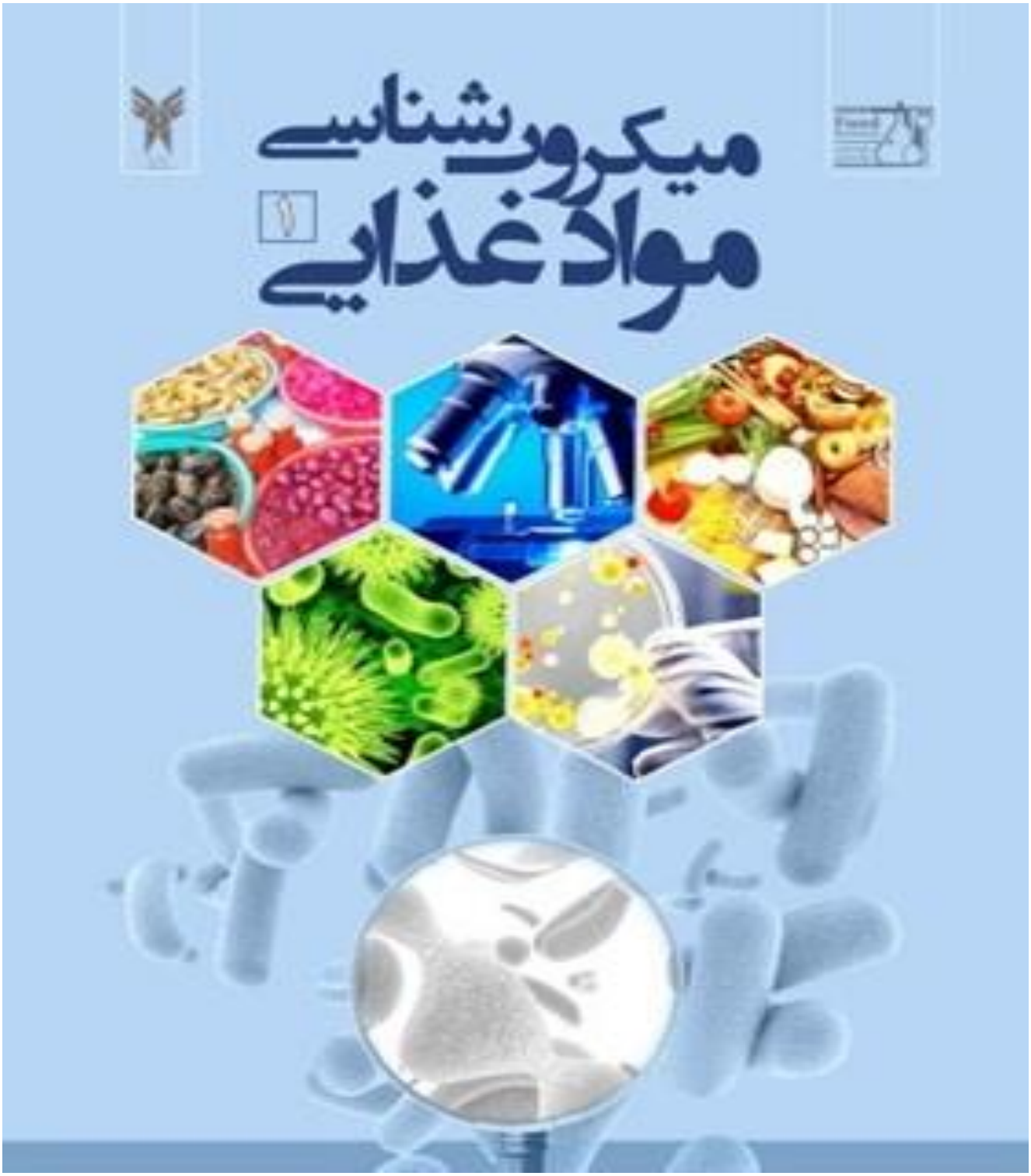

میکروب شناسی
مواد غذایی

فهرست

مطالعه اثر استافیلوفاژ جدا شده از فاضلاب بر استافیلوکوکوس های جدا شده از شیرخام

نیما بهادر، مریم حسینی سربس،بهار عجم لطفی، مائده نوشادی، ماه منیر بهرامیان ، سیده گلناز خانی ۳

بررسی شیوع باکتری کمپیلوباکتر و گونه‌های آن در مرغ و بلدرچین تهیه شده از مراکز توزیع در استان خوزستان شهرستان اندیکا

زهرا متقی ، منوچهر مؤمنی شهرکی ، رضا سلطانی ، حسین خدابنده شهرکی.....۱۸

آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان

محمد حسین مرحمتی زاده ، کیمیا کاظم زاده شیرازی نژاد ، ماندانا حسن زاده ، زهرا جمالی ، سید امیرحسین نفیسی ، سید مصطفی فاموری ۲۶

شناسایی مولکولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های باکتری شیگلا جدا شده از شیرهای خام و پنیرهای سنتی

فرزانه حسنی ، مجتبی بنیادیان ، حمداله مشتاقی.....۴۰

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نانومولسیون عصاره زرشک (*Berberis vulgaris*) به عنوان نگهدارنده طبیعی در یک مدل غذایی

بهروز دست پیمان ، امیر شاکریان ، زهره مشاک ، ابراهیم رحیمی ، رضا شرافتی چالشتری.....۵۵

بررسی فراوانی آلودگی به *توکسوپلاسما* در گوسفندان استان البرز به روش نستد پی سی آر

سید رضا حسینی ، میلاد حمزه علی طهرانی ، نادیا طایفی نصر آبادی.....۷۸

مطالعه اثر استافیلوفاژ جدا شده از فاضلاب بر استافیلوکوکوس های جدا شده از شیرخام

نیما بهادر[۱]، مریم حسینی سربس[۱]،بهار عجم لطفی[۲]، مائده نوشادی[۲]، ماه منیر بهرامیان[۳] ، سیده گلناز خانی[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز،دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. گروه بیولوژی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران

۳ گروه صنایع غذایی، ، دانشکده علوم پایه، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز،دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

نویسنده مسئول: ni.bahador@iau.ac.ir

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس ، مهمترین عامل ورم پستان در میان حیوانات تولید کننده شیر می‌باشد. اخیراً این ارگانیسم به‌عنوان یک باکتری مقاوم به چند دارو شناسایی شده است، بنابراین هدف از تحقیق حاضر جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ازشیر گاو آلوده به ورم پستان و متعاقبا ارزیابی اثر فاژهای جدا شده از محیط برروی جدایه‌های بدست آمده می‌باشد. در تحقیق حاضر ۵۰ نمونه شیر، از دامداری‌هایی که گاوهایی مشکوک به ورم پستان داشتند جمع آوری گردید. نمونه‌ها به محیط کشت مانیتول سالت آگار منتقل گردید و کلنی‌ها مشکوک پس از رنگ آمیزی گرم به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. سپس الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها ارزیابی شد. از طرف دیگر فاژ از نمونه‌های فاضلاب جداسازی گردید و به کمک آزمون‌هایی شامل: عکسبرداری الکترونی، تعیین نوع نوکلئیک اسید، محدوده اثر بر میزبان، اثر pH شناسایی گردید.سپس اثر فاژ بر جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که از ۵۰ نمونه جمع آوری شده ۶ جدایه استاف به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی تایید گردید. همچنین از بین آنتی بیوتیک‌های انتخابی، آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل ، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین ۱۰۰٪ روی باکتری‌های جدا شده اثر داشته اند و سایر آنتی بیوتیکها اثرات متفاوتی نشان دادند. فاژ جداشده از محیط با بروز پلاگ‌های شفاف در دمای اتاق و ۳۷ درجه ،حاوی DNA، محدوده اثر باکتری‌های گرم مثبت و رشد در pH خنثی متعلق به خانواده سیفوویریده شناسایی گردید. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که فاژ بر جدایه استافیلوکوک اثر داشته و می‌تواند به‌عنوان یک عامل بیولوژیک کنترل کننده عفونت در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک، محصولات لبنی، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، ورم پستان، استافیلوفاژ

مقدمه

بر اساس گزارشات بدست آمده از سازمان بهداشت جهانی سالانه، ۴۲۰۰۰۰ نفر به دلیل بیماری‌های ناشی از مواد غذایی جان خود را از دست می‌دهند. این امر تاثیر اقتصادی ۱۱۰ میلیارد دلاری بر اقتصاد جهانی دارد. همچنین این سازمان اعلام نمود که تقریبا ۱۸ درصد از شیوع بیماری‌های عفونی مربوط به بیماریهای آب زاد در اروپا ۲۰۱۶ (Kulinkina *et al.*,) است که این درصد ممکن است در سایر قاره‌ها بیشتر باشد. از طرف دیگر، باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR) نه تنها در سلامت انسان بلکه در صنایع دامی نیز نگرانی بزرگ محسوب می‌شوند. بطوریکه استفاده بیش از حد ترکیبات ضد میکروبی در تولید محصولات غذایی حیوانی تا سال ۲۰۳۰ چیزی حدود ۶۷ ٪ پیش‌بینی شده است (Van Boeckel *et al.*, ۲۰۱۵). در این میان، چین بیش‌ترین مصرف کننده مواد ضد میکروبی و پس از آن ایالات‌متحده آمریکا، برزیل، آلمان و هند قرار دارند، که در گزارشات ذکر شده انتقال باکتری‌های MDR از حیوانات به انسان نیز توصیف شده است (Teng *et al.*, 2023) بنابراین با توجه به عوامل ذکر شده به نظر می رسد که بایستی به فکر راهکاری جدید جهت کنترل این ارگانیسمها بود.

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن انسانی - حیوانی است که عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، اجتماعی و طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های خفیف پوستی تا عفونت‌های شدیدمی باشد(Kluytmans & Wertheim, 2005). این ارگانیسم یکی از پر خطرترین باکتری‌های جدا شده از مواد لبنی است که به دنبال ورم پستان گاوی می‌توان آن را جدا نمود. بنابراین ارگانیسم مذکور مسبب کاهش روند اقتصاد، در کشورهای توسعه یافته به شمار می رود و بطور حتم، مقاومت چند دارویی آن چالش این روزها در علم پزشکی و دامپزشکی است(Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). امروزه فاژها به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی برای کنترل پاتوژن‌های غذایی و همچنین کاهش خطرات و ایمنی موادغذایی، مورد استفاده قرار می گیرند(Bueno *et al.*, 2012). باکتریوفاژهای لیتیک و محصولات ژنی آن‌ها می‌تواند بطور بالقوه عاملی در درمان باکتری‌هایی که میزبان خاصی دارند باشند و ضرر کمتری نسبت به آنتی بیوتیک ها دارند (Ameer Hamza *et al.*, 2016). در دهه‌های گذشته، استفاده از باکتریوفاژها در کشورهای غربی به عنوان جایگزینی برای درمان‌های شیمیایی مطرح شده‌است. باکتریوفاژها به خاطر حضور در محیط، به‌عنوان فراوان‌ترین عوامل بیولوژیکی روی زمین شناخته می‌شوند. به‌طور خلاصه، این گروه از ارگانیسمها قادر به لیز کردن باکتری‌های MDR و کاهش اثرات نامطلوب تولید شده توسط مواد شیمیایی بر روی مواد غذایی می‌باشند. در ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* ، کنترل عفونت به تنهایی دشوار است. امروزه کنترل موفق تنها به‌وسیله پیشگیری از عفونت‌های جدید و جمع

آوری گاوهای آلوده می باشد. در طول شیردوشی، به‌علت نوسان نامرتب و خلا هوا، باکتری می‌تواند در کانال پستان بالا رود. بر حسب این عمل، اگر جمع‌آوری به طور مناسب صورت نگیرد، به‌طور بالقوه باعث عفونت مجدد می گردد. در این میان بسیاری از گاوها ممکن است پس از زاییدن گوساله های خود مبتلا به عفونت تحت کلینیکی شوند. پایداری باکتری درغدد پستانی، موجب گسترش عفونت در زمان شیردوشیدن می گردد. بنابراین برای جلوگیری از افزایش شیوع عفونت، باید گاوهای عفونی از گله جدا شوند. در بسیاری از دامداری‌ها، به‌علت تعداد زیاد گاوهای عفونی، قادر به ریشه کن کردن *استافیلوکوکوس اورئوس* با وجود تکنیک شیرگیری استاندارد نیستند. بنابراین از آنجایی‌که امروزه از باکتریوفاژها در صنعت غذا استفاده می‌شوند(Harda ۲۰۱۸ *et al.*,) این گروه از ارگانیسم‌ها با استفاده از اندولیزین‌های کد گذاری شده توسط فاژ مسئول تجزیه پپتیدوگلیکان باکتریایی در مرحله نهایی چرخه هستند (Ghose Euler 2020 .,). بنابراین با توجه به اهمیت باکتری استافیلوکوک و تاثیر گذاری آن براقتصاد جامعه، هدف از تحقیق حاضر جداسازی باکتری ازشیر گاو آلوده به ورم پستان و متعاقباً مطالعه اثر فاژهای جدا شده از محیط بر جدایه‌ها در جهت کنترل ارگانیسم می باشد.

مواد و روشها

غربالگری *استافیلوکوکوس اورئوس* از شیر

در تحقیق حاضر ۵۰ نمونه شیر به صورت تصادفی از دامداری‌هایی که گاوهایی مشکوک به ورم پستان داشته و توسط دامپزشک مورد تایید قرار گرفته جمع آوری گردید. نمونه‌ها از اولین شیر صبحگاهی در بطری‌های استریل جمع آوری و با زنجیره سرد از طریق جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل و آنالیز انجام گردید. جهت جداسازی، نمونه‌ها با سواپ برروی محیط کشت مانیتول سالت آگار منتقل و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کلونی‌های زرد طلائی جهت آزمون‌های بعدی خالص سازی گردید(Fitzgerald *et al.*, 2001). برای شناسایی جدایه‌ها، ابتدا به کمک رنگ آمیزی گرم و سپس به کمک آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، احیای نیترات، تست ژلاتیناز، استفاده از قند گلوکز، DNAes، کواگولاز و همولیز آنالیز گردید(Bahador, 2005) .

تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه ها

تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به روش بررسی حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اساس CLSI ۲۰۱۷ مورد آنالیز قرار گرفت. برای این منظور یک دهم میلی لیتراز ارگانیسم فعال بر روی محیط مولرهینتون آگار منتقل ودر تمامی جهات به صورت چمنی کشت داده، سپس بوسیله پنس استریل آنتی بیوتیک‌های مورد نظر شامل:تتراسایکلین(۳۰TE)، سیپروفلوکساسین(۵CP)، آموکسی سیلین(۲۵AMX)،

آمپی سیلین(AM۱۰)، جنتامایسین(GM۱۰)، کلرامفنیکل(C۳۰)، نووبیوسین(NB) با فاصله از سایرآنتی بیوتیک ها و دیواره بر سطح پلیت منتقل گردید. محیط‌های کشت در اینکوباتور دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند وپس از زمان مذکور محیط براساس تشکیل هاله بررسی گردید و بر اساس استاندارد بین المللی CLSI۲۰۱۷ حساسیت و مقاومت آنها همراه با درصد فراوانی تعیین شد (Wang *et al.*, 2009; Wayne *et al.*,2011).

جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب

جهت جداسازی باکتریوفاژها از فاضلاب بیمارستان نمازی شیراز نمونه تهیه گردید. ابتدا جهت غنی سازی 20ml از آب فاضلاب با ۲۰ml محیط باکتریوفاژ براث مخلوط نموده و مقداری از کلنی باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* را با لوپ برداشته و در محیط کشت داده، سپس محیط‌ها دردمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت اینکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط فاژ براث کانسنتریت را از فیلتر با منفذ ۴۵ میکرومتر عبور داده شد و 1.0ml از محلول فیلتر شده فاژ براث کانسنتریت را با 1.0ml از باکتری کشت یافته در محلول نوترینت براث که ۲۴ ساعت از رشد آن گذشته مخلوط نموده و روی محیط نوترینت آگار کشت داده. محیط نوترینت آگار در سه دمای۴ دمای اتاق (۲۷درجه)، و ۳۷ درجه سیلسیوس قرار داده شد و بعد از ۵ ساعت هر ۲ ساعت یکبار محیط‌ها از نظر تشکیل پلاک مورد مطالعه قرار گرفت(Sambrook & David, 2001;Jamalludeen *et al.*, 2007).

شناسایی باکتریوفاژها

جهت شناسایی باکتریوفاژ با استفاده از عکسبرداری الکترونی، نمونه‌های عبور یافته از فیلتر سر سرنگی با منفذ ۴۵ میکرومتر به دانشگاه دامپزشکی شیراز بخش میکروسکوپ الکترونی منتقل گردید. نمونه فاژ مورد نظر برای عکسبرداری با اورانیل استات ۲% بر روی کربن پوشیده شده از مس با روش استاندارد منتقل و عکس‌ها با میکروسکوپ الکترونی CM-10 (شرکت فیلیپس هلند با ولتاژ KV۱۰۰) گرفته شد و بر حسب کمیته بین المللی رده‌های ویروسی ICTV طبقه بندی گردید(Jamalludeen *et al.*, 2007). تعیین نوکلئیک اسید فاژ، توسط آنزیم RNAse انجام شد و برای بررسی محدوده اثرگذاری فاژ، از باکتری‌های گرم مثبت شامل: استرپتوکوک، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و گرم منفی شامل: اشرشیا کلای و سالمونلا استفاده گردید. بدین منظور 1.0mlاز هر یک از باکتری‌های گرم مثبت به صورت مجزا در نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت رشد نموده به همراه 1.0ml از محلول فاژ براث بر روی محیط نوترینت

آگارافزوده و با سواپ بصورت چمنی کشت داده شد. پس از گذشت ۵ ساعت، هر ۲ ساعت یکبار محیط از نظر رشد پلاگ بررسی گردید (Jamalludeen *et al.*, 2007). همچنین جهت ارزیابی بقای فاژدر pH های مختلف، محیط کشت فاژ براث با pH های مختلف از ۹-۴ به کمک اسید کلریدریک و سود تهیه گردید. سپس نمونه فاژ خالص به مدت یک ساعت در محیط‌های مذکور دردمای ۳۷ درجه نگه داری شد. پس از زمان مذکور 0.1ml از باکتری‌های کشت یافته و 0.1ml از فاژ بر روی محیط کشت نوترینت آگار مخلوط شده و به‌صورت کامل در سطح پلیت به فرم سفره‌ایی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سیلسیوس قرار داده شد و پس از ۵ ساعت هر ۲ ساعت یک‌بار از نظر حضور پلاک مورد ارزیابی قرار گرفت(Bahador, 2005) .

آنالیز آماری داده ها

نتایج بدست آمده از الگوی آنتی بیوتیکی جدایه ها مورد آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA به کمک نرم افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

درتحقیق حاضر از بین ۵۰ نمونه شیر، ۶ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید که همگی به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شدند. نتایج حاصل از الگوی آنتی بیوتیکی در شکل (۱) و جدول (۱) نشان داده شده است، از بین آنتی بیوتیک‌های انتخابی، آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نووبیوسین ٪۱۰۰ روی باکتری‌های جدا شده اثر داشته اند. همچنین آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین و تتراسایکلین تا ٪۸۳,۴ و آنتی بیوتیک آمپی سیلین، ٪۶۶,۷ روی باکتری‌ها اثر داشته اند. نمونه شماره ۵ نسبت به آنتی بیوتیک‌ها خیلی حساس بوده است و نمونه شماره ۳ مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها داشته است. وسایر نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۴ و ۶ تقریبا به یک میزان نسبت به آنتی بیوتیک‌ها حساس بوده اند (جدول ۲).

شکل ۱- بررسی حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک

جدول **۱**- تعیین درصد حساسیت جدایه ها به آنتی بیوتیک‌ها

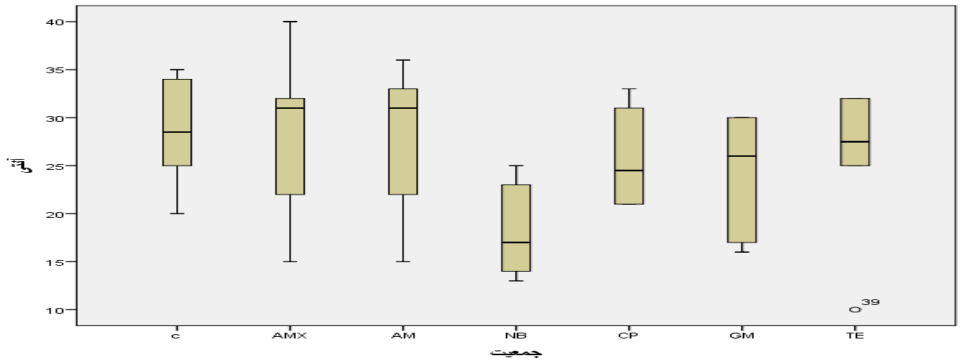
آنتی بیوتیک	(٪)حساس	(٪)نیمه حساس	(٪)مقاوم
کلرامفنیکل	۱۰۰	-	-
آموکسی سیلین	۶۶,۷	-	۳۳,۳
آمپی سیلین	۶۶,۷		۳۳,۳
نووبیوسین	۱۰۰		-
سیپروفلوکساسین	۱۰۰	-	-
جنتامایسین	۱۰۰	-	-
تتراسایکلین	۸۳,۴	-	۱۶,۶

جدول ۲- تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها

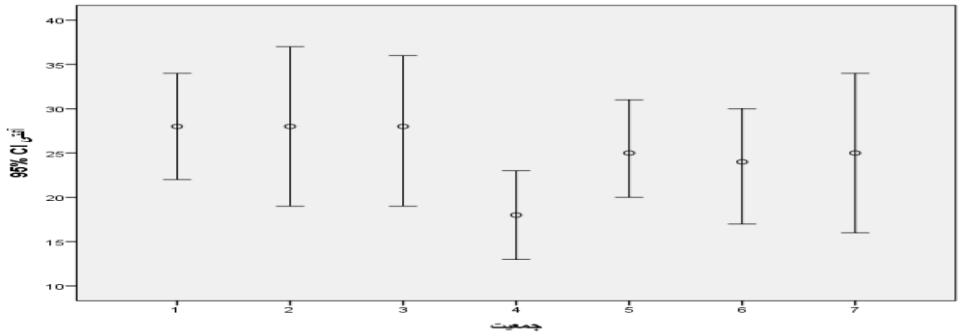
	C	AMX	AM	NB	CP	GM	TE
جدایه ها	۱۸<	۲۹<	۲۹<		۲۱<	۱۵<	۱۹<
۱	۲۵±۰,۵۷	۳۲±۰	۳۰±۰,۷	۱۷ ±۰,۵	۲۱±۰	۱۶±۰,۵	۳۰±۱,۱۵
۲	۲۶±۰	۳۰±۱,۴۱	۳۲± ۰,۷	۱۷±۰	۲۱±۰,۷	۱۷±۰,۷	۳۲±۰,۵۷
۳	۳۴±۰	۱۵ ±۰,۵	۱۵ ±۰,۵	۲۳±۱	۳۳±۰	۳۰±۰,۵	۱۰±۰
۴	۳۱±۱	۳۲±۰	۳۳±۱,۱۵	۱۴±۰,۵	۲۵±۰,۵	۲۵±۰,۵	۲۵±۰
۵	۳۵±۱,۴۱	۴۴±۱,۴۱	۳۶±۰,۵	۲۵±۰,۵	۳۱±۰,۵	۳۰±۰	۳۲±۱,۴۱
۶	۲۰±۰	۲۲±۰,۵	۲۲±۰,۵	۱۲±۰,۵	۲۴±۰	۲۷±۰,۵	۲۵±۰

طبق بررسی صورت گرفته توسط نرم افزار SPSS و آزمون‌های ANOVA، تفاوت معنی داری بین میانگین اثر گذاری آنتی بیوتیک‌ها وجود داشته است. همچنین طبق نمودار(۱) آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و جنتامایسین طول بیشتری را نشان داده که بیانگر پراکندگی بیشتر داده‌ها ست. با توجه به نمودار Box-Plot (۱) که برای جمعیت‌های غیر نرمال و مقایسه جمعیت‌ها کارایی دارد، توزیع داده‌ها در کل آنتی بیوتیک‌ها نامتقارن بوده است و آنتی بیوتیک‌های

کلرامفنیکل ، آموکسی سیلین ، آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین همپوشانی داشته اند ولی با آنتی بیوتیک نووبیوسین همپوشانی کمی مشاهده شده است. همچنین در این نمودار نووبیوسین با تتراسایکلین هیچ همپوشانی نداشته اند. طبق نمودار Error-Bar (۲) نیز میانگین اثر آنتی بیوتیک‌ها متفاوت بوده است و کل آنتی بیوتیک‌ها با هم همپوشانی داشته اند ولی با آنتی بیوتیک نووبیوسین کمترین هم پوشانی را داشته اند

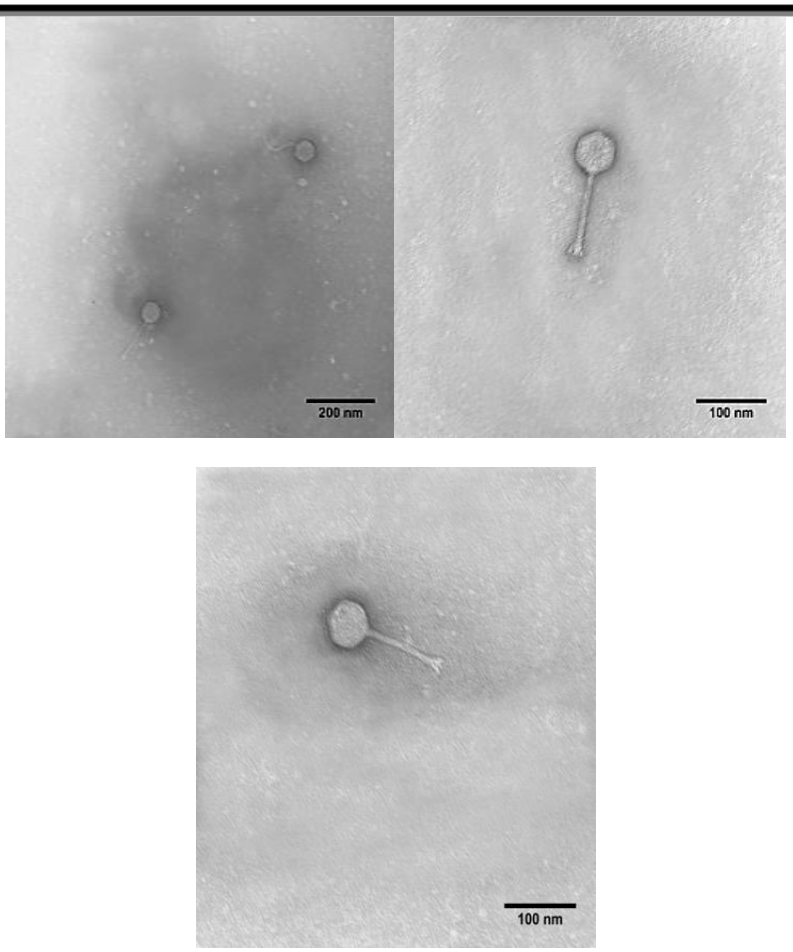


نمودار ۱- اثر آنتی بیوتیک‌ها بر نمونه‌ها به‌وسیله نمودار BOX-PLOT



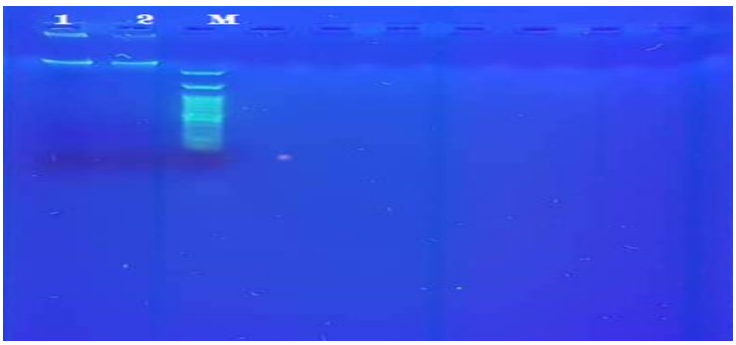
نمودار ۲- اثر آنتی بیوتیک‌ها بر نمونه‌ها به‌وسیله نمودار Error-Bar

در این تحقیق دو نوع استافیلوفاژ جدا شده که هر دو متعلق به خانواده سیفوویریده می باشد (شکل ۲) (ICTV-۲۰۰۵ International Committee on Taxonomy of Viruses).



شکل۲ – الکترون میکروگراف استافیلوفاژ

بررسی ماده ژنتیکی استافیلوفاژ با آنزیم RNAse مشخص کرد که هر دو فاژ حاوی ماده ژنتیکی، DNA است (شکل ۳).



شکل۳-تعیین نوکلیئک اسید استافیلوفاژهای جدا شده، چاهک اول: جدایه اول، چاهک دوم: جدایه دوم و چاهک سوم: لدر۱۰۰ جفت بازی (شرکت یکتا تجهیز ایران)

ازطرف دیگر تحقیق حاضر نشان داد که استافیلوفاژهای جدا شده بر روی باکتری‌های گرم مثبت شامل: استرپتوکوک، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* موثر بوده و پلاک مشاهده گردید، این در حالیست که بر روی باکتری‌های گرم منفی بی تاثیر بود. جهت ارزیابی بقای فاژ در pH های مختلف محیط کشت فاژ براث با pHهای مختلف از ۴-۹ به کمک اسید کلریدریک و سود تهیه گردید. تحقیق حاضر نشان داد که فاژها تنها در PH 7 بقای خود را حفظ نموده و اثر ضد باکتریایی خود را نشان میدهند.

بحث

شیر و فرآورده‌های آن به دلیل مفید بودنشان برای سلامتی و خصوصیات مناسب تغذیه‌ای آنها سبب شده است که امروزه در پژوهش‌های علمی و در تجارت، بسیار مورد توجه قرار گیرد(Farajvand & Alimohammadi, 2014). شیر یک غذای کامل اما در عین حال یک محیط رشد مناسب برای فعالیت باکتری‌های مختلف است. میکروب‌های شیر روی طعم و خواص فیزیکی شیر تاثیر نامطلوب داشته و موجب بیماری در انسان می‌شوند. بنابراین با توجه به تهیه محصولات لبنی مختلف از شیر خام و آماده سازی و رساندن آن احتمال وجود خطرات بهداشتی و انتقال باکتری‌های بیماری زا از گروه استافیلوکوک‌ها و انتروکوک‌ها در اثر مصرف این فرآورده‌ها وجود دارد (Najafi *et al.*, 2011). *استافیلوکوکوس اورئوس* ، باکتری مهاجم با توانایی گسترده استفاده از آنزیم‌ها و سموم مختلف است که در صنایع غذایی به عنوان یک میکروارگانیسم مهم به شمار می آید و متاسفانه امروزه سویه‌های مقاوم به داروی آن در کشورهای درحال توسعه و توسعه یافته بسیار گزارش شده است که می تواند تهدیدی بر سلامت جامعه باشد. این ارگانیسم از آنجایی‌که می تواند التهاب پستان را درگاو ایجاد نماید و بارها از شیر جداشده، قابل انتقال به انسان می‌باشد. این ارگانیسم همچنین به‌عنوان یک پاتوژن برجسته در عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی شناخته می‌شود که قادر به تحریک عفونت‌های مختلف در نقاط مختلف بدن در بیماران است و بروز عفونت‌های شدید با این ارگانیسم اغلب با میزان قابل توجهی مرگ و میر(۲۵ درصدی) همراه است. در غیاب درمان‌های جایگزین بهتر، آنتی بیوتیک‌ها هنوز رویکرد اصلی برای درمان عفونت‌ها هستند، با این حال استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها به نوبه خود منجر به افزایش مقاومت ضد میکروبی شده است. بنابراین، ضروری است که استراتژی‌های جدیدی برای کنترل عفونت‌های مقاوم به دارو ایجاد شود . طی مطالعه‌ای که صدیقی فرد و همکاران در ایلام در خصوص بررسی آلودگی شیر خام از نظر اشرشیاکلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند، دریافتند که میزان آلودگی اشرشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* از زمان دوشیدن شیر تا مرحله فروش به‌طور معنی داری افزایش می‌یابد (Sadeghifard *et al.*, 2006). اخیرا مشخص شده که ۳٪ از حیوانات درگیر عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند (Schulz-Collins & Senge, 2004) . همچنین *استافیلوکوکوس اورئوس* ، ۱۰ تا ۱۲ درصد از عفونت‌های ورم پستان را شامل

می شود. بنابراین هدف اصلی تحقیق اثر استافیلوفاژ به‌عنوان یک محافظ بیولوژیک بر روی استافیلوکوک‌های جدا شده از شیر گاوهای آلوده به ماستیت می‌باشد تا به این طریق سویه‌های مقاوم شناسایی شده و اثر فاژ بر روی آنها مطالعه گردد. باکتریوفاژها، برای درمان عفونت‌های باکتریایی پیش از ظهور آنتی بیوتیک‌ها مورد استفاده بودند، اما پس از آن به دلیل درک نظری محدود و فرایندهای آماده‌سازی ناکارآمد در آن زمان با آنتی بیوتیک‌ها جایگزین شدند. اخیرا به دلیل مشکل جدی مقاومت به آنتی بیوتیک دوباره توجه بسیاری از محققان به فاژها از جمله استافیلوفاژ جلب شده است. در ایالات متحده حدود ۴۰ تا ۶۰ ٪ سویه‌های استافیلوکوکی بیمارستانی مقاومت چند دارویی گزارش شده است (Levy & Marshall, 2004) و سرعت مرگ و میر گونه‌های مقاوم به متی سیلین نسبت به گونه‌های حساس به متی سیلین سه برابر شدیدتر است. به‌طوری که طی تحقیقی که توسط رولا و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک دوره سه ساله بر روی شیر خام انجام گردید نشان داد که پنیرهای تهیه شده از شیر مذکور از نه مزرعه دامداری در لهستان تهیه گردید که از ۲۴۴ نمونه جدا شده قادر به جداسازی ۱۲۲ جدایه استافیلوکوک با میزان ۵۰٪ فراوانی بوده است. وی همچنین نشان داد که میزان مقاومت به تتراسیکلین در بین جدایه‌ها ۴,۱٪ بوده است که در مقایسه با تحقیق حاضر (۱۶,۶٪) کمتر می‌باشد. بنابراین پیشنهاد نمودند که نمونه‌های شیر و پنیر تولید شده در کشور باید به طور مرتب از نظر حضور این ارگانیسم و مقاومت آنتی بیوتیکی ارزیابی شود (Can *et al.*, 2017). همچنین کان وهمکاران در سال ۲۰۱۷ برروی *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی سیلین جدا شده از شیرخام، پنیر، گوشت چرخ کرده گوساله و نمونه‌های گوشت مرغ انجام شده، از ۱۶۰ نمونه جمع آوری شده ۲۰ نمونه درگیر با ارگانیسم مذکور بوده است که چیزی حدود ۱۲,۵٪ می باشد این درحالیست که در مقایسه با تحقیق حاضر میزان باکتری‌های جدا شده ۶٪ است. از طرف دیگر میزان ارگانیسم‌های مقاوم به متی سیلین در تحقیق انجام شده توسط کان و همکاران ۹۷٪ بوده است که در تحقیق حاضر جدایه‌ها با ۳۳,۳٪ مقاوم به آمپی سیلین وآموکسی سیلین گزارش شده اند. همچنین اثر جنتامایسین در ایزوله‌های هر دو تحقیق به صورت یکسان گزارش شده و برابر ۱۰۰ درصد بوده است این در حالیست که اثر تتراسیکلین در بین جدایه‌های بدست آمده از هر دو تحقیق متفاوت می‌باشد و چیزی برابر ۳۰٪ برای جدایه‌های کان و همکاران است و برای جدایه‌های بدست آمده از تحقیق حاضر برابر ۱۶,۶٪ می‌باشد(Rola et al., 2016) .

در پژوهش حاضر، از فاضلاب بیمارستان نمازی شیراز به منظور جداسازی باکتریوفاژ علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نمونه گیری انجام شد. باکتریوفاژها پس از شناسایی اولیه جهت اثر بر روی جدایه‌های استاف از شیر خام مورد ارزیابی قرار گرفت. کنترل باکتری‌های جدا شده از شیر توسط باکتریوفاژ بحثی است که توسط پری ماراتنی و همکاران نیز در رابطه با باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از غذا نیز اشاره شده است. وی و همکاران اعتقاد داشتند که باکتریوفاژها می توانند به عنوان یک جایگزین مناسب برای باکتری‌های جدا شده از غذا به شمار آیند. بر همین اساس پس از غربالگری اولیه باکتری‌های از غذا باکتریوفاژ از نمونه های

محیطی و غذا جداسازی و اثر آن را بر روی باکتری‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژن* و *اشریشیا کلی* مورد ارزیابی قرار دادند و از آن به‌عنوان یک عامل موثر درکنترل باکتری‌های غذازاد معرفی نمودکه تحقیقات وی در راستای تحقیق حاضر می باشد (Premarathne *et al.*, 2017).

نمونه‌ها پس از غنی سازی توسط میکروسکوپ الکترونی مورد آنالیز قرار گرفت و بر اساس تعیین ماده ژنتیکی (DNA)، مرفولوژی و نوع پلاگ در خانواده سیفوویریده مانند سایر پژوهش‌های پیشین معرفی گردید(Deghorain & Van Melderen, 2012). در تحقیق حاضر بهترین زمان اثر گذاری فاژ بر جدایه‌های استافیلوکوک بین ۶ تا ۸ ساعت پس از کشت و بهترین دمای اثرگذاری، دمای اتاق و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تعیین شد که بر خلاف پژوهش انجام شده توسط جمال الدین و همکاران می‌باشد(Jamalludeen et al., 2007). همچنین فاژ درpH خنثی(Kluytmans & Wertheim, 2005) به‌خوبی رشد داشت که مشابه باتحیقات سایرین می باشد (Mishra et al., 2014).

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، اثر فاژ بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بیانگر آن بود که با توجه به روند افزایش مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف، می‌توان از فاژتراپی برای نابودی این باکتری استفاده کرد. بیشترین اثر فاژ بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ، پس از گذشت حدودا ۸ ساعت از زمان کشت و در دمای اتاق وهمچنین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد که می‌توان این امر را در حذف ارگانیسم در نظر گرفت و فاژ درمانی را به جایگزین درمان با آنتی بیوتیک قرار داد.

منابع

1. Ameer Hamza, A. H., Shehla Perveen, S. P., Zaigham Abbas, Z. A., & Shafiq-ur-Rehman, S.-u.-R. (2016). The lytic SA phage demonstrate bactericidal activity against mastitis causing *Staphylococcus aureus*. Journal of Open life sicence, 11(1):39.
2. Bahador, N. (2005). *Bacteriophages isolation characterization and exploitation in environmental problems* [PhD, Puna University].
3. Baserisalehi, M, Bahador, N. : diagnostic of bacteriology , Navid Publication ۲۰۱۲, ۱۰۵
4. Bueno, E., García, P., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of Staphylococcus aureus in fresh and hard-type cheeses. *International journal of food microbiology*, *158*(1), 23-27.
5. Can, H. Y., Elmalı, M., & Karagöz, A. (2017). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean journal for food science of animal resources*, *37*(2), 175.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. (**۲۰۱۴**). ‘’Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement’’. CLSI document M**۱۰۰**-S**۲۴**, **۳۴**: **۲۱۹**.
7. Deghorain, M., & Van Melderen, L. (2012). The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses*, *4*(12), 3316-3335.
8. Farajvand, N., & Alimohammadi, M. (2014). Prevalence of Staphylococcus aureus in four famous brand of doogh produced in Iran. *Iranian Journal of Health and Environment*, *7*(1).
9. Fitzgerald, J. R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., & Smyth, C. J. (2001). Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens. *Journal of bacteriology*, *183*(1), 63-70.
10. Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., & Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic Escherichia coli. *Veterinary microbiology*, *124*(1-2), 47-57.
11. Harda, L., Silva, E., Campos, WF., Fiol, F. (2018) . biotechnological applications of bacteriophages: state of the art. 212-213: 38-58.
12. Kluytmans, J., & Wertheim, H. (2005). Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. *Infection*, *33*, 3-8.
13. Kulinkina, A. V. Shinee, E. Herrador, B., Nygard, K. and Schmoll, O. (2016). The situation of water-related infectious diseases in the Pan-European Region. WHO.
14. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, *10*(Suppl 12), S122-S129.

15. Li, J., Law, H. K., Lau, Y. L., & Chan, G. C. F. (2004). Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *British journal of haematology*, *127*(3), 326-334.
16. Mishra, A., Sharma, N., Kumar, A., Kumar, N., Bayyappa, M. G., & Kumar, S. (2014). Isolation, characterization and therapeutic potential assessment of bacteriophages virulent to Staphylococcus aureus associated with goat mastitis. *Iranian journal of veterinary research*, *15*(4), 320.
17. Najafi, A., Ziabakhsh, D. M., Karimian, H., Abedinia, A. R., & Hosseininezhad, M. (2011). Microbiological changes of pousti cheese during ripening. *Journal of Food Technology and Nutrition*, *8*(2), 85-91.
18. Premarathne, J., Thung, T., New, C., Huat, J., Basri, D., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Son, R. (2017). Distribution of bacteriophages in food and environment samples. *International Food Research Journal*, *24*(2), 888-896.
19. Rola, J. G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2016). Occurrence of Staphylococcus aureus on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins*, *8*(3), 62.
20. Sadeghifard, N., Jalilian, A., Seidkhani, A., & Rostamzad, A. (2006). A study on contamination of E. coli and S. aureus in raw milk in Ilam during 1999-2003. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *14*(1), 44-49.
21. Sambrook, J., & David, W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York* (3rd ed.).
22. Schulz-Collins, D., & Senge, B. (2004). Acid- and acid/rennet-curd cheeses part A: Quark, cream cheese and related varieties. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 2, pp. 301-328).
23. Teng., L., Feng, M., Liao, S., Zheng, Zh., Jia, Ch., Zhou, X., Nambiar, RB., M, Zh., and Yue M. (2023). A cross sectional study of companion animal derived multi drug E. coli in Hangzhou, China. Journal of Microbiol Spectr. 11(2); e02113-22.
24. Van Boeckel., T., P. Brower, C., Gilbert, M. & Laxminaryan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food. Journal of PNAS. 112(18) 5649-5654.
25. Wang, X., Xu, M., Cai, Y., Yang, H., Zhang, H., & Zhang, C. (2009). Functional analysis of the disulphide loop mutant of staphylococcal enterotoxin C2. *Applied microbiology and biotechnology*, *82*, 861-871.
26. Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

Study on isolated staphylophage from waste water on detected Staphylococcus from raw milk

Nima Bahador[1], Maryam Hoseini sarbas[1], Bahar Ajam Lotfi[2], Maedeh Noshadi[2], Mahmonir Bahramian[3] and seyedeh Golnaz Khani[2]

1. Department of Microbiology, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Department of Biology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran
3. Department of Food Industry, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Corresponding author: ni.bahador@iau.ac.ir

Abstract:

Staphylococcus aureus is an important agent of mastitis among animal with capability to produce dairy compounds. Nowadays, the organism is recognized as multi drug resistant organism. Therefore, the aim of this study is isolation of *Staphylococcus aureus* from raw milk of cows infected with mastitis and the evaluation of bacteriophage on the same organisms. In this study 50 milk samples were collected from suspected cows with mastitis. The samples were cultivated on mannitol salt agar and the supposed colonies were identified using gram stain and biochemical tests. Then antibiotic pattern were evaluated. On the other hand, the sewage samples were collected and based on some tests including: electron micrograph, nucleic acid type, host range, pH bacteriophages were identified. Results indicated that out of 50 samples 6 isolates were confirmed using biochemical tests. In addition among antibiotics, chloramphenicol, ciprofloxacin, and gentamycin 100% had effect on the isolates and the other antibiotics showed different results. Detected phages showed clear plaque at room temperature and 37C, and they were belong to siphoviridae family with DNA, and had effect on gram positive bacteria at neutral pH. The results illustrated that phages had effect on *Staphylococcus aureus* and we could use them as biocontrol agents against infections.

Key words: Biological control, Dairy product, *Staphylococcus aureus*, mastitis, Staphylophage

بررسی شیوع باکتری کمپیلوباکتر و گونه‌های آن در مرغ و بلدرچین تهیه شده از مراکز توزیع در استان خوزستان شهرستان اندیکا

زهرا متقی [۱]، منوچهر مؤمنی شهرکی [۲*]، رضا سلطانی [۱]، حسین خدابنده شهرکی [۳]

۱. دانشجوی دکتری بهداشت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. گروه بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

***نویسنده مسئول: momeniman@yahoo.com**

چکیده

کمپیلوباکتر یکی از اصلی‌ترین عوامل بالقوه ایجاد کننده‌ی اسهال و گاستروآنتریت‌های باکتریایی در انسان در سراسر جهان است. غذای آلوده به خصوص گوشت طیور به عنوان عامل اصلی انتقال بیماری مطرح می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین شیوع گونه‌های کمپیلوباکتر در گوشت مرغ و بلدرچین در استان خوزستان شهرستان اندیکا، انجام شد. نمونه برداری بصورت تصادفی از مراکز توزیع گوشت پرندگان تهیه و در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. در زمستان ۱۴۰۲ در مجموع ۸۰ نمونه گوشت شامل ۴۰ نمونه گوشت مرغ و ۴۰ نمونه گوشت بلدرچین جمع آوری و جهت ارزیابی وجود کمپیلوباکتر مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۵۶ نمونه از ۸۰ نمونه (۷۰ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر بودند که از این تعداد ۲۷ نمونه از ۴۰ نمونه مرغ (۶۷/۵ درصد) و ۲۹ نمونه از ۴۰ نمونه بلدرچین (۷۲/۵ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر بودند. علاوه بر آن نمونه‌های مثبت با پرایمرهای اختصاصی *16SrRNA* و جهت بررسی گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* به ترتیب از ژن‌های اختصاصی *mapA* و *ceuE* استفاده گردید. همچنین فراوانی آلودگی به گونه‌های کمپیلوباکتر مورد بررسی قرار گرفت که مشاهده شد فراوانی آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* (۸۵/۷۱ درصد) با اختلاف معنی داری بیشتر از فراوانی آلودگی به *کمپیلوباکتر کلی* (۸/۹۲ درصد) بود.

کلمات کلیدی: *کمپیلوباکتر ژژونی*، *کمپیلوباکتر کلی*، گوشت مرغ، گوشت بلدرچین

مقدمه

گوشت و فرآورده‌های جانبی طیور از مهم‌ترین منابع میکروارگانیسم‌های غذازدایی مثل سالمونلا، کمپیلوباکتر، لیستریا و اشرشیاکلی انترپاتوژن محسوب می‌شود وگزارشات فراوانی که شیوع آنتریت ناشی از کمپیلوباکتر به دنبال مصرف گوشت و فرآورده‌های طیور در سراسر جهان گزارش شده است. لذا کنترل کیفیت این فراورده‌ها در مراحل مختلف تولید و توزیع از اهمیت زیادی برخوردار است (Frederick et al., 2011, Horrocks et al., 2009). در اکثر موارد عفونت‌های باکتریایی خود محدود شونده هستند و لذا نیازی به درمان آنتی بیوتیکی نیست مگر در مواردی که بیماری با علائم شدید و طولانی مدت بروز نماید و همچنین در بیمارانی که از ضعف سیستم ایمنی رنج می‌برند (ketley., 1997). کمپیلوباکتر میکروارگانیسم گرم منفی از خانواده کمپیلوباکتریوزیسه متشکل از ۱۸ گونه و با خاصیت رشد میکروآئورفیلیک می‌باشد (Corry et al., 2001, Frederick et al., 2011). در بین گونه‌های کمپیلوباکتر، *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکترکلی* مهم‌ترین گونه‌های بیماری زا برای انسان معرفی شده‌اند که با فراوانی بسیار بالا نسبت به سایرگونه ها از موارد بیماری‌های انسانی جداسازی شده‌اند (Corry et al., 2001, Horrocks et al., 2009, Hussain et al., 2007). کمپیلوباکتریوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام و از جمله مهم‌ترین عوامل وقوع گاستروآنتریت در کشورهای پیشرفته و به عنوان دومین عامل گاستروانتریت پس از سالمونلا در کشورهای در حال توسعه خصوصاً در بین کودکان و افراد مسن گزارش شده است (Franchin et al., 2007). علائم کمپیلوباکتریوزیس به طور تیپیک با اسهال آبکی همراه با مخاط می‌باشد که در موارد شدیدتر منجر به اسهال خونی می‌شود. بر پایه آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد از موارد اسهال‌های باکتریایی گزارش شده ناشی از گونه‌های کمپیلوباکترخصوصا *کمپیلوباکترژژونی* (۹۵ درصد) و *کمپیلوباکترکلی* (۴ درصد) می‌باشد (Van looveren et al., 2001). مصرف گوشت طیور نیم پز شده و فرآورده‌های آن به عنوان مهم‌ترین منبع آلودگی انسان محسوب می‌شود هرچند که گوشت سایر انواع دام‌ها، شیر و فرآورده‌های آن از دیگر منابع بالقوه این پاتوژن گزارش شده‌اند. گزارشات وسیعی در خصوص شیوع کمپیلوباکتر در پرندگان و حیوانات زنده و انواع مواد غذایی از سراسر دنیا وجود دارد و در این بین، محدوده وسیعی از نتایج مشاهده می‌شود (Frederick et al., 2011, Suzuki et al., 2009). یکی از دلایل اصلی آلودگی لاشه‌ی مرغ به کمپیلوباکتر حضور زیاد کمپیلوباکتر در روده‌ی طیور به سن کشتار رسیده و آلوده شدن لاشه درحین پروسه‌ی کشتار است (Saife et al., 2008). از این جهت بررسی و مطالعه در مورد قسمت‌های مختلف کشتارگاه و نقش آن‌ها در آلوده شدن لاشه‌ی مرغ و بلدرچین به کمپیلوباکتر اهمیت پیدا می‌کند. اما با توجه به اینکه در مورد میزان آلودگی لاشه‌ی مرغ و بلدرچین به کمپیلوباکتر اطلاعات دقیقی در دست نیست لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی شیوع کمپیلوباکتر در لاشه‌ی مرغ و بلدرچین عرضه شده در بازار در شهرستان اندیکا انجام شد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در این مطالعه طی فصل زمستان ۱۴۰۲ با مراجعه به بازار فروش شهرستان اندیکا مجموعاً ۸۰ نمونه گوشت مرغ و بلدرچین به صورت تصادفی اخذ شد و به ظروف درب دار استریل حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط آبگوشت مغذی کمپیلوباکتر انتقال یافت. نمونه‌ها در کنار یخ۰ به آزمایشگاه انتقال داده شد وسپس آزمایشات جهت جداسازی گونه‌های کمپیلوباکتر حداکثر تا ۲۴ ساعت پس از نمونه گیری انجام شد.

جداسازی و تفکیک گونه‌های کمپیلوباکتر

جهت جداسازی گونه‌های کمپیلوباکتر از هر نمونه هموژن ۵ میلی لیتر به ۴۵ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده کمپیلوباکتر

غنی شده با مکمل انتخابی کمپیلوباکتر و ۲۵ میلی لیتر خون دفیبرینه گوسفند برای هر ۴۷۵ میلی لیتر محیط اضافه، سپس این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت ۰/۱ میلی لیتر از آن به روش خطی بر روی محیط کشت انتخابی کمپیلوباکتر غنی شده با مکمل آنتی بیوتیکی و ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند (Campylobacter selective agar) کشت داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور CO2 دار قرار گرفت. پس از طی زمان مورد نظر پلیت ها از نظر حضور پرگنه های مسطح، غیر همولیتیک، خاکستری رنگ به قطر حدود ۱ میلی متر، مدور وآبکی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی گرم پرگنه های حاوی باسیل‌های گرم منفی، کشیده وفنری شکل مورد آزمایش کاتالاز قرار گرفتند. جهت تشخیص تفریقی *کمپیلوباکتر ژژونی* از *کمپیلوباکتر کلی* از آزمایش هیدرولیز هیپورات استفاده شد. برای این کار نمونه‌ها به محیط آبگوشت قلب[1]حاوی هیپورات سدیم منتقل شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در گرمخانه‌ی ۴۲ درجه سانتی گراد قرارگرفت سپس ۰/۸ میلی لیتر از این محیط کشت با ۰/۲ میل لیتر از محلول فریک کلراید ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. پس از آن نمونه‌های دارای رسوب به عنوان گونه‌ی *کمپیلوباکتر ژژونی* تلقی شدند. همچنین نمونه‌های فاقد رسوب نشان دهنده‌ی گونه‌ی *کمپیلوباکترکلی* بودند.

جهت تأیید نهایی گونه‌های کمپیلوباکتر از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با زوج پرایمرهای معرفی شده در جدول ۱ استفاده شد. به این منظور باکتری‌های جداشده در مرحله‌ی قبل به مدت یک شب در محیط مایع لوریا برتانی[2]در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس DNA ژنومی باکتری‌های رشد یافته با استفاده از روش Boiling استخراج گردید و در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آزمایش PCR جهت تشخیص کمپیلوباکتر با استفاده از پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر buffer Loding و ۱۵۰ میکرومول DNTP mix و ۲ میلی مول Mgcl و ۱ میکرومول از پرایمرهای Yer-F,R و ۱ واحد آنزیم Taq DNA و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۷۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۸۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در هر مرحله ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویر بردار ژل (U.K) قرائت شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کلی*

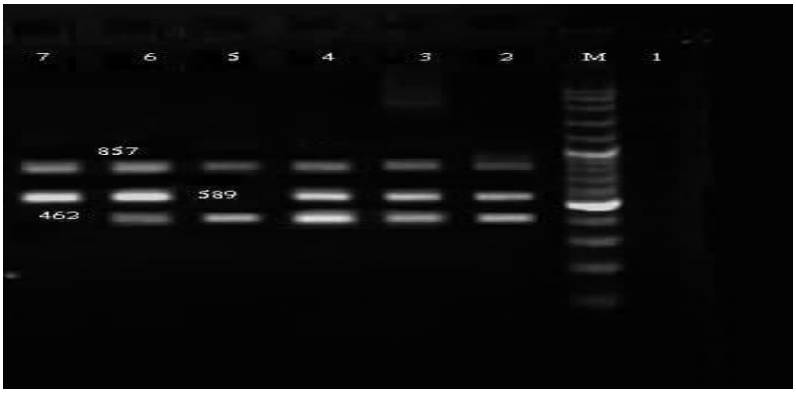
ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول
16SrRNA Campylobacter	3′ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC 5′ 3′ GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T 5′	857 bp
mapA C. Jejuni	3′CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG 5′ 3′ GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A 5′	589 bp
ceuE C. coli	3′AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG 5′ 3′ TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG 5′	462 bp

[1] Heart infusion broth

[2] Luria Bertani

نتایج

در این تحقیق از مجموع ۸۰ نمونه گوشت مرغ و بلدرچین بررسی شده ۵۶ (۷۰ درصد) نمونه از نظر حضور کمپیلوباکتر مثبت بودند. درجدول ۲ به طور خلاصه نتایج شیوع آلودگی نمونه‌ها به گونه‌های کمپیلوباکتر آورده شده است. شیوع آلودگی کمپیلوباکتر در گوشت مرغ و بلدرچین به ترتیب ۶۷/۵ و ۷۲/۵ درصد مشاهده شد که آلودگی نسبت به گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* در مرغ و بلدرچین ۴۸ نمونه (۸۵/۷۱ درصد) و *کمپیلوباکتر کلی* ۵ نمونه (۸/۹۲ درصد) و نمونه‌های واجد هر دو گونه ۳ نمونه (۵/۳۵ درصد) گزارش گردید.



شکل -۱ تصویر ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ردیابی جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کلی*
شماره ۱ کنترل منفی، M مارکر bp ۱۰۰، شماره ۲ کنترل مثبت، شماره ۳،۴،۵،۶،۷ مربوط به نمونه ها

جدول ۲: نتایج بدست آمده از کشت میکروبی و بررسی مولکولی نمونه‌ها

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت	تعدادنمونه های مثبت در PCR
مرغ	۴۰	۲۷ (۶۷/۵ درصد)	۲۴(۸۸/۸۸ درصد) کمپیلوباکتر *ژژونی* ۲(۷/۴۰ درصد) *کمپیلوباکتر کلی* ۱(۱/۷۰ درصد) *کمپیلوباکتر ژژونی* و کلی
بلدرچین	۴۰	۲۹ (۷۲/۵ درصد)	۲۴(۸۲/۷۵ درصد) کمپیلوباکتر *ژژونی* ۳(۱۰/۳۴ درصد) *کمپیلوباکتر کلی* ۲(۶/۸۹ درصد) *کمپیلوباکتر ژژونی* و کلی

بحث

بیماری‌های منتقل شده به‌وسیله غذا، از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا است و گونه‌های کمپیلوباکتر، عمدتاً *کمپیلوباکتر کلی* و *کمپیلوباکتر ژژونی* به عنوان شایع‌ترین باکتری ایجاد کننده گاستروانتریت منتقله از طریق غذا در انسان شناسایی شده است. منبع اصلی کمپیلوباکتریوزیس درانسان گوشت آلوده طیور است. به طوری که در انسان ۷۰ درصد از عفونت‌های ایجاد شده با مصرف گوشت آلوده مرغ ایجاد می‌شود (Saife et al., 2008). در انسان یا حیوانات کمپیلوباکتر معمولاً در اندام‌های تناسلی، مجرای روده‌ای و محوطه دهانی یافت می‌شود. درحالی که بیشتر گونه‌ها برای انسان‌ها بیماریزا هستند، حیوانات می‌توانند حامل‌های بدون علامت باشند (Humphrey et al., 2007). در انسان، بالاترین موارد ایجادکننده بیماری مربوط به *کمپیلوباکتر ژژونی* است که ممکن است نشان دهنده این مطلب باشد که

مرغ و گاو منابع اصلی کمپیلوباکتریوز در بیماران می‌باشند (Nielsen et al., 1997). در مطالعه حاضر ۶۷/۵ درصد از نمونه‌های مرغ و ۷۲/۵ درصد از نمونه‌های بلدرچین آلوده به کمپیلوباکتر بودند. در تحقیق انجام شده توسط رحیمی در ۲۰۱۳ نمونه‌هایی از گوشت مرغ در دو کشتارگاه شهرستان شهرکرد تهیه شد که طبق نتایج حاصل از این تحقیق ۵۶/۷ درصد نمونه‌ها آلوده به کمپیلوباکتر بودند (Rahimi, 2013). رحیمی و همکاران در ۲۰۰۸ میزان آلودگی گوشت طیور به کمپیلوباکتر در اصفهان را ۵۶/۱ درصد گزارش نمودند (Rahimi and Tajbakhsh 2008). مختاریان دلویی و همکاران در ۲۰۰۹ در یک بررسی میزان آلودگی لاشه طیور کشتار شده در کشتارگاه صنعتی گناباد به کمپیلوباکتر را ۳۱ درصد گزارش نمودند (Mokhtarian et al., 2009). طارمی و همکاران در ۲۰۰۶ از مرغ‌های فروشگاه‌های تهران نمونه گیری نموده و پس از بررسی میزان آلودگی به کمپیلوباکتر را ۶۳ درصد گزارش نمودند (Taremi et al., 2006). فرانچین و همکاران در ۲۰۰۷ در کشتارگاه‌های برزیل به بررسی آلودگی لاشه مرغ در مراحل مختلف کشتار پرداختند که ۶۸ درصد نمونه‌ها بعد از مرحله پر کنی آلوده به کمپیلوباکتر بودند (Franchin et al., 2007). در مطالعه Hussian و همکاران در ۲۰۰۷ در پاکستان میزان شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در گوشت مرغ را به ترتیب ۷۲ درصد و ۲۸ درصد گزارش نمودند (Hussian et al., 2007). در مطالعه رئیسی و همکاران در ۲۰۱۷ میزان آلودگی گوشت مرغ به *کمپیلوباکتر ژژونی* و کلی ۴۰/۸ درصد گزارش گردید (Raeisi et al., 2017). در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در گوشت مرغ به ترتیب ۸۸/۸۸ درصد و ۷/۴۰ درصد و در گوشت بلدرچین به ترتیب ۸۲/۷۵ درصد و ۱۰/۳۴ درصد گزارش گردید. در مطالعه بخشی در ۲۰۱۶ برروی نمونه گوشت مرغ در بازار تهران میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* را صفر و آلودگی به *کمپیلوباکتر کلی* را ۷۰ درصد گزارش نمودند (بخشی، ۲۰۱۶). طبق مطالعه Kagambega و همکاران در ۲۰۱۸ از ۲۰ لاشه مرغ، ۱۰ مورد کمپیلوباکتر جداسازی نمودند که همه *کمپیلوباکتر ژژونی* بودند (Kagambega et al., 2018). در مطالعه حسین پور و همکاران در ۲۰۱۷ ۳۱ درصد از نمونه‌های گوشت مرغ آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* گزارش گردید (حسین پور و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه دیگری توسط Babaei همکاران در ۲۰۱۶ میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* به ترتیب ۵۹/۷۹ درصد و ۴/۲ درصد گزارش گردید (Babaei et al., 2016). Ma وهمکاران در ۲۰۱۷ در چین طبق مطالعاتی که داشته‌اند در مجموع میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* را ۱۸ درصد گزارش کردند (Ma et al., 2017). در مطالعه‌ای که توسط Dan و همکاران در رومانی انجام شد میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونی* را ۷ درصد گزارش نمودند (Dan et al., 2015).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر وجود درصد بالایی از آلودگی را در گوش‌های مرغ و بلدرچین در حال توزیع را نشان داد. این آلودگی به میزان زیادی توسط *کمپیلوباکتر ژژونی* بود، هرچند سایر گونه‌ها نیز در این نمونه‌ها شناسایی گردیدند. لذا جهت کاهش بار آلودگی گوشت و فرآورده‌های آن به گونه‌های کمپیلوباکتر و سایر میکروارگانیسم‌های مشابه رعایت اصول بهداشت محیط و بهداشت فردی در کشتارگاه‌ها، رعایت اصول HACCP در زنجیره کشتار دام و طیور، به حداقل رساندن آلودگی لاشه‌ها با جلوگیری از تماس لاشه و احشاء خوراکی به محتویات دستگاه گوارش، به حداقل رساندن تماس لاشه‌ها با یکدیگر، حداقل دستکاری و استفاده از آب قابل شرب در پروسه کشتار لازم به نظر می‌رسد. همچنین رعایت اصول بهداشت در مراحل قطعه بندی، بسته بندی و حمل و نقل و حفظ زنجیره سرما در طول مرحله نگهداری گوشت تا رسیدن به دست مصرف کننده از اهمیت بالای در کاهش بار آلودگی لاشه‌ها به این پاتوژن ها خواهد داشت. آزمایش‌های منظم و اطلاع رسانی مناسب به مصرف کنندگان می‌تواند تا حد زیادی

از وقوع عفونت‌های کمپیلو باکتریایی بکاهد. در این خصوص پیشگیری از آلودگی‌های متقاطع مواد غذایی آماده مصرف و پخت کامل گوشت قبل از مصرف توصیه می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

منابع

1. Babaie Najad Basiri F, Haghighi Khoshkhoo P, Akbariazad G. Prevalence and Antibacterial Susceptibility of Thermophilic Campylobacter spp. in Broiler Chickens. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2016;26:1369-1385.
2. Bakhshi B, Kalantar M, Rastegar-Lari A, Fallah F. PFGE genotyping and molecular characterization of Campylobacter spp. isolated from chicken meat. Iranian Journal of Veterinary Research 2016;17(3):177.
3. Corry J.E. and Atabay H.I. (2001). Poultry as a source of Campylobacter and related organisms. Journal of Applied Microbiology, 90: 96S-114S.10- Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J. and Ricke S.C. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe,15:18-25.
4. Dan SD, Tabaran A, Mihaiu L, Mihaiu M. Antibiotic susceptibility and prevalence of foodborne pathogens in poultry meat in Romania. The Journal of Infection in Developing Countries 2015;9(01):035-41.
5. Franchin P.R., Ogliari P.J. and Batista C.R.V. (2007). Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. British Poultry Science, 48: 127-132.
6. Frederick A. and Huda N. (2011). *Campylobacter* in poultry: Incidences and possible control measures. Research Journal of Microbiology, 6: 182-192.
7. Hoseinpour F, Foroughi A, Nomanpour B, Nasab RS. Identification and differentiation of Campylobacter species by high-resolution melting curve analysis. Microbial Pathogenesis 2017;108:109-13.
8. Humphrey, T., O'Brien, S., and Madsen, M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology. 117: 237-257.
9. Hussain I., Mahmood M.S., Akhtar M. and Khan A. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. Food Microbiology, 24: 219-222.
10. Kagambèga A, Thibodeau A, Trinetta V, Soro DK, Sama FN, Bako É, et al. Salmonella spp. And Campylobacter spp. In poultry feces and carcasses in Ouagadougou, Burkina Faso. Food Science & Nutrition 2018;6(6):1601-6.
enteric 11. Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of Microbiology, 143, infection by *Campylobacter*. 5-21.
12. Ma H, Su Y, Ma L, Ma L, Li P, Du X, et al. Prevalence and characterization of Campylobacter jejuni isolated from retail chicken in Tianjin, China. Journal of Food Protection 2017;80(6):1032-40.
13. Mokhtarian, D.H., Mohsenzadeh, M., Ghahramani, M., Moshki, M. and Fani, M.J. 2009. Detection and identification of *campylobacter jejuni* and *campylobacter coli* from poultry carcasses slaughtered in Gonabad poultry slaughterhouse. Ofogh-e-Danesh. GMUHS J. 15 (3): 31-35.
14. Nielsen, E.M., Engberg, J., and Madsen, M. 1997. Distribution of serotypes of Campylobacter jejuni and C. coli from Danish patients, poultry, cattle and swine. FEMS Immunology Medical Microbiology. 19: 47–56.
15. Raeisi M, Khoshbakht R, Ghaemi EA, Bayani M, Hashemi M, Seyedghasemi NS, et al. Antimicrobial resistance and virulenceassociated genes of Campylobacter spp. isolated from raw milk, fish, poultry, and red meat. Microbial Drug Resistancen 2017;23(7):925-33.
16. Rahimi, E. 2013. *Campylobacter spp*. contamination of chicken meat and byproducts in Shahrekord, Iran. Iranian Vet J.38: 30-36.
17. Rahimi, E. and Tajbakhsh, E. 2008. Prevalence of *campylobacter* species in poultry meat in the Esfahan city, Iran. Bulg J Vet Med. 11: 257-262.
18. Saife, Y.M., Fadly, F.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K. and Swayne, D.E. (2008). Disease of poultry. 12 th edition, Blackwell Publishing Professional, PP: 657-690.
19. Suzuki H. and Yamamoto S. (2009). *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature

survey. Journal of Veterinary Medical Science, 71 (3): 255-261.
20. Taremi, M., Soltan Dallal, M.M., Gachkar, L., Moez Ardalan, S., Zolfagharian, K. and Zali, M.R. 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. Int J Food Microbiol. 108: 401-403.
21. Van Looveren, M., Daube, G. & De Zutter, L. (2001). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 235-240.

JFM مجله میکروب شناسی مواد غذایی

Investigating the prevalence of Campylobacter bacteria and its species in chicken and quail prepared from distribution centers in Khuzestan province, Andika city

Zahra Motaghi [1], Manouchehr Momeni Shahreki [2*], Reza Soltani [1], Hossein Khodabandeh Shahreki [3]

1. Ph.D. student of food hygiene, faculty of veterinary medicine, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
3. Ph.D. student of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

*Corresponding author Email: momeniman@yahoo.com

Abstract

Campylobacter is one of the main potential causes of diarrhea and bacterial gastroenteritis in humans worldwide. Contaminated food, especially poultry meat, is considered the main factor in disease transmission. This study aimed to determine the prevalence of Campylobacter species in chicken and quail meat in Khuzestan Province, Indika County. Random samples were taken from poultry meat distribution centers and transported on ice to the Food Quality Control Laboratory of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. In the winter of 1402, a total of 80 meat samples, including 40 chicken meat samples and 40 quail meat samples, were collected and tested for the presence of Campylobacter. The results showed that 56 out of 80 samples (70%) were infected with Campylobacter, of which 27 out of 40 chicken samples (67.5%) and 29 out of 40 quail samples (72.5%) were infected with Campylobacter. In addition, positive samples were tested with specific *16SrRNA* primers and specific *mapA* and *ceuE* genes were used to examine *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* species, respectively. The frequency of contamination with Campylobacter species was also examined, and it was observed that the frequency of contamination with *Campylobacter jejuni* (85.71%) was significantly higher than the frequency of contamination with *Campylobacter coli* (8.92%).

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, chicken meat, quail meat

مجله میکروب شناسی مواد غذایی JFM

آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان

محمد حسین مرحمتی زاده ۱*، کیمیا کاظم زاده شیرازی نژاد ۲، ماندانا حسن زاده ۳، زهرا جمالی ۳، سید امیرحسین نفیسی ۳، سید مصطفی فاموری ۳

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
۲. دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
***نویسنده مسئول:** Drmarhamati@gmail.com

چکیده:

باتوجه به اینکه راه اصلی ورود قارچها و باکتری‌ها به مراکز پرورش دام و طیور و در نهایت به زنجیره غذایی انسان خوراک می‌باشد؛ لذا اطلاع دقیق از مقادیر قارچ و باکتری اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های پودر گوشت و خوراک دام، طیور و آبزیان جهت کنترل آن‌ها ضروری می‌باشد. در این پژوهش آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش باکتری اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس انجام شد. در مجموع ۴۰ نمونه (۲۰ نمونه پودر گوشت، ۲۰ نمونه خوراک آماده) با وزن تقریبی ۱۵۰۰ گرم اخذ گردید. ابتدا مشخصات هر یک از نمونه‌ها ثبت و طبق دستورالعمل‌های استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور بررسی آلودگی نمونه‌ها به قارچهای مختلف از روش شمارش قارچ مطابق استاندارد ملی ایران، برای شمارش باکتری اشریشیاکلی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۵۶ و برای شناسایی سالمونلا، از روش جستجو سالمونلا در مواد غذایی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۸۱۰ استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲,۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشرشیاکلی (۲,۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷,۵ درصد) مثبت مشاهده شد. این نشان می‌دهد که در کارخانجات تولید خوراک دام و طیور و کشتارگاه‌های استان فارس پروتکل‌های بهداشتی جهت پیشگیری از ابتلا خوراک و پودر گوشت به قارچ، سالمونلا و اشرشیاکلی انجام می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پودر گوشت، خوراک، قارچ، سالمونلا، اشرشیاکلی

مقدمه

خوراک هزینه عمده پرورش دام و طیور را به خود اختصاص می‌دهد، بنابراین ارزیابی مداوم منابع جدید و گوناگون مواد خوراکی ضرروی باشد (گلیان و معینی، ۱۳۸۲). متخصصین همواره سعی می‌کنند با استفاده از روش‌های مختلف هزینه‌های مربوط به خوراک را در پرورش طیور کاهش دهند. از جمله این روش‌ها استفاده پودر ضایعات کشتارگاهی، که برای انسان قابل استفاده نیست، می‌باشد. اهمیت تغذیه مناسب ایجاب می‌کند که ارزش غذایی این ضایعات به طور صحیح و استاندارد تعیین گردد (روغنی و معینی زاده، ۱۳۸۵). لیکن حجم قابل‌توجه مصرف پودر ضایعات کشتارگاهی در سال‌های اخیر و وجود برخی از بیماری‌های نوپدید سبب گردیده تا با اطمینان از بی‌خطر بودن مصرف پودر گوشت، احتمال انتشار و انتقال بیماری از این طریق نیز افزون شده در نتیجه نظارت‌های مستمر و بهداشتی در همه جوامع از جمله ایران نیز ضروری‌تر گردد. شواهدی وجود دارد که کنترل آلودگی میکروبی در خوراک دام دارای مزایای بهداشتی قابل توجهی در جمعیت‌های انسانی و حیوانی است. انسان می‌تواند با مصرف تخم‌مرغ، گوشت یا شیر حیوانات مصرف کننده خوراک آلوده، در معرض آلودگی قرار گیرد (Anonymous,۲۰۰۹).

در خصوص آلودگی مواد خوراکی با قارچ‌ها و سموم آن‌ها گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که آلودگی ناشی از گونه‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم، آلترناریا و پنی‌سیلیوم در بسیاری از مواد خوراکی به وفور یافت می‌شود. آسپرژیلوس گونه غالب در خوراک گاوهای شیری و دیگر خوراک‌ها در مناطق گرمسیری و حاره می‌باشد (Kumar et al,.۲۰۱۷). آسپرژیلوس، گونه‌ای از قارچ هاست که برخی از آن‌ها انگل داخلی و یا پاتوژن‌های فرصت‌طلب انسانی هستند. گونه‌های دیگر آن شامل پنی‌سیلیوم، فوزاریوم، آلترناریا از آلودگی‌های مهم دانه‌های غلات به شمار می‌روند (Atherstone et al,۲۰۱۶). آلودگی‌های قارچی منشا تولید مایکوتوکسین‌ها هستند. دانه‌های تخمیری غلات و تفاله چغندرقند ممکن است توسط حیوانات استنشاق یا خورده شوند و باعث ایجاد آثار زیان‌آور و بیماری موسوم به مایکوزیس گردند(Sala, ۲۰۰۵) . معمولا کلیه مواد خوراکی بطور بالقوه حاوی مقادیر کمی کپک و قارچ می‌باشند که در شرایط خاصی می‌توانند به سرعت رشد و افزایش پیدا کنند. رشد قارچ‌ها موجب می‌شود که مواد خوراکی به صورت کلوخه و کیک درآمده، در نتیجه حمل و نقل آن‌ها مشکل می‌گردد و همچنین باعث تغییر رنگ، تغییر پایداری و بو و طعم مواد خوراکی شده و در نتیجه دام‌ها از مصرف آن‌ها امتناع می‌کنند. علاوه بر این، قارچ‌ها ترکیبات سمی به نام مایکوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که باعث کاهش تولید و ایجاد بیماری و در شرایط حاد، مرگ دام‌ها شده و از این طریق از نظر اقتصادی، موجب ضرر و زیان قابل‌توجه دامداران می‌گردد (Cardoso et al,.۲۰۱۶).

سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل آلودگی در خوراک دام و پودر گوشت است که به دلیل نقش بسیار مهم آن به‌عنوان یک بیماری مشترک جدی در بهداشت مواد غذایی، سلامت عمومی را به مخاطره می‌اندازد. (Soltandallal et al,.۲۰۱۰). اشریشیاکلی نیز از باکتری‌های روده‌ای است که آلودگی‌های ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است. یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌های این باکتری‌ها *E.coli O157:H7* می‌باشد که بیشتر از گوشت گاوی که حرارت کافی ندیده‌است جدا و گزارش شد (Shekarforoush et al,.۲۰۰۸).

باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه همراه با مواد اولیه مورداستفاده در تولید خوراک دام وارد زنجیره خوراک دام می‌شوند. خانواده انتروباکتریاسه شامل ۳۰ جنس ثابت از جمله سالمونلا و اشریشیاکلی است. بسیاری از جنس‌ها نسبت به انسان، حیوانات، حشرات و گیاهان بیماری‌زا هستند (Maciorowski et al, 2004). تعدادی از جنس‌های این خانواده به طور منظم در ارتباط با حیوانات وجود دارند. آن‌ها به عنوان اعضای بومی میکروفلور روده یافت می‌شوند که ممکن است هیچ گونه اثرات مضر ایجاد نکنند. ممکن است پس از پخت، در حین نگهداری و حمل و نقل محصولات را دوباره آلوده کنند (Hamilton,.۲۰۰۲). بین خطر جداسازی سالمونلا و درجه آلودگی انتروباکتریاسه ارتباط شناخته‌شده‌ای وجود دارد (Veldman ۱۹۹۵ et al,).

بعد از حرارت، آلودگی پودر گوشت به حداقل می‌رسد ولی باتوجه به اینکه شرایط رشد باکتری و قارچ در پودر گوشت فراهم است بعد از حرارت دوباره رشد باکتری شروع می‌شود. در این پژوهش آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش باکتری اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس انجام می‌شود. با توجه به این که راه اصلی ورود قارچ‌ها و باکتری‌ها به مراکز پرورش دام و طیور و در نهایت به زنجیره غذایی انسان خوراک می‌باشد؛ لذا اطلاع دقیق از مقادیر قارچ و باکتری اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های پودر گوشت و خوراک دام، طیور و آبزیان جهت کنترل آنها ضروری می‌باشد.

مواد و روش کار:

مطالعه حاضر از نوع توصیفی- مقطعی است که جامعه آماری آن، پودر گوشت از مراکز ضایعات و نمونه‌های پودرشده خوراک کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس می‌باشد. پس از اخذ مجوز و هماهنگی‌های لازم، نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام گرفت. در مجموع ۴۰ نمونه (۲۰ نمونه پودر گوشت، ۲۰ نمونه خوراک آماده) با وزن تقریبی ۱۵۰۰ گرم اخذ گردید. ابتدا مشخصات هر یک از نمونه‌ها ثبت و طبق دستورالعمل‌های استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده شد در طی حمل، جابجایی و نگهداری صدمه ندید و یا تغییری در آن ایجاد نشد. همچنین نمونه‌ها در ظروف تمیز، خشک، سترون ودر شرایط اسپتیک جمع‌آوری شده و در شرایطی نگهداری شدند که امکان رشد میکروارگانیسم‌ها وجود نداشته‌باشد. نمونه‌های جمع‌آوری شده حتی‌الامکان در همان روز نمونه‌برداری، موردآزمون قرارگرفتند (استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹). نمونه‌های اخذ شده به مدت یک دقیقه به خوبی مخلوط شده و نمونه حاصل بصورت مسقیم جهت آزمون‌های میکروبی و قارچی مورداستفاده قرار گرفتند.

روش شمارش قارچ‌ها

۱-روش کشت: برای شمارش قارچ‌ها، کشت مقادیر مشخصی از آزمایه (فرآورده‌های مایع (و یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) با استفاده از محیط کشت معین به روش کشت آمیخته و کشت رقت‌های تهیه شده از آزمایه فرآورده‌های مایع و یا رقت اولیه سایر فرآورده‌ها انجام شد.

۲-شرایط گرم خانه گذاری: گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای ۲۵ درجه به مدت زمان ۵ روز و در آخر محاسبه تعداد کلنی‌های قابل شمارش در هر گرم از نمونه صورت گرفت.

۳-تهیه محیط کشت: محیط کشت عصاره مخمر-دکستروز-کلرامفنیکل بود. محیط پایه شامل عصاره‌ی مخمر به مقدار ۵ گرم، دکستروز به مقدار ۲۰ گرم،

آگار به میزان ۱۵ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر است.

از تجهیزات معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی (طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹) استفاده شد. برای آماده‌سازی آزمایه به استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۸۹۲۳-۱، ۸۹۲۳-۴ و ۸۹۲۳-۵ و یا استانداردهای ملی اختصاصی مربوط به هر فرآورده مطابق استانداردها انجام گرفت.

شمارش کلنی ها: آزمونه‌ای به مقدار X گرم را به 9X میلی لیتر محلول رقیق‌کننده افزوده‌شد و خوب مخلوط (۱۰ سوسپانسیون اولیه) شد تا به رقت 10^{-1} رسید. در صورت نیاز به رقت‌های بعدی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه به ۹ میلی‌لیتر از محلول رقیق کننده اضافه شد.

با استفاده از یک پی‌پت سترون، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه به هر یک از دو پلیت سترون افزوده شد. در صورت نیاز برای سایر رقت-های اعشاری نیز با استفاده از یک پی‌پت سترون این کار تکرار گردید. به هر یک از پلیت‌ها حدود ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت (محیط کامل) با دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس افزوده و کاملا مخلوط شد. زمان لازم بین تلقیح و افزودن محیط کشت بیشتر از ۱۵ دقیقه نشد. پلیت‌های آماده شده پس از بستن محیط کشت به صورت وارونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و به مدت زمان ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد.

پرگنه‌ها بعد از ۳، ۴ و ۵ روز بعد از گرمخانه‌گذاری بررسی و بعد از پنج روز پلیت‌های حاوی کلنی شمارش شد. پلیت‌هایی را که دارای حداقل ۱۰ و حداکثر ۱۵۰ کلنی می‌باشند برای شمارش انتخاب شد. با استفاده از رابطه زیر تعداد کپک ها و مخمرهای موجود در آزمایه بر حسب میانگین تعداد شمارش شده از دو رقت متوالی محاسبه شد:

$$N=\frac{\sum c}{v(n1+0.1n2)d}$$

روش شمارش اشریشیاکلی:

۱-مرحله غنی سازی: برای شمارش اشریشیاکلی، غنی سازی در محیط کشت غیرانتخابی صورت گرفت. آزمونه به آب پپتونه بافری (BPW)تلقیح شد و در دمای۳۷ °C به مدت زمان ۱۸ ساعت گرم خانه گذاری شد.

۲-کشت انتخابی: از کشت به دست آمده در مرحله غنی سازی در محیط BPW، به محیط کشت ویولت رد بایل گلوکز (VRBG) آگار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس کلنی‌های شاخص اشرشیاکلی پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. کلنی‌های شاخص اشرشیاکلی احتمالی، روی یک محیط غیرانتخابی، کشت داده‌شد و سپس با آزمون‌های تخمیر گلوکز و واکنش اکسیداز تائید شد.

نمونه برداری جزئی از روش تعیین شده در این استاندارد نیست. برای هر فرآورده به استاندارد مربوط به آن فرآورده مراجعه شد. اگر استاندارد ملی مربوط به آن فرآورده وجود نداشت، با توافق بخش های مرتبط با آن فرآورده، نمونه برداری انجام گردید . روش‌های نمونه‌برداری طبق -استاندارد ۱۷۷۲۸ ISO/TSبرای موادغذایی و خوراک دام -استاندارد ISO 13307برای مرحله تولید اولیه؛ -استاندارد ISO 17604برای لاشه‌ها -استاندارد ISO 18593برای نمونه‌های محیطی توصیه شده است.

به طور کلی مقداری از آزمونه (جرم یا حجم) به مقداری ازBPW (جرم یا حجم) اضافه شد تا یک رقت ده تایی به دست آید. برای مثال یک آزمونه ۱۰ گرم با ۹۰ میلی گرم از BPW مخلوط شد .این استاندارد برای آزمونه‌های ۱۰ گرم با ۱۰ میلی گرم تائید شده-است. یک آزمون کوچکتر، ممکن است بدون نیاز به

اثبات اضافی استفاده شود، مشروط بر این که نسبت مشابه بین آب گوشت غنی کننده و آزمونه حفظ شود. اگر در بررسی صحه گذاری اتصدیق نشان داده شود که آزمونه بزرگتر از آنچه که در ابتدا تائید شده، اثرات نامطلوب روی جستجو و شناسایی انتروباکتریاسه ندارد، یک آزمونه بزرگتر نیز می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد.

سوسپانسیون اولیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. روش آزمون با جداسازی و انتخاب کلنی‌ها برای تائید ادامه دادیم.

با استفاده از حلقه کشت از محیط غنی سازی شده برداشته‌شد و به صورت خطی روی سطح پلیت حاوی محیط کشت انتخابی کشت شد، سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرم خانه‌گذاری شد.

۳-تایید کلنی‌های مشکوک: کلنی‌های مشخص، به رنگ صورتی تا قرمز یا ارغوانی هستند (با یا بدون هاله رسوبی)، کلنی‌های مشکوک از پلیت‌های گرم‌خانه-گذاری شده علامت‌گذاری شد. حداقل یک کلنی مشکوک برای کشت مجدد و انجام آزمون‌های تائیدی بیوشیمیایی انتخاب شد. اگر نتیجه منفی بود، حداکثر تا چهار کلنی مشکوک انتخاب شد.

اگر بیشتر از یک کلنی مشخص از نظر ظاهری وجود داشت، یک کلنی از هر مورفولوژی برای کشت مجدد انتخاب شد .بعضی از اشرشیاکلی‌ها ممکن است روی محیط کشت کلنی‌های بی‌رنگ ایجاد کنند، بنابراین وقتی هیچ کلنی مشخصی وجود نداشته‌باشد، کلنی-های متمایل به سفید برای تائید انتخاب شد. کلنی-های انتخاب شده برای تائید را روی محیط کشت غیرانتخابی (مانند پلیت‌های آگار مغذی)کشت خطی دادیم. سپس پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری کردیم. یک کلنی کاملا مجزا از هر پلیت گرم خانه‌گذاری شده برای آزمون‌های تائیدی بیوشیمیایی انتخاب شد.

برای آزمون تائیدی بیوشیمیایی از آزمون اکسیداز و آزمون تخمیر استفاده گردید.

۴-تفسیرنتایج: هر یک از کلنی‌های مشخص انتخاب شده از یک کشت مجدد دارای واکنش اکسیداز منفی و گلوکز مثبت، نمونه‌ای که از آن کشت مجدد تهیه شده‌است، از نظر اشرشیاکلی مثبت در نظر گرفته‌شد. براساس تفسیر نتایج، وجود یا عدم وجود اشرشیاکلی در x g با x ml از یک آزمونه از فرآورده، یا بر روی مساحت سطح سواب شده یا در کل کالاها (مانند پای پوش پارچه ای) نشان داده‌شد.

روش شمارش سالمونلا:

جستجو و شناسایی سالمونلا چهار مرحله دارد که در استاندارد ملی ایران ۱-۱۸۱۰ بیان شده‌است.

۱-مرحله پیش غنی سازی: سالمونلا ممکن است به تعداد کم و اغلب همراه با تعداد قابل‌توجهی از سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یا خانواده‌های دیگر همراه باشد. به منظور فراهم کردن امکان جستجو و شناسایی تعداد کم سالمونلا یا سالمونلاهای آسیب‌دیده پیش‌غنی‌سازی انجام شد.

نمونه موردآزمون در آب پپتونه بافری که به دمای محیط آزمایشگاه رسیده‌است، تلقیح می‌شود و به مدت زمان ۱۸ ساعت در دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. برای مقادیر بالا (برای مثال: یک لیتر یا بیشتر) آب پپتونه بافری به دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس رسانده شد و سپس با نمونه موردآزمون مخلوط شد.

۲-کشت انتخابی: از کشت به دست آمده به محیط کشت راپاپورت واسیلیادیس همراه با سویا (RVS براث) یا راپاپورت واسیلیادیس نیمه جامد اصلاح شده (MSRV)آگار و مولر کافمن تتراتیونات نوبیوسین براث (MKTTn براث)تلقیح شد .RVS براث یا

MSRV آگار در دمای ۴۱۵ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت و MKTTn براث در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری شد. برای برخی محصولات، ممکن است محیط کشت (های) ۳-کشت روی محیط های جامد انتخابی: غنی کننده انتخابی، به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری بیشتر نیاز داشته باشند. از کشت‌های به دست آمده روی دو محیط کشت جامد انتخابی زیر کشت داده‌شد:

گزیلوز الیزین دئوکسی کوالت آگار (XLDآگار)، هر محیط کشت انتخابی جامد دیگر برای تکمیل XLD آگار،XLD آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. آگار انتخابی دوم مطابق با دستورالعمل سازنده گرمخانه گذاری شد.

۴-تایید کلنی های سالمونلا: کلنی‌های سالمونلای فرضی مجدداً کشت داده شد و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب تأیید شد. آزمونه و سوسپانسیون اولیه در موارد معمول، برای تهیه سوسپانسیون اولیه از محیط کشت پیش‌غنی‌کننده (آب پپتونه بافری) به عنوان رقیق‌کننده استفاده شد. پیش از استفاده، محیط کشت آب پپتونه بافری به دمای اتاق رسانده شد.

از آزمونه (وزنی یا حجمی) به محیط کشت آب پپتونه بافری (وزنی یا حجمی) افزوده تا رقت یک دهم حاصل شد. برای این منظور، ۲۵ گرم آزمونه با ۲۲۵ میلی لیتر از محیط کشت آب پپتونه بافری مخلوط شد. برای مقادیر بیشتر (برای مثال: یک لیتر یا بیشتر) توصیه می شود قبل از مخلوط کردن آزمونه، محیط کشت در دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس گرم شود.

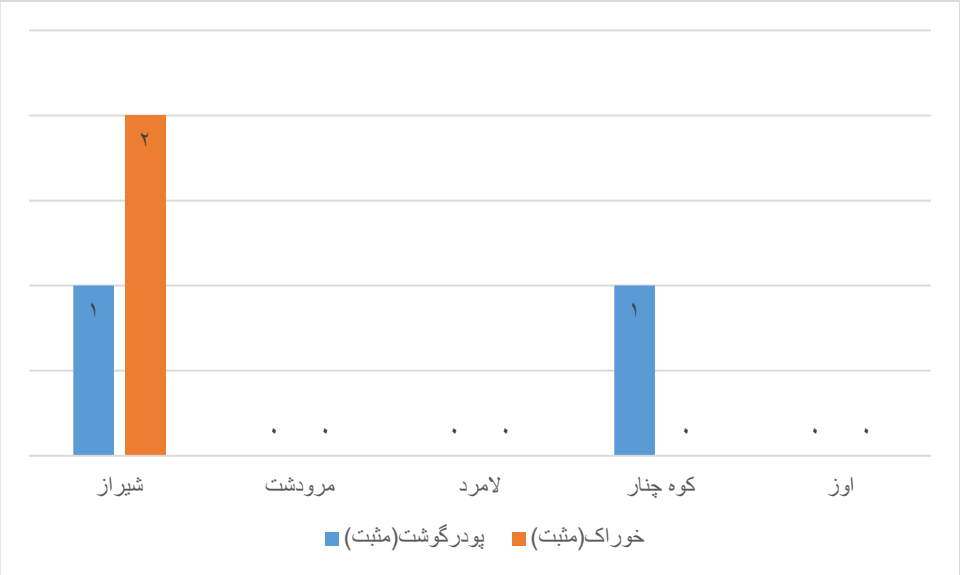
نتایج

۲۰ نمونه پودرگوشت و ۲۰ نمونه خوراک آماده در شهرهای شیراز، اوز، لامرد، کوه چنار و مرودشت از نظر وجود سالمونلا، اشرشیاکلی و قارچ مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول و نمودار (۱) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه پودر گوشت ۱ نمونه و از ۱۰ نمونه خوراک ۲ نمونه و در کوه چنار ۱ نمونه از ۲ نمونه پودر گوشت از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت اعلام گردید. در ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودرگوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودرگوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه ای از آلودگی به سالمونلا مشاهده نگردید.

جدول (۱) توزیع فراوانی جدایه‌های سالمونلا در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت
شیراز	پودرگوشت	۱۰	۱
شیراز	خوراک	۱۰	۲
مروردشت	پودرگوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودرگوشت	۲	۱
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودرگوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودرگوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰

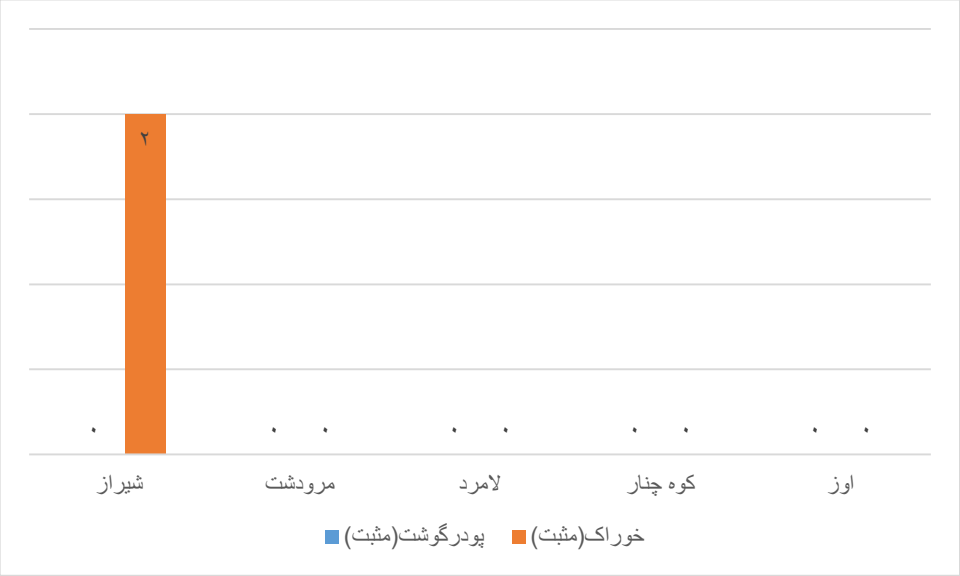


نمودار (۱) توزیع فراوانی جدایه‌های سالمونلا در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول و نمودار (۲) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه خوراک ۲ نمونه از نظر آلودگی به قارچ مثبت اعلام گردید. در ۱۰ نمونه پودر گوشت شیراز، ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودر گوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه پودر گوشت کوه چنار، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودر گوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه ای از آلودگی به قارچ مشاهده نگردید.

جدول (۲) توزیع فراوانی جدایه‌های قارچ در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت
شیراز	پودرگوشت	۱۰	۰
شیراز	خوراک	۱۰	۲
مروردشت	پودرگوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودرگوشت	۲	۰
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودرگوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودرگوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰



نمودار (۲) توزیع فراوانی جدایه‌های قارچ در نمونه های خوراک و پودر گوشت در شهر های شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

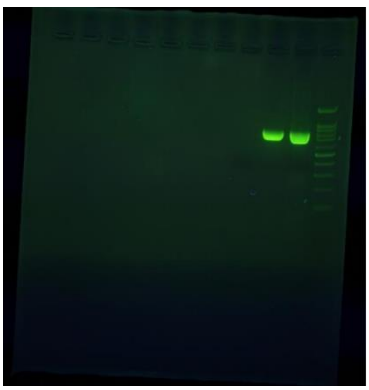
بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار (۳) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه خوراک ۱ نمونه از نظر آلودگی به اشریشیاکلی مثبت اعلام گردید. در ۱۰ نمونه پودر گوشت شیراز، ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودرگوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه پودر گوشت کوه چنار، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودرگوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه ای از آلودگی به اشریشیاکلی مشاهده نگردید.

جدول (۳) توزیع فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهر های شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت
شیراز	پودرگوشت	۱۰	۰
شیراز	خوراک	۱۰	۱
مروردشت	پودرگوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودرگوشت	۲	۰
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودرگوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودرگوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰

نمودار (۳) توزیع فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲,۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشرشیاکلی (۲,۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷,۵ درصد) مثبت گزارش شد.



تصویر (۱)PCR نمونه آلوده به سالمونلا

بحث

خوراک دام بیش از ۸۰ درصد هزینه‌های واحد پرورش را شامل می شود. مواد اولیه ای که جهت تامین جیره غذایی دام از مکان‌های مختلف تهیه می گردد امکان انتقال آلودگی و مشکلات مختلف را برای دامداری به همراه خود دارد. یکی از این مشکلات، قارچ ها و سموم تولیدی آن ها یعنی مایکو توکسین‌ها می باشد.

آلودگی قارچی و به ویژه مایکوتوکسین‌ها یک مشکل جهانی محسوب می‌شود و مطابق با آمار سازمان کشاورزی و غذای سازمان ملل متحد تقریبا ۲۵ درصد دانه‌های زراعی جهان دارای آلودگی قارچی هستند و طبق گزارش WHO مایکوتوکسین‌ها به ویژه آفلاتوکسین یکی از عوامل موثر در بروز بیماری‌های ناشی از غذا گزارش شده اند.

در مطالعه‌ای که رضایی و همکاران (۲۰۱۴) به منظور تعیین میزان آلودگی قارچی خوراک طیور انجام دادند، ۱۶ نمونه خوراک را از استان مرکزی جمع آوری کردند که ۳۱/۳ درصد نمونه ها آلوده بودند. این محققین متوسط سطح آلودگی به قارچ ها را $6/4\times10^4$ واحد تشکیل دهنده کلونی/گرم گزارش کردند (Rezaei et al.,2014).

در مطالعه ای که دیوید و اگونالد (۲۰۱۳) در نیجریه بر روی میزان آلودگی قارچی در ۱۰ نوع خوراک انجام دادند نشان دادند که در مجموع ۵ جنس قارچی آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، رایزوپوس و آبسیدیا جداسازی گردید. ترتیب فراوانی جدایه های گزارش شده توسط این محققین به صورت آسپرژیلوس فالووس (۲۰/۵۹ درصد)، آسپرژیلوس نیجر (۱۷/۶۵ درصد)، فوزاریوم مونیلی فورم (۱۴/۷۱ درصد)، آبسیدیا (۱۱/۷۶ درصد)، رایزوپوس (۸/۸۲)، پنی سیلیوم اکسپانسوم (۸/۸۲ درصد) پنی سیلیوم ایتالیکولوم و پنی سیلیوم کالیبئوم و آسپرژیلوس گالکوس هر کدام (۵/۸۸ درصد) بود. (David and Egonald et al.,2013)

مروی و همکاران (۱۳۹۷) به بررسی آلودگی خوراک دام و طیور به گونه‌های قارچی آسپرژیلوس پرداختند و گزارش کردند که به طور متوسط، ۲۵/۲۷ درصد خوراک دام و ۷۰/۳۱ درصد خوراک طیور آلوده به قارچ آسپرژیلوس بودند. از بین آسپرژیلوس های جدا شده، تعداد ۴ گونه فالووس، ۲ گونه ورسیکالر، ۲ گونه فومیگاتوس، ۲ گونه نایجر، ۱ گونه پارازیتیکوس، ۱ گونه اوخراسئوس و ۱ گونه ترئوس شناسایی شد. (Marvi et al.,1397)

سالا و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه ۷۸ نمونه خوراک دام در کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد نمونه را به گونه آسپرژیلوس فالووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس گزارش کردند. (sala et al.,2005)

مطالعه دونهام و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در تگزاس نشان داد تقریبا ۳۳ درصد جیره‌های خوراک حیوانات که عمدتا از نوع ذرت است آلوده به آفلاتوکسین هستند (Dunham et al,۲۰۱۷).

باتیالنی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند تغییرات آب و هوایی مهم‌ترین علت افزایش آلودگی ذرت‌ها به آفلاتوکسین است. آن‌ها بیان کردند آلودگی به آفلاتوکسین در ۱۰۰ سال آینده به عنوان عامل مهمی در آلودگی محصولات غذایی مطرح خواهد بود (Battilani et al,۲۰۱۶).

هاجنال و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ در صربستان نشان دادند که ۲۱ درصد ذرت‌های کشت شده در این کشور برای مصرف انسانی مناسب نیستند و این موضوع در فصول گرم سال بیشتر خودنمایی می‌کند (Hajnal et al,۲۰۱۷).

پژوهش میاحی و همکاران نیز بر روی مرغ‌های کشتار شده در اهواز نشان داد ۳۷/۵ درصد از جگرها، ۲۲/۵

درصد از عضلات سینه و ران مرغ های کشتار شده آلوده به سم آفلاتوکسین است (Mayahi et al, ۲۰۰۸).

سالمونلوز یکی از شایعترین عوامل عفونت غذائی به شمار می‌رود که ریشه‌کنی آن در هیچ یک از کشورهای جهان تاکنون امکان پذیر نبوده است. مهم ترین مواد غذایی آلاینده عبارتند از گوشت طیور، تخم‌مرغ، گوشت قرمز و شیر.

مشابه مطالعه فعلی، کاکس و همکاران (۱۹۸۳) سالمونلا را در ۹۲ درصد از نمونه‌های پودر گوشت و استخوان جمع‌آوری شده از کارخانه‌های تجاری شناسایی کردند. بنسینک (۱۹۷۹) همچنین گزارش داد که ۱۱۴ نمونه از ۱۶۴ نمونه پودر گوشت و استخوان (۶۹/۵ درصد) به سالمونلا آلوده بودند. (Cox et al,1983)

در تحقیقی دیگر اصغری (۱۹۹۶) تعداد ۶۵۰ مورد گوشت قرمز (۳۵۰ نمونه گوشت گوسفند و ۳۰۰ نمونه گوشت گوساله) از شهر تهران جمع آوری و مورد مطالعه قرار داد. جمعاً ۲ مورد سالمونلا انتریتیدیس و ۵ مورد سالمونلا تیفی موریوم جدا و شناسایی گردید. (asghari et al,1996)

در مطالعه حکیمی و همکاران (۲۰۰۴) تقریباً مشخص شده است که وسایل موجود در مراکز فروش گوشت به ویژه دستگاه های فرآوری گوشت، و حتی کارگران میتوانند از عوامل عمده آلودگی سالمونلایی به صورت ثانویه باشند.(Hakimi et al,2004)

مطالعه‌ای دیگر در ترکیه در سال ۲۰۱۶ شیوع انتروباکتریاسه و سالمونلا در ۹۰ نمونه پودر ضایعات کشتارگاهی طیور را مورد بررسی قرار داد و آلودگی به سالمونلا را ۲۶/۵ درصد گزارش کردند (Yalçın and Dalkiliç,et al,2016).

اشریشیاکلی نیز از باکتری‌های روده‌ای است که آلودگی های ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است. یکی از شایع ترین سروتیپ های این باکتری ها Ecoli H7:O157 می‌باشد که بیشتر از گوشت گاوی که حرارت کافی ندیده است جدا و گزارش شده است.

در مطالعه کاستا و همکاران (۲۰۰۷)E.coli از ۶۵/۹ درصد از مواد تشکیل دهنده خوراک و خوراک طیور شناسایی شد تا مشخصات مقاومت آن‌ها به داروهای ضد میکروبی تعیین شود.(Costa et al,2007)

همانطور که مامبر و کاتز (۱۹۸۵) نشان دادند، کلونیزاسیون از خوراک می‌تواند از نظر اپیدمیولوژیک مهم‌تر از فشار انتخابی اعمال شده توسط استفاده از داروهای ضدمیکروبی باشد. اینکه تا چه حد این باکتری‌های مقاوم منجر به خطرات بعدی برای مصرف‌کننده می‌شوند و اثر بخشی ضد میکروب‌های درمانی برای درمان بیماری هنوز مورد بحث است (Turnidge,et al,۲۰۰۴). نتایج ما نشان میدهد که فعل و انفعالات بین دما، زمان و رطوبت در پلت سازی خوراک قادر به القای مرگ حرارتی E.coli بودند.(mamber and katz,et al,1985)

در تحقیقی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شیراز از نظر آلودگی به E.coli بررسی شدند و ۱/۹٪ آن‌ها آلوده بودند (Tahamtan et al., 2007). همچنین لاشه گوسفندان همان کشتارگاه ۹/۳٪ آلودگی داشتند (Shekarforoush et al., 2008).

در سال ۱۳۹۰ در یک دوره نمونه برداری در ارومیه، تعداد ۱۳۴ نمونه گوشت طیور که از نقاط مختلف بدن ماکیان تهیه شده‌بود و از ۳۷ درصد نمونه‌ها اشریشیاکلی جدا گردید (Sadeghi zali et al, ۲۰۱۱).

نتیجه گیری

مطالعات به طورکلی نشان داد، درصد بالایی از نمونه های پودر گوشت و خوراک آماده به قارچ، سالمونلا و

اشرشیاکلی آلوده نبودند. بطوری که از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی، یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲/۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشرشیاکلی (۲/۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷/۵ درصد) مثبت مشاهده شد. این ارقام نشان می دهد که در کارخانجات تولید خوراک دام و طیور و کشتارگاه‌های استان فارس پروتکل‌های بهداشتی جهت پیشگیری از ابتلا خوراک و پودر گوشت به قارچ، سالمونلا و اشرشیاکلی انجام می‌شود. با این حال برای ارتقاء سلامت خوراک و پودر گوشت بایستی پروتکل‌های بهداشتی با دقت بیش‌تری رعایت گردد.

منابع

1-Anonymous. (2009). Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption.

2-Atherstone, C., Grace, D., Lindahl, J. F., Kang'ethe, E. K., & Nelson, F. (2016). Assessing the impact of aflatoxin consumption on animal health and productivity. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 16(3), 10949-10966.

3-Costa, P. M., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients. Veterinary Microbiology, 120(1-2), 122-131.

4-Cox, N. A., and J. E. Bailey. 1991. Present strategies to intervene in Salmonellae colonization of poultry. Pages 1–3 in Proc. 38th Maryland Nutr. Conf. Univ. Maryland, College Park.

5-da Silva Cardoso, V., Vermelho, A. B., Ribeiro de Lima, C. A., Mendes de Oliveira, J., Freire de Lima, M. E., Pinto da Silva, L. H., ... & Miranda Danelli, M. D. G. (2016). Antigenotoxic effect of piperine in broiler chickens intoxicated with Aflatoxin B1. Toxins, 8(11), 316.

6-David O.M. and Ogunlade J.T. Qualities of poultry feeds produced by local small-scale feed mills in Ekiti State, Nigeria. A public health and feed safety study. 2013; 3(9): 297-302.

7-Davies, R. H., and A. D. Wales. 2010. Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. J. Appl. Microbiol. 109:1430–1440.

8-Hakimi Najafabadi, S. (2004). Isolation of Salmonella from Tehran butcheries and their utensils and equipments. 7th Iran Congress of Microbiology, Semnan, Iran.

9-Hamilton CR, 2002. Real and perceived issues involving animal proteins. In Protein Sources for the Animal Feed Industry. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Expert Consultation and Workshop, Bangkok, 29 April, 255–276.

10-Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. Frontiers in microbiology, 7, 2170.

11-Maciorowski KG, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC, 2004. Incidence, sources, and control of foodborne Salmonella spp. in poultry feeds. World Poultry Sci J. 60, 446-457.

12-Rezaei M. Parviz M., Vakili Saatloo N., Rezapor I. and Assadi A. Fungal Contamination of Feed Material Manufactured in Iran with Emphasis on Its Importance in Safety of Animal Origin Foods. Journal of Food Quality and Hazards Control. 2014; 81-84.

13-Sadeghi Zali, M.H., Hashempour, A., Delshad, R., Kalbkhani, M., Khodayi, H. and Asadi, S. (2011). Evaluation of salmonella infection in poultry carcasses marketed in Urmia. 2nd International Congress of Food Hygiene, Tehran, Iran.

14-Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. (2008). Detection and frequency of Stx2 gene in Escherichia coli O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. Pak J Biol Sci. 2008 Apr 15; 11(8):1085-92.

15-Soltandallal, M.M., Doyle, M.P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, SH., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M.R. and Sharifi-Yazdi, M.K. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of salmonella serotypes, campylobacter and Yersinia spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. Food Control, 21: 388–392.

16-Tahamtan, Y., Pourbakhsh, S.A. and Shekarforoush S.S. (2007). PCR detection of Escherichia coli O157:H7 directed from slaughtered cattle in Shiraz, Iran, Archives of Razi Institute, 61: 1-6.

17-Yalçın, H., & Dalkılıç, B. (2019). Incidence of Enterobacteriaceae and Salmonella spp. in Poultry By-Product Meal for Sale on Retail Market in Adana and Mersin. Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute, 4(1).

18-Zhang, Y.J., Wu, H.C., Yazici, H., Yu, M.W., Lee, P.H., and Santella, R.M. (2012). Global hypomethylation in hepatocellular carcinoma and its relationship to aflatoxin B1 exposure. World Journal of Hepatology 4: 169-175.

Fungi counting, Escherichia coli counting and Salmonella detection from waste centers (meat meal) and livestock, poultry and aquaculture factories

Marhamatizadeh M H [1*], Kazemzadeh Shirazi K [2], Hasanzadeh M [3], Jamali Z [3], Nafisi S A H [3], Famouri S M [3]

1- Department of Food Safety and Quality Control, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
3- Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
*Corresponding author: **Drmarhamati@gmail.com**

Abstract:

Considering that the main way for fungi and bacteria to enter livestock and poultry breeding centers and finally to the human food chain is food, so accurate information about the amounts of *Escherichia coli*, *Salmonella* and fungi in meat meal samples and animal, poultry and aquatic feed is essential to control them. In this study, fungal counting tests, *Escherichia coli* bacterial counts and *Salmonella* detection were performed from waste centers (meat meal) and livestock, poultry and aquaculture factories in different parts of Fars province. A total of 40 samples (20 samples of meat meal, 20 samples of prepared feed) weighing approximately 1500 grams were taken in order to investigate the contamination of samples with different fungi by the method of counting fungi according to the national standard of Iran, to count the bacterium *Escherichia coli* according to the national standard of Iran No. 3456 and to detect *Salmonella* by the method of searching *Salmonella* in food according to the national standard of Iran NO. 1810. The results of this study showed that out of 40 samples, Fungi detected in one of feed samples (2.5%), *Escherichia coli* detected in one of feed samples (2.5%) and and the test results for *Salmonella* in three samples (one feed sample and two meat meal samples) were positive (7.5%). This indicates that hygienic protocols are performed in livestock and poultry feed factories and slaughterhouses in Fars province to prevent the infection of feed and meat meal with fungi, *Salmonella* and *Escherichia coli*.

Keywords: Meat meal, Feed, Fungi, *Salmonella*, *Escherichia coli*

شناسایی مولکولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های باکتری شیگلا جدا شده از شیرهای خام و پنیرهای سنتی

فرزانه حسنی [۱]،مجتبی بنیادیان *[۲]، حمداله مشتاقی[۲]

1.دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد 2.گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: boniad@sku.ac,ir

چکیده

شیگلوز یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از اسهال و عوارض آن در سطح جهان است. وجود شیگلا در فراورده‌های لبنی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری از بحران‌های کنونی در دنیا می‌باشد. هدف مطالعه حاضر ارزیابی آلودگی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری شیگلا در شیرهای خام و پنیرهای سنتی بود. تعداد ۲۰۰ نمونه شامل ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی از مراکز عرضه در شهرستان‌های مختلف استان چهارمحال و بختیاری به صورت تصادفی اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و آزمون های استاندارد میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی، همچنین آزمون PCR برای جداسازی و شناسایی شیگلا انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک انتشاری ارزیابی شد. نتایج نشان داد از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر و پنیر سنتی، فقط از ۵ نمونه شیرهای خام باکتری مشکوک به شیگلا جدا شد که با انجام آزمون PCR ۳ (۳ درصد) جدایه‌ها شیگلا تشخیص داده شدند. آزمون های تاییدی نشان داد که هر ۳ جدایه *شیگلا فلکسنری* بودند. ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت جدایه‌های شیگلا در برابر سولفامتاکسازول با ۶۶/۶۶ درصد و بیشترین حساسیت نسبت به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی-سیلین با ۱۰۰ درصد بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، شیرهای خام آلوده به سویه های بیماریزای باکتری شیگلا بوده که نسبت به برخی آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند، لذا ضروری است که از مصرف شیر و فراورده‌های غیر پاستوریزه آن اجتناب شده و جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع با دیگر مواد غذایی آماده مصرف صرفاً از شیرهایی که روند پاستوریزاسیون را گذرانده‌اند استفاده شود.

کلمات کلیدی: شیر خام، پنیر سنتی، شیگلا، تشخیص مولکولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

مقدمه

شیر یک ماده غنی است که از رشد باکتری‌ها حمایت می‌کند. بنابراین پس از آلودگی تعداد باکتری‌ها در محدوده وسیعی از زمان و دما افزایش می‌یابند در نتیجه ماندگاری، کیفیت و ایمنی شیر خام بر اساس بار میکروبی آن تعیین می‌شود. باکتری‌های عامل فساد موجب فعالیت بالای آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز و کاهش محتوای چربی و پروتئین و کاهش کیفیت شیر خام می شوند. این فعالیت‌های آنزیمی اثرات نامطلوب ارگانولپتیک از جمله تلخی، ترشی و طعم بد در شیر ایجاد می‌کنند (Barbano, et al., 2006). باکتری‌های بیماری-زا مانند باکتری شیگلا *(Shigella spp)* در درجه اول بر ایمنی شیر و سلامت مصرف کننده تأثیر می‌گذارد. منبع شیگلا در شیر می‌تواند دام باشد و حیوانات شیری ممکن است شیگلا را در مدفوع خود دفع کنند که می‌تواند باعث آلودگی پستان و در نتیجه در حین دوشیدن شیر، شیگلا به شیر منتقل شود، همچنین دست افراد و آب‌های آلوده منبع دیگری برای انتقال باکتری به شیر است (Hayes, et al., 2001).

شیگلا یک باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و بدون اسپور می‌باشد. این جنس دارای چهار گونه است که شامل: *شیگلا دیسانتری* (*Sh.dysenteriae*)، *شیگلا فلکسنری* (*Sh. flexneri*)، *شیگلا بویدی* (*Sh..boydii*) و *شیگلا سونی* (*Sh..sonnei*) می‌باشد (O'hara, 2005). دوز عفونی این ارگانیسم بسیار پایین و در حدود ده سلول است و خواستگاه طبیعی این باکتری روده انسان و سایر پستانداران می‌باشد. بیماری شیگلوز از طریق مدفوعی- دهانی انتقال یافته که در وهله اول از طریق دست‌های آلوده افراد و به میزان کمتر از طریق آب و مواد غذای آلوده از قبیل سالادها، سبزی‌های خام، شیر و محصولات لبنی و گوشت منتقل می‌شود (Dutta, et al., 2003).

راههای مختلفی برای کاهش شیگلا در شیر خام وجود دارد که موثرترین آنها درمان حرارتی است. پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون شیر با دمای فوق بالا (UHT) بسیار موثر است (Greig, and Ravel, 2009). پنیر از مهم‌ترین فراوردهای لبنی است که بیشتر به روش سنتی تهیه می‌گردد و به دلیل عدم استفاده از شیر پاستوریزه میزان آلودگی میکروبی آن بالا است (Najafi, et al., 2001). در مورد پنیر وجود باکتری های لاکتیک یک اثر بازدارنده بر رشد شیگلا اعمال می کنند اما در همه موارد ممکن است موجب از بین رفتن این باکتری در پنیر نشود (Greig, and Ravel, 2009).

شیگلوز نسبت به سایر اشکال گاستروانتریت از شدت بالاتری برخوردار بوده و سیر بیماری در بیشتر موارد از روز اول تا سوم پس از مصرف ماده غذایی آلوده است. با این حال دوره نهفتگی بسیار متفاوت است و علائم می‌تواند تا هفت روز پس از مصرف ظاهر شود و علائم ممکن است تا چهار هفته پس از بهبودی ادامه داشته باشند (Salek, et al., 2001; Octavia, et al., 2015). علائم معمول شیگلوز عبارتند از: تب، درد شکمی، بی‌حالی، کسالت، مدفوع خونی و مخاطی که منجر به کم آبی بدن می شود (Bern, et al., 1992). شدت بیماری فقط به شخص بستگی ندارد بلکه حدت سویه شیگلا نیز در شدت علائم تاثیرگذار است. به دلایل واضح افراد و کودکان دچار نقص ایمنی یا سوءتغذیه مستعد ابتلا به این بیماری هستند و دچار عفونت‌های شدیدتری می‌شوند. بر اساس گونه، *شیگلا دیسانتری و شیگلا فلکسنری* عفونت‌های شدید ایجاد می‌کنند، در حالی که *شیگلا سونی* خوش خیم تر است. عوارض ناشی از سپتی سمی و هیپوگلیسمی به خصوص در کودکان می‌تواند منجر به مرگ شود. در هنگام آلوده شدن به *شیگلا دیسانتری* یک سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) همراه با نارسایی کلیه ایجاد می‌شود. کراتیت ناشی از عفونت شیگلا نیز گزارش شده است و در برخی از بیماران ممکن است دچار اختلالات گوارشی مانند سندرم روده تحریک پذیر شوند (Najafi, et al., 2001; Salek, et al., 2001).

هیچ اطلاعات دقیقی در مورد تعداد کل شیوع اسهال خونی ناشی از شیگلا در هر سال در دسترس نیست و اکثریت آن در کشورهایی رخ می‌دهد که از وضعیت بهداشتی ضعیف، گرسنگی، جنگ یا فجایع رنج می‌برند. در مناطق گرمسیری

شیوع آن در فصل بارانی به دلیل سیل بیشتر است در حالی که در مناطق نیمه گرمسیری به دلیل درجه حرارت بالا، شیوع در تابستان بیشتر است و در فصول خشکسالی در بسیاری از موارد شیوع بیماری پراکنده است و به سبک‌های جدید زندگی و جهانی شدن مربوط می‌شود مثل غذا نخوردن در خانه، سفرهای تفریحی و غیره که حمل نادرست غذا اغلب مسئول این شیوع است (Greig, and Ravel, 2009).

استفاده از داروها برای درمان شیگلوزیس دو هدف دارد: کاهش علائم و طول مدت آن و عوارض تهدید کننده زندگی؛ همچنین کاهش تعداد و مدت دفع باکتری در روده و اجتناب از انتقال باکتری به سایر افراد. درمان مناسب آنتی بیوتیکی شیگلوز شدت، دوره علایم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می‌دهد (Woteki, and Kineman, 2003)، اما مقاومت باکتری شیگلا به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج به یک مسئله مهم در درمان عفونت شیگلایی تبدیل شده است (Bennish, et al., 1992).

با توجه به خصوصیات شیر و فراورده‌های لبنی و به منظور نقش مهمی که در برنامه غذایی انسان دارد باید کنترل دقیقی بر کیفیت آن صورت گیرد تا میزان آلودگی این محصولات به باکتری‌های بیماریزا ارزیابی شود. بر این اساس مطالعه حاضر طراحی شده تا میزان آلودگی این محصولات به باکتری شیگلا و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار:

نمونه گیری شیر

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه از شیرهای خام و ۱۰۰ نمونه پنیر عرضه شده در بازارهای سنتی مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری در مدت زمان چهار ماه از خرداد تا شهریور در سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری شد. این تعداد نمونه در روزهای مختلف و همچنین در ساعات اولیه‌ی روز به میزان ۵۰۰ گرم و با استفاده از ظروف نمونه‌برداری استریل جمع-آوری شدند. انتقال نمونه‌های مورد نظر به آزمایشگاه در کنار یخ و در دمایی حدود ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد و در ظروف مخصوص (Coolbox) صورت گرفت.

کشت نمونه‌ها و جداسازی شیگلا

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا ۲۵ گرم نمونه‌های شیر/پنیر بوسیله شیکر با ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط آبگوشت شیگلا (محیط تریپتون سوی براث حاوی ۰/۵ µg/ ml نووبیوسین) استریل مخلوط کرده سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۱/۵ درجهٔ سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. سپس روی محیط سالمونلا _ شیگلا آگار کشت جامد انتخابی به-صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی-های بی رنگ رشد کرده بر روی این محیط برای مرحله‌ی افتراقی انتخاب شدند. برای این منظور از محیط‌های سه قندی آهن‌دار، آگار لیزین حاوی آهن، سیمون سیترات و اوره آگار استفاده شد (Mokhtari, et al., 2012).

محیط سه قندی آهن‌دار: یکی از محیط های مهم برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی است. باکتری شیگلا در محیط سه قندی آهن دار به این صورت است که عمق محیط زرد رنگ بوده که نشان دهنده تخمیر قند گلوکز است و در سطح شیب‌دار محیط قرمز یا بدون تغییر می‌ماند که بیانگر عدم استفاده از قندهای لاکتوز و ساکارز است.

محیط آگار لیزین حاوی آهن: رنگ اولیه محیط بنفش می باشد باکتری *شیگلا* توانایی تولید لیزین دکربوکسیلاز و هیدروژن سولفید ندارد و گونه های شیگلا در این محیط رشد نمی کنند و محیط بدون تغییر یا بنفش رنگ باقی می ماند.

محیط سیمون سیترات آگار: گونه های باکتری شیگلا به دلیل عدم داشتن آنزیم سیتراز یا سیترات پرمیاز قادر به مصرف سیترات نبوده و سیترات محیط را از غشاء عبور نداده و این باکتری آمونیوم دهیدروژن فسفات را به آمونیاک و آمونیوم دهیدروکساید تبدیل نکرده و از نیتروژن آن استفاده نمی کند، بنابراین شیگلا توانایی استفاده از سیترات را نداشته و محیط سبز رنگ باقی می ماند.

محیط اوره آگار: اگر باکتری اوره آز مثبت باشد، آمونیاک آزاد شده از اوره رنگ فنل‌رد را به قرمز یا صورتی تغییر می‌دهد و طی مدت زمان ۲ تا ۴ ساعت عمق به قرمز روشن تغییر می-کند. باکتری شیگلا اوره آز منفی می باشد.

محیط متیل رد و وژس پرسکوئر: محیط هر دو لوله مایع Broth حاوی پپتون، بافر و قند دکستروز یا گلولز می باشد که با آنس از نمونه های مشکوک درون دو لوله کشت داده شد در صورتی که ترکیبات اسیدی پایدار در لوله ها ایجاد شود که بر بافر محیط چیره گردد و با اضافه کردن متیل رد رنگ محیط قرمز شود نشان دهنده مثبت بودن است. اگر باکتری از مسیر بوتیلن گلیکول استفاده کرده باشد استوئین تولید شده در مجاورت پتاسیم هیدروکساید و معرف VP اکسید شده و دی استیل تولید کرده و رنگ محیط را قرمز می‌کند و نشان دهنده مثبت بودن VP+ است در غیر این صورت رنگ مسی بعد اضافه شدن معرف VP، نشانه VPمنفی بودن آزمون می‌باشد. در نتیجه آزمون وژس پرسکوئر منفی بوده و نتیجه آزمون متیل رد مثبت است. جهت تفریق گونه های شیگلا از یکدیگر آزمون تخمیر قندها روی جدایه انجام شد.

تایید ملکولی

به‌منظور تایید کلنی‌های مشکوک به *شیگلا* از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

استخراج DNA باکتری

ابتدا کلنی‌های مشکوک در محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) کشت داده، پس از کشت باکتری برای استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. در این روش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر را با مقداری از کلنی رشد کرده در آگار، در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط کرده به طوری که کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک-فارلند (Mc Farland turbidity standard) به‌دست آمد. پس از این مرحله میکروتیوپ به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع بالایی آن جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون PCR

آزمون PCR با استفاده از پرایمر Ipa H انجام شد (جدول ۱) برای این منظور ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس را با ۲ میکرولیتر پرایمر (۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس) و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۱۰ میکرولیتر آب دیونایز استریل مخلوط کرده (مجموع آن باید ۲۵ میکرولیتر شود) و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سیکل‌های حرارتی برای آزمون PCR به تعداد ۳۰ بار تکرار شدند (جدول۲).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی باکتری شیگلا

پرایمر	توالی 5’ → 3’	وزن مولکولی (bp)	هدف	دمای اتصال T(°C)
IpaH-A forward	TGGAAAAACTCAGTGCCTCT	۴۲۳	*Shigella sp.*	۵۳
IpaH -A reverse	CCGTCCGTAAATTCATTCT			

جدول ۲: برنامه حرارتی جهت واکنش PCR برای پرایمر IpaH

	واسرشت اولیه	چرخه واسرشت	اتصال پرایمر	گسترش	گسترش نهایی
دما	۹۴ درجه‌سانتی‌گراد	۹۴ درجه‌سانتی‌گراد	۵۳ درجه‌سانتی‌گراد	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد
زمان	۵ دقیقه	۵۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۴ دقیقه

سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر ترکیب و درون چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد وارد شد. الکتروفورز ژل با ولتاژ ۱۰۰، به مدت ۴۵ تا ۵۰ دقیقه در بافر TBE انجام شد. پس از این مرحله ژل توسط ژل رد رنگ آمیزی و توسط دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت (Ghandian, et al., 2011).

سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های شیگلا

برای این منظور از روش دیسک انتشاری در محیط مولر هینتون آگار ا ستفاده شد. ابتدا جدایه‌های *شیگلا* در محیط نوترینت براث تلقیح و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌های ر شد کرده در محیط نوترینت براث به سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و کدورت آن‌ها با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. سپس با سوآپ استریل به صورت جداگانه در محیط مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar) به صورت چمنی کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (CFM5)، سیپروفلوکساسین (CP5)، تتراسیکلین (TE30)، جنتامایسین (GM10)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (SXT25) و آمپی سیلین (AM10) برای هر نمونه به طور جداگانه مورد روی محیط کشت قرار داده شد (۱۳). پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری توسط کولیس اندازه گیری شد. نتایج با ا ستاندارد تدوین شده CLSI مورد مقایسه و به سه گروه حساس، مقاومت متوسط و مقاوم دسته بندی شدند (Wayne, 2011).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده از آزمون‌ها به روش توصیفی توسط نرم افزار Sigma stat 4 و Exel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در قالب جداول و نمودارها ارایه شدند.

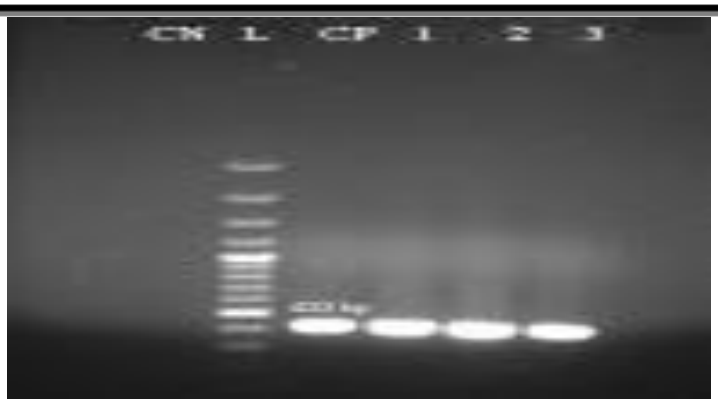
نتایج

نتایج کشت و جداسازی و تایید مولکولی شیگلا

از مجموع ۱۵۰ نمونه شیر و پنیر سنتی، تعداد ۵ جدایه فقط از ۵ نمونه شیر خام با توجه به نتایج آزمایشات میکروبی و بیوشیمیایی مشکوک به شیگلا تشخیص داده شدند. جهت تایید نتایج کشت میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی، روی جدایه‌های مشکوک به *شیگلا* آزمون PCR با جفت پرایمر IpaH انجام شد. از پنج جدایه مشکوک فقط سه جدایه در آزمون PCR شیگلا تشخیص داده شدند، که هر سه جدایه (۳ درصد) متعلق به شیر خام بودند. (جدول ۳)، (شکل ۱) آزمون‌های تکمیلی بیو شیمیایی و تخمیر قندها (عدم تخمیر گلوکز و تخمیر مانیتول) نشان داد که هر سه جدایه شیگلا گونه *شیگلا فلکسنری* بودند.

جدول ۳: نتایج آزمون‌های میکروبی و ملکولی برای شناسایی و تایید شیگلا در شیرخام و پنیرهای سنتی

ماده غذایی	تعداد نمونه	موارد مشکوک	موارد مثبت (PCR)
شیر خام	۱۰۰	۵ (۵٪)	۳ (۳٪)
پنیر سنتی	۵۰	۰	۰
مجموع	۱۵۰	۵ (٪ ۳/۳۳)	۳ (٪ ۲)



شکل ۱: شناسایی باکتری شیگلا به روش PCR

L: مارکر(100bp)، CP: کنترل مثبت، CN: کنترل منفی، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت

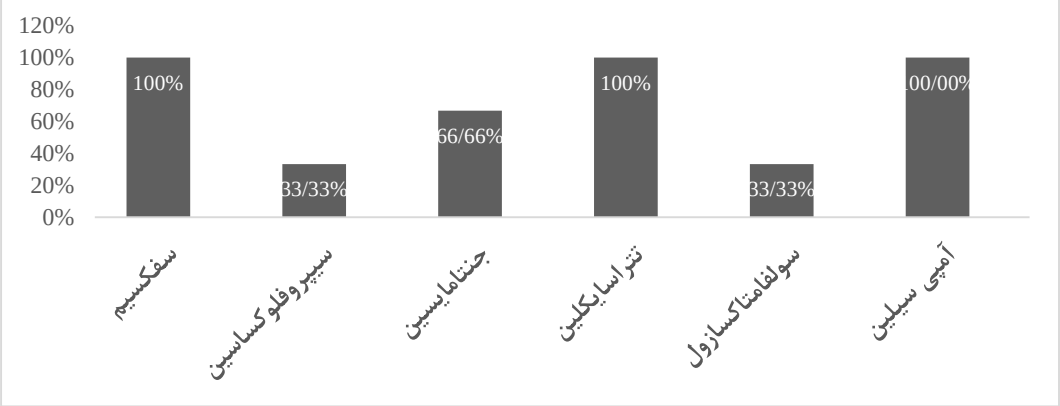
نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام

برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی روی جدایه‌های شیگلا آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک انتشاری انجام شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک استفاده شده عبارت بودند از: جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم) و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم). نتایج به دست آمده از اندازه گیری قطر هاله‌ی عدم رشد با استفاده از جدول CLSI تفسیر شدند.

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشـــان داد که جدایه های شـــیگلا بیشترین مقاومت در برابر سولفامتاکسازول با ۶۶/۶۶ درصد و بیشترین حساسیت به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین با ۱۰۰ درصد را دارا بودند. (جدول ۴ و شکل ۲)

جدول ۴: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های شیگلا از شیر خام و پنیر سنتی

وضعیت	سفکسیم (CFM)	سیپروفلوکساسین (CP)	جنتامایسین (GM)	تتراسایکلین (TE)	سولفامتاکسازول (SXT)	آمپی-سیلین (AM)
مقاوم	۰	۰	۰	۰	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۰
نیم حساس	۰	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۰	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۰
حساس	۳ (٪ ۱۰۰)	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۳ (٪ ۱۰۰)	۰	۳ (٪ ۱۰۰)



شکل ۲: حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های شیگلا از شیر خام

بحث

شیگلوز یک سندرم بالینی است که در اثر تهاجم گونه‌های شیگلا به اپیتلیوم پوشاننده ایلئوم انتهایی، کولون و رکتوم ایجاد می‌شود. اگرچه عفونت‌ها در سراسر جهان و در افراد در تمام سنین رخ می‌دهد، عفونت‌های بومی در بین کودکان ۱ تا ۴ ساله که در محیط‌های کم درآمد و متوسط درآمد زندگی می‌کنند بیشتر بار بیماری را تشکیل می‌دهد. شیوع این ارگانیسم‌های بسیار مسری از اسهال آبکی حاد تا اسهال خونی برق‌آسا که با مدفوع خونی کم مکرر همراه با تب و گرفتگی شکم مشخص می‌شود، متغیر است. طیف وسیعی از عوارض روده‌ای و خارج روده‌ای غیرمعمول، اما اغلب شدید ممکن است رخ دهد. علیرغم کاهش قابل توجه مرگ و میر در طول سه دهه گذشته، تقریباً ۱۶۴ هزار مرگ و میر سالانه مربوط به شیگلوزیس وجود دارد. انتشار بین قاره‌ای سویه‌های شیگلای مقاوم، که توسط مسافران و مردانی که با مردان رابطه جنسی دارند تسهیل می‌شود، توصیه‌های جدیدی را برای درمان آنتی بیوتیکی برانگیخته است. آگاهی از بار بیماری و تهدیدهای نوظهور ناشی از شیگلا، علاقه به توسعه واکسن‌های شیگلا را تسریع کرده است، که بسیاری از آنها در آزمایش‌های بالینی در حال آزمایش هستند. در همین راستا مطالعه حاضر نشان داد که در شیر از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام ۳ نمونه به شیگلا آلوده بودند و از مجموع ۵۰ نمونه پنیر سنتی آلودگی به *شیگلا* وجود نداشت. همچنین نتایج آزمون‌های آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به سولفامتاکسازول و بیشترین حساسیت مربوط به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین بود.

مطالعه Soulieman و همکاران (۲۰۲۰)، در عراق بر روی آلودگی به شیگلا در شیر خام گزارش شد که از مجموع ۷۰ نمونه شیر نمونه‌گیری شده، ۱۵ نمونه (۲۱/۴۲ درصد) به شیگلا آلوده بودند (Soulieman, et al., 2020)، که با نتایج مطالعه حاضر تفاوت زیادی دارد. Elkenany و همکاران (۲۰۲۲) در هندوستان گزارش دادند که از ۱۰۰ نمونه، ۷ نمونه (۷ درصد) به شیگلا آلوده بودند و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) بود که از نظر میزان آلودگی با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت ندارد (Elkenany, et al., 2022)، ولی در ارتباط با میزان مقاومت به آمپی‌سیلین نتایج یکسان است. جنس شیگلا از چهار گونه مختلف تشکیل شده است که بر اساس آنتی ژن سرولوژیکی آنها با یک حروف مشخص می شوند: سروتیپ *Shigella dysenteriae*، سروتیپ *Shigella flexneri*، سروتیپ *Shigella boydii* و سروتیپ *Shigella sonnei*. سه مورد اول در کشورهای در حال توسعه و *S. sonnei* در کشورهای توسعه یافته و ایران رایج است (Farshad, et al., 2006; Shakya, et al., 2016). بر اساس نتایج مطالعه حاضر هر سه جدایه *شیگلا* از شیر *شیگلا فلکسنری* بودند.

در تحقیق مشابه با مطالعه حاضر، Thabet و Elhamed (۲۰۲۰) در مصر گزارش دادند از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر و ۵۰ نمونه پنیر سنتی، باکتری شیگلا از ۳۷ درصد شیرهای خام و ۴۳ درصد پنیرهای سنتی جداسازی شد (Thabet, and Elhamed, 2020). بر اساس نتایج مطالعه حاضر هیچ کدام از نمونه‌های پنیر سنتی به باکتری شیگلا آلوده نبودند. از مهم‌ترین دلایل عدم آلودگی پنیرهای سنتی مورد بررسی در مطالعه حاضر نسبت به سایر پژوهش‌ها، می‌توان به رعایت شرایط بهداشتی در روند تولید و نگهداری این فراورده اشاره کرد. همچنین در اغلب موارد پنیرهای سنتی برای مدتی در آب نمک غلیظ نگهداری می‌شوند و سپس مورد مصرف قرار می‌گیرند و در این شرایط اغلب باکتریهای بیماریزا از جمله شیگلا از بین خواهند رفت.

Demirci و همکاران (۲۰۱۹) در نیجریه میزان آلودگی شیر خام به شیگلا را ۱۶/۵ درصد گزارش کردند (Demirci, et al., 2019). مطالعه Reta و همکاران (۲۰۱۶) در اتیوپی بر روی آلودگی به انتروباکتریاسه در شیر خام نشان داد که از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر خام، ۱۷/۵ درصد نمونه‌ها آلوده به باکتری شیگلا بودند که ۳۰ درصد آنها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند (Reta, et al., 2016). مطالعه Hornik و همکاران (۲۰۲۱) در لهستان میزان آلودگی به شیگلا در شیر خام را ۲۴ درصد گزارش دادند (Hornik, et al., 2021).

مطالعات دیگر نشان داده است که میزان آلودگی شیر خام به باکتری شیگلا همانند مطالعه حاضر کم است. Younis و همکاران (۲۰۱۸) در هندوستان بر روی آلودگی لبنیات به سالمونلا و شیگلا گزارش دادند که از مجموع ۲۵۰ نمونه شیر خام، ۳/۲ درصد به شیگلا آلودگی داشتند (Younis, et al., 2018). همچنین پاک‌بین و همکاران (۲۰۲۱)، در قزوین بر آلودگی شیر خام به شیگلا را ۴/۴۴ درصد گزارش کردند (Pakbin, et al., 2021). در مطالعه ای که توسط Vicar و همکاران (۲۰۱۹) در غنا انجام شد، گزارش دادند که از مجموع ۲۱۰ نمونه شیر خام، ۷ نمونه (۳/۳۳ درصد) به شیگلا آلودگی داشت و بیشترین میزان حساسیت به تتراسایکیلین (۱۰۰ درصدی) را داشت (Vicar, et al., 2019). نتایج مطالعه Mokhtari و همکاران (۲۰۱۲) در تونس نشان داد که شیگلا از نمونه‌های شیر خام و لبنیات جداسازی نشد (Mokhtari, et al., 2012). بررسی نمونه-های غذایی و بالینی در ایران نشان داده است که جدایه‌های شیگلا نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپیم، آمی-کاسین و جنتامیسین کاملاً حساس بودند (Karimi yazdani, et al., 2020).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، شیرهای خام به سویه های بیماریزای باکتری شیگلا آلوده بوده که نسبت به برخی آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند، لذا ضروری است که از مصرف شیر و فراورده‌های غیر پاستوریزه آن اجتناب شده و جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع با دیگر مواد غذایی آماده مصرف صرفاً از شیرهایی که روند پاستوریزاسیون را گذرانده‌اند استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد و جناب آقای مهندس یداله خسروی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض در منافع: وجود ندارد

حمایت مالی: ندارد

منابع

1. Barbano DM., Ma Y. and Santos MVd. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J Dairy Sci. 89(3): 15-24.
2. Bennish ML., Salam MA., Hossain MA., Myaux J., Khan EH. and Chakraborty J. 1992. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nalidixic acid. Clin Infect Dis. 14(5): 1055-1060.
3. Bern C., Martines J., De Zoysa I. and Glass R. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. Bulletin WHO. 70(6): 705-715.
4. Demirci M., Yiğin A., Altun S., Uysal H., Saribaş S. and Kocazeybek B. 2019. *Salmonella Spp*. and *Shigella Spp*. detection via multiplex real-time PCR and discrimination via Maldi-tof ms in different animal raw milk samples. Nigerian J Clin Prac. 22(8): 1083-1090.
5. Dutta S., Ghosh A., Ghosh K., Dutta D., Bhattacharya SK. and Nair GB. 2003. Newly emerged multiple-antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains in and around Kolkata, India, are clonal. J Clin Microbiol. 41(12): 5833-44.
6. Elkenany R., Eltaysh R., Elsayed M., Abdel-Daim M. and Shata R. 2022. Characterization of multi-resistant *Shigella* species isolated from raw cow milk and milk products. J Vet Med Sci. 84(7): 890-897.
7. Farshad S., Sheikhi R., Japoni A., Basiri E. and Alborzi A. 2006. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol. 44(8): 2879-2883.
8. Ghandian Sh., Satari M. and Nikbin V. 2011. Examining the pattern of antibiotic sensitivity and determining the *ipaH* gene in *Shigella* strains isolated from selected provinces of the country. Modares J Med Sci: Biopathol. 14(1): 81-88.
9. Greig J. and Ravel A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int J Food Microbiol. 130(2): 77-87.
10. Hayes M., Ralyea R., Murphy S., Carey N., Scarlett J. and Boor K. 2001. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. J Dairy Sci. 84(1): 292-298.
11. Hornik B., Czarny J., Staninska-Pięta J., Wolko Ł., Cyplik P. and Piotrowska-Cyplik A. 2021. The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characteristics by NGS analysis method. Molecules. 26(16): 5029-5042.
12. Karimi-Yazdi M., Ghalavand Z., Shabani M., Houri H., Sadredinamin M. And Taheri M. 2020. High rates of antimicrobial resistance and virulence gene distribution among *Shigella spp*. isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. Infec Drug Res. 48(4): 101-112.
13. Mokhtari W., Nsaibia S., Majouri D., Ben Hassen A., Gharbi A. and Aouni M. 2012. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. J Appl Microbiol. 113(1): 209-222.
14. Najafi A., Ziabakhsh DM., Karimian H., Abednia AR. and Hosseininezhad M. 2011. Microbiological changes of pousti cheese during ripening. J Food Tech Nutr. 30(2): 741-752.
15. Octavia S. and Lan R. 2015. *Shigella* and *Shigellosis*: genetics, epidemiology and pathogenesis. Molecul Med Microbiol. 2: 1147-1168.
16. O'hara CM. 2005. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. Clin Microbiol Rev. 18(1): 147-62.
17. Pakbin B., Amani Z., Allahyari S., Mousavi S., Mahmoudi R. and Brück WM.

2021. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella spp*. isolates from food products. Food Sci Nut. 9(11): 6362-6371.
18. Reta MA., Bereda TW. and Alemu AN. 2016. Bacterial contaminations of raw cow's milk consumed at Jigjiga City of Somali Regional State, Eastern Ethiopia. Int J Food Conta. 3(1): 1-9.
19. Salek MA., Forouhesh TH., Ansari H., Ravadgar B., Noorian VA. and Ghassemi M. 2001. A Survey on Bacterial Contamination on One-Hundred Unpasteurized Cheese Samples and Pasteurized Cheese as Control and Stability of Commonly Contaminating Bacteria to Different Salt Concentration. Razi J Med Sci. 15(2): 70-82.
20. Shakya G., Acharya J., Adhikari S. and Rijal N. 2016. *Shigellosis* in Nepal: 13 years review of nationwide surveillance. J Heal Popul Nutr. 35(1): 1-9.
21. Soulieman N., Al-Mariri A. and Al-Atrash F. 2020. Detection of *Shigella* in raw bovine milk by polymerase chain reaction. Iraqi J Vet Sci. 34(1): 9-16.
22. Thabet H. and Mabd Z. 2020. Occurrence of *Shigella* species in raw milk and Kareish cheese with special reference to its virulence genes. Assi Vet Med J. 12(1): 44-54.

23. Vicar EK., Feglo PK., Acquah SE., Williams W., Saba CK. and Mensah GI. 2019. Antibiotic-resistant bacteria in raw cow milk and milk products retailed in the northern region of Ghana; a food safety challenge. J Food Safe Hyg. 5(4): 206-213.
24. Wayne P. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8(3): 79-90.

25. Woteki C. and Kineman BD. 2003. Challenges and approaches to reducing foodborne illness. Ann Rev Nutr. 23(1): 315-344.

26. Younis GA., Elkenany RM. and Abd-Elmoati WS. 2018. Advanced studies on virulence genes of *Salmonella* and *Shigella* species isolated from milk and dairy products. Ann Res Rev Biol. 29(3): 1-11.

Molecular detection and antibiotic resistance pattern of Shigella sp. Isolated from raw milk and traditional cheeses

Hassani F[1] , Bonyadian M[2*], Moshtagi H[2]

1. Graduated in Msc of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran

*(Corresponding Author) Email: boniadian@sku.ac.ir

Abstract

Shigellosis is one of the main causes of death due to diarrhea and its complications worldwide. The prevalence of Shigella in dairy products and the antibiotic resistance of this bacterium are among the current crises in the world. This study aimed to evaluate the prevalence and antibiotic resistance pattern of Shigella species isolated from raw milk and traditional cheeses. Totally 200 samples including 100 samples of raw milk and 100 samples of traditional cheese from the supply centers in different cities of Chaharmahal and Bakhtiari province were randomly collected and transported to the food hygiene laboratory in Coolbox. Shigella was detected using standard microbiological and biochemical tests. The PCR test was performed to verify the isolates. Antibiotic resistance was also evaluated using the disk diffusion method and CLSI standard. The results of this study showed that out of a total of 150 samples of traditional milk and cheese, from 5 samples of raw milk *Shigella* suspected colonies were isolated. The PCR revealed that only 3(3%) isolates were confirmed as *Shigella flexnerii*. Also, among Shigella isolates, there was the highest resistance to sulfamethoxazole at 66.66% and the highest sensitivity to cefixime, tetracycline, and ampicillin at 100%. According to the results, raw milk is contaminated with Shigella pathogenic strains that are resistant to some antibiotics, so it is necessary to avoid the consumption of milk and its non-pasteurized products and prevent Cross-contamination with other ready-to-eat foods, use only milk that has passed the pasteurization process.

Keywords: Raw milk, Traditional cheese, *Shigella*, Molecular detection, Antibiotic resistance

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نانوامولسیون عصاره زرشک (*Berberis vulgaris*) به عنوان نگهدارنده طبیعی در یک مدل غذایی

بهروز دست پیمان[1]، امیر شاکریان [2] ، زهره مشاک [3]*، ابراهیم رحیمی [1]، رضا شرافتی چالشتری[4]
[1] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[2]مرکز تحقیقات تغذیه و فرآورده های ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[3]گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[4]مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماریهای متابولیک،دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان،ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mashak@kiau.ac.ir

چکیده

در دهه‌های اخیر، ترجیح مصرف کننده بیشتر به سمت غذاهای نگهداری شده با نگهدارنده‌های طبیعی گیاهی (مانند عصاره و اسانس‌های روغنی) است. در این مطالعه پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال نانو امولسیون عصاره زرشک ارزیابی شد. در مجموع سیزده ترکیب فنلی در عصاره شناسایی شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و نانو امولسیون عصاره زرشک با دو روش DPPH و ATBS به ترتیب ۰/۰۲ mg/g - ۲/۱۴ و ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۰ بود. همچنین خاصیت ضدمیکروبی آن روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) تأیید شدو باکتری‌های گرم مثبت نسبت به هر دو فرم عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره حساسیت بالاتری داشتند. مقاوم‌ترین و حساس‌ترین پاتوژن ها نسبت به عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب *سالمونلا انتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و بود. در ادمه پتانسیل اکسیداتیو (اکسیداسیون لیپید و پروتئین) و آنتی‌باکتریال نانوامولسیون‌ها بر روی فیله ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) به عنوان یک مدل غذایی فسادپذیر استفاده شد. نتایج نشان دهنده افزایش پایداری اکسیداتیو،تشکیل کمتر ترکیبات نیتروژن فرار و کاهش بار میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی بود. بطوریکه استفاده از نانوامولسیون عصاره زرشک توانست طی ۶ روز کیفیت فیله‌های ماهی در دمای یخچال را حفظ کند. در مجموع می‌توان گفت استفاده از نانوامولسیون عصاره زرشک به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای برای افزایش عمر مفید و حفظ کیفیت مواد غذایی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: نانوامولسیون، ماندگاری مواد غذایی، نگهدارنده‌های طبیعی، *Berberis vulgaris*، *Rutilus frisii*

مقدمه

حفظ مواد غذایی از تمدن باستان یک دغدغه بزرگ بوده است. جوامع باستانی روش‌های نگهداری مختلفی مانند خشک کردن و نمک سود کردن را برای نگهداری طولانی‌تر غذا استفاده کردند. با پیشرفت جوامع، نگهدارنده‌های شیمیایی مانند بنزوات‌ها، نیترات‌ها، نیتریت‌ها و سوربات‌ها به طور گسترده‌ای برای افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده می‌شوند. با این حال، نگرانی‌هایی در مورد تأثیر منفی بالقوه استفاده بیش از حد از مواد نگهدارنده بر سلامت انسان وجود دارد (Cedillo-Olivos *et al*., 2024). در نتیجه، مصرف‌کنندگان به‌طور فزاینده‌ای خواستار افزودنی های ایمن، کارآمد و طبیعی هستند که دارای پتانسیل گسترده‌ای برای مهار رشد پاتوژن‌های غذایی باشند (Dong *et al*., 2024). برای غلبه بر نگرانی مصرف‌کننده، در سال‌های اخیر تمرکز محققان بر استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس و عصاره های گیاهی در مدل آزمایشگاهی و همچنین مدل غذایی بوده است. تنوع نگهدارنده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان، علاوه بر امکان انتخاب متنوع، می‌تواند ماندگاری، ویژگی‌های تغذیه‌ای و خواص فیزیکوشیمیایی مواد غذایی را بهبود دهد (Soutelino *et al*., 2024).

زرشک با نام علمی *(Berberis vulgaris* L.) یک گیاه بوته‌ای، با رنگ قرمز و طعم ترش از خانواده *Berberidaceae* است و تقریباً ۱۹۰ گونه در سراسر جهان وجود دارد و در اروپا، آسیا و به ویژه ایران کشت می شود. میوه‌های زرشک تقریباً ۷ تا ۱۰ میلی‌متر طول و ۳ تا ۵ میلی‌متر پهنا دارند و ظاهری بیضی شکل و ساختاری شبیه زغال اخته دارند و به دلیل محتوی آلکالوئیدی، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، محتوای ویتامین‌ها (C و E) و اسیدهای آلی یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است (Tacer-Tanas *et al*., 2024; Homayoonfal *et al*., 2021). همچنین میوه‌های زرشک به دلیل داشتن آنتوسیانین و کاروتنوئید بالا به عنوان یک رنگدانه طبیعی و عوامل آنتی‌اکسیدانی طبیعی استفاده می‌شود. علاوه بر این، به دلیل حضور آلکالوئید بربرین[1] و سایر ترکیبات زیست فعال (مانند پلی‌فنول‌ها و فلاوونوییدها)، عصاره زرشک فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را نشان می‌دهد (Parseghian *et al*., 2024). با این حال، ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره زرشک، به شرایط محیطی حساس هستند و مهمتر از آن، گروه‌های هیدروکسیل فنلی آنتوسیانین‌ها به راحتی به فرم کینون اکسید می‌شوند و باعث کاهش فعالیت بیولوژیکی آنها می‌شود. از این رو، پایداری پایین کاربرد آنها را در فرآیندهای مختلف محدود کرده است که این امر در سال‌های اخیر به عنوان یک چالش جدی در صنایع غذایی مطرح می‌باشد (Jawed Khan *et al*., 2023). بر این اساس، استراتژی‌های مختلفی پیشنهاد شده‌اند که کپسوله‌سازی کاربردی‌ترین تکنیک است. اساساً، کپسوله‌سازی باعث حفاظت و افزایش پایداری، فراهمی زیستی و همچنین هدف‌گیری، رهاسازی کنترل‌شده یا طولانی‌مدت ترکیبات زیست فعال از طریق چسباندن آنها در داخل یک پوشش یا دیواره لایه نازک به صورت میکرو یا نانوذرات می‌باشد (Taouzinet *et al*., 2023). نانوامولسیون‌ها به دلیل اندازه قطرات کوچکشان از نظر نوری

[1] Berberine

شفاف یا نیمه شفاف هستند و پایداری ترمودینامیکی بالایی در برابر بارش و تجمع نشان می‌دهند. همچنین نانوامولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی به سمت میکروارگانیسم‌هایی که در غشای خود ساختار لیپیدی دارند رانده می شوند و این اتصال با گرانش الکتروا ستاتیکی بین بارهای کاتیونی ذرات نانوامولسیون و بارهای آنیونی غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها بهبود می‌یابد؛ از طرفی به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، فعل و انفعالات مولکولی با سطوح سلولی باکتری‌ها را تسهیل می‌کند. هنگامی‌که نانوامولسیون به پاتوژن متصل می‌شود، انرژی آن آزاد می شود. بنابراین غشای لیپیدی پاتوژن ناپایدار شده و مرگ سلولی رخ می‌دهد (Pandey *et al.*, 2024). مطالعات مختلفی اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های روغنی را نشان داده‌اند (Mutlu, 2023; Gholamhosseinpour *et al.*, 2023; da Silva *et al.*, 2023). ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) متعلق به خانواده کپور ماهیان است. صرف نظر از اهمیت اقتصادی، تغذیه‌ای، حضور پروتئین‌های حیاتی، محتوی ا سید چرب غیر ا شباع بالا (خ صو صاً ω6 و ω3)، پروفایل اسیدهای آمینه و لذیذ بودن گوشت این ماهی سبب شده که بسیار مورد استقبال مصرف کننده باشد (Hedayatifard *et al.*, 2017). عمر مف ید و کیف یت آبز یان به دل یل حضور پروتئین بالا، pH خنثی، وجود آنزیم‌های اتولیتیک و پتانسیل فساد شیمیایی بسیار کم است. بنابراین ایمنی افزایش ارتقاء کیفیت و کنترل کیفی فرآورده آبزی جهت جلوگیری و کاهش دور ریز این محصول ذی قیمت مهم می‌با شد (Huss, 2007). از این رو در این مقاله ابتدا ویژگی‌های نانوامولسیون عصاره زرشک ارزیابی شد و سپس فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌های تهیه شده جهت پایداری اکسیداتیو و میکروبی فیله ماهی دریای خزر (*Rutilus frisii*)، به عنوان یک مدل غذایی با فسادپذیری بالا، طی ۹ روز نگهداری در دمای یخچال بررسی شده است .

مواد و روش کار

تهیه مواد اولیه: میوه تازه زرشک از بازار محلی (قاین، خراسان جنوبی، ایران) تهیه شد. همچنین سویه‌های میکروبی پاتوژن‌های *اشریشیاکلی* (PTCC 25922)، *سالمونلا انتریتیدیس* (PTCC 13076)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 7644) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 13565) مورد بررسی بصورت ویال‌های لیوفیلیزه ۱ گرمی (10^{12} CFU/Sachet) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم-های صنعتی ایران تهیه شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck (آلمان) و محیط های کشت استفاده شده از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

تهیه عصاره میوه زرشک: میوه تازه رسیده درون آون (Memmert، آلمان) با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خ شک و پودر شد. پس از آن، اتانول (با خلوص ۹۹ درصد) به نسبت ۱:۱۰ (وزن / حجم) اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق به کمک شیکر (IKA، آلمان) هم زده شد. سپس، مخلوط از طریق کاغذ صافی Whatmanشماره ۱ فیلتر شد و اتانول توسط یک اواپراتور چرخشی (Heidolph، آلمان) تبخیر شد. عصاره میوه زرشک جهت انجام آزمایشات (کمتر از دو هفته) در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Shekarabi *et al.*, 2022).

تهیه نانو امواسیون عصاره زرشک: جهت تهیه نانوامولسیون، عصاره به نسبت مساوی با توین ۸۰، به عنوان

سورفکانت، به خوبی مخلوط شدند. سپس فاز آبی (آب مقطر) به وسیله اسید سیتریک ۰/۳درصد اسیدی شده و مخلوط فاز روغنی (روغن آفتابگردان، لادن، ایران) با پلی‌گلیسرول پلی‌رسینولئات مخلوط شد و سورفکتانت بر روی همزن مغناطیسی با سرعت دورانی ۷۰۰ دور در دقیقه به آرامی به فاز آبی، به منظور تهیه پیش مخلوط امولسیونی، اضافه شد. پیش مخلوط امولسیونی تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Greatultrasonic، چین) با توان ۱۰۰وات و ۴۰ کیلوهرتز برای تهیه نانو امولسیون‌ها قرار گرفتند (Fallah *et al*., 2022). به این ترتیب نانو امولسیون مورد نظر تهیه شد.

شناسایی ترکیبات عصاره میوه زرشک با HPLC[1]: آنالیز HPLC با Beckman HPLC با پمپ مدل ۱۲۷، آشکارساز UV مدل ۱۶۶ و سیستم عامل ۳۲ KARAT Sotware انجام شد. ترکیبات فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با سرعت کم ۱ میلی‌لیتر در دقیقه شناسایی شدند. کارکرد ستون دستگاه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تنظیم شده بود. جداسازی در یک سیستم پمپاژ دوگانه با تغییر نسبت ۲/۵ درصد (v/v) اسید استیک در آب (فاز متحرک A) و ۷۰ درصد متانول در آب (فاز متحرک B) انجام شد. برنامه شستشوی گرادیان حلال به شرح زیر بود: ۱۰تا ۲۶ درصد B (v/v) در ۱۰ دقیقه، تا ۷۰ درصد B در ۲۰ دقیقه و در نهایت تا ۹۰ درصد B در ۲۵ تا ۳۱ دقیقه. حجم تزریق برای همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بود. ترکیبات فنلی با تطبیق زمان ماند و ویژگی‌های طیفی آن‌ها با استانداردها آنالیز شدند (Och *et al*., 2023).

اندازه‌گیری کارایی ریزپوشانی (EE)[2]: نانوامولسیون با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت اولتراسانتریفیوژ شد، مایع رویی جمع آوری و با بافر فسفات رقیق شد تا غلظت آزاد مربوط به عصاره زرشک محاسبه شود. نمونه‌ها مجدداً سانتریفیوژ شدند و فرآیند فوق سه بار تکرار شد. سوپرناتانت‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۳۵ نانومتر برای تعیین غلظت عصاره زرشک ریزپوشانی شده جمع‌آوری گردید. درصد راندمان به دام افتادن به صورت زیر محاسبه و گزارش شد (Ananingsih *et al*., 2024):

% Entrapment efficiency = Total extract added - free extract/Total extract added × 100 رابطه (۱)

اندازه‌گیری محتوی فنل کل: ۲۵ میکرولیتر از نانو امولسیون عصاره با ۲۵ میکرولیتر معرف Folin-Ciocalteu (۲۵ درصد وزنی/وزنی) و ۲۰۰ میکرولیتر آب مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه قبل از مخلوط کردن ۲۵ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد انکوبه (شیماز- ایران) شد. مجدداً مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد و جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر (Shimatzo- ژاپن) ثبت شد. نتایج به عنوان میلی‌گرم اسید گالیک (۰-۲۰۰ میکروگرم بر گرم) معادل در هر گرم نمونه (mg GAE/g) گزارش شد (Ali *et al*., 2021).

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید: نانو امولسیون عصاره در یک تیوپ ۸۰ میکرولیتری ریخته و پس از افزودن ۸۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم (۲ درصد) و استات سدیم ۱۲۰ میکرولیتر (۵۰ گرم در لیتر) تکان داده شد. سپس مخلوط واکنش به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شد. جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و تمام نمونه‌ها در سه تکرار آنالیز شدند. منحنی استاندارد (۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کوئرستین)

[1] High-performance liquid chromatography
[2] Encapsoulation Efficiency

رسم شد و نتایج به صورت mg QE/g ارائه شد (Suleria *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات: به منظور اندازه‌گیری میانگین قطر حجمی قطرات ابتدا همه نانو امولسیون ها به منظور جلوگیری از پراکنش متعدد ذرات[1] با نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شده و به وسیله دستگاه Malvern DLS[2]، اندازه قطرات در دمای ۲۵ $^{\circ}C$ نگهداری و با زاویه ۹۰ درجه مشخص گردید (Rezaei Savadkouhi *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی:

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH[3]: ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر DPPH ۰/۰۰۲درصد متانول مخلوط گردید. بعد از انکوباسیون برای ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق، جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارزیابی بر اساس µg/mL و گزارش شد (Ganesan and Shanmugam, 2020).

I% = (A control – A sample) / A control × 100

رابطه (۲)

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ABTS: ۳۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده با متانول در ۳ میلی‌لیتر محلول رادیکال $ABTS^{\bullet+}$، اضافه شد و جذب واکنش پس از ۶ دقیقه در طول موج ۷۳۴ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. آب به عنوان نمونه بلانک واکنش استفاده شد. محلول رادیکال $ABTS^{\bullet+}$ از واکنش بین ۵ میلی‌لیتر محلول ذخیره ABTS (7 mmol/L) و ۸۸ میکرولیتر پرسولفات پتاسیم (140 mmol/L) تهیه شد که هر دو در آب مقطر تهیه شده بودند. مخلوط به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد. این محلول با اتانول تا جذب ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. یک منحنی استاندارد Trolox در اتانول، ساخته شده در شرایط واکنش مشابه، برای تعیین کمیت کل فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Ganesan and Shanmugam, 2020).

I% = (A control – A sample) / A control × 100

رابطه (۳)

اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی:

تهیه سوسپانسیون میکروبی: پاتوژن‌های *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* برای آزمایش انتخاب شدند زیرا مهم‌ترین پاتوژن‌های مرتبط با بیماری‌های ناشی از غذا هستند. پاتوژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر دو بار در محیط کشت Brain Heart Infusion فعال شدند که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این، کلنی‌های پاتوژن‌ها بر روی آگارهای انتخابی مختلف (شامل EMB agar برای *اشریشیاکلی*، XLD برای *سالمونلا انتریتیدیس*، Listeria Oxford Agar برای لیستریا *مونوسیتوژنز* و Baird Parker Agar همراه با تلوریت زرده تخم مرغ برای *استافیلوکوکوس اورئوس*) جداشدند و به لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول نمک استریل در ۰/۸۵ درصد (m/v) منتقل شدند. کدورت با محلول سولفات باریم استاندارد (استاندارد نیم مک فارلند برابر با غلظت ۸ log CFU/mL) مقایسه شد (da Silva *et al.*, 2023).

تعیین قطر هاله عدم رشد: برای تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون عصاره در برابر باکتری‌های مورد

[1] Multiple Scattering
[2] Dynamic light scattering
[3] DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

بررسی، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. دیسک‌ها به قطعات ۱۰ میلی‌متری بریده شدند و پس از آغشته شدن به نانومولسیون‌ها (۰/۴ mg/ml، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) روی پلیت‌های Mueller Hinton Broth که قبلاً با کلنی‌های $1/5 \times 10^8$ CFU/ml پاتوژن‌ها آغشته شده بود، قرار داده شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (Ansarifar and Moradinezhad, 2022).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2]: MIC برای هر پاتوژن به روش میکرودیلوشن تعیین شد. برای این منظور، عصاره نانومولسیون در محلول ۴ درصد دی متیل سولفوکسید[3] رقیق و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت درون ۱۰ لوله آزمایش در غلظت‌های (۰ mg/ml، ۰/۱۹، ۰/۳۹، ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵۰ و ۵۰) ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به طور جداگانه تلقیح شد. سپس پلیت‌های چندخانه به دقت مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری (شیماز – ایران) شدند. پایین‌ترین غلظت مهار رشد میکروارگانیسم‌ها به عنوان MIC گزارش شد. جهت تعیین میزان MBC، از هر چاهک به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت Mueller Hinton Agar کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. پایین‌ترین غلظت کشنده کامل میکروارگانیسم‌ها (کاهش ۹/ ۹۹ درصدی در (Log CFU /ml) به عنوان MBC گزارش شد (El Hamdaoui *et al.*, 2018).

تهیه فیله ماهی و پوشش‌دهی با نانومولسیون عصاره زرشک: تعداد ۵ عدد ماهی سفید از بازار بندر انزلی از بین ماهی‌های صید شده، بطور تصادفی خریداری شد. سپس ماهیان تازه در داخل جعبه‌های یونولیت همراه با یخ قرار داده شد و طی مدت ۶ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی مواد زائد خارجی از سطح بدن ماهیان، شستشوی آن‌ها با آب شیرین انجام پذیرفت. پس از سرزنی، تخلیه شکمی و فیله نمودن ماهیان مجدداً شسته شدند. فیله‌ها به وزن ۵۰ گرم تهیه شدند. جهت تهیه تیمارها، ابتدا نمونه‌های فیله ماهی در محلول پوشش‌دهی (نانومولسیون) به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. نهایتاً، در زیر هود قرار داده شده تا خشک شدند. سپس هر قطعه فیله به طور جداگانه در یک ظرف پلی اتیلنی استریل شده به وسیله اشعه UV قرار داده شده و در یخچال با دمای ۱±۴ درجه سلسیوس به مدت ۹ روز نگهداری شدند (Mezhoudi *et al.*, 2022).

آزمون پایداری اکسیداتیو: اکسیداسیون لیپید (ماده واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک) نمونه‌ها به روش کالریمتریک (Efendi *et al.*, 2023) و اکسیداسیون پروتئین (اکسیداسیون پروتئین با واکنش بین گروه‌های کربونیل و هیدرازون‌های پروتئینی تشکیل‌دهنده دی‌نی‌تروفنیل هیدرازین) نمونه‌ها به روش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (Monteiro *et al.*, 2020) و تشکیل ترکیبات ازت فرار به روش تیتراسیون با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال (Mehrabi *et al.*, 2024) به مدت ۹ روز (روز ۰، ۳، ۶ و ۹) تعیین شد.

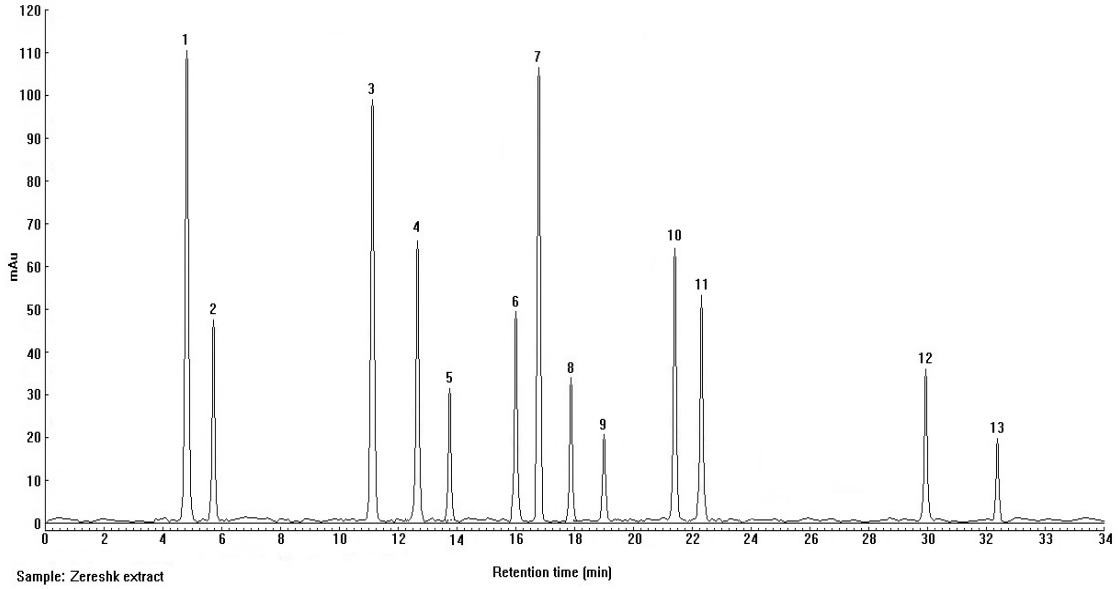
[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Bactericidal Concentration
[3] Dimethyl sulfoxide

آزمون میکروبی: پس از آماده‌سازی سوسپانسیون فیله‌های ماهی، باکتری‌های کل سایکروتروف در محیط کشت Nutrient agar (گرمخانه‌گذاری در دمای ۶/۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز) (ISIRI, 2024)، باکتری‌های کل مزوفیل در محیط کشت Nutrient agar (گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت) (ISIRI, 2015)، و باکتری‌های انتروباکتریاسه در محیط کشت Violet Red Bile Lactose Agar (گرمخانه-گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) (Khanzadi *et al.*, 2020). به مدت ۹ روز (روز ۰، ۳، ۶ و ۹) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده در آزمایشات ، برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شدند. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p\leq$ ۰/۰۵ برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج بررسی ترکیبات فنلی موجود در عصاره زرشک استخراج شده با HPLC در شکل ۱ نشان داده شده است. در مجموع ۱۳ ترکیب در عصاره زرشک شناسایی شد.

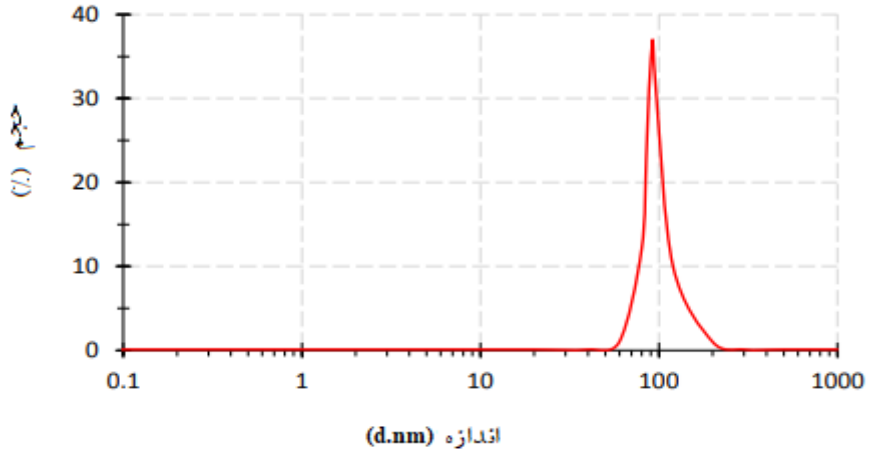


شکل ۱- ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره زرشک با HPLC

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده و فراوانی آنها در عصاره زرشک با HPLC

ترکیب شناسایی شده	فراوانی (µm/g)	ترکیب شناسایی شده	فراوانی (µm/g)
اسید کلروژنیک	۸/۳۱	گالیک اسید	۳/۲۰
اپی‌کاتچین گالات	۷/۷۲	کامفرول	۲/۵۸
کاتچین هیدرات	۶/۶۰	اسید فولیک	۲/۲۶
پروتوکاتکویک اسید	۴/۳۳	اسید کافئیک	۱/۹۵
کوئرستین	۴/۱۴	ایزورامنتین	۱/۶۳
میریستین	۳/۶۶	ترانس اسید سینامیک	۱/۵۵
اسید p-کوماریک	۳/۴۵		

نتایج میانگین قطر ذرات (شکل ۲) نشان داد یک پیک با پنهای ۳۱ نانومتر مشاهده شد. میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها ۹۲ نانومتر با PDI برابر ۰/۳۴۵ گزارش شد.



شکل ۲- توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها

در این مطالعه میزان کارائی ریزپوشانی عصاره زرشک برابر با ۸۷ درصد بود. نتایج محتوی فنل و فلاونوئید نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با فرم آزاد (جدول ۲) نشان داد محتوی فنل و فلاونوئید در عصاره زرشک بطورمعناداری از نانوامولسیون بالاتر بود ($p<0.05$). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر در فرم آزاد عصاره بود ($p<0.05$).

جدول ۲- میانگین نتایج محتوی فنلی، فلانوئیدی و آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون عصاره زرشک و عصاره آزاد

تیمار	فنل (mg/g)	فلاونوئید (mg/g)	DPPH (mg/g)	ATBS (mg/g)

[1] polydispersity index

عصاره زرشک	۴۳/۲۶ ± ۰/۳۶ [a]	۲۴/۵۸ ± ۱/۰۲ [a]	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ [b]	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ [b]
نانوامولسیون عصاره زرشک	۹/۱۹ ± ۰/۰۱ [b]	۲/۹۷ ± ۰/۰۵ [b]	۲/۱۴ ± ۰/۰۷ [a]	۲/۱۰ ± ۰/۰۲ [a]

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

نتایج فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (جدول ۳) در برابر گونه‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنو سیتوژنز) و گونه‌های گرم منفی (*شریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) نشان داد نانوامولسیون‌ها فعالیت ضدمیکروبی کمتری نسبت به عصاره نشان دادند ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان داد باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت عصاره و نانوامولسیون داشتند ($p<0.05$). مقاوم‌ترین و حساس‌ترین پاتوژن‌ها نسبت به عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* بود ($p<0.05$).

جدول ۲- میانگین نتایج ضدمیکروبی (log cfu/ml) نانوامولسیون عصاره زرشک و عصاره

	تیمار	*اشریشیاکلی*	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*سالمونلا انتریتیدیس*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
MIC (mg/ml)	**عصاره زرشک**	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ [a]	۱۰/۴۱ ± ۰/۰۵ [a]	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ [a]	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ [a]
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ [a]	۸/۳۳ ± ۱/۰۲ [b]	۶/۲۵ ± ۲/۹۴ [b]	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ [a]
MBC (mg/ml)	**عصاره زرشک**	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ [a]	۱۲/۵۰ ± ۰/۰۰ [a]	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ [a]	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ [a]
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۱۰/۴۱ ± ۲/۹۴ [a]	۸/۳۳ ± ۱/۰۲ [b]	۲۵/۰۰ ± ۰/۰۰ [b]	۸/۳۳ ± ۲/۹۴ [b]
رشد هاله عدم (mm)	**عصاره زرشک**	۱۰/۰۵ ± ۱/۱۸ [a]	۱۱/۶۴ ± ۱/۱۵ [a]	۱۰/۶۴ ± ۲/۰۲ [a]	۱۲/۶۶ ± ۱/۳۱ [a]
	نانوامولسیون عصاره زرشک	۷/۲۷ ± ۱/۰۵ [b]	۱۰/۸۱ ± ۱/۵۶ [b]	۴/۹۱ ± ۱/۱۱ [b]	۶/۶۶ ± ۱/۰۵ [b]

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

نتایج اکسیداسیون چربی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره (جدول ۳) نشان داد در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p>0.05$). با این حال از روز سوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پوشش‌دهی شده با نمونه شاهد مشاهده شد ($p<0.05$). همچنین نتایج نشان داد طی ۹ روز نگهداری روند افزایشی معنادار اکسیداسیون لیپید در همه گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد ($p<0.05$). نتایج نشان داد اکسیداسیون لیپید وابسته به تیمارهای پوشش‌دهی بود ($p<0.05$).

محتوای کربونیل (اکسیداسیون پروتئین نشان داده شده در جدول ۳) رفتار مشابهی با اکسیداسیون لیپید با در نظر گرفتن دوره نگهداری و تفاوت بین تمام تیمارها بود ($p<0.05$). پوشش‌دهی با نانوامولسیون عصاره زرشک بطورمعناداری روند اکسیداسیون پروتئین نمونه‌های فیله ماهی را کاهش داد ($p<0.05$).

جدول ۳- میانگین نتایج پایداری اکسیداتیو نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک

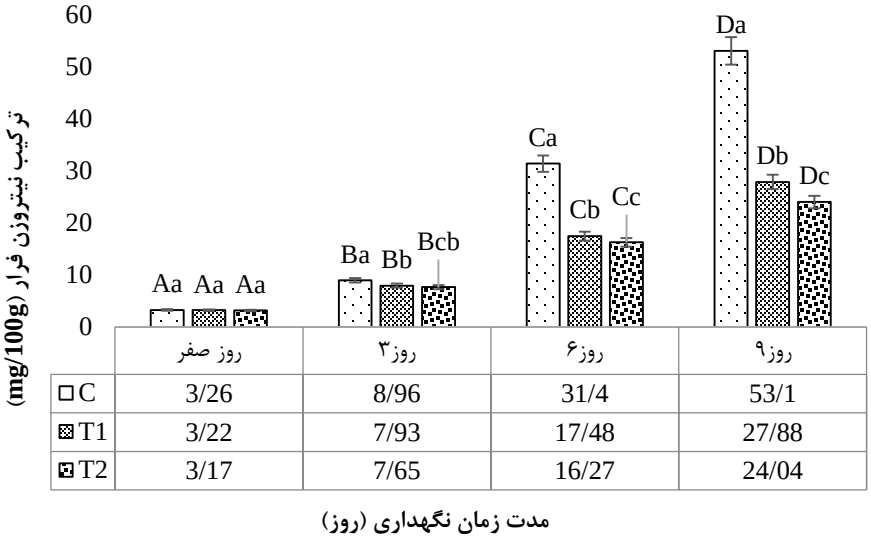
	تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم
اکسیداسیون لیپید (mg MAL/Kg)	Co	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ Aa	۰/۲۳ ± ۱/۰۲ Ba	۰/۵۶ ± ۰/۰۴ Ca	۰/۸۷ ± ۰/۰۱ Da
	T1	۰/۱۲ ± ۰/۰۰ Aa	۰/۱۹ ± ۰/۰۰ Bb	۰/۴۵ ± ۰/۰۲ Cb	۰/۷۱ ± ۰/۰۱ Db
	T2	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ Aa	۰/۱۳ ± ۰/۰۰ Bb	۰/۳۰ ± ۰/۰۰ Cc	۰/۶۰ ± ۰/۰۲ cD
اکسیداسیون پروتئین (nmol carbonyl/mg protein)	Co	۱/۳۳ ± ۰/۱۷ Aa	۳/۳۴ ± ۰/۲۴ Ba	۴/۴۶ ± ۰/۳۱ Ca	۵/۱۶ ± ۰/۹۴ b
	T1	۱/۳۰ ± ۰/۱۴ Aa	۲/۴۸ ± ۰/۱۹ Bb	۲/۸۴ ± ۰/۱۳ Cb	۳/۳۴ ± ۰/۲۸ b
	T2	۱/۳۰ ± ۰/۱۲ Aa	۱/۸۴ ± ۰/۱۴ Bb	۲/۰۶ ± ۰/۱۲ Cb	۲/۵۳ ± ۰/۳۴ b

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانومولسیون عصاره زرشک

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

*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد ($p<0.05$).

نتایج تشـــکیل ترکیبات ازت فرار در نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با نانومولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصـــاره (شـــکل ۳) نشـــان داد در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف مشـاهده نشـد ($p>0.05$). با این حال از روز سوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پو شش‌دهی شده با نمونه شاهد م شاهده شد ($p<0.05$). همچنین نتایج ن شان داد طی ۹ روز نگهداری روند افزای شی معنادار تشـــکیل ترکیبات ازت فرار در همه گروه‌های مورد بررســی مشـاهده شـد ($p<0.05$). افزایش سـریع تشـکیل ترکیبات ازت فرار در نمونه شاهد (تیمار C) مشاهده شد که به مقدار ۵۳/۱۰ mg/100g در روز ۹ نگهداری رســـید. بطورکلی ا ستفاده از ع صاره و نانوامولسیون ع صاره زر شک سبب کاهش معنی‌دار افزایش این پارامتر شد ($p<0.05$).



	روز صفر	روز۳	روز۶	روز۹
C	3/26	8/96	31/4	53/1
T1	3/22	7/93	17/48	27/88
T2	3/17	7/65	16/27	24/04

شکل ۳- میانگین نتایج تغییرات تشکیل ترکیبات ازت فرار نمونه فیله‌های ماهی طی ۹ روز

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانوامولسیون عصاره زرشک

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<0/05$).

*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد ($p<0/05$).

نتایج بار میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پو شش‌دهی شده با نانوامولسیون عصاره زر شک در مقایسه با عصاره (جدول ۴) نشـــان داده شـــده اســـت. نتایج باکتری‌های ســـایکروتروف فیـله های ماهی نشـــان دهـنده اختلاف معـنادار در بین تیمارهای مختلف بود ($p<0.05$). در بین گروه‌های مختلف درروز اول، از نظر میزان جمعیت باکتری ســـایکروفیل در گروه‌هـای تحقیق (میـانگین Log cfu/g ۳/۱۴) اختلاف معنی‌دار وجود نداشـت ($p>0.05$). درصـورتیکه از روز ۳ تا روز ۹ روند افزایشـــی مســـتمر در جمعیت باکتری‌های مورد برر سی در تیمارهای تحقیق گزارش شد ($p<0.05$). باتوجه به نـتایج نمونه های فیله ماهی پوشـــش داده شـــده با نانوامولســـیون عصـــاره زرشـــک (تیمار T3) کمترین روند افزایش میزان باکتری‌های سرمادوست را داشتند ($p<0.05$).

نتایج باکتری‌های مزوفیل (جدول۴) نیز روند افزایشـــی را نـشان داد در روز اول اختلاف آماری معنادار (میانگین Log cfu/g ۳/۳۴) بین گروه‌های مورد بررســـی مشـــاهده نشـــد ($p>0.05$). همچنین روند افزایش معنادار در تمام گروه‌های مورد بررسی گزارش شد ($p<0.05$). مطابق نتایج استفاده از عصـــاره و نانوامولســـیون عصـــاره زرشـــک بطور معنادار روند افزایشی باکتری‌های مزوفیل را مهار کرد ($p<0.05$).

برر سی نتایج باکتری‌های انتروباکتریا سه نـ شان دهنده روند مشـابه باکتری‌های مزوفیل و سـایکروتروف (جدول ۴) بود و نتایج نشـان داد اسـتفاده از عصـاره و نانوامولسـیون عصـاره زرشـــک بطورمعناداری ســـبب کاهش آلودگی باکتری‌های انتروباکتریاسه در نمونه فیله ماهی شدند ($p<0.05$).

جدول ۴- میانگین نتایج میکروبی نمونه‌های فیله ماهی پوشش‌دهی شده با عصاره آزاد و نانوامولسیون عصاره زرشک

	تیمار	روز صفر	روز سوم	روز ششم	روز نهم
باکتری‌های سایکروتروف (Log cfu/g)	Co	۳/۱۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۳/۳۸ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۵/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Ca}	۷/۸۷ ± ۰/۰۱ ^{Da}
	T1	۳/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۳/۳۰ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۴/۲۳ ± ۰/۰۲ ^{Cb}	۵/۷۱ ± ۰/۰۱ ^{Db}
	T2	۳/۱۵ ± ۰/۰۲ ^{Aa}	۳/۲۱ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۳/۸۴ ± ۰/۰۴ ^{Cc}	۴/۶۱ ± ۰/۰۲ ^{cD}
باکتری‌های مزوفیل (Log cfu/g)	Co	۳/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۳۹ ± ۰/۰۰ ^{Ba}	۶/۲۸ ± ۰/۳۱ ^{Ca}	۹/۰۷ ± ۰/۰۴ ^{Db}
	T1	۳/۳۵ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۲۸ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۵/۳۴ ± ۰/۱۳ ^{Cb}	۷/۲۰ ± ۰/۰۸ ^{Db}
	T2	۳/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Aa}	۴/۲۱ ± ۰/۰۱ ^{Bb}	۵/۱۵ ± ۰/۱۲ ^{Cb}	۶/۳۴ ± ۰/۰۱ ^{Cc}
باکتری‌های انتروباکتریاسه (Log cfu/g)	Co	۲/۵۴ ± ۰/۰۹ ^{Aa}	۴/۱۸ ± ۰/۰۲ ^{Ba}	۴/۳۱ ± ۰/۶۱ ^{Ca}	۶/۳۵ ± ۰/۰۴ ^{b}
	T1	۲/۳۸ ± ۰/۱۳ ^{Aa}	۳/۰۶ ± ۰/۰۳ ^{Bb}	۳/۸۴ ± ۰/۲۲ ^{Cb}	۵/۸۱ ± ۰/۰۲ ^{b}
	T2	۲/۳۴ ± ۰/۰۸ ^{Aa}	۲/۵۴ ± ۰/۰۳ ^{Bb}	۲/۴۰ ± ۰/۰۷ ^{Cb}	۴/۲۳ ± ۰/۰۳ ^{b}

*Co: نمونه شاهد/ T1: نمونه پوشش‌داده شده با عصاره زرشک/ T2: نمونه پوشش‌داده شده با نانوامولسیون عصاره زرشک

*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<۰/۰۵).

*حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث

مطالعات نشان داده که عصاره میوه زرشک حاوی فیتوکمیکال‌هایی مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدی و آنتوسیانین است (Homayoonfal *et al.*, 2021). در این مطالعه طی بررسی ترکیبات فنلی (شکل ۱) عصاره میوه زرشک، سیزده ترکیب فنولی به ترتیب فراوانی شامل اسید کلروژنیک (۸/۳۱ µm/g)، اپی‌کاتچین گالات (۷/۷۲ µm/g)، کاتچین هیدرات (۶/۶۰ µm/g)، پروتوکاتکویک اسید (۴/۳۳ µm/g)، کوئرستین (۴/۱۴ µm/g)، میریستین (۳/۶۶ µm/g)، اسید p-کومار یک (۳/۴۵ µm/g)، گالیک اسید (۳/۲۰ µm/g)، کامفرول (۲/۵۸ µm/g)، اسید فولیک (۲/۲۶ µm/g)، اسید کافئیک (۱/۹۵ µm/g)، ایزورامنتین (۱/۶۳ µm/g) و ترانس اسید سینامیک (۱/۵۵ µm/g) شناسایی شد. Bhardwaj و هم کاران (۲۰۲۳) طی بررسی ترکیبات عصاره زرشک در مجموع ۳۳ ترکیب شناسایی کردند. همچنین آنها گزارش کردند در میان اجزای شنا سایی شده پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها (آگلیکون‌ها و گلوکوزیدها)، مشتقات اسیدهای بنزوئیک و سینامیک بالاترین غلظت را داشتند. همچنین وجود ا سیدهای فنولیک ساده مانند گالیک ا سید، اسید وانیلیک، اسیدهای کلروژنیک، اسید هیدروکسی بنزوئیک، ا سید فرولیک یا کافئیک ا سیید در عصاره زر شک گزارش شد. El-Zahar و همکاران (۲۰۲۲) طی بررسی ترکیبات عصاره زرشک اسید گالیک، بربرین، اسید کلروژنیک، ا سید وانیلیک، ا سید کافئیک، ا سید سیرینجیک،

روتین، اسید p-کوماریک، کاتچین، میریستین و کامفرول در غلظت‌های بالا یافت شد. تفاوت در ترکیبات شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات انجام شده تأثیر شرایط جغرافیایی را تأیید می‌کند. مطالعات نشان داده است که نوع، میزان ترکیبات و مواد مؤثره موجود در اسانس و عصاره گیاهان تابع موقعیت جغرافیایی، تغییرات فصلی، فاز رویشی یا زایشی گیاه است (Al-Askar *et al.*, 2023).

اندازه ذرات بر حسب نانومتر، مقدار آن‌ها بر حسب درصد همچنین پیک منتخب نانومولسیون در شکل ۲ ارائه شده‌اند. مقدار شاخص چند پراکندگی (PDI)[1] برابر با ۰/۳۴۵ گزارش شد. PDI نشان دهنده همگنی اندازه قطرات در نانو امولسیون است. مقدار پراکندگی بالاتر، نشان دهنده یکنواختی کمتر اندازه قطرات نانومولسیون است (Parseghian *et al.*, 2023). در این مطالعه میزان PDI نانومولسیون بدست آمده مقدار پایینی داشت که نشان دهنده پایداری کلی و همگنی خوب آن می‌باشد. ریز بودن اندازه قطرات و ویژگی‌های منحصر به فرد نانومولسیون‌ها مزیت‌هایی برای استفاده از آن‌ها را در بسیاری از فناوری‌های کاربردی ایجاد نموده و منجر به طولانی‌تر شدن دوره پایداری فیزیکی آن‌ها گردیده است. به واسطه ریز بودن قطرات، سطح ویژه نانومولسیون ها زیاد شده ، قابلیت نفوذ آنها افزایش می یابد و این ویژگی آن ها را به یک سامانه انتقالی مؤثر تبدیل کرده است (Parseghian *et al.*, 2023). Afroozandeh و همکاران (۲۰۲۴) طی بررسی توزیع اندازه ذارت دو گونه بربرین (ترکیب آلکالوئیدی عصاره زرشک) کنژوگه با پلی‌اتیلن گلیکول و دی اتیلن گلیکول مونو متیل اتر نشان دادند توزیع اندازه ذرات به ترتیب برابر با ۲۹/۱ نانومتر (PDI =۰/۲۱۵) و ۹۵/۵ نانومتر (=۰/۱۰۸ PDI) بود. این محققان همگن با پایداری و پراکندگی مناسب نانومولسیون‌ها را تأیید کردند.

گیاهان منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. در میان ترکیبات زیست فعال موجود در گیاهان، فنل‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند زیرا تمام گروه‌های پلی فنل (فنولیک، فلاونوئید و پرو-آنتوسیانیدین) ظرفیت ساختاری از بین بردن رادیکال های آزاد را دارند (Omar *et al.*, 2023). جدول ۳ محتوی ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانومولسیون عصاره زرشک در مقایسه با عصاره را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج اختلاف آماری معنی داری بین محتوی فنولی عصاره (۴۳/۲۶ mg/g) و نانومولسیون (۹/۱۹ mg/g) گزارش شد ($P<0.05$). همچنین تست‌های ABTS و DPPH روش‌های گسترده‌ای برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصولات طبیعی هستند. هر دو روش اسپکتروفتومتری مبتنی بر مهار رادیکال‌های رنگی پایدار (ABTS یا DPPH) هستند و توانایی مهار آنتی‌اکسیدان‌ها را حتی در صورت وجود در مخلوط‌های بیولوژیکی پیچیده مانند عصاره‌های گیاهی یا غذایی نشان می‌دهند. اصل این آزمایش‌ها این است که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند اتم‌ها یا الکترون‌های هیدروژن را به رادیکال‌ها اهدا کنند و آن‌ها را به شکل پایدار خود کاهش دهند. درجه کاهش رادیکال با کاهش جذب در یک طول موج خاص اندازه‌گیری می‌شود (Omar *et al.*, 2023). خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک به ترتیب ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۴ همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش ATBS به ترتیب ۰/۰۲ mg/g و ۲/۱۰ تعیین شد. نتایج بدست آمده قابل انتظار بود زیرا محتوی ترکیبات فنلی در عصاره بالاتر بود،

[1] polydispersity index

افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانائی نمو نه های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش می‌دهد. کمتر بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نانوامولسیون عصاره زرشک به دلیل عاری بودن فاز بیرونی نانو امولسیون‌از هرگونه ترکیبات فنولیک می‌باشد. افزایش غلظت ترکیبات فنولی بطور مستقیم میزان توانائی نمونه‌های مختلف را در مهار رادیکال های آزاد افزایش می‌دهد. در واقع خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها به رهایش مواد فرار از فاز درونی به فاز بیرونی مربوط می‌گردد (El-Sayed and El-Sayed, 2021).

بر اساس نتایج جدول ۲ عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک فعالیت ضد میکروبی بر روی هر دو باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنوسیتوژنز) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) نشان دادند. نتایج نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به هر دو فرم عصاره و نانوامولسیون عصاره حساسیت بالاتری داشتند. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین پاتوژن‌ها نسبت به عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* بود. تفاوت بین دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است. باکتری‌های گرم مثبت فقط یک لایه پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی خود دارند. در مقابل، علاوه بر این لایه پپتیدوگلیکان داخلی، باکتری‌های گرم منفی دارای یک لایه خارجی متشکل از لیپوپروتئین، فسفوپروتئین و پروتئین نیز هستند که باعث کاهش نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها و اثر مواد ضد میکروبی نظیرعصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی می شود (Mollaei *et al.*, 2010). همچنین، به دلیل وجود گروه‌های شیمیایی مختلف، اثر ضد میکروبی یک عصاره را نمی‌توان به یک مکانیسم مشخص نسبت داد. مطالعات نشان داده که ترکیبات فنلی که به وفور در عصاره وجود دارند، از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر در انتشار سلول میکروبی، تداخل با عوامل غشایی (مانند انتقال الکترون و از دست دادن مواد مغذی)، تداخل در سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک و فعالیت آنزیمی، برهمکنش بر روی پروتئین‌های غشایی و جایگزینی آلکیل با هسته فنلی در امر ضد میکروبی نقش دارند (Lima *et al.*, 2019). همچنین برای اعمال خاصیت MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد کمتر فرم نانو امولسیون عصاره زرشک در مقایسه با فرم عصاره مشاهده شد که نشان دهنده قوی‌تر بودن خاصیت ضدمیکروبی نانو عصاره زرشک است. که این امر به دلیل اندازه ذرات با ابعاد نانو است که می‌توانند به دیواره سلولی باکتری نفوذ کنند، غشای سلولی را از بین ببرند و فعالیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به ذرات بزرگتر نشان دهند (Amiri *et al.*, 2023). El-Zahar و همکاران (۲۰۲۲) فعالیت ضدمیکروبی عصاره زرشک را بر روی هر دو باکتری‌های گرم مثبت *(استافیلوکوکوس اورئوس)* و گرم منفی *(اشریشیاکلی)* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱/۷۵ cm و ۲/۳ نشان دادند.

به منظور بررسی عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به عنوان نگهدارنده طبیعی، عصاره و نانوامولسیون بر روی فیله‌های پوشش‌دهی شده و پایداری اکسیداتیو و میکروبی فیله‌ها طی ۹ روز نگهداری بررسی شد. اکسیداسیون لیپید (بررسی تیوباربیتوریک اسید) یک معیار کیفی مهم در محصولات گوشتی است. اکسیداسیون لیپید در طول فرآیند و ذخیره سازی باعث تغییرات نامطلوب در رنگ، طعم، عطر و بافت و همچنین از دست دادن ارزش غذایی می‌شود (Mezhoudi *et al.*, 2019). مطابق با نتایج تیوباربیتوریک اسید نشان داده شده در جدول ۳، در روز اول اختلاف آماری معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. با این حال از

روز سوم اختلاف آماری معنادار بین تیمارهای پوشش‌دهی شده با نمونه شاهد مشاهده شد. علاوه بر این، طی ۹ روز نگهداری روند افزایشی معنادار اکسیداسیون لیپید در همه گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد. بطوریکه محتوی تیوباربیتوریک اسید با میانگین ۰/۱۱ mg MAL/kg از روز اول باروند افزایشی شاخص تیوباربیتوریک اسید به mg MAL/kg ۰/۸۷، ۰/۷۱ و ۰/۶۰ (به ترتیب در تیمارهای Co، T1 و T2) رسید. با این حال، نمونه‌های پوشش‌دهی شده با عصاره زرشک عدد تیوباربیتوریک اسید با کمتری نسبت به نمونه شاهد داشتند. سطح قابل قبول تیوباربیتوریک اسید ۰/۴۵ mg MAD/Kg گزارش شده است (Maghami *et al.*, 2019). بر این اساس، نمونه‌های پوشش‌دهی شده با عصاره و نانوامولسیون عصاره طی شش روز سطح قابل قبولی از تیوباربیتوریک اسید را نشان دادند. فرآورده‌های اولیه اکسیداسیون چربی‌ها، هیدروپروکسیدها هستند که ترکیباتی ناپایدارند و نقشی در طعم نامطلوب ماهی ندارند؛ اما در مرحله دوم اتواکسیداسیون، که هیدروپراکسیدها به آلدهید و کتون اکسیده می‌شوند، مالون دی آلدهید تشکیل می‌شود که طعم و بوی نامطلوب در محصول ایجاد می‌کند (Idumah *et al.*, 2020). حملات اکسیژن علیه پیوند دوگانه در اسیدهای چرب غیر اشباع مانند دوکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید می‌تواند باعث شروع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد در اکسیداسیون لیپید شود. روند افزایشی کندتر شاخص تیوباربیتوریک اسید فیله‌های پوشش‌دهی شده با عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک در مقایسه با تیمار شاهد ممکن است مرتبط با ویژگی‌های شناخته شده و مستند شده عالی ممانعت از تبادل اکسیژن پوشش‌ها باشد (Nguyen *et al.*, 2021). همچنین، اعتقاد بر این است که مقدار شاخص تیوباربیتوریک اسید پایین در نمونه‌های پوشش‌دهی شده با عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک به دلیل محتوای فنلی موجود در عصاره زرشک باشد. مطالعات نشان داده که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند پراکسیداسیون لیپیدی را با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، قطع واکنش‌های زنجیره‌ای، شکستن پراکسیدها، کاهش غلظت موضعی اکسیژن و اتصال به کاتالیزورهای آغازگر زنجیره مانند یون‌های فلزی کاهش دهند (Topcu and Gamze, 2024). همراستا با نتایج بدست آمده Jaberi و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند استفاده از عصاره زرشک در فرمولاسیون فرانکفورت مرغ سبب کاهش معنادار شاخص تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها شده بود.

اکسیداسیون پروتئین مسیری مشابه اکسیداسیون لیپید را دنبال می‌کند که یک واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را از طریق انتزاع یک اتم هیدروژن از یک پروتئین، عمدتاً از گروه‌های عاملی به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه ایجاد می‌کند. بسته به اسید آمینه اکسید شده، باقیمانده‌های کربونیل، پیوند متقابل و باقی‌مانده‌های حاوی گوگرد می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب بر روی اسید آمینه، رنگ و بافت فرآورده‌های گوشتی شود (Mozaffarzogh., 2020). به این ترتیب، افزایش محتوای کربونیل به طور طبیعی در طول نگهداری گونه‌های ماهی در یخچال اتفاق می‌افتد که با نتایج بدست آمده در این مطالعه منطبق است. تفاوت بین تیمارها ممکن است با همان دلایلی که برای اکسیداسیون لیپید ذکر شد در ارتباط با این واقعیت توضیح داده شود که اکسیداسیون پروتئین و لیپید واکنش همزمان هستند. مالون دی آلدئید از اکسیداسیون لیپید می‌تواند به باقی‌مانده‌های اسید آمینه به میوگلوبین و به برخی از مکان‌ها به پروتئین های میوفیبریلار متصل شود و آن را در برابر اکسیدا سیون پروتئین حساس‌تر کند. از طرف دیگر، اکسیداسیون پروتئین، مقادیر زیادی آهن غیر متصل آزاد می‌کند که عامل‌های

پرواکسیدانی برای اکسیداسیون لیپید هستند (Monteiro *et al.*, 2019).

نیتروژن کل فرار به طور گسترده برای تعیین کیفیت غذاهای دریایی استفاده می‌شود زیرا ارتباط مستقیمی با رشد میکروارگانیسم‌ها و تشکیل ترکیبات اساسی ناشی از متابولیسم آنها مانند آمونیاک، تری متیل آمین، دی اتیل آمین و متیل آمین دارد (Maghami *et al.*, 2019). مطابق شکل ۳، میزان تشکیل ترکیب نیتروژن فرار فیله‌های ماهی در تمام گروه‌های مورد بررسی با افزایش مدت زمان نگهداری افزایش معنادار یافت. در روز اول اختلاف آماری معنی‌دار بین میزان ترکیب نیتروژن فرار تیمارها گزارش نشد و مقدار آن در تمامی گروه‌های مورد بررسی تقریباً برابر با ۳/۲۳ mg/100g بود. افزایش تشکیل ترکیب نیتروژن فرار در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. استفاده از عصاره تأثیر مثبت بر روند جلوگیری از افزایش تشکیل ترکیب نیتروژن فرار تیمارها داشت و به ترتیب میزان ترکیب نیتروژن فرار در روز ۹ نگهداری در تیمارهای T2 و T3 به ترتیب ۲۷/۸۸ mg/100g و ۲۴/۰۴ بود. همانطور که در دستور اجرایی کنترل و نظارت بهداشتی بر فرآورده‌های خام دامی سازمان دامپزشکی ایران و همچنین انجمن بین المللی تولیدکنندگان پودر و روغن ماهی (IFOMA) مشخص شده است، اندازه‌گیری احتمالی تشکیل ترکیب نیتروژن فرار برای ماهی تازه و منجمد ۲۰ mg/100g است و محدوده قابل استفاده بین ۲۱ mg/100g تا ۲۵ و مجموع غیر قابل استفاده آن بیش از ۲۵ mg/100g است (Azari *et al.*, 2022). بر این اساس استفاده از عصاره تا ۶ روز و نانوامولسیون عصاره زرشک تا ۹ روز سطح تشکیل ترکیبات نیتروزن فرار فیله‌های ماهی را در سطح قابل قبول نگهداشتند. از آنجاییکه تشکیل ترکیب نیتروژن فرار عمدتاً با تجزیه باکتریایی گوشت ماهی تولید می‌شود، مقادیر بالاتر تعداد کل باکتری‌ها در نمونه شاهد نشان‌دهنده فساد بالاتر است. مقادیر پایین‌تر تشکیل ترکیب نیتروژن فرار نمونه‌های پوشش دهی شده با عصاره و نانو امولسیون عصاره زرشک، می‌تواند به کاهش سریع‌تر جمعیت باکتریایی یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای دِآمیناسیون اکسیداتیو ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی یا هر دو نسبت داده شود (Ibrahim *et al.*, 2024). Sayadi و همکاران (۲۰۲۱)، نشان دادند استفاده از عصاره زرشک سبب کاهش تشکیل ترکیب نیتروژن فرار در گوشت بوقلمون طی نگهداری در یخچال شد.

بر اساس نتایج به دست آمده (در جدول ۴) بین گروه‌های مختلف درروز اول، از نظر میزان جمعیت باکتری سایکروفیل، مزوفیل و انتروباکتریاسه در گروه‌های تحقیق (به ترتیب Log CFU/g ۳/۱۴، ۳/۳۴ و ۲/۴۲) اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. درصورتیکه از روز ۳ تا روز ۹ روند افزایشی مستمر در جمعیت تمام باکتری های مورد بررسی در تیمارهای تحقیق گزارش شد. باکتری‌های سرمادوست، گرم منفی و گروه اصلی میکروارگانیسم‌های مسئول فساد ماهی تازه نگهداری شده به صورت سرد هستند و محدوده فساد باکتری‌های سرمادوست در فرآورده‌هایی همچون فیله ماهی بین Log CFU /g ۶ تا ۷ است (Erkan *et al.*, 2006). باتوجه به نتایج استفاده از عصاره و نانوامولسیون عصاره زرشک جمعیت باکتری‌های سرمادوست، فیله‌های ماهی طی ۹ روز و تا انتهای زمان نگهداری را در حد مجاز نگهداشت. افزایش باکتری‌های سرمادوست در بسته‌بندی معمولی نشانگر وجود اکسیژن کافی برای رشد این گونه از باکتری‌ها می‌باشد. کاهش سرعت رشد این باکتری‌ها در پوشش‌های عصاره زرشک به ممانعت‌کنندگی اکسیژن این فیلم‌ها (Indumathi *et al.*, 2019) و همچنین به ترکیبات آنتی باکتریالی عصاره زرشک نسبت داده شده است

(Sayadi *et al.*, 2021). باکتری‌های انتروباکتریاسه نیز به عنوان یک شاخص بهداشتی و همچنین بخشی از میکروفلور ماهی تازه می‌باشند. نتایج جدول ۴، تأثیر خاصیت ضدمیکروبی عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک بر انتروباکتریاسه ها را نشان داد. همچنین در بررسی باکتری‌های مزوفیل در روز ۹ میزان این باکتری‌ها درنمونه شاهد بیشتر از ۷ Log CFU /g بودند که بیشتر از حداکثر محدوده توصیه شده در ماهی خام است. نتایج کاهش شمارش باکتری‌ها و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری در نمونه‌های تیمار شده با عصاره‌ها، تأیید تأثیر معنی‌دار عصاره گیاهی به کار برده شده به عنوان ترکیب ضد باکتریایی می‌باشد (Perricone *et al.*, 2015). Sayadi و همکاران (۲۰۲۱)، نیز گزارش کردند استفاده از عصاره زرشک سبب کاهش بار میکروبی گوشت بوقلمون در یخچال شد. این محققان علت این امر را به حضور ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی موجود در عصاره زرشک گزارش کردند.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی نانومولسیون عصاره زرشک پرداخته شد. در مجموع سیزده ترکیب فنولی عصاره زرشک با HPLC شناسایی شد. نانو امولسیون‌ها PDI برابر ۰/۳۴۵ داشتند که نشان دهنده همگنی و پایداری خوب نانومولسیون‌های عصاره زرشک بود. همچنین نتایج پتانسیل اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره و نانومولسیون زرشک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریامنوسیتوژنز) و باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*) را تأیید کرد. همچنین افزایش پایداری اکسیداتیو (اکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین)، کاهش تشکیل ترکیبات نیتروژن فرار و نیز کاهش بار میکروبی فیله‌های ماهی دریای خزر پو شش‌دهی شده با عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک نشان داده شد. نتایج این مطالعه تأیید کرد عصاره و نانومولسیون عصاره زرشک می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی استفاده کرد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع برای اعلام ندارند.

منابع

Afroozandeh, Z., Rashidi Ranjbar, P., Khoobi, M., Forootanfar, H., Ameri, A., & Foroumadi, A. (2024). New Berberine Conjugates with Self-Assembly and Improved Antioxidant/Neuroprotection Properties: Effect of the Anchored Part on CMC, Shape and Size of the Nanomicelles. *Journal of Cluster Science*, 1-11.

Al-Askar, A. A., Bashir, S., Mohamed, A. E., Sharaf, O. A., Nabil, R., Su, Y., ... & Behiry, S. I. (2023). Antimicrobial efficacy and HPLC analysis of polyphenolic compounds in a whole-plant extract of Eryngium campestre. *Separations*, *10*(6), 362.

Ali, A., Wu, H., Ponnampalam, E. N., Cottrell, J. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2021). Comprehensive profiling of most widely used spices for their phenolic compounds through LC-ESI-QTOF-MS2 and their antioxidant potential. *Antioxidants*, *10*(5), 721.

Amiri, E., Aminzare, M., Azar, H. H., & Mehrasbi, M. R. (2019). Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of Zataria multiflora essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. *Meat Science*, *153*, 66-74.

Ananingsih, V. K., Pratiwi, A. R., Soedarini, B., & Putra, Y. A. S. (2024). Formulation of nanoemulsion parijoto fruit extract (Medinilla Speciosa) with variation of tweens stabilizers. *Frontiers in Nutrition*, *11*, 1398809.

Ansarifar, E., & Moradinezhad, F. (2022). Encapsulation of thyme essential oil using electrospun zein fiber for strawberry preservation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *9*, 1-11.

Azari, A., Ahari, H., & Anvar, A. A. (2022). Increased shelf life of Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) through Cu-Clay nanocomposites. *Food Science and Biotechnology*, *31*(3), 295-309.

Bhardwaj, D., & Kaushik, N. (2023). HPLC–DAD fingerprinting coupled with chemometric analysis can successfully differentiate Indian Berberis species and its plant parts. *3 Biotech*, *13*(7), 254.

Cedillo-Olivos, A. E., Juárez-Chairez, M. F., Cid-Gallegos, M. S., Sánchez-Chino, X., & Jiménez-Martínez, C. (2024). Natural preservatives used in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.

da Silva, B. D., do Rosário, D. K. A., Neto, L. T., Lelis, C. A., & Conte-Junior, C. A. (2023). Antioxidant, antibacterial and antibiofilm activity of nanoemulsion-based natural compound delivery systems compared with non-nanoemulsified versions. *Foods*, *12*(9), 1901.

Dong, H., Xu, Y., Zhang, Q., Li, H., & Chen, L. (2024). Activity and safety evaluation of natural preservatives. *Food Research International*, 114548.

Efendi, R., Harahap, N. A., Ayu, D. F., Saputra, E., & Nopiani, Y. (2023, September). The shelf life of smoked catfish coated with edible coating chitosan with an addition horticultural product (red

ginger and red galangal) essential oil using the acceleration method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1241, No. 1, p. 012084). IOP Publishing.

El Hamdaoui, A., Msanda, F., Boubaker, H., Leach, D., Bombarda, I., Vanloot, P., ... & El Mousadik, A. (2018). Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activities of wild and cultivated Lavandula mairei Humbert. *Biochemical Systematics and Ecology*, *76*, 1-7.

El-Sayed, S. M., & El-Sayed, H. S. (2021). Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (Thymus vulgaris) essential oil for UF labneh preservation. *Journal of Materials Research and Technology*, *10*, 1029-1041.

Erkan, N., Özden, Ö., Alakavuk, D. Ü., Yildirim, Ş. Y., & İnuğur, M. (2006). Spoilage and shelf life of sardines (Sardina pilchardus) packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, *222*, 667-673.

Fallah, A. A., Sarmast, E., Dehkordi, S. H., Isvand, A., Dini, H., Jafari, T., ... & Khaneghah, A. M. (2022). Low-dose gamma irradiation and pectin biodegradable nanocomposite coating containing curcumin nanoparticles and ajowan (Carum copticum) essential oil nanoemulsion for storage of chilled lamb loins. *Meat Science*, *184*, 108700.

Ganesan, A. R., & Shanmugam, M. (2020). Isolation of phycoerythrin from Kappaphycus alvarezii: a potential natural colourant in ice cream. *Journal of Applied Phycology*, *32*, 4221-4233.

Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2023). Nanoemulsion of Satureja sahendica bornm essential oil: Antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(1), 317-323.

Homayoonfal, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2021). Encapsulation of berberis vulgaris anthocyanins into nanoliposome composed of rapeseed lecithin: A comprehensive study on physicochemical characteristics and biocompatibility. *Foods*, *10*(3), 492.

Hedayatifard, M., Alinezhad, M. A., & Hashemi Karouei, M. (2017). Individual and combined effects of nisin-Z and sodium citrate on the chemical attributes and lactic acid, mesophyll and psychrophill bacteria communities of Caspian Kutum fillets (Rutilus frisii kutum) Stored at 4 ºC. *Aquatic Animals Nutrition*, *3*(2), 19-34.

Huss, H. H. (2007). *Assessment and management of seafood safety and quality* (No. 444). Daya Books.

Ibrahim, S. Y., Abd El-kader, S. A., Gomaa, W. M., Arab, W. S., & Elsabagh, R. (2024). Assessment of the potential impacts of garlic and/or sage essential oils on quality enhancement of chilled tilapia fish kofta. *Journal of Advanced Veterinary Research*, *14*(2), 282-285.

Idumah, C. I., Zurina, M., Ogbu, J., Ndem, J. U., & Igba, E. C. (2020). A review on innovations in polymeric nanocomposite packaging materials and electrical sensors

for food and agriculture. *Composite Interfaces*.

Indumathi, M. P., Sarojini, K. S., & Rajarajeswari, G. R. (2019). Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits. *International journal of biological macromolecules*, *132*, 1112-1120.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. (2024). Microbiology of food and animal feed - Enumeration of psychrophilic microorganisms - Test method. ISIRI no 2690. 1st.edition, Karaj: ISIRI; [in Persian]. Available from: https://standard.inso.gov.ir

Institute of Standards and Industrial Research of Iran [Internet]. (2015). Microbiology of the food chain —Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. ISIRI no 5272-2. 1st.edition, Karaj: ISIRI; [in Persian]. Available from: https://standard.inso.gov.ir

Jaberi, R., Kaban, G., & Kaya, M. (2020). The effect of barberry (Berberis vulgaris L.) extract on the physicochemical properties, sensory characteristics, and volatile compounds of chicken frankfurters. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(7), e14501.

Jawed Khan, M., Hafeez, A., & Aftab Siddiqui, M. (2023). Nanocarrier based delivery of berberine: a critical review on pharmaceutical and preclinical characteristics of the bioactive. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *24*(11), 1449-1464.

Khanzadi, S., Keykhosravy, K., Hashemi, M., & Azizzadeh, M. (2020). Alginate coarse/nanoemulsions containing Zataria multiflora Boiss essential oil as edible coatings and the impact on microbial quality of trout fillet. *Aquaculture Research*, *51*(3), 873-881.

Lima, M. D. C., De Sousa, C. P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., & De Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, *130*, 259-270.

Maghami, M., Motalebi, A. A., & Anvar, S. A. A. (2019). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (Foeniculum vulgare) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. *Food science & nutrition*, *7*(9), 3030-3041.

Mezhoudi, M., Salem, A., Abdelhedi, O., Fakhfakh, N., Mabrouk, M., Khorchani, T., ... & Zouari, N. (2022). Development of active edible coatings based on fish gelatin enriched with Moringa oleifera extract: Application in fish (Mustelus mustelus) fillet preservation. *Food Science & Nutrition*, *10*(11), 3979-3992.

Mehrabi, E., Bonyadian, M., & Fallah, A. A. (2024). Investigating the Effect of Chitosan Coating Along with Ginger Essential oil on Shelf life of Salmon Fish in Refrigerator Temperature. *Iranian*

Food Science and Technology Research Journal, *20*(4), 447-463.

Maghami, M., Motalebi, A. A., & Anvar, S. A. A. (2019). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (Foeniculum vulgare) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. *Food science & nutrition*, *7*(9), 3030-3041.

Monteiro, M. L., Mársico, E. T., Rosenthal, A., & Conte-Junior, C. A. (2019). Synergistic effect of ultraviolet radiation and high hydrostatic pressure on texture, color, and oxidative stability of refrigerated tilapia fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(9), 4474-4481.

Monteiro, M. L. G., Mársico, E. T., & Conte-Junior, C. A. (2020). Application of active packaging in refrigerated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets treated with UV-C radiation. *Applied Sciences*, *10*(17), 5787.

Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., & Kamkar, A. (2020). Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. *Lwt*, *126*, 109305.

Mutlu, N. (2023). Effects of grape seed oil nanoemulsion on physicochemical and antibacterial properties of gelatin-sodium alginate film blends. *International Journal of Biological Macromolecules*, *237*, 124207.

Nguyen, H. L., Tran, T. H., Hao, L. T., Jeon, H., Koo, J. M., Shin, G., ... & Oh, D. X. (2021). Biorenewable, transparent, and oxygen/moisture barrier nanocellulose/nanochitin-based coating on polypropylene for food packaging applications. *Carbohydrate polymers*, *271*, 118421.

Och, A., Olech, M., Bąk, K., Kanak, S., Cwener, A., Cieśla, M., & Nowak, R. (2023). Evaluation of the antioxidant and anti-lipoxygenase activity of Berberis vulgaris L. leaves, fruits, and stem and their LC MS/MS polyphenolic profile. *Antioxidants*, *12*(7), 1467.

Omar, A. A. A. H., Gad, M. F., Abdelhafez, H. M., Ebrahem Mersal, A. T., & Mossa, A. T. H. (2023). Phytochemical Study, Antioxidant Potential and Preparation of a Clove Nanoemulsion Loaded with Pomegranate Peel Extract. *Egyptian Journal of Chemistry*, *66*(13), 21-37.

Pandey, V. K., Srivastava, S., Dash, K. K., Singh, R., Dar, A. H., Singh, T., ... & Kovacs, B. (2024). Bioactive properties of clove (Syzygium aromaticum) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon*.

Parseghian, L., Kahrarian, N., Arabanian, A. S., Alvand, Z. M., Massudi, R., Rahimi, M., & Rafati, H. (2024). Berberine-loaded nanoemulsions as a natural food preservative; the impact of femtosecond laser irradiation on the antibacterial activity. *Heliyon*, *10*(17).

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology*, *6*, 76.

Rezaei Savadkouhi, N., Ariaii, P., & Charmchian Langerodi, M. (2020). The effect of encapsulated plant extract of hyssop (Hyssopus officinalis L.) in biopolymer nanoemulsions of Lepidium perfoliatum and Orchis mascula on controlling oxidative stability of soybean oil. *Food Science & Nutrition*, *8*(2), 1264-1271.

Sayadi, M., Langroodi, A. M., & Pourmohammadi, K. (2021). Combined effects of chitosan coating incorporated with Berberis vulgaris extract and Mentha pulegium essential oil and MAP in the shelf life of turkey meat. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*, 5159-5169.

Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Ramezani, F., Dawood, M. A., Van Doan, H., Moonmanee, T., ... & Kari, Z. A. (2022). Effect of dietary barberry fruit (Berberis vulgaris) extract on immune function, antioxidant capacity, antibacterial activity, and stress-related gene expression of Siberian sturgeon (Acipenser baerii). *Aquaculture Reports*, *23*, 101041.

Soutelino, M. E. M., de Paiva Vieira, G., Goulart, M. B., Miranda, K. C., da Conceição, R. P., Pimentel, T. C., ... & da Silva Rocha, R. (2024). Natural food dyes on dairy products: A critical approach between 2012-2023 literature regarding the technological and functional aspects, health benefits and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 104370.

Suleria, H. A., Barrow, C. J., & Dunshea, F. R. (2020). Screening and characterization of phenolic compounds and their antioxidant capacity in different fruit peels. *Foods*, *9*(9), 1206.

Tacer-Tanas, S., Oguzhan-Yildiz, P., & Arslan, M. (2024). How fillet quality changes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed diets supplemented with barberry (Berberis vulgaris) fruit extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106986.

Taouzinet, L., Djaoudene, O., Fatmi, S., Bouiche, C., Amrane-Abider, M., Bougherra, H., ... & Madani, K. (2023). Trends of nanoencapsulation strategy for natural compounds in the food industry. *Processes*, *11*(5), 1459.

Topcu, K. C., & Gamze, U. G. U. R. (2024). Effect of Berberis vulgaris L. Extract on Beef Patties Quality Parameters. 10:1-16.

Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of barberry *(Berberis vulgaris)* extract Nano emulsion as a natural preservative in a food model

Behrouz Dast Peyman, Amir Shakerian[2], Zohreh Mashak[3*], Ebrahim Rahimi[1] and Reza Sharafati Chaleshtori[4]

[1] *Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
[2] *Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.*
[4]*Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Disease, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran*

Corresponding Author: Mashak@Kiau.ac.ir

Abstract

Recently, consumer preference has been more toward foods preserved with natural plant preservatives (such as extracts and essential oils). In this study, the potential of antioxidant and antibacterial activity of barberry extract nano emulsions was evaluated. A total of thirteen phenolic compounds were identified in the extract. The antioxidant properties of barberry extract and nano emulsion by DPPH and ATBS methods were 0.02-2.14 mg/g and 0.02 -2.10 mg/g, respectively. Also, the antibacterial properties on gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) were confirmed. The most resistant and sensitive pathogens to barberry extract and it nano emulsion were *Staphylococcus* aureus and *Salmonella enteritidis*, respectively. In the following, the oxidative (lipid and protein oxidation) and antibacterial potential of Nano emulsions was evaluated on Caspian Sea fish fillets as a perishable food model. The results showed increased oxidative stability, lower formation of volatile nitrogen compounds, and reduced microbial load of coated fish fillet. Thus, the barberry extract Nano emulsion was able to maintain the quality of fish fillets in the refrigerator for 6 days. In summary, it can be said that the barberry extract Nano emulsion as a natural preservative is recommended to increase the shelf life and maintain the quality of food.

Key words: Nano emulsion, Food Shelf Life, Natural Preservatives, *Berberis vulgaris*, *Rutilus frisii*

بررسی فراوانی آلودگی به *توکسوپلاسما* در گوسفندان استان البرز به روش نستد پی سی آر

سید رضا حسینی [۱*]؛ میلاد حمزه علی طهرانی [۲] ؛ نادیا طایفی نصر آبادی [۳]

۱- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- دانش آموخته رشته دکتری تخصصی انگل شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
*نویسنده مسئول:.dr.s.reza@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه با توجه به مصـــرف روز افزون گوشـــت گوســـفند و محبوبیت گوشـــت این حیوان و همچنین زئونوز بودن بیماری توکسوپلاسموزیس میان انسان و حیوانات و همچنین خسارات مالی که این انگل به دامداران وارد می نماید باید مورد توجه قرار گیرد. هدف ما در این تحقیق بررسی ارزیابی ردیابی *توکسوپلاسما* به روش پی سی آر نستد در خون گوسفند در استان کرج بوده است.

در این تحقیق بعد از جمع آوری نمونه های آزمایش و ثبت مشـخصـات و اطلاعات هر نمونه به کمک روش نسـتد پی سـی آر به بررسی حضور انگل *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان استان کرج پرداخته شد.

سـپس تمامی داده های به دسـت آمده به کمک نرم افزار SPSS آنالیز گردید. نتایج به دسـت آمده نشـان می دهد که ۹ نمونه) ۱۱,۱٪(از نمونه های آزمایش شده) ۸۱ نمونه(دارای سطح آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* می باشند، همچنین رابطه معنی داری میان سن و جنسیت دام با آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده شده است.

نتایج به دست آمده در این گزارش، ضرورت بررسی ایمنی انگلی در ایران را نشان می دهد، زیرا با توجه به این موضوع که بیشتر دام های ایران به شکل سنتی پرورش داده می شود و مراقبت های پیشگیرانه به منظور آلودگی انگلی کمتر انجام می شود یک خطر بالقوه برای سلامتی حیوانات و مصرف کنندگان گوشت آن ها باشد.

کلمات کلیدی: گوسفند، *توکسوپلاسما گوندی*، پی سی آر، زئونوز.

مقدمه

توکسوپلاسموزیس یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز است که توسط انگل *توکسوپلاسما گوندی* ایجاد می شود .این انگل به عنوان یک انگل در حیوانات خانگی و وحشی یافت می شود .گوسفندها از مهمترین میزبانان این انگل هستند و می توانند برای انتقال آن به انسان نقش مهمی داشته باشند.

نیکول و مانسو (۱۹۴۲)یک تک یاخته را در بافت های یک جونده همستر مانند به نام *تنوداکتیلوس گوندی* یافتند که برای تحقیقات لیشمانیوز مورد استفاده قرار می گرفت. نیکول ابتدا معتقد بود که این انگل یک پیروپلاسم است، سپس لیشمانیا، اما به زودی متوجه شد که ارگانیسم جدیدی را کشف کرده و آن را *توکسوپلاسما گوندی* نامید، این نام گذاری بر اساس مورفولوژی و میزبان انجام شده بود (Dubey JP et al,2002و Dubey JP et al,2008).

در ۳۴ سال بعد از اکتشاف، ارگانیسمهای مشابه *توکسوپلاسما گوندی* در چندین میزبان دیگر، به ویژه گونه های پرندگان یافت شد (۹) اما *توکسوپلاسما گوندی* زنده برای اولین بار توسط سابین و اولیتسکی(۱۹۳۱)جدا شد و ثابت شد که با سویه انسانی یکسان است (Dubey JP,2016و Dubey JP, Bealty CP,2010).

چرخه بیولوژیکی (مسیرهای انتقال)

اثبات شده است که *توکسوپلاسما گوندی* میزبان هایی از جمله پستانداران و پرندگان خشکی و آبزی را آلوده می کند. این حیوانات به عنوان میزبان های واسط در نظر گرفته می شوند زیرا فقط مراحل غیرجنسی در آنها رخ می دهد. مراحل جنسی فقط در اعضای خانواده فلیدا[1] از جمله گربه خانگی دیده می شود.

برای تشخیص این بیماری در گوسفندان، نمونه برداری از بافت عضلانی و آزمایشات میکرو سکوپی معمولاً استفاده می شود .در انسان، تشخیص *توکسوپلاسما گوندی* معمولاً با استفاده از آزمایشات خون و سرم انجام می شود.

درمان *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان عموماً شامل استفاده از داروهای ضد انگلی مانند سولفادیازین و پیرامتامین است .همچنین، برای کنترل انتقال بیماری به انسان، بهبود شرایط بهداشتی و فرهنگ سازی درباره راه های پیشگیری از این بیماری اهمیت دارد. به طور کلی، توکسوپلاسموزیس یک بیماری خطرناک است که می تواند بر سلامتی انسان ها و حیوانات تأثیر داشته باشد.

مواد و روش کار

به طور کلی ۳۹۶ نمونه از مناطق مختلف استان کرج اخذ گردید؛ ابتدا شهرستان کرج را به چهار قسمت)شرق ،غرب، شمال، جنوب(تقسیم شد و از هر قسمت ۹۹ نمونه خون به صورت خوشه های تصادفی و از ورید وداج اخذ شد و به آزمایشگاه موردنظر با رعایت شرایط سرمای مناسب منتقل شد. نمونه های خون جمع آوری شده سانتریفیوژ شده و متعاقباً تا زمان شروع آزمایشات نهایی در دمای ۱۴- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج DNA مورد نظر از نمونه های خون جمعآوری شده، درون میکروتیوبهای ۱ میلی لیتری ۱۴۴ میلیگرم از هر نمونه خون جمع آوری شده قرار داده شد و سپس DNA مورد نظر با استفاده از کیتهای استخراج کلون سینا (Cat No. EX6071) استخراج شد. سپس استخراج DNA بر اساس پروتکل یاد شده در کاتالوگ شرکت معرفی شده انجام گردید

در این پژوهش از پرایمرهای استفاده شده توسط سایر محققین درگذشته استفاده شده است (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱ پرایمر ژن B1 مورداستفاده در PCR RE

Primer	Sequence	bp	Ref
Forward	AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA	116	62
Reverse	TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT		

جدول 3-1 پرایمرهای مورداستفاده در Nested PCR

Marker	Primer	Forward	Reverse	Ref
ITS1	External MN1/ MN2	CCTTTGAATCCCAAGCAAA ACATGAG	GCGAGCCAAGACATCCATTG CTGA	69
Rdna	Internal Tg-NP1/ Tg-NP2	GTGATAGTATCGAAAGGT AT	ACTCTCTCTCAAATGTTCCT	

بررسی حضور *توکسوپلاسما گوندی* به کمک**PCR**

پس از استخراج DNA، از ژن با پرایمر *توکسوپلاسما گوندی* جهت تائید حضور این انگل استفاده شد. ابتدا برای حضور *توکسوپلاسما گوندی* از کیت های پی سی آر سینا کلون (Cat No. : PK3141) استفاده شد، بدین ترتیب مشخص کردن نمونه های مثبت به کمک پی سی آر به شکل زیر و بر اساس پروتکل درج شده در کاتالوگ انجام: ابتدا PCR با استفاده از پرایمرهای (جدول ۱-۳) ژن B1 ۱۱۶ جفت باز (Repetitive Element) در حجم کل Ul ۱۶ محلول انجام شد. ابتدا در پلیتهای آزمایش معرفهای PCR MIX به مقدار µl ۱۹/۲ و Taq DNA polymerase به مقدار µl ۴/۱ ریخته شد. همچنین تمام مراحل آزمایش بر روی یخ انجام شد و قبل انجام کار DNA نمونه های مورد استفاده یخ زدایی شد. سپس ۱ قطره روغن معدنی به لوله اضافه شد و درب لوله های آزمایش بسته شد. سپس µl ۶ از DNA موردنظر به لوله اضافه شد. بعد از این عملیات به کمک ورتکس محتویات لوله به مدت ۶ ثانیه مخلوط شد. سپس لوله های آزمایش به سیکل دمایی منتقل شد و بر اساس جدول ۱-۲ و به شکل زیر مراحل آزمایش انجام شد:

ابتدا دناتوراسیون اولیه به مدت ۶ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به صورت یک مرحله ای انجام شد. سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۴ ثانیه صورت گرفت و بعد از این مرحله در مرحله ی آنیلینگ لوله های آزمایش ۳۰ مرتبه در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۴ ثانیه قرار گرفتند، همچنین پس

از آن در مرحله ی گسترش نیز مواد ۳۰ بار به مدت ۳۴ ثانیه و در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس در گسترش نهایی نمونه ها یکبار به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

در نهایت برای اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده و تصویربرداری از ژل تاییدی، تمامی نمونه ها بر روی ژل آگاروز ۱٪ ران شدند. وجود قطعه ۱۱۶ جفت باز نشان دهنده مثبت بودن تست بوده است.

پی سی آر نستد این حالت از انواع PCR رو شی ا ست که برای افزایش حساسیت واکنش سنجش طراحی شده است . نستد پی سی آر یا پی سی آر تو در تو شامل استفاده از دو مجموعه آغازگر است که مکمل یک ژن هدف بوده و در دو واکنش پی در پی PCR کار میکنند. در این روش از انواع PCR اولین مجموعه آغازگرها به منظور ترمیم توالی های بالادست مجموعه دوم آغازگرها طراحی شده اند، در حالی که مجموعه دوم آغازگرها با توجه به اولین مجموعه آغازگرها به صورت داخلی تر یا تو در تو قرار دارند.

تمام نمونه های مثبت توسط پرایمر اکسترنال(MN1/ MN2) و اینترنال (Tg-NP2 /Tg-NP1) (جدول ۳-۱) ژنهای ITS1 rDNA با ا ستفاده از پرایمرهای اختصا صی آنها به کمک کیتهای سینا کلون آنالیز شدند (جدول ۱). تمام مراحل این آزمایش بر روی یخ صورت گرفت. مخلوط کلی واکنش PCR شامل محصول را ند اول پی سی آر، Tris HCl 14 ،KCl 14 mM ،mM ۱/۶MgCl2 mM، ۴/۴۱٪ ژلاتین ،mM ۴/۱ از دئوکسی نوکلئوتید µm، ۴/۱ پرایمر خارجی ،µm ۴ پرایمر داخلی Taq polymerase 1 U/µl بوده است.

مخلوط کلی واکنش PCR شامل µl۱۶/۲PCR MIX و µl۴/۱Taq DNA polymerase ریخته شد. سپس µl ۱۶ روغن معدنی به نمونه ها اضافه شد و درب لوله های آزمایش بسته شد. سپس µl ۶ از µm،DNA ۴/۱ پرایمر خارجی ،µm ۴ پرایمر داخلی به لوله اضافه شد. سپس به کمک ورتکس محتویات لوله به مدت 6 ثانیه مخلوط شد. سپس لوله های آزمایش به سیکل دمایی منتقل شدند و بر اساس جدول(۳-۳) مراحل آزمایش انجام شد: مراحل به این صورت بوده است که ابتدا دناتوراسیون اولیه به مدت ۶ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به صورت یک مرحله ای انجام شد. سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۴ ثانیه صورت گرفت و بعد از این مرحله در مرحله ی آنیلینگ لوله های آزمایش ۳۰ مرتبه در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۴ ثانیه قرار گرفتند، پس از آن در مرحله ی گسترش نیز مواد ۳۰ بار به مدت ۳۴ ثانیه و در دمای ۱۱درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس در گسترش نهایی یکبار نمونه ها به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در اولین PCR و PCR نستد، یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز وارد شد.

در این پژوهش از نرمافزارهای آماری SPSS ۱۶ برای استخراج داده های توصیفی و اپیدمیولوژیک با استفاده از آزمون آماری مربع کای استفاده شد. نفی بگذارد. به همین دلیل، پیشگیری، تشخیص زود هنگام و درمان مناسب از اهمیت بالایی برخوردارند.

هم اکنون به وا کاوی و بررسی داده های حاصل از آزمایش پرداخته میشود .در این فصل اطلاعات مربوط به ۴۴ نمونه خون گوسفند از جامعه آماری پژوهش برای تحلیل رابطه

بین متغیرها برای برر سی سؤالات تحقیق برر سی شد. داده های جمع آوری شده با ا ستفاده از نرم افزارهای اس پی اس اس نسخه ۱۶و اکسل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته اند.

نتایج

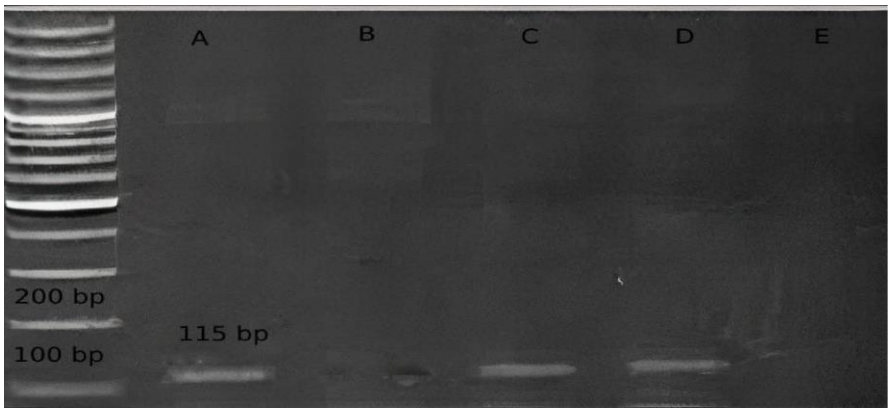
تشخیص *توکسوپلاسما گوندی* توسط PCR

به طورکلی از ۳۹۶ نمونه خون جمع آوری شـــده و آزمایش شـده توسـط ژن ۱۱۶ جفت باز ،۸۱ نمونه(۲۰/۴۵٪) از نظر توکســـوپلاســـموز مثبت بودند. همچنین ۳۱۵ نمونه خون معادل ۷۹/۵۴٪ از نمونه ها فاقد ژن *توکســـوپلاســـما گوندی* بوده اند (جدول ۲-۱).

جدول ۲-۱ نتایج اولیه PCR نمونه خون

		فراوانی	درصد فراوانی
نمونه ها	مثبت	۹	%۲۰/۴۵
	منفی	۳۵	%۷۹/۵۴

همچنین برای تأیید مضـــاعف محصـــول PCR، الکتروفورز چند نمونه از محصـــولات تکثیری نمونه های مثبت بر روی ژل آگاروز ۱٪ انجام گردید (شـــکل ۱-۱). در ردیف ســـمت چپ لدر قرار گرفته که معیار تشخیص ما است و در ردیفهای A ،B ،C ،D و E در باند 116 جفت بازی حضور *توکسوپلا سما گوندی* تأیید میکند و ســـتون Bنشـــان از عدم حضـــور *توکسوپلا سما گوندی* میبا شد همچنین ستون E به عنوان کنترل منفی است.



تصویر ۱-۱ تأیید حضور ژن B1 در نمونه های مثبت PCR برای توکسوپلاسما گوندی.

تحلیل داده های به دست آمده نشان داد به طور کلی ۵۴ نمونه در گروه ۴-۱ سال، ۱۷ نمونه در گروه ۰-۱ سال ،۹ نمونه در گروه ۴-۶ سال ،۱ نمونه از نمونه ها در گروه سنی بالای ۶ سال قرار داشته اند که از این بین ۸۱ نمونه(۲۰/۴۵٪) از کل نمونه ها مثبت بوده است و ۳۱۵ نمونه(۷۹/۵۴٪) از کل نمونه ها منفی بوده اند (جدول ۱-۲) . داده های این تحلیل نشان داد میان شیوع *توکسوپلا سما گوندی* با سن حیوانات رابطهٔ معناداری وجود دارد($P\leq0.001$). همچنین نتایج به دست آمده بیانگر این موضوع هست بیشترین میزان درگیری در سن بالای ۶ سال است و بعد از این گروه سنی با کاهش سن از شدت ابتلا کم می شود.

جدول ۱-۲ بررسی میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در گروههای سنی مختلف

گروه سنی	۱-۰ سال	۴-۱ سال	۶-۴ سال	بالای ۶ سال	مجموع
تعداد موارد مثبت	۱۷	۵۴	۹	۱	۸۱
تعداد موارد منفی	۱۴۱	۱۵۵	۱۸	۲	۳۱۵
مجموع	۱۵۸	۲۰۹	۲۶	۳	۳۹۶
درصد فراوانی موارد مثبت	۱۱	۲۴	۳۲	۳۳	۲۰

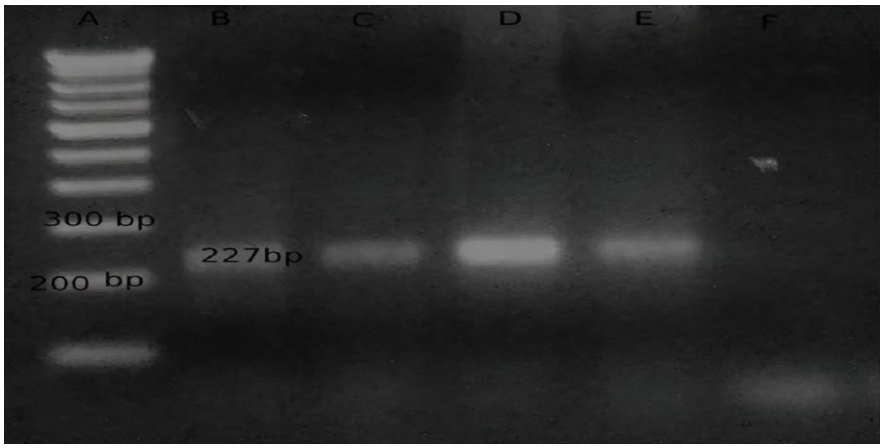
با توجه به نتایج به د ست آمده م شخص شد که ۵۹نمونه(با درصد فراوانی۲۶٪ماده ها) از دامهای ماده اخذ شده و ۲۲ نمونه(با درصد فراوانی ۱۲٪) از دامهای نر اخذ شده است ، به همین ترتیب نمونه های حاصل از ۱۶۳ دام ماده و ۱۵۱ دام نر فاقد آلودگی برر سی برای *توک سوپلا سما گوندی* بوده اند. همچنین رابطهٔ معناداری بین شیوع *توکسوپلا سما گوندی* و جنسیت دام وجود دارد($P\leq0.001$)، بر این اساس بیشتر دامهای مبتلا به *توکسوپلاسما گوندی* ماده هستند که نشان میدهد شیوع با جن سیت دامهای مبتلا رابطهٔ معناداری دارد (جدول ۱-۳).

جدول ۱-۳ بررسی میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* و جنسیت دام

جنسیت	نر	ماده	مجموع
موارد مثبت	۲۲	۵۹	۸۱
موارد منفی	۱۶۱	۱۵۴	۳۱۵
مجموع	۱۷۳	۲۲۳	۳۹۶
درصد فراوانی	۲۶	۱۲	۲۰

از مجموع ۸۱ نمونه مثبت به *توکسوپلاسما گوندی* به طور کلی ۱۸ نمونه (۲۶/۱٪) از پرایمر ژن های MN1/ MN2 (External Primer) در نمونه های آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* شناسایی شد و همچنین در ۹ نمونه (۱۱/۱٪) از نمونه های آلوده پرایمرهای اکسترنال مشاهده نگردید، همچنین ۵۴ عدد از نمونه های(۶۰/۳٪) مورد بررسی از مجموع ۸۱ نمونه دارای پرایمر ژنهای (Internal Primer Tg-NP1/ Tg-NP2)ه ستند و بقیه نمونه ها(۲۹/۳٪) از نمونه های مثبت فاقد ژن های مورد بررسی بوده اند. همچنین رابطۀ معنی داری میان شیوع کلی و پرایمر ژنهای ITS1 rDNA دیده می شود (۱.. ≥P). اما به طور کلی حضور ژنهای منتسب به پرایمر خارجی بیشتر از پرایمر داخلی بوده است.

در ضمن برای تأیید محصول PCR، چند نمونه از محصولات تکثیری نمونه های مثبت بر روی الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ انجام گردید (شکل ۱-۱). به این ترتیب در ردیف A لدر bp۱۴۴ قرار گرفته است در ردیف B کنترل مثبت الکتروفورز قرار گرفته که معیار تشخیص ما است و در ردیفهای E،C ،D در باند ۱۱۱ جفت بازی حضور مثبت پرایمر ژن های ITS1 rDNA را تأیید میکند همچنین ستون F به عنوان کنترل منفی آزمایش بوده است.



تصویر ۱-۳ بررسی شیوع کلی در برابر ژنهای ITS1 rDNA. A: لدر- B: کنترل مثبت - C, D, E: نمونه های مثبت- F: کنترل منفی.

بحث

در این مطالعه میزان آلودگی گوسفندان استان کرج به انگل *توکسوپلاسما گوندی* با کمک روش PCR۸۱ نمونه(۲۰٪) بود. به دلیل اینکه میزان آلودگی در بین گوسفندان مورد بررسی که گوشت آنها به مصرف انسان میرسد بالا بوده است، میتواند نشان دهنده ی هشداری در مورد احتمال انتقال عفونت توکسوپلاسموزیس به انسان از طریق تماس با لاشه های آلوده و گوشت آنها باشد و این امر از نظر بهداشت عمومی و از لحاظ خسارتهای مالی وارده بسیار حائز اهمیت میباشد.

در مطالعاتی که رئیس زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از واکنش زنجیرهای پلیمراز نستد انجام دادند مشخص شد که ۱۲٪ نمونه های مورد بررسی آنها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند (Raieszadeh et al,2021)که این میزان کمتر

از نتایج به دست آمده در تحقیقات ما بوده است و نشانگر این موضوع میباشد که آلودگی در استان کرج بیشتر از استان اصفهان است.

در مطالعه ای که بهرامی و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی سرولوژی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان کشتاری در ایلام به کمک روش الایزا انجام دادند مشخص گردید ۱۱/۰۶٪ نمونه خون اخذ شده از گوسفندان در کشتارگاه این شهر نیز آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند. که با توجه به نتایجی که در مطالعات ما به دست آمده نشان داده شد که میزان آلودگی در کرج بسیار پایین تر از شهرستان ایلام بوده است(Bahrami et al, 2013).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ توسط چراغی پور و همکاران به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد صورت گرفت مشخص شد ۱۶/۱٪ نمونه های گوسفند در این مطالعه آلوده به *توکسوپلاسما* بوده اند (Cheraghipouret al, 2013)که نتایج به دست آمده در این تحقیق نزدیک به نتایج به دست آمده در مطالعه ی ما بوده است با این حال میزان آلودگی در استان کرج کمتر بوده است.

در مطالعه ای که صالحی و نظامی در سال ۲۰۱۹ به منظور بررسی میزان آلودگی به *توکسوپلاسماگوندی* در جنین های سقط شده گوسفندان با استفاده از روش الایزا در خراسان شمالی انجام دادند دریافتند که شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در جنین های سقط شده ۱۴/۶۳٪ بوده است (Salehi M, Nezami H,2019)که این میزان بسیار نزدیک به نتایج به دست آمده در مطالعات ما بوده است.

در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۷ توسط ابراهیم و همکاران در مصر به منظور بررسی شیوع مولکولی و سرولوژیکی *توکسوپلاسما گوندی* در زنان باردار و گوسفندان انجام شد مشخص گردید شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان به کمک روش الایزا و RT-PCR به ترتیب ۱۶/۱۶٪ و ۱۱/۶۶٪ بوده است (Habibi et al, 2012) که نتایج به دست آمده در مصر بسیار نزدیک و همسو با نتایج ما بوده است و نشان دهنده این موضوع هست که آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان در خاورمیانه شایع است.

در مطالعه ای که صالحی و همکاران در سال ۲۰۲۰ به منظور بررسی عفونت *توکسوپلاسما گوندی* در جنین های سقط شده گوسفند با استفاده از PCR در خراسان شمالی در ایران انجام دادند مشخص گردید ۱۶ مورد از ۱۳۳ مورد جنین سقط شده آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بودهاند (Salehi M et al,2020).

در مطالعه ی دیگر سان و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی شیوع سرولوژیکی عفونت *توکسوپلاسما گوندی* و نئوسپورا کنینوم در گوسفند و بز استخوان سیاه در جنوب غربی چین پرداختند که پس از تفسیر نتایج این پژوهش مشخص گردید از ۲۱۰ نمونه اخذ شده از گوسفند و بز ۳۶/۲٪ از نمونه ها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده اند (Sun LX et al,2020)، نتایج به دست آمده توسط ما در این پژوهش نشان میدهد شیوع *توکسوپلاسما گوندی* بسیار کمتر از نتایج به دست آمده توسط سان و همکارانش در چین است.

در مطالعه ی دیگری که در برزیل توسط کونسالتر و همکاران در سال ۲۰۱۹ به منظور بررسی اپیدمیولوژیک

عفونت *توکسوپلاسما گوندی* در گله گوسفند تجاری در یک منطقه آندمیک توکسوپلاسموز چشمی در جنوب برزیل صورت گرفت مشخص شد از ۳۱۹ نمونه گوسفندان ۱۱۰ نمونه ۱۴/۱٪ نمونه ها آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* میباشند (Consalter A et al, 2019)که نتایج به دست آمده بسیار بالاتر از نتایج به دست آمده در این پژوهش بوده است.

کاکمک و کاراتپ در سال ۲۰۱۷ به منظور بررسی شیوع سرمی *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان استان نوشهیر ترکیه مطالعاتی را انجام دادند که پس از تفسیر نتایج مشخص شد از میان ۱۲۴ نمونه مورد بررسی ۱۲ نمونه) ۱۴/۴٪(آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بوده است (Çakmak DÖ, Karatepe B,2017)که نشان میدهد میزان آلودگی در تحقیقات کاکمک و کاراتپ همسو با نتایج به دست آمده در تحقیقات ما بوده است.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان میدهد میزان آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* در استان کرج مانند استان خراسان شمالی بسیار پایین تر از میزان آلودگی در سایر نقاط ایران است، همچنین میزان آلودگی در کرج نسبت به نتایج آورده شده در سایر نقاط جهان نیز پایین تر می‌باشد.

در مطالعاتی که چراغی پور و همکاران در خرم آباد و در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد انجام دادند مشخص گردید بیشترین میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در سن های بالای ۶۰ ماه روی میدهد و همچنین رابطه معنی داری با آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* و سن گوسفندان دیده شد (Cheraghipouret al, 2013). در مطالعات دیگری که رئیس زاده و همکاران در سال ۲۰۲۱ در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از پی سی آر نستد صورت گرفت مشخص گردید تفاوت معنی داری بین دو گروه سنی مورد بررسی در این تحقیق به آلودگی با توکسو پلاسموز دیده نمیشود (Raieszadeh et al,2021). در مطالعاتی که بهرامی و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی سرولوژی توکسوپلاسموزیس در گوسفندان کشتاری در ایلام به کمک روش الایزا صورت گرفت مشخص گردید با افزایش سن، در صد آلودگی نیز افزایش مییابد با این حال ارتباط معنی داری در این مقاله در این پژوهش دیده نشد (Bahrami et al,2013). همچنین نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که در گروه سنی ۰-۱ سال بیشترین میزان آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* وجود دارد همچنین رابطه معنی داری میان سن دام و شیوع *توکسوپلاسما گوندی* وجود دارد.

در مطالعاتی که توسط چراغی پور و همکاران به منظور بررسی شیوع توکسوپلاسموز گوسفندان و گاوان کشتار شده در شهرستان خرم آباد صورت گرفت مشخص شد ۴/۱٪ از دام های نر و ۱۱/۹٪ از دامهای ماده آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* بودهاند و همچنین ارتباط معنی داری بین جنسیت و آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده نشد (Cheraghipouret al, 2013).

در مطالعاتی که در اصفهان به منظور تشخیص ژن B1 *توکسوپلاسما گوندی* در گوسفندان کشتار شده اصفهان با استفاده از پی سی آر نستد توسط رئیس زاده و همکاران صورت گرفت مشخص گردید تفاوت معنی داری میان شیوع در میان دو جنس نر و ماده وجود ندارد (Raieszadeh et al,2021).

در مطالعاتی که در ایلام صورت گرفت م شخص گردید در جنسیت های مختلف، ارتباط معنی داری در این مقاله در این پژوهش دیده نشد. همچنین نتایج به دست آمده در این گزارش نشان داد که بیشترین میزان شیوع در جنسیت ماده صورت گرفته است همچنین رابطه ی معنی داری بین جنسیت و آلودگی با *توکسوپلاسما گوندی* دیده شده است.

گو سفندانی که دوز خوراکی اوو سیست های زنده دریافت میکنند معمولا تبدار میشوند و گهگاهی ناراحتی تنفسی نشان میدهند، اما این علائم معمولا تا ۱۰ روز بعد از ظهور بهبود می یابند. در مطالعه ای که چیه بائو و همکاران در برزیل انجام دادند مشخص گردید که دامهای مورد بررسی و مبتلا به *توکسوپلاسما گوندی* دارای تب با مداومت 1 الی 9 روز بوده اند و هیچ مورد سقط جنینی در این دامها گزارش نگردید اما از ۱۶ بره متولد شده از گوسفندان آلوده در این بررسی ۶ راس به شکل مادرزادی آلوده بودند (Dubey JP et al,1998). در مطالعه ی دیگری که توسط گلور و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در جمهوری چک انجام شد مشخص گردید نمونه های مثبت مورد بررسی دارای علائم خفیف درمانگاهی به مدت یک الی دو هفته بوده اند (Glor SB et al,2013). در مطالعات دیگری که در کشور اسکاتلند و در سال ۲۰۱۱ توسط بناویدس و همکاران صورت گرفت مشخص گردید که نمونه های مورد بررسی دارای تب ۱ الی ۱۴ روزه بوده اند (Benavides et al, 2011). در مطالعه ی دیگری که در اسکاتلند توسط کاتزر و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت مشخص شد که علائم بالینی در دو گروه واکسینه شده و غیر واکسینه متفاوت است و نشانه های بالینی در گروه غیر واکسینه به صورت تب ۹ روزه و نشانه های بالینی در گروه واکسینه به صورت تب ۱ روزه دیده شد (Carruthers VB, Tomley FM.,2008 وCarruthers VB, Boothroyd JC,2007). در مطالعه های که در اسپانیا صورت گرفت مشخص شد در ۶ روز اول آلودگی علائم بالینی دیده نشد ولی در روز ۱۱ سقط جنین گزارش شد (Habibi et al, 2012). همچنین نتایج مورد بررسی ما نشان داد که بیشتر نمونه های آلوده به *توکسوپلاسما گوندی* فاقد علائم بالینی مشخص بوده اند با این حال رابطه ی معنی داری میان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* و علائم بالینی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی نتایج سایر مقالات منتشر شده میتوان نتیجه گرفت میزان شیوع *توکسوپلاسما گوندی* در استان کرج پایین تر از سایر نقاط میباشد. با این حال با توجه به زئونوز بودن این انگل و میزان مصرف بالای گوشت گوسفندی در ایران باید اقدامات پیشگیرانه و بهداشتی مناسب در مورد کنترل این انگل صورت بگیرد.

منابع

1. Bahrami A.M, Jafarian M., Ali rahmi H., Mohammadi M, Cheragh afrooz S., Havasi Z., et al.(2013) Seroepidemiological Study of Toxoplasmosis in Sheep, Ilam, Iran (2013). J Vet Clin Res [Internet];4(4):263–8. Available from: https://jvcr.karaj.iau.ir/article_525906.html
2. Benavides, J., Maley, S., Pang, Y., Palarea, J., Eaton, S., Katzer, F., Innes, E.A., Buxton, D. Chianini F.(2011) Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of Toxoplasma gondii. Vet Parasitol;179:209–15.
3. Çakmak DÖ, Karatepe B.(2017) Seroprevalence of Toxoplasma gondii in sheep from Nevşehir province in Turkey. Türkiye Parazitolojii Derg;41(3):148.

4. Carruthers VB, Tomley FM.(2008) Microneme proteins in apicomplexans. Mol Mech parasite invasion Subcell Biochem;33–45.
5. Carruthers VB, Boothroyd JC.(2007) Publisher's note Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Curr Opin Microbiol;10:82.
6. Cheraghipour k, Sheikhian A, Tarahi MJ, Nosrati Z, Moradpour K, Zibaei M. (2013) Seroprevalence of toxoplasmosis in slaughtered sheep and cattle in khorram Abad, Lorestan, Iran. J Vet Lab Res [Internet];5(2):113–20. Available from: https://jvlr.semnan.ac.ir/article_1246.html
7. Consalter A, Frazão-Teixeira E, Dubey JP, Zanella EL, da Silva AF, de Souza GN, et al. (2019) Epidemiological investigation of *Toxoplasma gondii* infections in commercial sheep flock in an endemic area for ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Acta Parasitol;64:514–9.
8. Dubey JP.(2016) Toxoplasmosis of animals and humans. CRC press.
9. Dubey JP, Prowell M.(2013) Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. J Parasitol;99(1):158–60.
10. Dubey JP, Bealty CP.(2010) Toxoplasmosis of animals and humans, CRC Press. Boca Raton, FL.
11. Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan G V, Bandini LA, Kwok OCH, et al.(2008) High prevalence and abundant atypical genotypes of Toxoplasma gondii isolated from lambs destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol;38(8–9):999–1006.
12. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, et al. (2002) Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (Gallus domesticus) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol;32(1):99–105.
13. Dubey JP, Lindsay DS, Speer C.(1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev;11(2):267–99.
14. Glor SB, Edelhofer R, Grimm F, Deplazes P, Basso W.(2013) Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep. Parasit Vectors;6:1–11.
15. Habibi GR, Imani AR, Gholami MR, Hablolvarid MH, Behroozikhah AM, Lotfi M, et al. (2012) Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin Province of Iran. Iran J Parasitol;7(3):64.
16. Ibrahim HM, Mohamed AH, El-Sharaawy AA, El-Shqanqery HE.(2017) Molecular and serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and sheep in Egypt. Asian Pac J Trop Med;10(10):996–1001.
17. Katzer F, Canton G, Burrells A, Palarea-Albaladejo J, Horton B, Bartley PM, et al. (2004) Immunization of lambs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* reduces tissue cyst burden following oral challenge with a complete strain of the parasite. Vet Parasitol [Internet].

[cited 2023 Sep 5];205(1–2):46–56. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25062897/

18. Katzer F, Brülisauer F, Collantes-Fernández E, Bartley PM, Burrells A, Gunn G, et al.(2011) Increased Toxoplasma gondii positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. Vet Res;42(1):1–9.

19. Raieszadeh H, Jamshidi A, Noaman V, Razmi G.(2021) Detection of B1 Gene of *Toxoplasma gondii* infection in Slaughtered Sheep in Isfahan Using the Nested PCR. J Anim Biol [Internet];13(2):39–48. Available from: https://ascij.damghan.iau.ir/article_679296.html

20. Salehi M, Nezami H, Niazkar HR.(2020) Investigation of *Toxoplasma gondii* infection in aborted fetuses of sheep using PCR: A study in North Khorasan Province, Iran. Vet Med Int.;2020.

Salehi M, Nezami H.(2019) A Survey of *Toxoplasma gondii* Infection in Aborted Fetuses of Sheep Using ELISA Method in Different Cities of North Khorasan Province. J Vet Res [Internet];74(3):304–10. Available from: https://jvr.ut.ac.ir/article_72869.html

21. Sun L-X, Liang Q-L, Nie L-B, Hu X-H, Li Z, Yang J-F, et al.(2020) Serological evidence of *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum infection in black-boned sheep and goats in southwest China. Parasitol Int;75:102041.

Investigation of the frequency of *Toxoplasma* infection in sheep of Alborz province by nested PCR method

Hosseini S.R.*[1], Hamzeh Ali Tehrani M. [2], Taiefi Nasrabadi N.[3]

[1] Department of Veterinary Patobiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] PhD graduate in Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran

[3] Department of Veterinary Patobiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

* Correspondig Author's.Email: dr.s.reza@gmail.com

Abstract

Introduction: Today, due to the increasing consumption of sheep meat and the popularity of this animal's meat, as well as the zoonosis of *Toxoplasma gondii* disease between humans and animals, as well as the financial losses caused by this parasite to livestock farmers, attention should be paid.
Purpose: Our purpose in this research is to evaluate the detection of *Toxoplasma* by nested PCR method in sheep blood it was in Karaj province.
Research implementation method: In this research, after collecting test samples and recording the characteristics and information of each sample, the presence of *Toxoplasma gondii* parasite in the sheep of Karaj province was investigated using the nested PCR method. Then all the obtained data were analyzed with the help of SPSS software.
Results: The obtained results show that 9 samples (11.1%) of the tested samples (81 samples) have a level of contamination with *Toxoplasma gondii*, also a significant relationship between the age and sex of the animal with contamination with *Toxoplasma gondii* has been seen.
Discussion and conclusion: The results obtained in this report show the necessity of examining the safety of parasites in Iran, because most of Iran's livestock are raised in a traditional way and preventive care for parasitic contamination is less. It can be a potential risk for the health of animals and their meat consumers.

Keywords: sheep, *Toxoplasma gondii*, PCR, zoonosis.

Roster

Study on isolated staphylophage from waste water on detected Staphylococcus from raw milk
Nima Bahador, Maryam Hoseini sarbas, Bahar Ajam Lotfi, Maedeh Noshadi, Mahmonir Bahramian, seyedeh Golnaz Khani……..……...……..17

Investigating the prevalence of Campylobacter bacteria and its species in chicken and quail prepared from distribution centers in Khuzestan province, Andika city
Zahra Motaghi, Manouchehr Momeni Shahreki, Reza Soltani, Hossein Khodabandeh Shahreki…..…….25

Fungi counting, Escherichia coli counting and Salmonella detection from waste centers (meat meal) and livestock, poultry and aquaculture factories
Mohammad Hossein Marhamatizadeh, Kimia Kazemzadeh Shirazinejad, Mandana Hassanzadeh, Zahra Jamali, Seyyed Amir Hossein Nafisi, Seyyed Mostafa Famori ….……..……...…….39

Molecular detection and antibiotic resistance pattern of Shigella sp. Isolated from raw milk and traditional cheeses
Farzaneh Hassani, Mojtaba Bondayian, Hamdollah Moshtaghqi …….……..……...….54

Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of barberry *(Berberis vulgaris)* extract Nano emulsion as a natural preservative in a food model
Behrouz Dast Peyman, Amir Shakerian[2], Zohreh Mashak[3*], Ebrahim Rahimi[1] and Reza Sharafati Chaleshtori……..……77

Investigation of the frequency of *Toxoplasma* infection in sheep of Alborz province by nested PCR method
Seyed Reza Hosseini, Milad Hamzeh Ali Tehrani, Nadia Taifi Nasrabadi…….92

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL
ICV score: 5.21