ۱۶ را نشان می‌دهد (Moawad et al., 2022). همچنین، تایید شناسایی اشریشیاکلی‌های جدا شده از

### تحلیل آماری

داده های بدست آمده وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ گردید و با استفاده از آزمون مربع کای ۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده ها در سطح ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

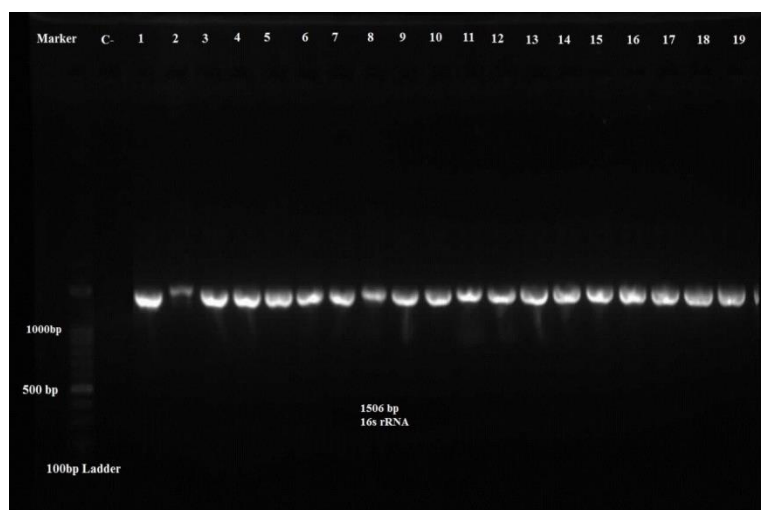
پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند ( Nolan et al., 2013, Seifi et al., 2015). سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک به وسیله کولیس اندازه گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی CLSI قرائت شد (شکل ۱).

جدول ۱. F=Forward, R=Reverse, bp=Base pair, PCR=Polymerase chain reaction

پرایمر	توالی	اندازه - (bp)
<i>E. coli</i> 16S (F)	5'- AATTGAAGAGTTTGATCATG-3'	۱۵۰۶
<i>E. coli</i> 16S (R)	5'- CTCTACGCATTTCCACCGCTAC-3'	

جدول ۲. شرایط دمایی PCR برای آمپلیفیکشن ژن 16S rRNA

دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	توضیح
۹۶	۶۰	واشرشت اولیه
۹۶	۱۵	واشرشت
۵۸	۶۰	هم سوشت
۷۲	۴۵	طویل شدن
۷۲	۶۰	طویل سازی نهایی



شکل ۱. ژل الکتروفورز جهت مشاهده ژن 16S rRNA اشریشیا کلی های جدا شده از نمونه‌ها: ستون اول سمت چپ مارکر ۱۰۰ جفت بازی یکتا تجهیز ژن. ستون C- نمونه کنترل منفی، ستون ۱ نمونه استاندارد (اشریشیا کلی) همراه با کد ATCC 25922 به اندازه ی ۱۵۰۶ جفت باز و ستون های با شماره ۲ تا ۱۹ نمونه های جدا شده می باشد.

جدول ۳. تایید شناسایی اشریشیا کلی های جدا شده از ازجوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز بر اساس توالی یابی

ژن 16S rRNA

کد دسترسی	نتیجه توالی	کد دسترسی	نتیجه توالی
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
CP021207.1	<i>E. coli</i> strain Z247	CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	CP020933.1	<i>E. coli</i> strain HB-COLI0
KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515
MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...	CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
CP021844.1	<i>E. coli</i> strain EC1515	KY617770.1	<i>E. coli</i> strain BDUMS-3 16S
MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...	MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...
CP021207.1	<i>E. coli</i> strain Z247	MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...
MF067514.1	<i>E. coli</i> strain EGE 104574-76...	CP021207.1	<i>E. coli</i> strain Z247

جدول ۴. تعداد و درصد جدایه های اشریشیا کلی حساس، حدواسط و مقاوم جدا شده از جوجه های گوشتی مبتلا به

کلی باسیلوز، نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران

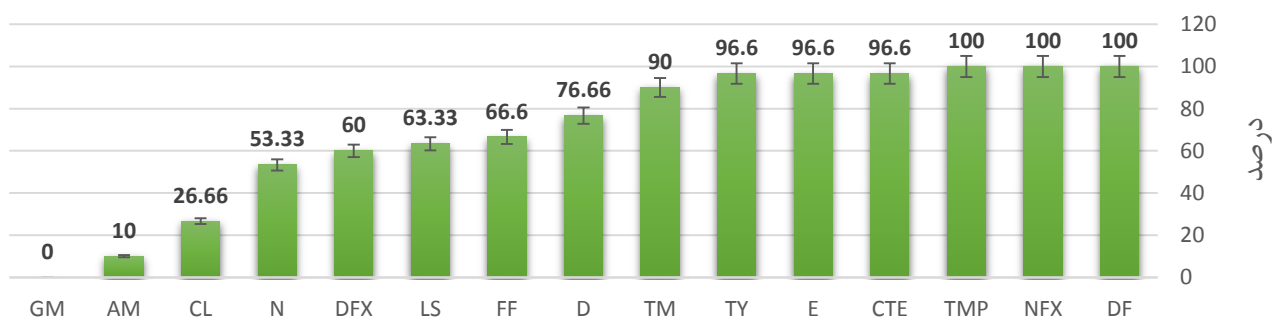
مقاوم تعداد (درصد)	حد واسط تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)	آنتی بیوتیک
(۲۶/۶۶)۸	(۰)۰	(۷۳/۳۳)۲۲	کلیستین
(۱۰۰)۳۰	(۰)۰	(۰)۰	دیفلوکساسین
(۱۰۰)۳۰	(۰)۰	(۰)۰	انزوفلوکساسین
(۶۳/۳۳)۱۹	(۰)۰	(۳۶/۶۷)۱۱	لینکومايسين
(۱۰۰)۳۰	(۰)۰	(۰)۰	تریمتوپریم
(۹۶/۶۷)۲۹	(۰)۰	(۳/۳۳)۱	کلر تتراسیکلین
(۹۶/۶۷)۲۹	(۰)۰	(۳/۳۳)۱	اریترومایسین
(۶۶/۶۷)۲۰	(۰)۰	(۳۳/۳۳)۱۰	فلورفنیکل
(۶۰)۱۸	(۲۶/۶۷)۸	(۱۳/۳۳)۴	دانوفلوکساسین
(۷۶/۶۷)۲۳	(۱۶/۶۶)۵	(۶/۶۷)۲	داکسی سیکلین
(۱۰)۳	(۱۳/۳۳)۴	(۷۶/۶۷)۲۳	آمیکاسین
(۹۰)۲۷	(۱۰)۳	(۰)۰	تیامولین
(۵۳/۳۳)۱۶	(۶/۶۷)۲	(۴۰)۱۲	نئومايسين
(۰)۰	(۶/۶۷)۲	(۹۳/۳۳)۲۸	جتنامايسين
(۹۶/۶۷)۲۹	(۳/۳۳)۱	(۰)۰	تیلوسین

دیفلوکساسین، انروفلوکساسین و تری متوپریم مقاومت دارویی بسیار بالایی (۱۰۰٪) را نشان دادند، در حالی که مقاومت این جدایه‌ها نسبت به ۱۲ ترکیب آنتی‌بیوتیک دیگر بین صفر تا ۹۶/۶ درصد متغیر بود (نمودار ۱ و ۲).

نتایج آزمایش انتشار از دیسک جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از جوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوزیس در نمودار شماره ۱ و ۲ آورده شده است. آزمون مربع کای نشان داد که تفاوت در میزان مقاومت و حساسیت جدایه ها نسبت به داروهای مورد بررسی معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در برابر دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتراسایکلین، اریترومايسين، تیلوسین و تیممالین بود. کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر جتتامایسین، آمیکاسین و کلیستین گزارش شد. در این نمودارها مشخص می شود که جدایه های اشریشیاکلی مورد بررسی، نسبت به سه آنتی‌بیوتیک

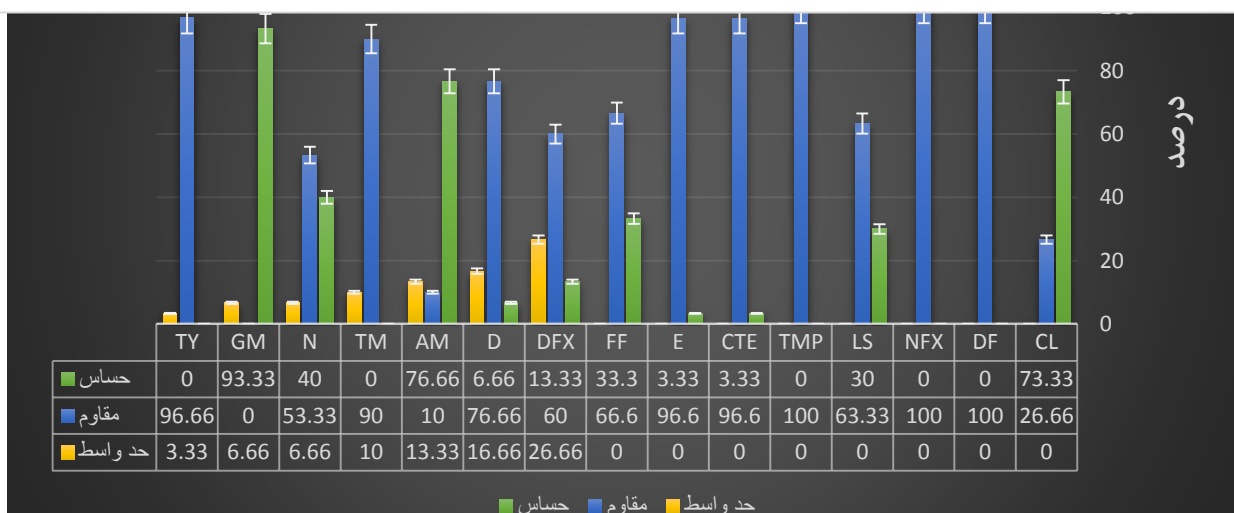
نمودار ۱. نمای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های جوجه های گوشتی ( $n=130$ ). کلیستین (CI)، دیفلوکساسین (DF)، انروفلوکساسین (NFX)، لینکومايسين (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتراسایکلین (CTE)، اریترومايسين (E)، فلورفنیکل (FF)، دانوفلوکساسین (DFX)، داکسی‌سیکلین (D)، آمیکاسین (AM)، تیممالین

### الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک ی ۳۰ سویه



### آنتی‌بیوتیک

■ درصد های سویه های مقاوم



(TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY).

نمودار ۲. نمای مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های اشیشیاکلی جدا شده از نمونه های جوجه های گوشتی (n=۳۰). کلیستین (CI)، دیفلوکساسین (DF)، انزوفلوکساسین (NFX)، لینکومایسین (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتراسیکلین (CTE)، اریترومایسین (E)، فلورفینیکل (FF)، دانوفلوکساسین (DFX)، داکسی سیکلین (D)، آمیکاسین (AM)، تیامولین (TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY).

آنتی بیوتیکی، ۱۳/۳ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره یک، ۱۰ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره دو، ۱۰ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره هفت، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره سه، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره چهار، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره شش، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره نه، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره دوازده و ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره سیزده بودند. مابقی جدایه ها در الگوهای مشترک شماره پنج، هشت، ده و یازده قرار گرفتند. بیشترین و کمترین فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به ترتیب ۱۳/۳ درصد و ۳/۳ درصد دیده شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). (جدول شماره ۵).

بررسی فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بین ۳۰ جدایه اشیشیاکلی از موارد کلی باسیلوز جوجه های گوشتی، نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک با مصرف رایج در صنعت طیور ایران نشان دهنده ی ۱۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بود. بطوری که ۲۶ جدایه (۸۶/۶۷ درصد) به ۱۳ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی (بیش از یک اشیشیاکلی در هر الگو) و ۴ جدایه دیگر (۳۳/۱۳ درصد) به ۴ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی (یک اشیشیاکلی در هر الگو) تعلق داشتند. تفاوت از نظر فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بین دو گروه (جدایه های بیش از یک اشیشیاکلی در هر الگو و جدایه های یک اشیشیاکلی در هر الگو) با یکدیگر معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). در بین ۱۳ الگوی مقاومت

جدول ۵. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه اش‌ریشیاکلی جدا شده از جوجه های گوشتی نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران

شماره الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک	تعداد ترکیبات ضد میکروبی	مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی	تعداد جدایه‌های اش‌ریشیاکلی متعلق به هر الگو (درصد)	شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی چند گانه (MAR Index)	درصد
۱	۱۰	AM, CTE, CL, D, DFX, DF, E, FF, NFX, TMP	۴ (۱۳/۳)	۰/۶۷	۶۷
۲	۱۰	AM, CTE, CL, D, DFX, DF, E, FF, NFX, TY	۳ (۱۰)	۰/۶۷	۸۶
۳	۹	CL, D, DFX, DF, E, FF, LS, NFX, TY	۲ (۶/۷)	۰/۶	
۴	۸	AM, CTE, CL, D, DFX, DF, LS, TM	۲ (۶/۷)	۰/۵۳	
۵	۷	CL, D, DFX, DF, LS, TM, TMP	۱ (۳/۳)	۰/۵	
۶	۷	AM, CTE, CL, D, DF, TM, TMP	۲ (۶/۷)	۰/۵	
۷	۶	AM, CTE, CL, D, DFX, DF	۳ (۱۰)	۰/۴۳	
۸	۶	AM, CTE, DFX, DF, LS, TMP	۱ (۳/۳)	۰/۴۳	
۹	۵	AM, CTE, D, DFX, DF	۲ (۶/۷)	۰/۳۶	
۱۰	۵	CL, E, FF, NFX, TY	۱ (۳/۳)	۰/۳۶	
۱۱	۴	AM, DF, NFX, TMP	۱ (۳/۳)	۰/۲۹	
۱۲	۴	LS, N, TM, TMP	۲ (۶/۷)	۰/۲۹	
۱۳	۳	DFX, NFX, TMP	۲ (۶/۷)	۰/۲۱	
۱۴-۱۷	متغیر	الگوهای انفرادی متنوع	۴ (۱۳/۳)	-	۳۳

کلستین (CI)، دیفلوکساسین (DF)، انزوفلوکسازین (NFX)، لینکومایسین (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتراسیکلین (CTE)، اریترومایسین (E)، فلورفیکل (FF)، دانوفلوکسازین (DFX)، داکسی‌سیکلین (D)، آمیکاسین (AM)، تیمولین (TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY)

اپیدمیولوژیک و بررسی های تکمیلی سرولوژیکی و ژنوتیپی در آینده استفاده گردد تا بتوان سیاست پیشگیری و درمانی مناسبی در منطقه اتخاذ نمود.

گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت سویه های پاتوژن اش‌ریشیاکلی نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال در حال افزایش است و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می باشد (Lambie et al., 2000, Salmon and )

## بحث

این مطالعه به منظور ارزیابی برخی از خصوصیات مهم سویه های پاتوژن اش‌ریشیاکلی در یکی از مناطق مهم پرورش صنعتی طیور گوشتی در ایران یعنی بهبهان انجام شد. روش کار به گونه ای برنامه ریزی شد تا بتوان از نتایج بدست آمده برای مطالعات

آینده‌ی نه چندان دور مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک ایجاد گردد (Salehi and Bonab, 2006). همچنین، ذاکری و کاشفی در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که ایزوله‌های APEC اشیشیاکلی جدا شده از طیور آلوده در تبریز میزان حساسیت بالایی نسبت به انروفلوکساسین (۷۷ درصد) داشتند (Zakeri and Kashefi, 2012).

در گزارشات مختلف، تفاوت‌هایی در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشیشیاکلی‌های پاتوژن طیور در برابر ترکیبات ضد میکروبی دیده شده است (Mohammadi et al., 2018, Rafiei and Nasirian, 2003). مطالعه حاضر نیز، بررسی فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه مورد بررسی، نسبت به ۱۵ ترکیب آنتی‌بیوتیک پر مصرف در صنعت طیور ایران، نشان دهنده ۱۷ الگو بود که ۱۳/۳۳ درصد جدایه‌ها از اشیشیاکلی‌های جدا شده، هر کدام تنها به یک الگو و ۸۶/۶۷ درصد جدایه‌ها از اشیشیاکلی‌های جدا شده، به بیش از یک الگو تعلق داشتند. یافته‌های بدست آمده از مطالعه حاضر در خصوص وجود ۱۷ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌های مورد بررسی، از برخی گزارش‌های پیشین کمتر است (Rafiei and Nasirian, 2003, Seifi et al., 2015). این موضوع بیانگر آن است که فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نواحی مختلف جغرافیایی و مقاطع زمانی متفاوت حتی در یک منطقه ممکن است متفاوت باشد. لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با توجه به الگوی مقاومت دارویی سایر مناطق و یا کشورها بدلیل قابل تغییر بودن مکان و زمان این الگوها امکان‌پذیر نیست. بنابراین آزمون حساسیت ضد میکروبی (آنتی‌بیوگرام) بایستی مستقلاً برای هر منطقه و یا حتی هر مرغداری قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها انجام گردد.

(Watts, 2000). مقایسه بین تفاوت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شهرهای مختلف شاید مقایسه‌ی مناسبی برای مصرف آنتی‌بیوتیک برای درمان این بیماری در یک منطقه نباشد. با استفاده از نتایج این تحقیق در کنار تحقیقات گذشته در یک منطقه، می‌توان روش درمانی مناسب برای درمان بیماری کلی باسیلوز با این آنتی‌بیوتیک‌ها جایگزین گردد. گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت سویه‌های پاتوژن اشیشیاکلی نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال در حال افزایش است و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می‌باشد (Lambie et al., 2000). در ایران در مطالعاتی که بر روی جدایه‌های اشیشیاکلی از نمونه‌های جوجه‌های گوشتی بیمار، در شیراز و تهران و دیگر شهرها به عمل آمده مشخص شده که میزان مقاومت جدایه‌ها به ترکیبات آنتی‌باکتریال، گسترده و بالا می‌باشد (Jahantigh et al., 2020b, Farhoumand et al., 2020, Rajaeian et al., 2003). در این مطالعه فراوانی مقاومت نسبتاً بالایی علیه آنتی‌بیوتیک‌های دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتراسایکلین، اریترومایسین، تیلوسین و تیمولین برای جدایه‌های طیور تعیین شد که می‌تواند ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در طیور باشد (Sanchez et al., 2020). زهرایی صالحی و همکاران، در سال ۲۰۰۶ در بررسی بر روی طیور مبتلا به کلی‌سپتیمی، به این نتیجه رسیدند که جدایه‌ها مقاومت بیش از ۹۴ درصد را علیه تتراسایکلین نشان دادند. در حالیکه هیچ مقاومتی نسبت به جنتامایسین دیده نشد و مقاومت به سفالوسپورین‌ها بسیار نادر بود، اما در این تحقیق حد واسطی از مقاومت نسبت به جنتامایسین (۶/۶۳ درصد) مشاهده گردید. بنابراین، ممکن است در



genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16, 1-6.

5. JASSIM, W. G. & M SHAREEF, A. 2023. Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated From Broiler Chickens with Colibacillosis in Duhok Province. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 54, 137-148.
6. LAMBIE, N., NGELEKA, M., BROWN, G. & RYAN, J. 2000. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. *Avian diseases*, 155-160.
7. MA, W. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *Clsi (Nccls)*, 26, M7-A7.
8. MOAWAD, A. A., HOTZEL, H., HAFEZ, H. M., RAMADAN, H., TOMASO, H., BRAUN, S. D., EHRLICH, R., DIEZEL, C., GARY, D. & ENGELMANN, I. 2022. Occurrence, phenotypic and molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy turkeys in Northern Egypt. *Antibiotics*, 11, 1075.
9. MOHAMMADI, V., GHANIEI, A. & SEPEHRNIA, P. 2018. Antimicrobial resistance profile and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, Northwestern Iran. *Bulgarian J. Vet. Med*, 21, 169-175.
10. NOLAN, L. K., BARNES, H. J., VAILLANCOURT, J.-P., ABDUL-AZIZ, T. & LOGUE, C. M. 2013. Colibacillosis. *Diseases of poultry*, 751-805.
11. OLIVEIRA, E., CARDOZO, M., BORZI, M. M., BORGES, C., GUASTALLI, E. & ÁVILA, F. 2019. Highly pathogenic and multidrug resistant avian pathogenic *Escherichia*

### نتیجه گیری نهایی

نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای رایج در صنعت طیور ایران بالاست که بر لزوم اجرای طرح پایش ملی برای مقاومت ضد میکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها تاکید می‌کند.

### منابع

1. ABALAKA, S., SANI, N., IDOKO, I., TENUCHE, O., OYELOWO, F., EJEH, S. & ENEM, S. 2017. Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 15, 95-102.
2. FARHOUMAND, P., HASSANZADAZARH., SOLTANPOUR, M. S., AMINZARE, M. & ABBASI, Z. 2020. Prevalence, genotyping and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in fresh beef and chicken meats marketed in Zanjan, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 12, 537.
3. JAHANTIGH, M., SAMADI, K., DIZAJI, R. E. & SALARI, S. 2020a. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC veterinary research*, 16, 1-6.
4. JAHANTIGH, M., SAMADI, K., DIZAJI, R. E. & SALARI, S. 2020b. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance

- A., COLLINS, C., DURAN-GONZALEZ, M., GIRAGOSSIAN, E., HORNSTRA, A., KAMEL, S. & MABEN, A. 2020. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from conventional, no antibiotics, and humane family owned retail broiler chicken meat. *Animals*, 10, 2217.
19. SAROWSKA, J., FUTOMAKOLOCH, B., JAMA-KMIECIK, A., FREJ-MADRZAK, M., KSIAZCZYK, M., BUGLAPLOSKONSKA, G. & CHOROSZYKROL, I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11, 1-16.
20. SCIBERRAS, M., PIPOVÁ, M., REGECOVÁ, I., JEVINOVA, P. & DEMJANOVÁ, S. 2019. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *FOLIA*, 63, 1-8.
21. SEIFI, S., KHOSHBAKHT, R. & ATABAK, A. 2015. Antibiotic susceptibility, serotyping and pathogenicity evaluation of avian *Escherichia coli* isolated from broilers in northern Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18.
22. ZAKERI, A. & KASHEFI, P. 2012. Antimicrobial susceptibilities of avian *Escherichia coli* isolates in Tabriz, Iran. *African Journal of Biotechnology*, 11, 4467-4470.
- coli* in free-range chickens from Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21.
12. PANTH, Y. 2019. Colibacillosis in poultry: A review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 2, 301-311.
13. RAFIEI, T. R. & NASIRIAN, A. 2003. Isolation, Identification and Antimicrobial Resistance Patterns of *E. Coli* Isolated From Chicken Flocks.
14. RAJAEIAN, H., FIROUZI, R., JALAEI, J. & HEYDARI, D. F. 2003. Antibiotic resistance of several common bacterial species isolated from chickens in Shiraz area.
15. RUETER, C. & BIELASZEWSKA, M. 2020. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 91.
16. SALEHI, T. Z. & BONAB, S. F. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *International Journal of Poultry Science*, 5, 677-684.
17. SALMON, S. A. & WATTS, J. L. 2000. Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults. *Avian diseases*, 85-98.
18. SANCHEZ, H. M., WHITENER, V. A., THULSIRAJ, V., AMUNDSON,

## **Isolation, identification, and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis against 15 common antibiotics in the Iranian poultry industry**

*Seyedeh Ommolbanin Ghasemian*<sup>1</sup>, *Hamid Mahmoodipour*<sup>2\*</sup>

1. Assistant Professor, Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

2. Assistant Professor, Department of Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

Received: 28 May 2023

Accepted: 8 October 2023

---

### **Abstract**

*The purpose of this research is to identify and isolate antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains and determine the antibiotic resistance pattern in 30 *Escherichia coli* isolates isolated from broiler chickens with colibacillosis in Behbahan city. The antibiotic resistance pattern of all isolates was determined against 15 important and common antibiotics in Iran's poultry industry using the disk diffusion method. The percentage of resistance to difloxacin, enrofloxacin, trimethoprim, chlortetracycline, erythromycin, tylosin, tiamulin, doxycycline, florfenicol, lincomycin, danofloxacin, neomycin, colistin, amikacin and gentamicin is 100, 100, 100, 96/6, 96/6, respectively. 96/6, 90, 76/66, 66/6, 63/33, 60, 53/33, 26/66, 10 and 0 were observed. 17 drug resistance patterns were identified among 30 *Escherichia coli* isolates to 15 commonly used antibiotics in the poultry industry, of which 26 isolates (86.67%) belonged to more than one pattern, while the other 4 isolates (13.33%) each belonged to only one pattern. The results of this study showed that the resistance of the isolates to the majority of commonly used drugs in Iran's poultry industry is high, which makes it necessary to implement a strong national monitoring plan for antimicrobial resistance and the principled use of antibiotics.*

**Keywords:** *antibiotic resistance, *Escherichia coli*, broilers, colibacillosis*

---

\*Corresponding author: hamidmahmoudipour

Address: Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan

Email: hamidmahmoudipour@yahoo.com

## جداسازی و تعیین حساسیت ضد میکروبی آרקوباکتر در شیر خام و فراورده های آن به روش کشت و PCR در استان اصفهان

اباذر لامعی<sup>۱</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>، امیر شاکریان<sup>۳</sup>، حسن ممتاز<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

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

۳- استاد مرکز تحقیقات تغذیه و فرآورده های ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۴- استاد گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸

### چکیده

آرکوباکترها عامل بیماری مشترک بین انسان و حیوانات هستند و از طریق آب و مواد غذایی منتقل می شوند تاکنون اطلاعات اندکی در خصوص مکانیسم های بیماری زایی آرکوباکترها منتشر شده است. بررسی حاضر با هدف بررسی دقیق مقاومت دارویی آرکوباکتر و شیوع آن در شیر خام و فراورده های آن در استان اصفهان انجام گرفت.

در این مطالعه تعداد ۳۵۰ نمونه شیر خام از ۵ گونه حیوان شامل گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش و ۴۰۰ نمونه از فراورده های شیر شامل پنیر، خامه، کره و بستنی سنتی به طور تصادفی از لبنیاتی های شهر اصفهان و اطراف اصفهان جمع آوری و در شرایط سترون به آزمایشگاه انتقال داده شدند جهت جداسازی باکتری از محیط CAMP (مرک-آلمان)، غنی شده با خون گوسفند دفیبرینه شده استفاده گردید سپس کلنی های مشکوک با استفاده از تست بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شدند و از تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) جهت تأیید آرکوباکترها استفاده شد. همچنین در این مطالعه به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسکی طبق معیار CLSI (۲۰۱۷) استفاده گردید.

یافته ها نشان داد از مجموع ۷۵۰ نمونه بررسی شده، ۱۸ نمونه (۲/۴٪) به یکی از گونه های آرکوباکتر آلوده بودند. که این ۱۸ مورد فقط از شیر خام یافت شد و هیچ کدام از فراورده های شیر به این باکتری آلوده نبودند، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک نیز مربوط به آمپیسیلین، آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید، سفالوتین، سفوتاکسیم و تتراسایکلین مشاهده گردید. از این مقاله نتیجه گیری شد بیشترین مقاومت دارویی مربوط به سفالوتین، آمپیسیلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به جنتامایسین و اریترومایسین می باشد.

**واژه های کلیدی: آרקوباکتر، شیر خام، مقاومت آنتی بیوتیک-PCR**

\*نویسنده مسئول: ابراهیم رحیمی

آدرس: گروه دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران  
پست الکترونیکی: ebrahimrahimi55@yahoo.com

## مقدمه

Kopilović et al, 2008; Hayath Kownhar et al, 2007; Abdelbaqi et al, 2007; Ho et al, 2006)

محصولات غذایی با منشاء حیوانی به عنوان یک مسیر انتقال بالقوه مهم آرکوباکتر می باشند ( Forsythe and Arcobacter 2006; Korolik and Ketley 2006; Arias et al, 2011) مطالعه‌ای در تایلند گزارش داده است که ۱۳ درصد وعده‌های غذایی که در برخی رستوران‌های بانکوک سرو می‌شود، آلوده به آرکوباکتر بوتزلری است (ICoMSfF 2010). مطالعات انجام شده روی غذاها نشان داده است که آرکوباکتر بوتزلری شایع ترین گونه بعد از آرکوباکتر کری ائروفیلوس و آرکوباکتر اسکیرووی است. این امر دلیلی برای درج نام آرکوباکتر بوتزلری در لیست میکروب های با خطر بالا برای سلامت انسان ها است که از سوی کمیسیون بین المللی ویژگی های میکروبی مواد غذایی مطرح شده است ( Collado González 2010). مطالعه ای بر روی محصولات دریایی نشان داد که ۱۰۰ درصد صدف ها و ۴۱٫۱ درصد از سایر نمونه ها دارای شیوع بالا و تنوع گسترده ای از گونه های آرکوباکتر بودند (Collado 2009). اکثر موارد آنتریت و باکتری می ناشی از آرکوباکتر مانند کمپیلوباکتر، خود محدود شونده به نظر می رسد و نیازی به درمان ضد میکروبی ندارد. اما درمان آنتی بیوتیکی برای بیماران مبتلا به تب بالا، اسهال خونی، نقص سیستم ایمنی و افرادی که علائم شدید دارند توصیه می شود ( Liu 2009; Yan 2000).

تست وسترن بالت نشان می دهد که سویه های آرکوباکتر بوتزلری توانایی چسبندگی مولکولی به سلول های گلبول های قرمز انسان و خرگوش و هماگلوتین را دارا هستند. سویه های آرکوباکتر باعث القای یک پاسخ التهابی می شود که به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی در این گونه و همچنین

جنس آرکوباکتر متعلق به خانواده کمپیلیو باکتریاسه است و در حال حاضر شامل بیست و شش گونه از آن یافت شده است. باکتری های متعلق به این جنس در همه جا وجود دارند و حیوانات می توانند گونه های آرکوباکتر را جابه جا و منتقل کنند ( Collado et al, 2011; Giacometti et al, 2013). گونه های آرکوباکتر به عنوان یک پاتوژن در حال ظهور مشترک بین انسان و دام و یک خطر جدی برای سلامت انسان شناخته شده اند ( Arias et al, 2011; Ramees et al, 2002; ICoMSfF, I.C.M.S.F., 2017). در خط تولید فراورده های لبنی، گونه های آرکوباکتر از منابع مختلفی مانند مدفوع، فیلترهای شیر درون خطی، شیر مخزن فله، پنیرها و سطوح فرآوری جدا شده اند (Giacometti et al, 2013).

آرکوباکترها عمدتاً از طریق مواد غذایی آلوده و منابع آبی که ممکن است از طریق فاضلاب آلوده شوند، منتقل می شوند. گزارش های متعددی در مورد وجود آرکوباکتر در آب به عنوان یک منبع موثر عفونت وجود دارد (Teague et al, 2010; Jacob 1993). مصرف مواد غذایی آلوده و آب آلوده عامل انتقال این باکتری به انسان و همچنین حیوانات می باشد. از این رو گونه های آرکوباکتر را به عنوان پاتوژن مشترک بین انسان و حیوان در نظر می گیرند ( Wang et al, 2014; Figueras et al, 2008).

عفونت آرکوباکتر در انسان به طور عمده در بیماران مبتلا به بیماری های مزمن، افراد مسن و کودکان شناسایی شده اند. اسهال مرتبط با آرکوباکتر بوتزلری مداوم تر، آبکی و بدون علامت است اما نسبت به کمپیلوباکتر ژژونی که اسهال حاد تری می دهد ضعیف تر است ( Lau et al, 200; Jiang et al, 2010).



تری متوپریم ۱ میلیگرم/میل لیتر بود، کشت صورت گرفت. سپس محیط های کشت در داخل انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ۲۴-۷۲ ساعت قرار داده شد. پس از دوره زمانی گرمخانه گذاری پلیت ها جهت شناسایی آرکوباکترها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر روی محیط کشت پایه، کلنی باکتری به شکل محدب، صاف، شفاف، بدون رنگ تا کرم به اندازه ۲-۴ میلیمتر بعنوان کلنی مشکوک به آرکوباکتر در نظر گرفته شد. این کلنی ها جهت شناسایی اولیه آرکوباکترها مورد آزمایشات میکروبی مانند رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قند گلوکز و حرکت قرار گرفتند. با مشاهده باسیل های خمیده گرم منفی، متحرک، اکسیداز مثبت و منفی شدن تست تخمیر قند گلوکز، می توان تا حدود بسیار زیادی به جداسازی و شناسایی جنس آرکوباکتر مطمئن شد سپس در مرحله بعد از تستهای فنوتیپی معرفی شده به وسیله آتابای و کوری (۱۹۹۸) که شامل تستهای تولید اوره آز، رشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط میکروآنروفلیک و رشد در مک کانگی آگار بود، استفاده گردید (Atabay and Corry 1998).

### تایید و تشخیص آرکوباکتر به روش PCR

برای انجام PCR، ابتدا با استفاده از کیت (شرکت کیاژن ساخت ایران) استخراج DNA از کلنی ها طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد سپس به منظور اجرای روند، پرایمر های فوروارد و ریورس برای شناسایی ژن *Stx2A* استفاده گردید که این ناحیه ژنی در تمام گونه های آرکوباکتر وجود دارد (جدول ۱) جهت انجام فرایند پلیمریزاسیون دستگاه ترمال سایکلر به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد جهت دناتوراسیون اولیه قرار داده شد. سپس ۳۵ سیکل

در گونه های کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر است گونه های آرکوباکتر مانند کمپیلوباکتر و سایر عوامل بیماری زا وارد شده، توانایی چسبیدن به سلول های اپیتلیال روده ای (MPI ۲) و آغاز پاسخ التهابی به وسیله القای تولید اینترولوکین (IL ۸) را دارا هستند (Ferreira et al, 2016).

با توجه به قدرت بالای بیماری زایی آرکوباکتر بر آن شدیم که میزان شیوع این باکتری و حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های رایج را در شیر و فراورده های آن بررسی کنیم.

### مواد و روش ها

در این مطالعه برای تشخیص آرکوباکتر، تعداد ۳۵۰ نمونه شیر خام از ۵ گونه حیوان شامل گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش و ۴۰۰ نمونه از فراورده های شیر شامل پنیر، خامه، کره و بستنی سنتی به طور تصادفی از لبنیات های شهر اصفهان و اطراف اصفهان در ظروف سترون نمونه گیری و طی کوتاه ترین زمان به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد انتقال داده شد.

### کشت و جداسازی باکتری

ابتدا نمونه ها به لوله های حاوی محیط کشت پرستون انتقال داده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر از باکتریهای رشد یافته با کمک لوپ استریل بر روی محیط CAMP (مرک-آلمان)، غنی شده با خون گوسفند دفیبرینه شده که حاوی آنتی بیوتیکهایی مانند ونکومايسين ۲ میلیگرم/میلیلیتر، پلی میکسین ۰/۰۵ میلیگرم/میلیلیتر،



تمام آنتی بیوتیک ها از شرکت پادتن طب (ساخت ایران) تهیه شدند.

### نتایج

در مجموع ۷۵۰ نمونه شیر خام و فراورده های شیر شامل تعداد ۱۲۰ نمونه مربوط به شیر خام گاو، ۶۰ نمونه شیر خام گوسفند، ۱۰۰ نمونه شیر خام بز، ۳۲ نمونه مربوط به شیر خام گاو میش، ۳۸ نمونه مربوط به شیر خام شتر، ۴۰۰ نمونه از فراورده های خام دامی شامل پنیر سنتی، کره سنتی، بستنی سنتی و خامه (۱۰۰ نمونه از هر کدام) جمع آوری گردید. طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه هیچ یک از فراورده های شیر به آرکوباکترها آلوده نبودند. همچنین تمام نمونه های شیر خام بجز شیر شتر به آرکوباکتر آلوده بودند، در این مطالعه از ۱۸ نمونه درگیر به آرکوباکتر ۱۵ نمونه مربوط به گونه آرکوباکتر بوتزلری و ۳ نمونه مربوط به گونه آرکوباکتر کری ائروفیلوس شناسایی شد. شیر خام گاو دارای بیشترین آلودگی به آرکوباکتر نسبت به بقیه نمونه ها بود در ادامه نتایج این تحقیق نشان داده شد که آرکوباکتر بوتزلری در همه نمونه های شیر خام آلوده وجود داشت ولی آرکوباکتر کری ائروفیلوس فقط در شیر خام گاو و گوسفند یافت شد. (جدول ۲) نتایج حاصل از بررسی میزان حساسیت با آنتی بیوتیک های استفاده شده نشان داد که تمام آرکوباکتر بوتزلری جدا شده از شیر به آمپیسیلین و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند و حداقل یک ایزوله از شیر خام گاو به هر آنتی بیوتیک آزمایش شده مقاوم بود. همچنین آنالیز نتایج نشان داد که تمام جدایه های آرکوباکتر بوتزلری از شیر خام گوسفند و بز به آنتی بیوتیک سفالوتین مقاوم بودند.

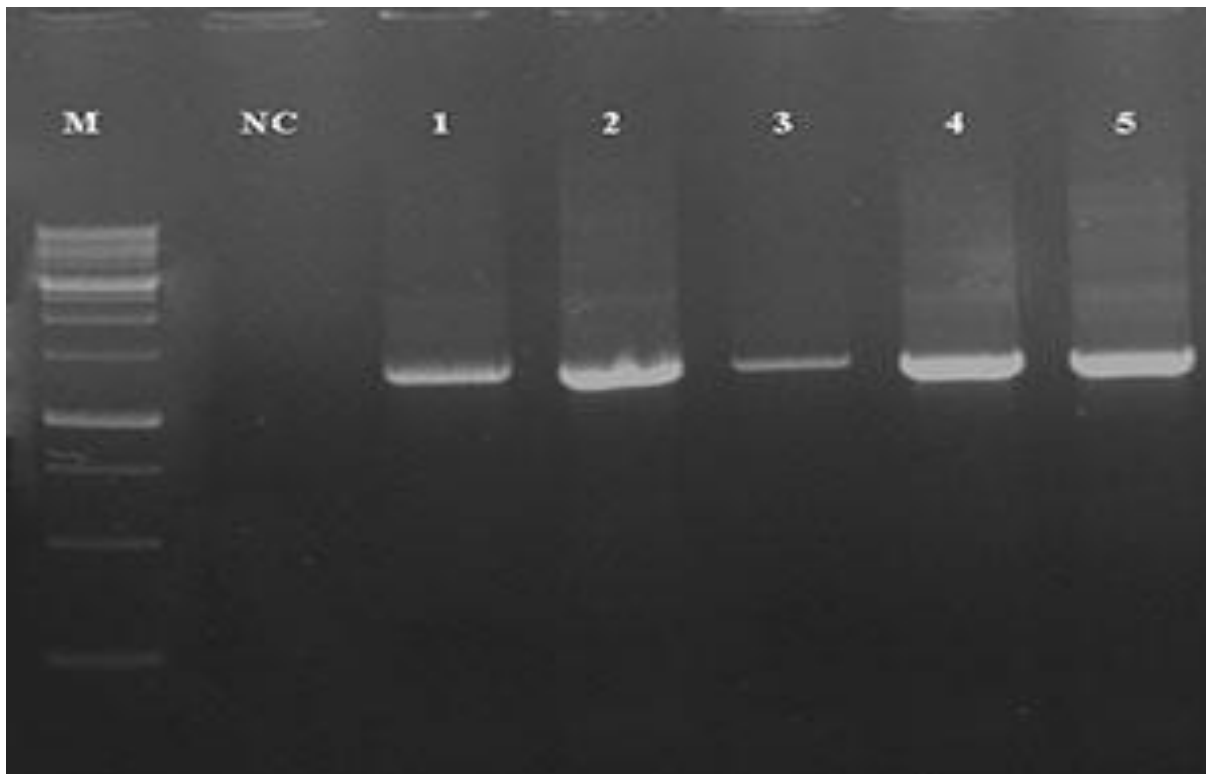
PCR شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه انجام شد. در خاتمه به مدت ۱۰ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. روش آزمون و برنامه حرارتی اعمال شده مطابق دستورالعمل Son و همکاران (۲۰۰۷) اعمال و جهت ردیابی محصول مورد نظر از ژل ۱/۵ درصد آگاروز استفاده گردید. به این صورت که پس از قرار دادن ژل در داخل تانک الکتروفورز، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA تکثیر یافته به همراه ۵/۰ میکرولیتر ژل رد داخل هر یک از چاهک های تعبیه شده در ژل آگاروز منتقل گردید. سپس ولتاژ بر روی ۱۰۰-۱۱۰ ولت تنظیم نموده و ۳۰ الی ۴۰ دقیقه زمان در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان فوق، ژل به درون دستگاه UV ترانس لومیناتور منتقل گردید تا باندهای تشکیل شده مشاهده گردد (شکل ۱) (Son et al, 2007).

### ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیک

به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسکی طبق معیار CLSI (۲۰۱۷) استفاده شد. ایزوله های جدا شده به روش متراکم در محیط مولر هینتون آگار واجد ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت و مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها در حضور دیسک های آنتی بیوتیکی شامل اریترومايسن (۱۵ میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین (۵۳ میکرو گرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکرو گرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکرو گرم)، جنتامایسین (۳۰ میکرو گرم)، آموکسی سیلین (۲۰/۱۰)، آمپی سیلین (۱۰ میلی گرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکرو گرم)، سفالوتین (۳۰ میکرو گرم) ارزیابی گردید.

جدول ۱: توالی ها

TTCGCTTGCGCTGCATCAT	Arcobacter 1
AGCGTTCTATTCAGCGTAGAAGATGT	A.butzleri 2
ACCGAAGCTTTAGATTCGAATTTATTCA	A.cryaerophilus 3



شکل ۱: تصویر الکتروفورز برای ردیابی آرکوباکتر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد M خط کش مولکولی ، ۱،۲،۳،۴،۵ نمونه های آرکوباکتر جدا شده ، C کنترل منفی

جدول ۲: نتایج مربوط به شیوع آرکوباکتر در شیر و فراورده های آن

نوع نمونه	تعداد نمونه	نمونه مثبت	آرکوباکتر بوتزلری	آرکوباکتر کری ائروفیلوس
شیر خام گاو	120	9(11%) / 16(13%)	9(81/8%)	2(18/18%)
شیر خام بز	100	2(2%)	2(100%)	0
شیر خام گوسفند	60	3(5%)	2(66/6%)	1(33/3%)
شیر خام گاومیش	32	2(6/2%)	2(100%)	0
شیر خام شتر	38	0	0	0
جمع	350	18(2/4%)	15(83/3%)	3(16/6%)

جدول ۳: نتایج مربوط به مقاومت دارویی در سویه آرکوباکتر بوتزلری

سپروفلوکساسین	اریترومايسين	تتراسایکلین	اسید فالیسیکسیک	سفتو تاکسیم	سفالوتین	آموکسیسیلین	آمپیسیلین	استرپتومايسين	جنتامايسين	
1(11%) )	1(11%) )	9(100%) )	6(6/66%) )	7(7/77%) )	7(7/77%) )	8(8/8%) )	9(100%) )	2(22%) )	1(11%) )	شیر خام گاو (9)
1(50%) )	1(50%) )	2(100%) )	2(100%)	-	2(100%)	1(50%)	2(100%) )	1(50%) )	-	شیر خام بز (2)
1(50%) )	-	2(100%) )	1(50%)	-	2(100%)	1(50%)	2(100%) )	-	-	شیر خام گوسفند (2)
-	-	2(100%) )	-	-	1(50%)	-	2(100%) )	-	-	شیر خام گاومیش (2)

جدول ۴: نتایج مربوط به مقاومت دارویی در سویه آرکوباکتر کری ائروفیلوس

سپروفلوکساسین	اریترومايسين	تتراسایکلین	اسید فالیسیکسیک	سفتو تاکسیم	سفالوتین	آموکسیسیلین	آمپیسیلین	استرپتومايسين	جنتامايسين	
-	-	2	1	2	2	2	1	-	-	شیر خام گاو (2)
-	-	1	1	-	1	-	1	-	-	شیر خام گوسفند (1)

اریترومايسين و سپروفلوکساسین حساس می باشد همچنین نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که تمام جدایه

مطابق جدول ۴ آنالیز نتایج نشان داد که باکتری کری ائروفیلوس شیر به جنتامايسين، استرپتومايسين،

های شیر خام گاو به آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید، سفالوتین، سفوتاکسیم و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند. نتایج آزمون حساسیت و مقاومت در جدایه شیر خام گوسفند نیز نشان داد که آروکوباکتر کری ائروفیلوس به آمپی سیلین، سفالوتین، نالیدیکسیک اسید و تتراسایکلین مقاومت بوده و آنتی بیوتیک های فوق فاقد کارایی لازم می باشند.

### بحث و نتیجه گیری

عوامل بیماریزا با منشأ مواد غذایی می توانند در هر زمان وارد زنجیره غذایی شوند سالانه میلیونها نفر در سراسر جهان از بیماریهای ناشی از مواد غذایی رنج می برند و این موضوع در کشورهای در حال توسعه باعث ایجاد فشار اجتماعی و اقتصادی شده است حتی در کشورهای پیشرفته مانند ایالات متحده، سالانه حدود ۴۸ میلیون مورد بیماری ناشی از غذا گزارش می شود این امر منجر به تلاش های علمی و سیاسی بسیاری برای حل این مشکل شده است یکی از عوامل بیماری زای این نگرانی متعلق به آروکوباکتر بوتزلری می باشد (Ferreira et al, 2016; Giacometti et al, 2013). آروکوباکترها باکتری گرم منفی و فاقد اسپور هستند و اولین بار در سال ۱۹۷۷ از جنین سقط شده گاو با استفاده از محیط کشت لپتوسپیرا جدا گردیدند گونه مهم این جنس شامل: آروکوباکتر بوتزلری، آروکوباکتر کری ائروفیلوس، آروکوباکتر اسکیرووی و آروکوباکتر نیترو فیژیلوس می باشد گونه معروف و بیماری زای آن در انسان آروکوباکتر بوتزلری می باشد که به عنوان خطرناک ترین گونه برای سلامت انسان از سوی کمیسیون شاخص های میکروبیولوژی مواد غذایی (ICMSF) و اخیرا به عنوان پاتوژن مهم

زنونوتیک شناسایی و معرفی شده است تاکنون اطلاعات اندکی در خصوص مکانیسم های بیماری زایی آروکوباکترها منتشر شده است این باکتریها همچنین بصورت فرصت طلب در افراد با ضعف ایمنی می توانند بیماریهای شدید به وجود آورند (Wilson et al 2000; Greisen et al 1994). مطالعه که توسط Lehner و همکارانش در سال (۲۰۰۵) در مورد مواد غذایی انجام شد نشان داد که آروکوباکتر بوتزلری شایع ترین گونه بعد از آروکوباکتر کری ائروفیلوس و آروکوباکتر اسکیرووی است این موضوع دلیلی برای اضافه کردن نام آروکوباکتر بوتزلری در لیست میکروب های با خطر بالا برای سلامت انسان است که توسط کمیسیون بین المللی ویژگی های میکروبی مواد غذایی مطرح شده است. در مطالعه دیگری که توسط Houf و همکاران در سال (۲۰۰۴) انجام شد نشان داده شد که آروکوباکتر می تواند در آب و غذاهایی مانند گوشت مرغ، ماهی و سبزیجات تازه یافت شود. همچنین، آنها نشان دادند که برخی از سویه های آروکوباکتر می توانند مقاومت در برابر ضد عفونی کننده های معمولی را داشته باشند و در محیط به زندگی ادامه دهند (Houf et al, 2004). در مطالعه دیگری که توسط Rahimi و همکاران در سال (۲۰۱۱) در ایران انجام شد نشان داده شد که در شیر و فراورده های شیر میزان آلودگی آروکوباکتر بین ۲/۵ تا ۲۵٪ بود. در یک مطالعه دیگر در ایتالیا که توسط Shah و همکاران در سال (۲۰۱۱) انجام شد نشان داده شد که میزان آلودگی آروکوباکتر در شیر و فراورده های آن به ترتیب ۱۷/۴ و ۹/۳٪ بود. در مطالعه دیگری که توسط Lenzen و همکاران در سال (۲۰۱۶) انجام گرفت نشان داده شد که بیشترین شیوع آروکوباکتر در محصولات لبنی مربوط به شیر گاو و گوسفند است که با مطالعات ما همخوانی و مطابقت

می تواند منجر به افزایش تعداد باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و انتقال آنها از دام به انسان و بقایای دارویی در شیر شود هر چند در مورد آروکوباکترها اطلاعات اندکی در مورد مقاومت دارویی وجود دارد با توجه به مطالعه ما، می توان از آنتی بیوتیک های جنتامایسین و اریترومایسین به عنوان خط اول درمان برای عفونت های ناشی از آروکوباکتر بوتزلری و کری آتروفیلوس استفاده کرد. همچنین مطالعه ما نشان داد که آروکوباکتر بوتزلری موجود در شیر گاو ۱۰۰٪ مقاومت نسبت به آمپی سیلین و تتراسایکلین دارد. این نتایج نشان می دهد که استفاده تنها از این دو آنتی بیوتیک برای کنترل بیماری کافی نیست. و استفاده مناسب و صحیح از آنتی بیوتیک ها در زنجیره غذایی بسیار اهمیت دارد تا جلوی افزایش مقاومت در باکتری ها گرفته شود این مورد با مطالعه Elmalی در سال (۲۰۱۷) که تتراسایکلین را به عنوان آنتی بیوتیک موثرتر تشخیص دادند، مطابقت ندارد. تحقیقات انجام شده توسط Rahimi و همکاران در سال (۲۰۱۱) نیز نشان داد که تفاوت ها در الگوهای حساسیت می تواند به دلیل فراوانی داروها در حیوانات برای درمان و یا پیشگیری و عدم استانداردسازی تست های حساسیت ضد میکروبی آروکوباکتر باشد. مطابق مطالعه ما Collado و همکاران در سال (۲۰۱۱) نشان دادند که آروکوباکتر در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها حساسیت نشان می دهد، اما مقاومت در برابر آنتی بیوتیک هایی مانند تتراسایکلین، کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین نیز مشاهده شده است. مطالعه دیگری که توسط Vidall و همکاران در سال (۲۰۲۱) انجام شد نشان داد که تمام سویه های آروکوباکتر به چهار آنتی بیوتیک ارزیابی شده از جمله اریترومایسین و سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و جنتامایسین حساس بودند (Vidal-

دارد نتایج مطالعه ما نشان داد که آروکوباکتر در تمام نمونه های شیر خام به جز شیر شتر یافت شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه های شیر خام گاو بود و حدود ۱۶٫۹ درصد را شامل می شد. همچنین، شیر خام شتر به دلیل حضور لاکتوفرین، لیزوزیم و پراکسید، دارای خواص ضد باکتریایی و ضد ویروسی بالایی است این ترکیبات می توانند باکتری های گرم مثبت و منفی را سرکوب کنند. علاوه بر این، محتویات ترکیبات ضد باکتریال در شیر شتر بیشتر از شیر گاو است که می تواند یکی از دلایل یافت نشدن آروکوباکتر در شیر شتر باشد. مطابق مطالعه ما Goojani و همکاران در سال (۲۰۲۲) نیز هیچ گونه آروکوباکتر را در شیر شتر پیدا نکردند. بر اساس مطالعه ما، آروکوباکتر کری آتروفیلوس نیز در شیر خام گاو و گوسفند جداسازی شد و این نشان می دهد که ممکن است بعد از آروکوباکتر بوتزلری، آروکوباکتر کری آتروفیلوس رایج ترین گونه آروکوباکتر در شیر باشد (Goojani et al, 2022). در مطالعه دیگری که توسط Serraino و Giacometti در سال (۲۰۱۳) و (۲۰۱۴) انجام شد نشان داده شد که آروکوباکتر بوتزلری و به دنبال آن آروکوباکتر کری آتروفیلوس رایج ترین گونه های موجود در شیر و محصولات لبنی هستند. انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب در درمان عفونت آروکوباکتر نقش مهمی در کنترل این باکتری ایفا می کند. در مطالعه که توسط Hoof و همکاران در سال (۲۰۰۴) انجام شد نشان داده شد که تعیین الگوهای مقاومت ضد میکروبی برای انتخاب بهتر آنتی بیوتیک به عنوان درمان اولیه عفونت آروکوباکتر حیاتی است. استفاده صحیح و مناسب از آنتی بیوتیک ها در درمان بیماری های عفونی در دام ها بسیار حائز اهمیت است؛ در عوض، استفاده نادرست و بی رویه از آنتی بیوتیک ها

مقاومت در باکتری‌ها گرفته شود و کنترل بیماری‌ها حفظ شود. در نهایت، با توجه به اینکه مصرف شیر به عنوان یک ماده غذایی حیاتی برای بدن انسان است، استفاده از شیر غیر پاستوریزه و یا آنتی‌بیوتیک‌هایی که به آرکوباکتر مقاومت نشان داده اند، باید با احتیاط مصرف گردد.

(Veuthey et al, 2021). به طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آرکوباکترها می‌تواند وجود داشته باشد و استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنجیره غذایی می‌تواند منجر به افزایش مقاومت در این باکتری‌ها شود. بنابراین، ضرورت استفاده متناسب و صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنجیره غذایی بسیار مهم است تا جلوی افزایش

### نتیجه گیری نهایی

مصرف مستقیم شیر خام ممکن است انسان را در معرض عوامل خطرناک مشترک بین انسان و دام مانند گونه‌های آرکوباکتر قرار دهد. پاستوریزه و استریل کردن شیر قبل از تبدیل به محصولات لبنی می‌تواند تا حدود زیادی از گسترش این باکتری در این محصولات بکاهد مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان شیوع مربوط به شیر خام گاو (۹/۱۶٪) و گوسفند (۵٪) بود در مجموع، بیشترین مقاومت دارویی مربوط به سفالوتین، آمپیسیلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به جنتامایسین و اریترومایسین می‌باشد. تست حساسیت ضد میکروبی در این مطالعه نشان داد که مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خط اول مورد استفاده در بالینی و دامپزشکی افزایش یافته است بنابراین، هنگام کنترل آلودگی آرکوباکتر و همچنین درمان عفونت‌های ناشی از گونه‌های آرکوباکتر در حیوانات و انسان، باید به این نتایج توجه کرد. همچنین توصیه می‌شود این مطالعه در سایر نقاط کشور اجرا تا میزان آلودگی در کشور تخمین زده شود.

### منابع

1. fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. \*Journal of Clinical Microbiology\*, 45(9), pp.3015-3021.
2. Arias M.L., Cid A. and Fernández H., 2011. *Arcobacter butzleri*: first isolation report from chicken carcasses in Costa Rica. \*Brazilian Journal of Microbiology\*, 42:703-706.
3. Atabay, H.I. and Corry, J.E.L., 1998. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. \*Journal of Applied Microbiology\*, 84(6), pp.1007-1016.
4. Collado González, L.R., 2010. Taxonomy and epidemiology.
5. Collado, L. and Figueras, M.J., 2011. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. \*Clinical Microbiology Reviews\*, 24(1), pp.174-192.
6. Collado L. Guarro J. and Figueras M.J., 2009. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. \*Journal of Food Protection\*, 72(5), pp.1102-1106.
7. Elmali, M. and Can, H.Y., 2017. Occurrence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species in food and slaughterhouse samples. \*Food Science and Technology (Campinas)\*, 37(2), pp.280-285.
8. Ferreira, S., Queiroz, J.A., Oleastro, M. and Domingues, F.C., 2016. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: a review. \*Critical Reviews in Microbiology\*, 42(3), pp.364-383.

1. Abdelbaqi, K., Buissonniere, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F. and Ménard, A., 2007. Development of a real-time



- Clinical Microbiology\*, 32(2), pp.335-351.
16. Hayath Kownhar, H.K., Shankar, E.M., Ramachandran Rajan, R.R., Appasamy Vengatesan, A.V. and Rao, U.A., 2007. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in southern India.
  17. Ho, H.T., Lipman, L.J.A. and Gaastra, W., 2006. *Arcobacter*: what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! \*Veterinary Microbiology\*, 115(1-3), pp.1-3.
  18. Houf, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.P., Hoof, J.V. and Vandamme, P., 2004. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. \*Microbial Drug Resistance\*, 10(3), pp.243-247.
  19. ICoMSfF ; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICoMSfF), 2002. \*Microorganisms in Foods 7–Microbiological Testing in Food Safety Management\*. Kluwer Academic Plenum, New York, NY.
  20. Jacob, J.E., Lior, H.E. and Feuerpfel, I.R., 1993. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. \*Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin\*, 193(6), pp.557-562.
  21. Jiang, Z.D., DuPont, H.L., Brown, E.L., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S. and Chen, J.J., 2010. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. \*Journal of Clinical Microbiology\*, 48(4), pp.1417-1419.
  9. Figueras, M.J., Collado, L. and Guarro, J., 2008. A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. \*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease\*, 62(1), pp.11-15.
  10. Forsythe, S.J., 2006. *Arcobacter*, pp.181–221 in *Emerging foodborne pathogens*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
  11. Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R.G. and Serraino, A., 2013. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy. \*Applied and Environmental Microbiology\*, 79(21), pp.6665-6669.
  12. Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D., Bonfante, E., Zanoni, R.G. and Rosmini, R., 2013. Isolation of *Arcobacter butzleri* in environmental and food samples in an industrial and an artisanal dairy plant. \*Italian Journal of Food Safety\*, 2(3), pp.121-123.
  13. Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E. and Rosmini, R., 2014. Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cow's milk under different temperature conditions. \*Foodborne Pathogens and Disease\*, 11(1), pp.15-20.
  14. Goojani, R.N., Rahimi, E. and Shakerian, A., 2022. Prevalence, virulence genes and antimicrobial resistance of *Arcobacter* isolates from animal meat in Iran. \*Bulgarian Journal of Veterinary Medicine\*, 25(3).
  15. Greisen, K., Loeffelholz, M.J., Purohit, A., and Leong, D., 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. \*Journal of

- of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses. *\*International Journal of Antimicrobial Agents\**, 29(4), pp.451-455.
30. Teague, N.S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J. and Mason, C.J., 2010. Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand. *\*Journal of Travel Medicine\**, 17(2), pp.118-123.
  31. Vidal-Veuthey, B., Jara, R., Santander K., Mella, A., Ruiz, S. and Collado, L., 2021. Antimicrobial resistance and virulence genes profiles of Arcobacter butzleri strains isolated from backyard chickens and retail poultry meat in Chile. *\*Letters in Applied Microbiology\**, 72(2), pp.126-132.
  32. Wang, X., Seo, D.J., Lee, M.H. and Choi, C., 2014. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of Arcobacter species. *\*Journal of Clinical Microbiology\**, 52(2), pp.557-563.
  33. Wilson, D.L., Abner, S.R., Newman, T.C., Mansfield, L.S. and Linz, J.E., 2000. Identification of ciprofloxacin-resistant Campylobacter jejuni by use of a fluorogenic PCR assay. *\*Journal of Clinical Microbiology\**, 38(11), pp.3971-3978.
  34. Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chen, H.M., Jin, Y.T. and Wu, J.J., 2000. Arcobacter butzleri bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *\*Journal of the Formosan Medical Association\**, 99(2), pp.166-169.
  22. Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M. and Kraigher, A., 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *\*Eurosurveillance\**, 13(34), p.18957.
  23. Korolik, V. and Ketley, J., 2006. Campylobacter chemotaxis.
  24. Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Leung, K.W. and Yuen, K.Y., 2002. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of Arcobacter butzleri bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *\*Molecular Pathology\**, 55(3), pp.182-185.
  25. Liu D., 2009. *\*Molecular detection of foodborne pathogens\**. CRC Press.
  26. Rahimi, E., 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of Arcobacter species isolated from poultry meat in Iran. *\*British Poultry Science\**, 55(2), pp.174-180.
  27. Ramees, T.P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R.S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y.S. and Singh, R.K., 2017. Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *\*Veterinary Quarterly\**, 37(1), pp.136-161.
  28. Shah, A.H., Saleha, A.A., Zunita, Z. and Murugaiyah, M., 2011. Arcobacter–An emerging threat to animals and animal origin food products? *\*Trends in Food Science & Technology\**, 22(5), pp.225-236.
  29. Son, I., Englen, M.D., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, P.J. and Harrison, M.A., 2007. Antimicrobial resistance

## **Investigation of the prevalence and antibiotic resistance of Arcobacter in raw milk and its products in Isfahan province**

**Abazar Lameei<sup>1</sup> · Ebrahim Rahimi<sup>2\*</sup> · Amir Shakerian<sup>3</sup> · Hasan Momtaz<sup>4</sup>**

1. Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. professor Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. professor Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
4. professor Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Received: 8 May2023

Accepted: 6 September2023

---

### **Abstract**

*Arcobacteria are the cause of common diseases between humans and animals and are transmitted through water and food. So far, little information has been published about the pathogenic mechanisms of Arcobacteria. These bacteria can also opportunistically infect people with weak immunity. cause severe diseases. The present study was conducted with the aim of investigating drug resistance of Arcobacter and identifying virulence and resistance genes in raw milk in Isfahan province.*

*In this study, to detect Arcobacter, 350 samples of raw milk from 5 species of animals, including cows, sheep, goats, camels, and buffaloes, and 400 samples of milk products, including cheese, cream, butter, and traditional ice cream, were randomly selected. Samples were taken from the dairies of Isfahan city and around Isfahan and were transferred to the microbiology laboratory of Kurd University in the shortest possible time. Then, bacteria grown in Preston medium with the help of a sterile loop on CAMP medium (Merck-Germany), enriched with defibrinated sheep blood containing antibiotics such as vancomycin 2 mg/ml, polymyxin 0.005 mg/ml, tri Methoprim was 1 mg/ml, linear culture was done. Also, in order to evaluate the phenotypic antibiotic resistance, the simple disk diffusion method was used according to CLSI (2017) criteria*

*Results showed that out of a total of 350 samples of raw milk and 400 samples of milk products examined, 18 samples were infected with at least one species of Arcobacter. These 18 cases were only isolated from raw milk and none of the milk products were infected with this bacterium. Also, out of 18 samples infected with Arcobacter species, 15 samples were infected with Arcobacter botzeleri and 3 samples were infected with Arcobacter cari aerophilus.*

*It was concluded that the highest antibiotic resistance was also evaluated for ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cephalothin, cefotaxime and tetracycline.*

**Keywords: Arcobacter, raw milk, antibiotic resistance**

---

\*Corresponding author: Ebrahim rahimi

Address: Department of Veterinary, shahrekord Branch, Islamic Azad University, shahrekord, Iran

E. mail: ebrahimrahimi55@yahoo.com

## بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا

عرازسلطان ساعدی فر<sup>۱</sup>، هادی کوهساری<sup>۲\*</sup>، مریم صادق شش‌پلی<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد مینودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مینودشت، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳- دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۷

### چکیده

کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس، از یک مجموعه همزیستی میکروبی است که از تخمیر شیر به‌وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. نوع سوبسترا (شیر) مورد استفاده برای تهیه این نوشیدنی تخمیری در فعالیتهای بیولوژیک آن از جمله فعالیت ضدباکتریایی تاثیر دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز است. دانه‌های کفیر فعال شده به شیر گاو (پرچرب و کم چرب)، گاومیش، گوسفند و بز افزوده شدند و عمل تخمیر در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از انجام فرایند تخمیر، دانه‌های کفیر از عصاره کفیر جدا شدند و فعالیت ضدباکتریایی عصاره علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی* موریوم داشت ( $P < 0.05$ ). نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نشان دادند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس*، *ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سرئوس* در نمونه‌های تهیه شده با شیر گاومیش و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲، ۲۴/۵، ۲۰ و ۱۸ میلی‌متر مشاهده شد. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلا دیساتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* موریوم به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر بز و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مربوط می‌شود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های تهیه شده با شیر گوسفند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. حساس‌ترین باکتریهای مورد مطالعه به نمونه‌های تهیه شده با شیر گاو پرچرب، *ایزوله بومی اشریشیا کلی* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* بودند. در نتیجه گیری نهایی با توجه به فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، بز و گوسفند، استفاده از شیر این دامها به‌عنوان سوبسترای مناسب و جایگزین شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری توصیه می‌شود. همچنین انجام فرایند تخمیر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای دستیابی به فعالیت ضدباکتریایی بیشتر پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** کفیر، فعالیت ضد باکتریایی، شیر گاو، شیر گاومیش، شیر گوسفند، شیر بز

\*نویسنده مسئول: هادی کوهساری

آدرس: گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

پست الکترونیکی: hadikoohsari@yahoo.com

## مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی از آن‌ها مصرف می‌شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (Fuller, 1989). فرآورده‌های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده‌اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته‌اند. کفیر مثالی از یک پروبیوتیک است که انواع مختلفی از باکتری‌ها و مخمرها در آن حضور دارند (Simova et al., 2002). نوشیدنی کفیر از جمله قدیمی‌ترین محصولات تخمیری شیر است که یک پروبیوتیک طبیعی و نوشابه‌ای الکلی - لاکتیکی است که از تخمیر شیر به وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. مصرف کفیر در ارتقای سلامت مؤثر است و سبب بالا بردن سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماری‌های گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شود و همچنین دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری می‌باشد (Farnworth, 2006).

دانه‌های کفیر، دانه‌های ژله‌مانندی شبیه گل‌های گل کلم کوچک هستند. طول آنها ۱ تا ۳ سانتی‌متر، دارای لبه و شکل نامنظم و به رنگ سفید تا زرد و دارای یک بافت لزج اما محکم هستند (Fuller, 1989; Farnworth, 2006). دانه‌های کفیر وقتی به شیر تازه منتقل می‌شوند، زنده می‌مانند و در این مدت تقریباً ۲۰ ساعت رشد می‌کنند و جرم آنها ۲۵ درصد افزایش می‌یابد (Farnworth, 2006). ظرفیت تولید مثلی دانه‌های کفیر به طور قابل توجهی تحت تاثیر شرایط رشد قرار دارد. در شرایط نامساعد، رشد دانه کفیر مختل می‌شود، ظاهر آنها بدتر می‌شود و انعطاف پذیری آنها از دست می‌رود، کوچک می‌شوند و تعادل میکروبیولوژیکی آنها مختل می‌شود. در حالی که در شرایط مساعد، پس از پاساژهای متعدد در شیر، ظاهر معمولی، عملکردهای

فیزیولوژیکی و خصوصیات تکنولوژیکی خود را

بازایی می‌کنند (Pop et al., 2014).

میکرو فلور دانه‌های کفیر بسته به منبع دانه متغیر است. دانه‌ها، حاوی گروهی از میکروب‌های خاص هستند که در یک رابطه پیچیده همزیستی وجود دارند و شامل گونه‌های مخمرها، باکتری‌های اسیدلاکتیک (لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس) و باکتری‌های اسید استیک هستند (Garbers et al., 2004).

باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در دانه‌های کفیر به دلیل توانایی رقابت و مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا و عامل فساد، چه با تولید اسیدلاکتیک و چه با افزایش بیان ترکیبات ضد میکروبی، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (Kourkoutas et al., 2007). طیف وسیعی از ترکیبات فعال زیستی از جمله اسیدهای آلی، CO<sub>2</sub>، پراکسید هیدروژن، اتانول، پپتیدهای فعال زیستی، آگزوپلی ساکاریدهایی مانند کفیران، باکتریوسین‌ها از تخمیر دانه‌های کفیر تولید می‌شوند که به طور مستقل یا با یکدیگر مزایای سلامتی مختلفی مرتبط با مصرف کفیر را باعث می‌شوند. محصولات اصلی تخمیر کفیر، اسید لاکتیک، اتانول، و CO<sub>2</sub> هستند که ویسکوزیته، اسیدیته و مقدار کم الکل این نوشیدنی را مهیا می‌کنند. اجزای جزئی از جمله دی‌استیل، استالدهید، اتیل و اسیدهای آمینه نیز به طعم این نوشیدنی تخمیری کمک می‌کنند (Ratray and O'Connell, 2011).

ترکیب شیمیایی کفیر نه تنها به دانه‌های کفیر، بلکه به منشأ جغرافیایی دانه‌ها، دما و شرایط تخمیر مربوط به زمان و به ویژه به نوع و حجم شیر مصرفی بستگی دارد (İrkin and Berkacan, 2022).

تکثیر میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر و تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف توسط این

## مواد و روش ها

### تهیه نمونه های کفیر و آماده سازی عصاره های آنها

دانه های کفیر از فروشگاه پریبوتیک تهیه شد و فرایند احیاء و تخمیر دانه مطابق روش ارائه شده توسط Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) انجام شد. بطور خلاصه دانه ها با ساب کالچرهای متوالی در شیر به مدت ۴ روز در ۲۵ درجه سانتیگراد احیاء شدند. شیر هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از احیاء، دانه های کفیر با آب مقطر استریل شسته شدند و ۵ گرم از آن ها به ۵۰ میلی لیتر شیر گاو (پرچرب و کم چرب) و همچنین شیر گاو میش، گوسفند و بز تلقیح شد و در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از بازه زمانی تخمیر (۴۸ ساعت) دانه های کفیر از محصول تخمیری جدا شدند. عصاره های کفیر تا زمان انجام آزمون های فعالیت ضدباکتریایی در دمای یخچال نگهداری شدند (Ajam and Koohsari, 2020).

### آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون

فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر علیه ۱۰ باکتری بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت. باکتری های بیماریزا شامل ۷ باکتری گرم منفی یعنی *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد 1338 PTCC)، *شیگلا دیسانتری* (1188 PTCC)، *سالمونلا تیفی موریوم* (1596 PTCC)، *سودوموناس آنروژینوزا* (PTCC)، (1811) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد 1290 PTCC) و سه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (1112 PTCC)، *باسیلوس اندروکوکوس فکالیس* (1154 PTCC) و *انتروکوکوس فکالیس* (1778 PTCC) بودند. سویه های استاندارد به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد

میکروارگانیزم ها با توجه به نوع شیر متفاوت است که در نهایت بر روی نوشیدنی کفیر با توجه به ویژگی های تغذیه ای و سلامت انسان تأثیر می گذارد (Guzel- Seydim et al., 2011; Khan et al., 2020).

ترکیب شیمیایی، محتویات معدنی و ویتامین های شیر بدست آمده از حیوانات مختلف به دلیل چندین عامل مهم بسیار متفاوت است و به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی شیرهای مختلف، تفاوت هایی در کیفیت و ویژگی های مرتبط با سلامت محصولات وجود دارد (Morand-Fehr et al., 2007). به همین دلایل نوع سوبسترا (شیر) مورد استفاده در فرایند تخمیر به وسیله دانه های کفیر در فعالیتهای بیولوژیک این نوشیدنی از جمله فعالیتهای ضدباکتریایی آن نقش بسزایی دارد. معمولاً از شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری استفاده میشود و مطالعات زیادی هم در این خصوص انجام شده است. با این وجود استفاده از شیر دامهای مختلف برای تهیه این نوشیدنی و بررسی فعالیت های ضدباکتریایی این نوشیدنی های تخمیری می تواند زمینه های مبهم بسیاری در خصوص تهیه نوشیدنی کفیر با شیر دامهای مختلف را شفاف سازد. در مطالعه حاضر نمونه های کفیر علاوه بر شیر گاو، با استفاده از شیر دامهای دیگر یعنی بز، گوسفند و گاو میش تهیه شدند و فعالیت ضدباکتریایی این نوشیدنی های تخمیری تهیه علیه ۱۰ باکتری بیماریزا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آنروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ویژگی های حسی نمونه های کفیر تهیه شده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (Meilgaard *et al.*, 1991).

### تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای مستقل تحقیق شامل نوع کفیر (نمونه‌های کفیر تهیه شده از شیر گاو پرچرب و کم چرب و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، شیر گوسفند و شیر بز)، دمای تخمیر (۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد) و نوع باکتری بیماری‌زا (۱۰ گونه باکتری) و متغیرهای وابسته تحقیق فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتریهای بیماری‌زا در مواجهه با نمونه‌های کفیر) و ویژگی‌های حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده می‌باشند. هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد و داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA یا آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها اعم از نتایج آزمون‌های ضدباکتریایی (قطرهای هاله عدم رشد) و نتایج ویژگی‌های حسی با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری  $P < 0.05$  صورت گرفت و تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 18 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

### نتایج

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون در مواجهه با نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دام‌های مختلف در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتری‌های مورد آزمون به استثناء سالمونلا تیفی موریوم داشت ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱).

اسلامی واحد گنبد کاووس در محیط BHI و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد تا کدورتی معادل  $0.5$  مک فارلند  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml حاصل شود (Weinstein *et al.*, 2018).

### بررسی اثرات ضد باکتریایی به روش چاهک

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های کفیر، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) باکتریهای بیماری‌زای مورد آزمون با سواب استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس با کمک چوب پنبه سوراخ کن استریل چاهک‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های کفیر در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد آزمون تعیین شد (Weinstein *et al.*, 2018).

### ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده توسط ۱۰ نفر از داوران از افراد داوطلب از نظر ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهر کلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهانی (بافتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی



جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاو میش، بز و گوسفند

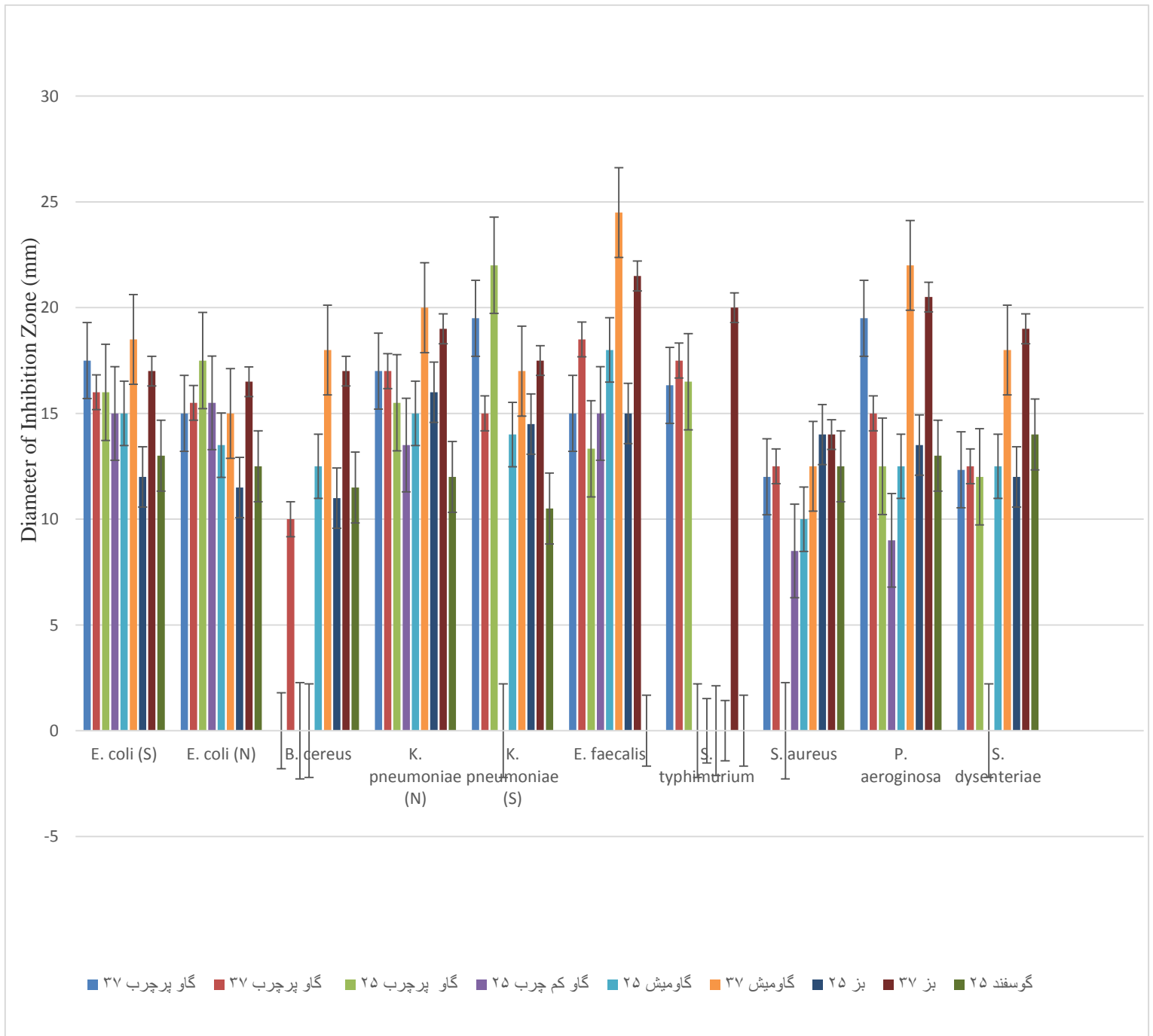
سطح معنی داری	گوسفند ۳۷	گوسفند ۲۵	بز ۳۷	بز ۲۵	گاو میش ۳۷	گاو میش ۲۵	گاو کم چرب ۲۵	گاو پرچرب ۲۵	گاو کم چرب ۳۷	گاو پرچرب ۳۷*	
*/**	۱۹/۵±۰/۵ <sup>aA</sup>	۱۳±۰ <sup>abF</sup>	۱۷±۱ <sup>cdCD</sup>	۱۲±۰ <sup>cdF</sup>	۱۸/۵±۰/۵ <sup>cdAB</sup>	۱۵±۰ <sup>bE</sup>	۱۵±۰ <sup>aE</sup>	۱۶±۰ <sup>bcDE</sup>	۱۶±۰ <sup>abDE</sup>	۱۷/۵±۰/۵ <sup>abBC</sup>	اشریشیا کلی (سویه استاندارد)
*/**	۱۴/۵±۰/۵ <sup>cCD</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>abE</sup>	۱۶/۵±۰/۵ <sup>dAB</sup>	۱۱/۵±۰/۵ <sup>dF</sup>	۱۵±۰ <sup>eBCD</sup>	۱۳/۵±۰/۵ <sup>bcDE</sup>	۱۵/۵±۰/۵ <sup>aBC</sup>	۱۷/۵±۰/۵ <sup>bA</sup>	۱۵/۵±۰/۵ <sup>bcBC</sup>	۱۵±۱ <sup>bcBCD</sup>	اشریشیا کلی (ایزوله بومی)
*/**	۱۸±۰ <sup>abA</sup>	۱۱/۵±۰/۵ <sup>bcD</sup>	۱۷±۰ <sup>cdB</sup>	۱۱±۰ <sup>dD</sup>	۱۸±۰ <sup>cdA</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>cC</sup>	-	-	۱۰±۰ <sup>dE</sup>	-	باسیلوس سرئوس
*/**	۱۴/۵±۰/۵ <sup>cCD</sup>	۱۲±۰ <sup>bcE</sup>	۱۹±۱ <sup>bcAB</sup>	۱۶±۱ <sup>aCD</sup>	۲۰±۰ <sup>bcA</sup>	۱۵±۱ <sup>bCD</sup>	۱۳/۵±۰/۵ <sup>aDE</sup>	۱۵/۵±۰/۵ <sup>cCD</sup>	۱۷±۱ <sup>abBC</sup>	۱۷±۱ <sup>abBC</sup>	کلسیلا پنومونیه (ایزوله بومی)
*/**	۱۷/۵±۰/۵ <sup>abBC</sup>	۱۰/۵±۰/۵ <sup>cF</sup>	۱۷/۵±۰/۵ <sup>cdBC</sup>	۱۴/۵±۰/۵ <sup>abE</sup>	۱۷±۰ <sup>deCD</sup>	۱۴±۱ <sup>bcE</sup>	-	۲۲±۱ <sup>aA</sup>	۱۵±۱ <sup>bcDE</sup>	۱۹/۵±۰/۵ <sup>aB</sup>	کلسیلا پنومونیه (سویه استاندارد)
*/**	-	-	۲۱/۵±۰/۵ <sup>aB</sup>	۱۵±۰ <sup>abD</sup>	۲۴/۵±۰/۵ <sup>aA</sup>	۱۸±۱ <sup>aC</sup>	۱۵±۱ <sup>aD</sup>	۱۳/۳۳±۰/۳۳ <sup>dD</sup>	۱۸/۵±۱/۵ <sup>aC</sup>	۱۵±۱ <sup>bcD</sup>	انتروکوکوس فکالیس
*/۳۴	۱۸/۵±۰/۵ <sup>abA</sup>	-	۲۰±۰ <sup>abA</sup>	-	-	-	-	۱۶/۵±۰/۵ <sup>bcA</sup>	۱۷/۵±۰/۵ <sup>abA</sup>	۱۶/۳۳±۳/۲۱ <sup>abA</sup>	سالمونلا تیفی مورنوم
*/**	۱۴±۱ <sup>cA</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>abA</sup>	۱۴±۱ <sup>cA</sup>	۱۴±۱ <sup>bA</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>fA</sup>	۱۰±۰ <sup>dBC</sup>	۸/۵±۰/۵ <sup>bc</sup>	-	۱۲/۵±۰/۵ <sup>cdA</sup>	۱۲±۰/۵۷ <sup>cAB</sup>	استافیلوکوکوس اورئوس
*/**	۱۶/۵±۱/۵ <sup>bcBC</sup>	۱۳±۰/۵ <sup>abCD</sup>	۲۰/۵±۰/۵ <sup>abA</sup>	۱۳/۵±۰/۵ <sup>bcC</sup>	۲۲±۱ <sup>bA</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>cD</sup>	۹±۰ <sup>bE</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>dD</sup>	۱۵±۱ <sup>bcCD</sup>	۱۹/۵±۱/۵ <sup>aAB</sup>	سودوموناس آئروژینوزا
*/**	۱۶±۱ <sup>bcB</sup>	۱۴±۱ <sup>aC</sup>	۱۹±۱ <sup>bcA</sup>	۱۲±۰ <sup>cdC</sup>	۱۸±۰ <sup>cdA</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>cC</sup>	-	۱۲±۰ <sup>dC</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>cdC</sup>	۱۲/۳۳±۰/۳۳ <sup>cC</sup>	شیگلا دیسنتری
	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	سطح معنی داری

\* درجه سانتیگراد

میانگین ± انحراف معیار. حروف مشترک کوچک در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P ≥ ۰/۰۵).

میانگین ± انحراف معیار. حروف مشترک بزرگ در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P ≥ ۰/۰۵).



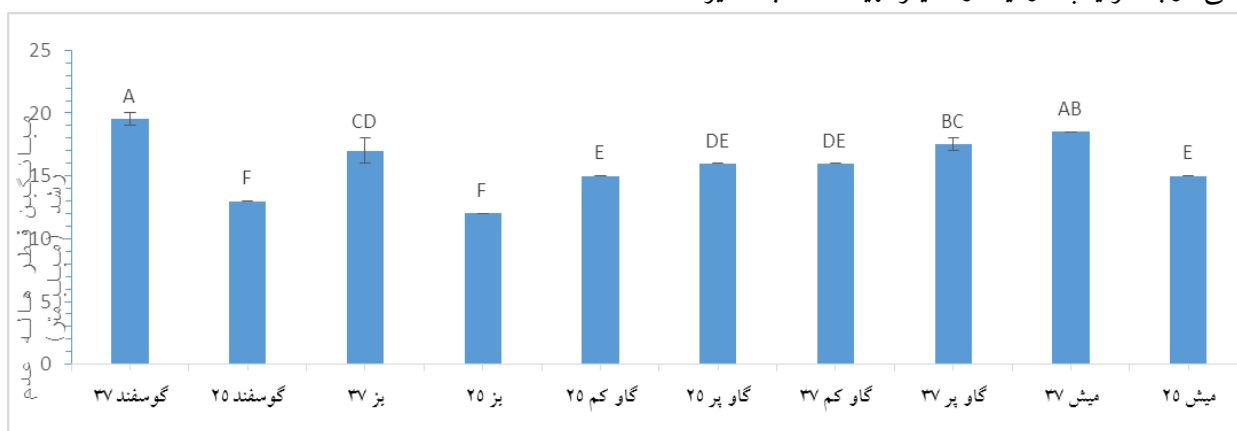


شکل ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمون در نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاو میش، بز و گوسفند

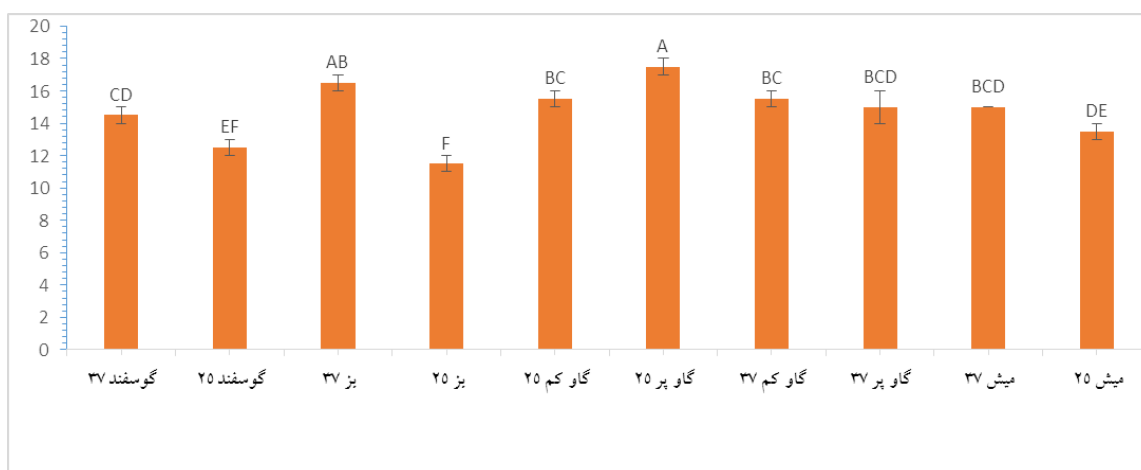
گوسفند، گاو میش و شیر گاو پرچرب همگی در ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۹/۵، ۱۸/۵ و ۱۷/۵ میلیمتر برای سویه استاندارد این باکتری بود (جدول ۱) و بطور کلی نتایج حاصل بخصوص در سویه استاندارد دلالت بر تفاوت معنی دار قطر هاله عدم رشد در تیمارهای کفیر در دمای ۳۷ درجه داشت ( $P < 0/05$ ).

**تاثیر انواع نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاو میش، گوسفند و بز در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر هر یک از ۱۰ گونه باکتری بیماری‌زای مورد آزمون**

نتایج مربوط به سویه استاندارد و ایزوله بومی اشریشیا کلی حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۲ و ۳)، بطوریکه بر اساس مقایسه دانکن، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی بطور معنی دار به ترتیب در تیمار کفیر تهیه شده با شیر



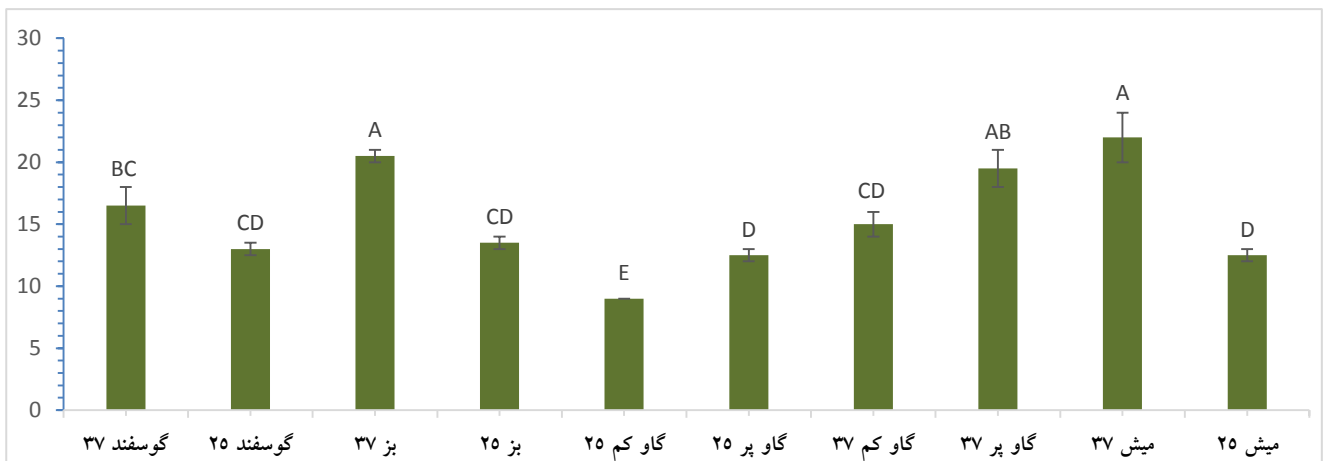
شکل ۲. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد اشریشیا کلی



شکل ۳. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی اشریشیا کلی

درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲، ۲۰ و ۱۹/۵ میلیمتر مشاهده شد (جدول ۱). همچنین کمترین میزان نیز بطور معنی داری به تیمار کفیر شیر گاو کم چرب در دمای ۲۵ درجه اختصاص یافت ( $P < 0/05$ ).

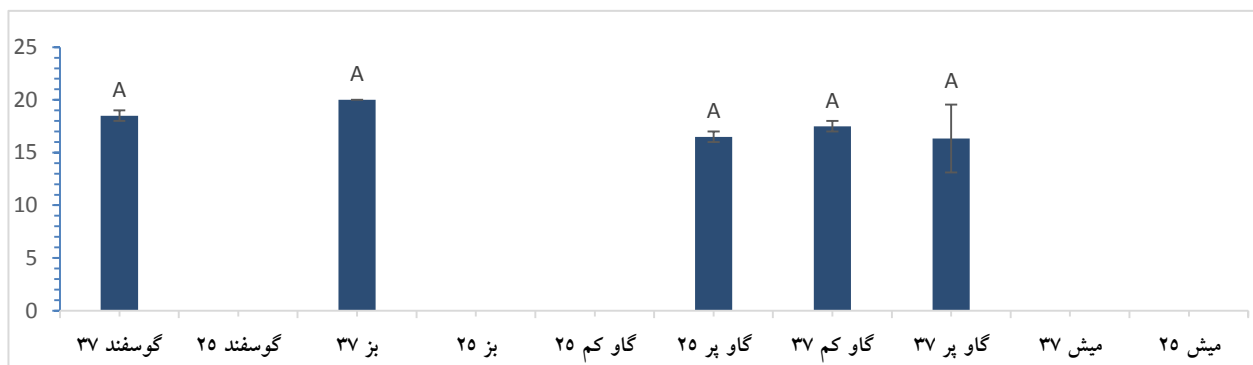
یافته‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیانگر وجود تفاوت معنی دار در بین تیمارها بود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۴). بطوریکه بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سودوموناس آئروژینوزا مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو میش، بز و شیر گاو پرچرب هر سه در دمای ۳۷



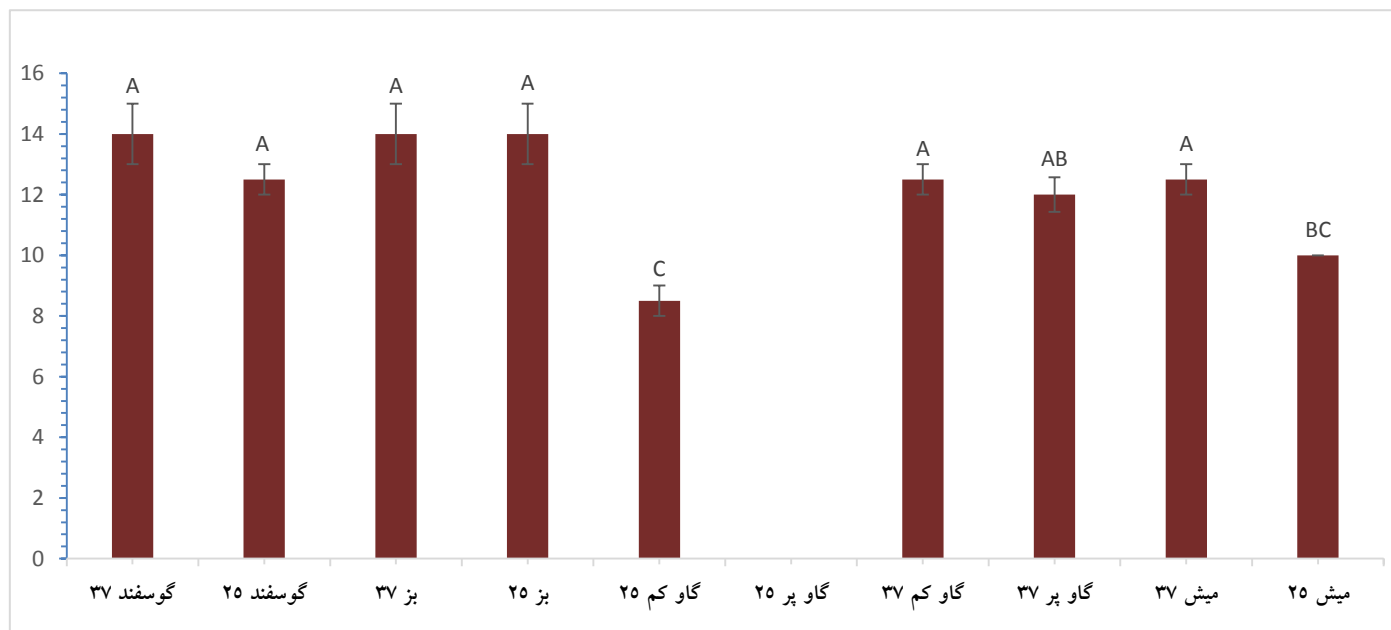
شکل ۴. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سودوموناس آئروژینوزا

منفی سالمونلا تیفی موربوم به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر بز و گوسفند ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ و ۱۸/۵ میلیمتر بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نیز مربوط به همین تیمارها در کنار نمونه‌های تهیه شده با شیر بز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلیمتر بود (جدول ۱).

نتایج مربوط به اثر ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دام‌های مختلف در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد علیه باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی موربوم بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها بود ( $P > 0/05$ ) (شکل ۵). در خصوص باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس این نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۶). بر این اساس بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم



شکل ۵. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سالمونلا تیفی موربوم

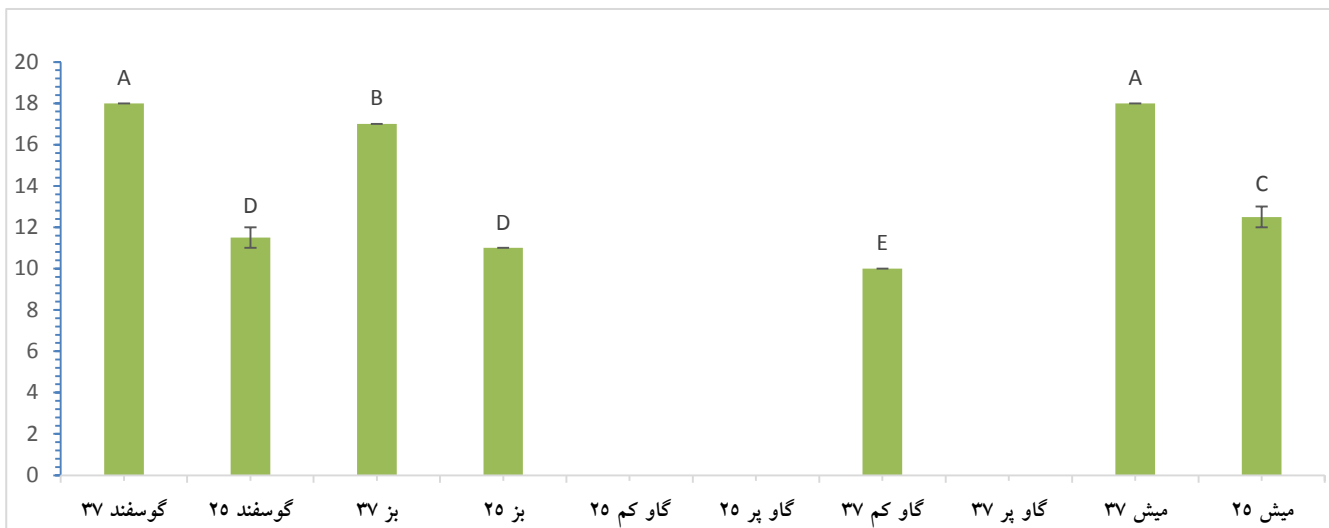


شکل ۶. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس

می‌باشد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۷). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باسیلوس سرئوس مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو میش و گوسفند در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد

نتایج مربوط به تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس حاکی از وجود اختلاف معنی در بین تیمارها

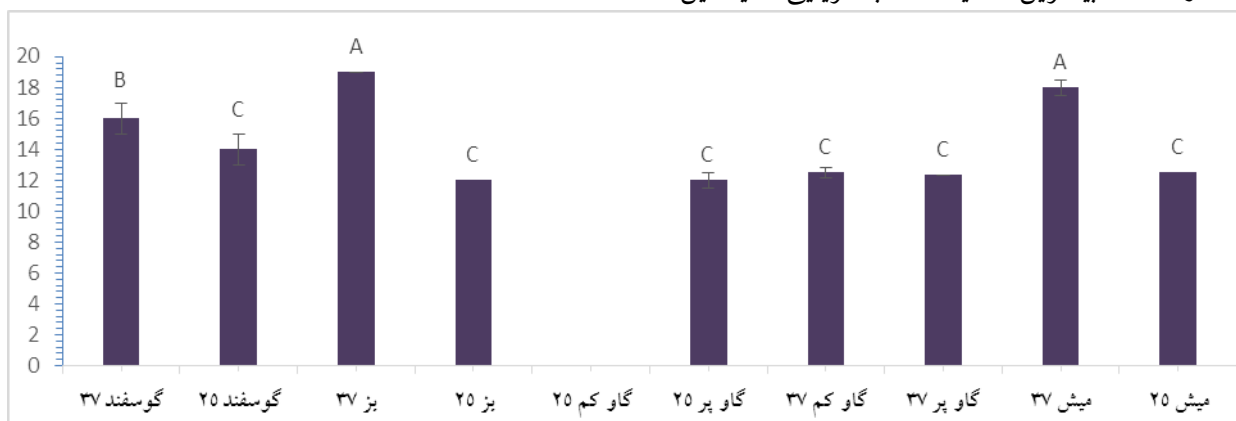
۱۸ میلیمتر بود (جدول ۱). و نمونه های تهیه شده با شیر گاو اعم از پرچرب و کم چرب فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند (جدول ۱).



شکل ۷. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باسیلوس سرئوس

باکتری مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر بز و گاو میش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۹ و ۱۸ میلیمتر است و نمونه تهیه شده با شیر گاو کم چرب در ۲۵ درجه سانتیگراد هیچگونه فعالیت ضدباکتریایی علیه شیگلا دیسانتری نشان نداد (جدول ۱).

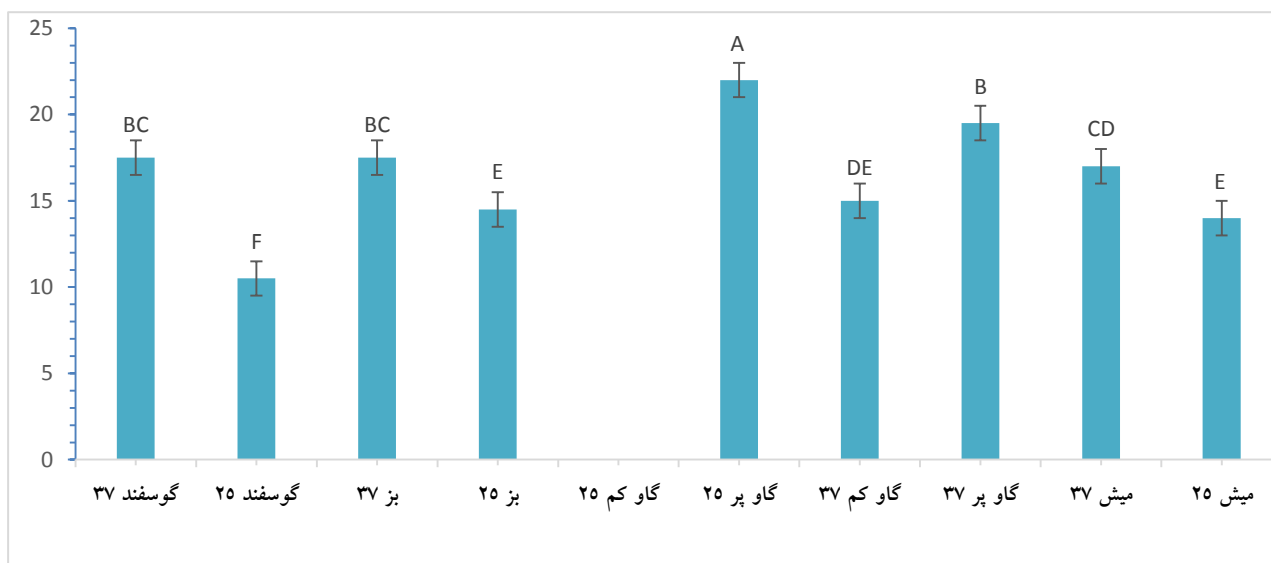
نتایج در خصوص باکتری گرم منفی عامل اسهال خونی یعنی شیگلا دیسانتری حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۸) و نشاندهنده این است که نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی این نوشیدنی تخمیری تاثیر گذار است. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه این



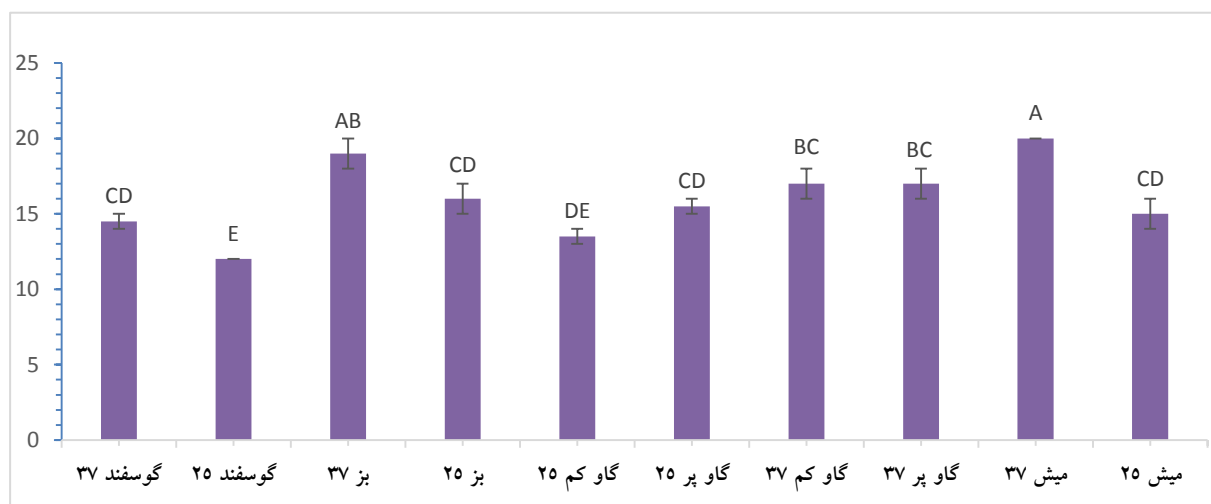
شکل ۸. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه شیگلا دیسانتری

تهیه شده با شیر گاو میش و بز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ و ۱۹ میلیمتر می باشد و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه مربوط به نمونه های تهیه شده با شیر گاو پرچرب در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹/۵ میلیمتر بود (جدول ۱).

نتایج نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده علیه کلبسیلا پنومونیه اعم از سویه استاندارد و ایزوله بومی تحت تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد است که حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۹ و ۱۰). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی این باکتری مربوط به نمونه های



شکل ۹. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه

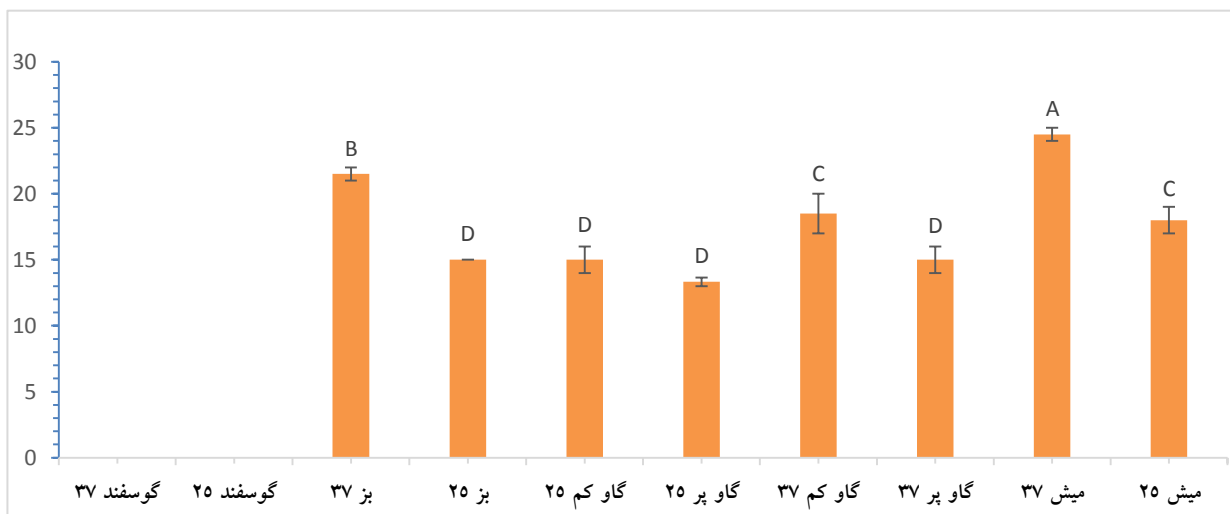


شکل ۱۰. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه



فکالیس مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو میش و بز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۴/۵ و ۲۱/۵ میلیمتر بود و نمونه‌های تهیه شده با شیر گوسفند فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند (جدول ۱).

یافته‌های بدست آمده مربوط به تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می باشد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۷). نتایج بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *انتروکوکوس*



شکل ۱۱. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *انتروکوکوس فکالیس*

۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (Meilgaard et al., 1991).

نتایج مربوط به ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف (گاو، گاو میش، گوسفند و بز) در جدول ۲ آمده است. ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهر کلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهانی (بافتی) بودند. یافته‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها در شاخص‌های عطر و بو، طعم، احساس دهان و امتیاز کل بود ( $P < 0.05$ ) و همچنین اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها در شاخص‌های ظاهر کلی و رنگ مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

### ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاو میش، گوسفند و بز

ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده توسط ۱۰ نفر از داوران از افراد داوطلب از نظر ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهر کلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهانی (بافتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتاً نمره

خواص ارگانولپتیکی را تحت تأثیر قرار می دهد و بین تیمارها نیز تیمار دارای هفت درصد (۰.۷٪) دانه کفیر را بعنوان بهترین غلظت معرفی نمود (Fitrianingsih et al., 2022).

بطور کلی برآیند نتایج، حاکی از اقبال بیشتر مصرف کننده نسبت به دوغ کفیر گوسفندی و همچنین استقبال کمتر از دوغ کفیر بز بود. در مطالعه Fitrianingsih و همکاران (2021) نتایج نشان داد که غلظت دانه کفیر به طور معنی داری ( $P < 0.05$ )، pH، درصد الکل و

جدول ۲: مقایسه ویژگی های حسی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف

ویژگی حسی	نوع شیر	گاو	گاو میش	بز	گوسفند	سطح معنی داری
ظاهر کلی	$8 \pm 1/41^{ab}$	$7/71 \pm 0/75^{ab}$	$6/71 \pm 1/79^b$	$8/42 \pm 0/53^a$	-/0.8	
رنگ	$7/71 \pm 1/7^a$	$7/57 \pm 0/97^a$	$7/14 \pm 0/69^a$	$8/28 \pm 0/75^a$	-/3	
عطر و بو	$7/71 \pm 2/13^a$	$7/14 \pm 1/34^a$	$4/71 \pm 2/56^b$	$8/14 \pm 0/89^a$	-/0.1	
طعم	$7/71 \pm 2/13^a$	$6/85 \pm 1/46^a$	$4/71 \pm 2/56^b$	$8/28 \pm 0/75^a$	-/0.0	
احساس دهان	$7/57 \pm 2/14^a$	$6/85 \pm 1/21^a$	$4/85 \pm 1/77^b$	$8 \pm 1/15^a$	-/0.0	
امتیاز کل	$18 \pm 3/05^a$	$17/71 \pm 1/25^a$	$15/14 \pm 2/11^b$	$19/42 \pm 0/78^a$	-/0.0	

میانگین  $\pm$  انحراف معیار. حروف مشترک کوچک در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $P \geq 0.05$ ).

## بحث

شیر بز و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مربوط می شود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گوسفند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. حساس ترین باکتریهای بیماریزای مورد مطالعه به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو پر چرب ایزوله بومی *اشریشیا کلی* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

نتایج تحقیق Suhartanti and Septian (2014) نشان داد که کفیر شیر بز در مقایسه با کفیر شیر گاو فعالیت ضدباکتریایی بهتری در برابر *باسیلوس سرئوس* دارد (Suhartanti and Septian, 2014).

Azizkhani و همکاران (2020) در مطالعه فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر

نتایج این تحقیق حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف علیه باکتریهای مورد آزمون بود و نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تأثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی موریوم* داشت ( $P < 0.05$ ) بطوریکه بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای *سودوموناس آثرورژینوزا*، *اتروکوکوس فکاليس*، ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سرئوس* مربوط به نمونه های تهیه شده با شیر گاو میش و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* به نمونه های کفیر تهیه شده با

تولید ترکیبات فعال زیستی نقش دارند، نوع و جمعیت میکروارگانیسم‌ها و تنوع آنزیم‌های دانه کفیر و کشت استارتر باشد (Azizkhani et al., 2020).

نتایج نشان داد که نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون نشان دادند. با وجود اینکه، کفیرهای سنتی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت تهیه می‌شوند (Farnworth and Mainville, 2008). مطالعه Ajam and Koohsari (2020) نشان داد که دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیا کلی و باسیلوس سرئوس تاثیر معناداری داشت و با در نظر گرفتن تمامی فاکتورها و اثرات متقابل آنها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در نمونه‌های کفیر تخمیر شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (Ajam and Koohsari, 2020).

بطور کلی نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف علیه باکتریهای مورد آزمون است. این فعالیت ضدباکتریایی با تولید اسیدهای آلی، پپتیدها (باکتریوسین‌ها)، دی‌اکسید کربن، پراکسید هیدروژن، اتانول و دی‌استیل ارتباط دارد (Leite et al., 2013). علاوه بر این ترکیبات، آگزوپلی ساکارید تولید شده بوسیله دانه‌های کفیر به نام کفیران نیز دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی می‌باشد (Wang et al., 2008; Prado et al., 2015).

از مکانیسمهای فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های کفیر، می‌توان به pH اسیدی، در نتیجه تخمیر لاکتوز و افزایش محتوای اسیدهای آلی، همچون اسید لاکتیک،

گاو، گوسفند، بز و شتر نشان دادند که کفیر حاصل از شیر گوسفند و گاو بترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت ضد میکروبی هستند. استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز حساس‌ترین باکتریها و اسپرژیلوس نایجر حساس‌ترین قارچ نسبت به نمونه‌های کفیر گزارش شدند و اش‌ریشیا کلی و گونه پنی‌سیلیوم مقاومترین میکروارگانیسمها نسبت به نمونه‌های کفیر بودند. در مجموع فعالیت بازدارندگی نمونه‌ها در برابر باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق به ترتیب کفیر میش، کفیر بز، کفیر شتر، کفیر گاو، بود (Azizkhani et al., 2020).

همچنین، de Lima و همکاران (2018) نشان داد که کفیر برزیلی تولید شده از شیر تخمیر شده گوسفند منبع غنی از متابولیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است (de Lima et al., 2018).

در مطالعه ای توسط Said و همکاران (2019)، فعالیت ضد میکروبی کفیر شیر بز بر روی اش‌ریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم نشان داده شد (Said et al., 2019).

مطالعه Biadala و همکاران (2020) نشان داد که در طی تخمیر شیر بز با میکروارگانیسم‌های منفرد دانه‌های کفیر، مواد فعال زیستی تشکیل می‌شوند که دارای خواص ضدباکتریایی در برابر مهم‌ترین سویه‌ها سویه‌ها در زمینه بهداشت مواد غذایی از جمله اش‌ریشیا کلی و سالمونلا هستند (Biadala et al., 2020).

تفاوت در فعالیتهای بیولوژیک از جمله فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده از منابع مختلف (شیر دامهای مختلف) می‌تواند تحت تاثیر پارامترهای متعددی مانند ترکیب اسیدهای چرب، محتوای لاکتوز که تاثیر قابل توجهی بر PH نهایی و اسیدیته محصول دارد، انواع پپتیدها و ترکیبات شیمیایی دیگر که در

به این واسطه تفاوت‌های موجود در فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های مختلف را می‌توان به تفاوت‌های موجود در شرایط تخمیر و نوع شیر مورد استفاده و البته حساسیت سویه‌های مختلف باکتریایی نسبت داد.

نقش‌های بیولوژیک این نوشیدنی تخمیری به ترکیبات موجود در محصول نهایی، میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر و ترکیبات حدواسط ناشی از متابولیسم آنها مربوط می‌شود. تفاوت در مقدار و نوع این میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات حدواسط با شرایط تخمیر از قبیل زمان، تخمیر، دما، درجه همزن، نوع شیر، نسبت تلقیح دانه‌ها همچنین pH و حساسیت‌های سویه‌های مختلف باکتریایی به آن ارتباط دارد (Simova et al., 2002; Wszolek et al., 2006; ) (Ratray and O'Connell, 2011).

در مطالعه Ajam and Koohsari (2020) نمونه‌های تخمیر شده در شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس و شیگلا دیسانتری نشان دادند (Ajam and Koohsari, 2020).

با در نظر گرفتن اینکه بسیاری فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به ترکیب پلی ساکاریدی کفیران نسبت می‌دهند، Zajšek و Goršek (2011) نیز با هدف بررسی نیازمندی‌های رشد برای تولید کفیران از دانه‌های کفیر، بهترین شرایط برای تولید کفیران از دانه‌های کفیر را شیر پرچرب گاو معرفی کردند که با وقوع بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در شرایط مذکور، همخوانی دارد. (Zajšek and Goršek, 2011).

Florence و همکاران (2012) شیر خام را به عنوان سوبسترای مناسب برای تهیه شیرهای تخمیری پیشنهاد دادند (Florence et al., 2012).

اسید استیک و ... توسط میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر اشاره کرد. اسید لاکتیک از طریق غشاء سیتوپلاسمی نفوذ می‌کند و باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم و مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. در pH داخل سلولی بیشتر اسیدها منجر به تولید یون‌های هیدروژن می‌شوند که با اعمال متابولیسمی مهم همچون فسفریلاسیون اکسیداتیو تداخل می‌کنند و باعث مهار گونه‌های هوازی می‌شوند. علاوه بر این، مشخص شد که اسید لاکتیک و استیک وقتی در عصاره کفیر با هم تولید می‌شوند، اثر مهاری هم‌افزایی عالی دارند و این اثر به تقویت اسید استیک در کاهش pH توسط اسید لاکتیک مربوط می‌شود (Farnworth, 2006).

تصور می‌شود که باکتریوسین‌ها با خراب کردن (Corrupting) یون پتاسیم و ATP، پتانسیل غشاها را تغییر می‌دهند و باعث می‌شوند سلول‌ها نتوانند pH داخل سلول را متعادل کنند (Sezar and Guven, 2009).

میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر به وسیله ماتریکس پروتئینی و پلی ساکاریدی به نام کفیران احاطه شده‌اند. کفیران یک گلوکوگالاکتان منشعب محلول در آب است که از مقادیر یکسان D-گالاکتوز و D-گلوکز تشکیل شده است. تولید کفیران بیشتر توسط گونه‌های لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس و لاکتوباسیلوس کفیر صورت می‌گیرد. فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند. تولید کفیران می‌تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت و اصلاح ترکیب واسطه، افزایش یابد، همچنین افزایش دانه‌های کفیر و تولید کفیران با اضافه کردن منابع معدنی تحریک می‌شود (Frengova et al., 2002; Zajšek and Goršek, 2011).

سوبسترا (شیر) مورد استفاده در فرایند تخمیر به وسیله دانه های کفیر در فعالیت های بیولوژیک این نوشیدنی از جمله فعالیت های ضدباکتریایی آن نقش بسزایی دارد. از طرفی تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در منشاء کفیر مورد آزمون باشد. تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر با منشاء مختلف در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Pintado *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1999).

تفاوت های منطقه ای و شرایط تخمیر می تواند تنوع میکروبی در دانه های کفیر را تغییر دهد و تنوع میکروبی مسئول فعالیت های بیولوژیکی است (Kukhtyn *et al.*, 2018). تنوع میکروبی مسئول فعالیت های بیولوژیکی و ویژگی های فیزیکوشیمیایی کفیر است و بسته به منشأ منطقه ای دانه های کفیر، تنوع میکروبی آنها متفاوت است و بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی آن نیز تغییر می کند (Gao *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009; Kabak and Dobson, 2011; Altay *et al.*, 2013).

فعالیت های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می دهند و تولید کفیران می تواند به طور چشم گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Frengova *et al.*, 2002; Zajšek and Goršek, 2011).

با تمام این تفاسیر، رشد دانه های کفیر در محیط های کشت مختلف، به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسم های موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز وابسته است و مقادیر ترکیبات اصلی شیر می تواند به طور قابل توجهی بین دامها و نژادهای مختلف و بسته به نوع خوراک متفاوت باشد (Bylund, 1995).

ترکیب شیمیایی، محتویات معدنی و ویتامین های شیر بدست آمده از حیوانات مختلف به دلیل چندین عامل مهم بسیار متفاوت است و به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی شیرهای مختلف، تفاوت هایی در کیفیت و ویژگی های مرتبط با سلامت محصولات وجود دارد (Morand-Fehr *et al.*, 2007). به همین دلایل نوع

## نتیجه گیری

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد، نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتریهای مورد آزمون به استثناء سالمونلا تیفی موریوم داشت. نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون نشان دادند. برای دستیابی به بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای سودوموناس آتروژنیوزا، اتروکوکوکوس فکالیس، ایزوله بومی کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس، تهیه کفیر با شیر گاومیش، علیه شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم شیر بز، علیه سویه استاندارد اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوکوس اورئوس شیر گوسفند و علیه ایزوله بومی اشریشیا کلی و سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه شیر گاو پرچرب پیشنهاد می شود. همچنین با توجه به حصول فعالیت ضدباکتریایی بیشتر در نمونه های تهیه شده در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد، انجام فرایند تخمیر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای دستیابی به فعالیت ضدباکتریایی بیشتر پیشنهاد می شود. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، بز و گوسفند، استفاده از شیر این دامها به عنوان سوپسترای مناسب و جایگزین شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری توصیه می شود.

## منابع

1. Ajam, F. and Koohsari, H., 2020. Effect of some fermentation conditions on antibacterial activity of fermented milk by kefir grains. *Journal of Food Processing and Preservation*. **44**(12), 14913. DOI: 10.1111/jfpp.14913
2. Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C. and Heperkan, D., 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International journal of food microbiology*. **167**(1), 44-56. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016. PMID: **23859403**
3. Anderson, J.W. and Gilliland, S.E., 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*. **18**(1), 43-50. DOI: 10.1080/07315724.1999.10718826. PMID: **10067658**
4. Azizkhani, M., Saris, P.E.J. and Baniasadi, M., 2021. An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization*. **15**(4), 406-415. DOI: 10.1007/s11694-020-00645-4
5. Biadała, A., Szablewski, T., Lasik-Kurdyś, M. and Cegielska-Radziejewska, R., 2020. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of kefir grain microflora. *European food research and technology*. **246**(5), 1231-1239. DOI: 10.1007/s00217-020-03483-2
6. Bylund, G. (1995). Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund.

- DOI: 10.1515/znc-2002-9-1009.  
PMID: **12440716**
13. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*. **66**(5), 365-378.
  14. Gao, J., Gu, F., Abdella, N.H., Ruan, H. and He, G., 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *Journal of food science*, **77**(8), M425-433. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02805.x. PMID: **22860591**
  15. Garbers, I.M., Britz, T.J. and Witthuhn, R.C., 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **20**(7), 687-693. DOI: 10.1007/s11274-004-2624-3
  16. Guzel-Seydim, Z.B., Kok-Tas, T., Greene, A.K. and Seydim, A.C., 2011. Functional properties of kefir. *Critical reviews in food science and nutrition*. **51**(3), 261-268. DOI: 10.1080/10408390903579029. PMID: **21390946**
  17. İrkin, R. and Berkkacan, E.G., 2022. Improving Some Properties of Cow and Goat Mixed Milk Based Kefir with Inulin Addition as a Functional Food. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. **25**(3), 556-564. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.895501
  18. Zhou, J., Liu, X., Jiang, H. and Dong, M., 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food microbiology*. **26**(8), 770-775. DOI: 10.1016/j.fm.2009.04.009. PMID: **19835760**
  19. Kabak, B. and Dobson, A.D., 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical reviews in food science and nutrition*. **51**(3), 248-260.
  7. de Lima, M.D.S.F., da Silva, R.A., da Silva, M.F., da Silva, P.A.B., Costa, R.M.P.B., Teixeira, J.A.C., Porto, A.L.F. and Cavalcanti, M.T.H., 2018. Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **10**(3), 446-455. DOI: 10.1007/s12602-017-9365-8. PMID: **29285743**
  8. Farnworth, E.R., 2006. Kefir—a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. **2**(1), 1-17. DOI: 10.1616/1476-2137.13938
  9. Farnworth, E.R. and Mainville, I. 2008. Kefir - a fermented milk product. In: Handbook of fermented functional foods. 2nd ed. Farnworth, E. R. (ed) CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 89-127.
  10. Fitrianiingsih, F., Hafid, H., Kimestri, A.B., Sulfitriana, A. and Toba, R.D.S., 2022, March. The Effect of Different Kefir Grain Starter Concentration on pH, Alcohol Percentage, and Organoleptic Properties of Ultra High Temperature (UHT) Milk Kefir. In *International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)* (pp. 399-403). Atlantis Press. DOI: 10.2991/absr.k.220309.078
  11. Florence, A.C.R., Oliveira, R.P., Silva, R.C., Soares, F.A., Gioielli, L.A. and Oliveira, M.N., 2012. Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *LWT*. **49**(1), 89-95. DOI:10.1016/j.lwt.2012.04.023
  12. Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z.I., 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **57**(9-10), 805-810.



83822013000200001.  
PMID: **24294220**
26. Pintado, M.E., Da Silva, J.L., Fernandes, P.B., Malcata, F.X. and Hogg, T.A., 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International journal of food science & technology*. **31**(1), 15-26. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1996.16-316.x
27. Pop, C., Apostu, S., Salanță, L., Rotar, A.M., Sindic, M., Mabon, N. and SOCACIU, C., 2014. Influence of different growth conditions on the kefir grains production used in the kefir synthesis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*. **71**(2), 147-153. DOI: 10.15835/buasvmcn-fst:10802
28. Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C.R., 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*. **6**.1177. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01177. PMID: **26579086**
29. Rattray, F.P. and O'Connell, M.J. (2011). Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, p.518-524.
30. Said, N., Fahrodi, D.U., Malaka, R. and Maruddin, F., 2019, March. Assessment of the antibacterial activity of goat milk kefir on *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enteric* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 using a well diffusion method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 247, No. 1, p. 012051). IOP Publishing. DOI: 10.1088/1755-1315/247/1/012051
- DOI: 10.1080/10408390903569640.  
PMID: **21390945**
20. Khan, R.A.A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y. and Xie, B., 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*. **8**(3), 401. DOI: 10.3390/microorganisms8030401. PMID: **32182971**
21. Kourkoutas, Y., Sipsas, V., Papavasiliou, G. and Koutinas, A.A., 2007. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. *Journal of dairy science*. **90**(5), 2175-2180. DOI: 10.3168/jds.2006-557. PMID: **17430915**
22. Kukhtyn, M., Vichko, O., Horyuk, Y., Shved, O. and Novikov, V., 2018. Some probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of "Tibetan kefir grains" cultivated in Ukrainian household. *Journal of food science and technology*. **55** (1), 252-257. DOI: 10.1007/s13197-017-2931-y
23. Meilgaard, M.C., Civille, G.V., and Carr, B.T. (1991). *Sensory evaluation techniques*. 2<sup>nd</sup> edition. Crc prees, inc. bocaration, florida. pp: 345-386.
24. Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M. and Le Frileux, Y., 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. **68**(1-2), 20-34. DOI:10.1016/j.smallrumres.2006.09.019
25. Leite, A.M.D.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T. and Paschoalin, V.M.F., 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian journal of microbiology*. **44**(2), 341-349. DOI: 10.1590/S1517-

35. Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S., 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*. **43**(3), 283-288. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011. PMID: **18662712**
36. Weinstein, M. P., Patel, J. B., Burnham, C. A., Campeau, S., Conville, P. S., Doern, C., ... Zimmer, B. L. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Clinical and laboratory standard institute* (Vol. M07, 11th ed., pp. 15–35). Pennsylvania, USA. Wayne.
37. Zajšek, K. and Goršek, A., 2011. Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefir production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. *Chemical Engineering Transactions*. **24**, 481-486. DOI: 10.3303/CET1124081.
31. Sezar, Ç. and Guven, A., 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15**(1), 45-50. DOI:10.9775/kvfd.2008.56-A
32. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T.S., Frengova, G. and Spasov, Z., 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **28**(1), 1-6. DOI: 10.1038/sj/jim/7000186. PMID: **11938463**
33. Suhartanti, D. and Septian, R., 2014. Comparison of the antibacterial activity of cow milk kefir and goat milk kefir against bacteria *Bacillus cereus*. *KESMAS*. **8**(2), 71-76. DOI: 10.12928/kesmas.v8i2.1030.
34. Wszolek, M., Kupiec- Teahan, B., Skov Guldager, H. and Tamime, A.Y., 2006. Production of kefir, koumiss and other related products. *Fermented milks*, pp.174-216. DOI: 10.1002/9780470995501.ch8.

## Investigation of Antibacterial Activity of Kefir Samples Prepared with Cow, Buffalo, Ewe and Goat Milk against a Number of Pathogenic Bacteria

Araz Soltan Saedifar<sup>1</sup>, Hadi Koohsari<sup>\*2</sup>, Maryam Sadegh Shesh Poli<sup>3</sup>

1. MSc, Department of Microbiology, Minudasht branch, Islamic Azad University, Minudasht, Iran

2. Associate Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

3. Ph. D of Molecular Medicine, Department of Microbiology, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Received: 8 August 2023

Accepted: 5 December 2023

### Abstract

Kefir is a complex probiotic, and a microbial symbiosis collection that is prepared from milk fermentation by kefir grains. The type of substrate (milk) used to prepare this fermented beverage is effective on its biological activities, including its antibacterial activity. The purpose of this study is to investigate the antibacterial activity of kefir samples prepared with cow, buffalo, ewe and goat milk. Activated kefir grains were added to cow (Full-fat and low-fat), buffalo, ewe, and goat milk, and the fermentation process was performed at 25°C and 37°C. After the fermentation process, kefir grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of the extract against 10 pathogenic bacteria was evaluated based on agar diffusion and by the well method. The type of milk used in the preparation of kefir samples at 25°C and 37°C had a significant effect on antibacterial activity against all tested bacteria except *S. typhimurium* ( $P < 0.05$ ). Kefir samples prepared at 37°C compared to kefir samples prepared at 25°C showed more antibacterial activity. The highest antibacterial activity against the *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* native isolate and *B. cereus* in the samples prepared with buffalo milk and at the fermentation temperature of 37°C, respectively, with the mean of diameter of inhibition zone of 22, 24.5, 20 and 18 mm was observed. The highest antibacterial activity against *S. dysenteriae*, *S. aureus* and *S. typhimurium* is related to kefir samples prepared with goat's milk and at fermentation temperature of 37°C. The highest antibacterial activity against the standard strain of *E. coli*, *B. cereus*, and *S. aureus* was observed in kefir samples prepared with ewe milk at 37°C. The most sensitive bacteria studied to the samples prepared with full-fat cow's milk were *E. coli* native isolate and *K. pneumoniae* standard strain. In the final conclusion considering the antibacterial activity of kefir samples prepared with buffalo, goat and ewe milk, it is recommended to use the milk of these animals as a suitable substrate and substitute for cow's milk to prepare this fermented beverage. Also, it is suggested to perform the fermentation process at 37°C to achieve more antibacterial activity.

**Keywords:** Kefir, Antibacterial activity, Cow milk, Buffalo milk, Ewe milk, Goat milk

\*Corresponding author: Hadi Koohsari

Address: Department of Microbiology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan, Iran

E. mail: hadikoohsari@yahoo.com