

مروری بر اثر مکمل غذایی ریز جلبکها بر رشد و ایمنی طیور

بهاره نوروزی^{۱*}، طاهره تقی زاده اشرفی^۲

۱- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، بخش زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱

چکیده

امروزه افزایش مقاومت دارویی در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف، تهدید قابل توجهی در صنعت طیور است. در این میان، ریز جلبکها به عنوان مکمل غذایی در انسان، حیوانات، طیور و آبزیان محسوب می شوند که حاوی پروتئین، ویتامین ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب، رنگدانه ها و اسیدهای آمینه ضروری هستند. علاوه بر این، حاوی مقادیر قابل توجهی از آنتی اکسیدان های طبیعی منحصر به فرد از جمله پلی فنول ها، کاروتنوئیدها و فیکوسیانین نیز هستند. مکمل غذایی *Spirulina* می تواند بر جمعیت میکروبی روده، پارامترهای بیوشیمیایی سرم و عملکرد رشد جوجه ها تأثیر مفیدی بگذارد، چرا که حاوی محتویات پلی فنلی است که دارای اثرات ضد باکتریایی است و از تحرک باکتری ها، مهاجم و تشکیل بیوفیلم جلوگیری می کنند. علاوه بر آن با اثر مستقیم روی باکتری ها با تضعیف و متخلخل تر کردن دیواره های سلولی و در نتیجه نشت محتوای سیتوپلاسمی، نقش مهمی در از بین بردن باکتری ها دارند. از آنجاییکه ریز جلبکها، فعالیت های ضد ویروسی بالقوه ای در برابر برخی از ویروس های مشترک انسانی یا حیوانی دارند، می توانند در برابر ویروس های پرندگان نیز موثر واقع شوند. در این مقاله مروری، تأثیرات ایمنی شناسی سیانوباکتری ها به عنوان غذای مکمل در طیور برای افزایش رشد، سلامت روده و مقاومت در برابر بیماری ها بررسی خواهد شد.

کلمات کلیدی: تغذیه، ریز جلبکها، طیور، ضد ویروسی، فعالیت ضد میکروبی

* نویسنده مسئول: بهاره نوروزی

آدرس: گروه بیوتکنولوژی بخش زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

مقدمه

با وجود استفاده گسترده از واکسن ها و داروها، بیماری های متعددی در صنعت طیور همچنان رخ می دهد که منجر به خسارات مالی می شود. به عنوان مثال، عفونت های ویروسی پرندگان مانند آنفولانزای پرندگان، برونشیت عفونی، بیماری بورس عفونی و بیماری نیوکاسل منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی به خصوص در جوجه ها، افزایش مرگ و میر، کاهش رشد و سرکوب سیستم ایمنی می شود (Alaql & Abbas, 2023). همین امر در مورد عفونت های باکتریایی مانند سالمونلا، E.coli و غیره نیز صادق است. بنابراین نیاز مداوم به استفاده از مواد طبیعی برای رفع این مشکل وجود دارد. به عنوان مثال، جلبک ها منبعی از اجزای مفید بیولوژیکی حیاتی هستند که استفاده از زیستگاه های طبیعی را به عنوان منبع این مواد شیمیایی به یک استراتژی مناسب برای ایجاد غذاهای نوآورانه تبدیل می کند (Valikboni, Anvar, & Nowruzi, 2024). یکی از بزرگترین منابع برای مواد مغذی آلی در میان جلبک های خوراکی، جلبک سبز آبی میکروسکوپی *Spirulina* است که به عنوان یک مکمل غذایی برای خوراک انسان و دام در سطح جهان استفاده می شود. *Spirulina platensis* یک سیانوباکتری تجاری رشته ای است که به عنوان مکمل غذایی و خوراکی در صنعت انسان، آبی پروری، دام و طیور مورد استفاده قرار می گیرد (Khan et al., 2020).

Spirulina می تواند هم در آب شور و هم در آب شیرین رشد کند و در چندین کشور به صورت نیمه و انبوه کشت می شود. *Spirulina* یک منبع غذایی غنی از پروتئین بالا (۲۶۰-۷۷۰ گرم در کیلوگرم) است که ۷۰٪ وزن خشک و محتوای چربی زیادی (۱۰-۱۴۰ گرم / کیلوگرم) دارد (Mohammad Shirazi et al., 2021).

مهمترین مزیت *Spirulina* این است که قابلیت هضم مواد مغذی بالایی دارد که نسبت به سایر رژیم ها و خوراک های سبزیجات برتر است. بنابراین، *Spirulina* این پتانسیل را دارد که تا حدی جایگزین منابع سنتی پروتئین، به ویژه کنجاله سویا شود. اسید اولئیک، لینولئیک اسید، گامالینولئیک اسید، دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، سولفولیپیدها و گلیکولیپیدها از جمله اسیدهای چرب غیراشباع موجود در *Spirulina* هستند، علاوه بر این، اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ و ۶ در *Spirulina* فراوان هستند. *Spirulina* همچنین حاوی رنگدانه هایی مانند کاروتنوئیدها (۴۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) است که شامل بتا-کاروتن و زآگزانتین و رنگدانه های کلروفیل است (Nowruzi, 2024). فیکوبیلی پروتئین ها، ویتامین ها و ماکرو و میکروالمانهای معدنی مانند کلسیم، آهن، منیزیم، منگنز، پتاسیم، روی و سلنیوم نیز در *Spirulina* یافت می شوند (El-Shall et al., 2023).

علاوه بر این، پلی ساکاریدها، پرو ویتامین A، ویتامین E، ویتامین K و انواع ویتامین های B و همچنین آنتی اکسیدان ها نیز از اجزای مهم *Spirulina* هستند (Behjati, Ataee, Nowruzi, Anvar, & Ahari, 2025). *Spirulina* به دلیل داشتن ترکیبات مغذی استثنایی و چشمگیر به عنوان یک افزودنی رژیمی در طیف گسترده ای از محصولات غذایی استفاده می شود که به بهبود کیفیت غذایی محصولات و همچنین پتانسیل آنها برای بهبود عملکرد تولید مثلی و تولیدی، سلامت عمومی و علائم بیماری های مختلف حیوانی مانند آرتریت، دیابت، کم خونی، فشار خون بالا و اختلالات قلبی عروقی کمک می کند. *Spirulina* به عنوان جایگزینی قوی آنتی بیوتیکی در غذای مرغ استفاده می شود و منجر به خواص دارویی بالقوه ای مانند ضد



Spirulina در رژیم غذایی منجر به افزایش لاکتوباسیلوس می شود، در حالی که جمعیت اشریشیا کلی را کاهش می دهد (Chamari, Anvar, 2024). در طول ۳۵ روز اول زندگی، رژیم غذایی ۵ گرم بر کیلوگرم *Spirulina* باعث افزایش قابل توجهی در افزایش وزن بدن می شود. اما رژیم غذایی در سطح ۳ گرم بر کیلوگرم *Spirulina*، میزان کلسترول را در هر گرم زرده، به میزان قابل توجهی کاهش داد و در عین حال رنگ زرده تخم مرغ را نیز بهبود بخشید (El-Shall et al., 2023).

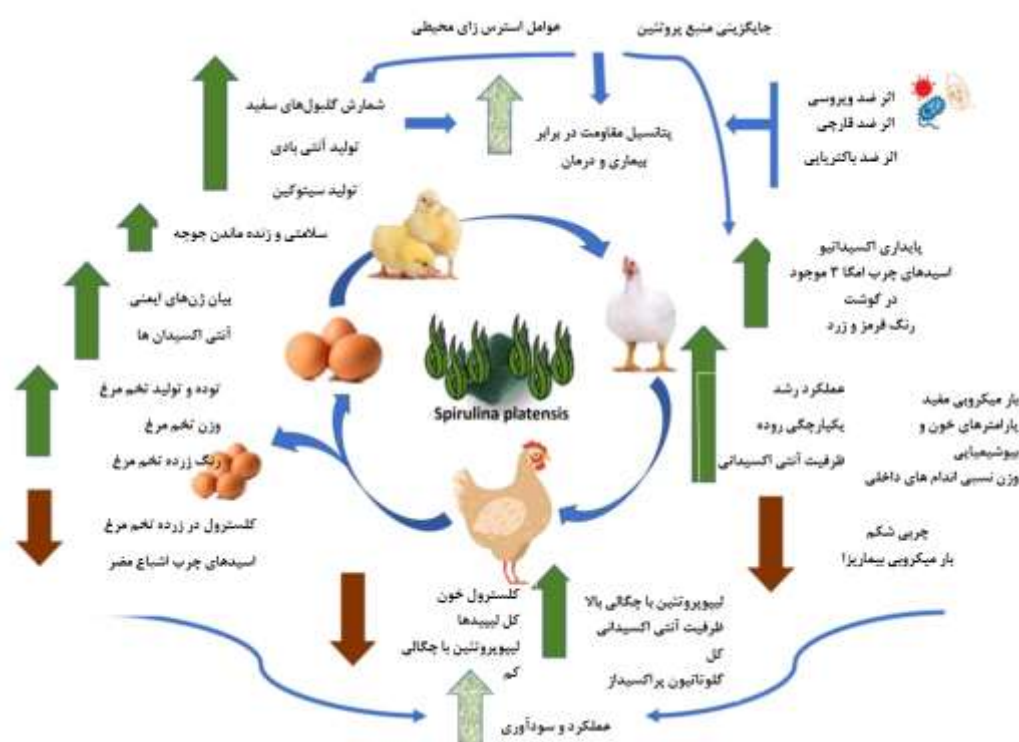
با این حال، مصرف خوراک روزانه، FCR، درصد تخم‌های شکسته، ضخامت پوسته تخم‌مرغ، ارتفاع آلبومین، واحد هاو و وزن تخم‌مرغ تحت تأثیر *Spirulina* جیره تا ۰/۹ درصد قرار نگرفت. در مقایسه با پرندگان بدون مکمل، جلبک ۰/۶ درصد به طور قابل توجهی سبب افزایش توده و تولید تخم مرغ و همچنین رنگ زرده تخم مرغ در جوجه‌های تخمگذار بین ۲۶ تا ۳۷ هفتگی شد. برای بهبود عملکرد تولید مثل و تولید مثل، آنها پیشنهاد کردند که *Spirulina* را به رژیم غذایی اضافه کنید. هنگامی که رژیم غذایی اولیه با ۲ یا ۳ گرم *Spirulina* در هر کیلوگرم جیره در طول دوره تخمگذاری از ۲۹ تا ۴۰ هفتگی داده شد، مرغ ها و خروس ها به طور قابل توجهی دارای بالاترین سطوح لیوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAOC)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPx)، مقدار تخم مرغ، وزن تخم مرغ و درصد جوجه کشی شدند و کلسترول خون، لیپیدهای کل و لیوپروتئین با چگالی کم به طور قابل توجهی کاهش یافتند (Selim, Hussein, & Abou-Elkhair, 2018).

میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی و تقویت کننده سیستم ایمنی در آنها می شود. خواص ضد ویروسی *Spirulina*، سیستم ایمنی را تقویت می کند (Bortolini et al., 2022). در آینده *Spirulina* در حال تبدیل شدن به یک روش مقرون به صرفه برای افزایش تولید طیور است. در این مقاله مروری، مزایای درمانی ریز جلبکها به عنوان مکمل غذایی برای مبارزه با بیماری های مختلف طیور مورد بررسی قرار می گیرد.

اثرات *S. platensis* بر عملکرد تولیدی

از مرحله جنینی تا تخم گذاری، *Spirulina* را می توان در جیره طیور مصرف کرد. تزریق *S. platensis* در تخم مرغ بیان ژن های مرتبط با ایمنی و آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد (Iry, Nowruzi, & Ghazi, 2023). محققان گزارش کردند که حضور *Spirulina* در آب های آشامیدنی به مدت ۴ هفته در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر منجر به میانگین افزایش وزن بدن با بالاترین درصد زنده ماندن جوجه می شود. (Al-Batshan, Al-, Mufarrej, Al-Homaidan, & Qureshi, 2001). مکمل *Spirulina*، ۱ یا ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم جیره های حاوی پروتئین های گیاهی و حیوانی در بلدرچین ژاپنی، عملکرد رشد را بدون تأثیر بر کیفیت گوشت یا فلور روده در بلدرچین های تغذیه شده با منبع پروتئین گیاهی بهبود بخشید، اما هیچ تأثیری در جیره غذایی مبتنی بر پروتئین حیوانی مشاهده نشد. با مصرف ۰/۷ و ۰/۹ گرم *S. platensis* در هر کیلوگرم خوراک، عملکرد رشد جوجه های گوشتی، پارامترهای خونی، تغییرات بیوشیمیایی در سرم و بار میکروبی را می توان بهبود بخشید. مکمل غذایی *Spirulina* با ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم جیره، افزایش وزن بدن را به طور قابل توجهی نشان داد (Satyaraj, Reynolds, Engler, Labuda, & Sun, 2021). علاوه بر این، سطوح مختلف





شکل ۱- کاربردها و اثرات کلی *Spirulina* بر عملکرد و سلامت طیور (El-Shall et al., 2023).

Spirulina نسبت دادند. حتی افزودن آنزیم‌های برون‌زا مانند لیزوزیم نتایج بدتری را به دنبال داشت، اگرچه لیزوزیم موفق به شکستن دیواره سلولی *Spirulina* شد. دانشمندان پیشنهاد کردند که اگر لیزوزیم و یک پیتیداز تخصصی ترکیب شوند، پروتئین‌های این ریزجلبک ممکن است راحت‌تر هضم شوند و از ژله‌ای شدن مضر جلوگیری شود (Bonos et al., 2016).

اثرات *S. platensis* بر سیستم ایمنی و فعالیت تومور

مکمل *Spirulina* بسیاری از فرآیندهای ایمنی را تقویت می‌کند. *Spirulina* اثر خاصی بر روی مونوسیت‌ها که اجزای ضروری سیستم ایمنی ذاتی هستند، دارد. تجویز *Spirulina* منجر به افزایش پاسخ فاگوسیتی ماکروفاژها در مرغ و انسان می‌شود. همچنین مشخص شد که فعالیت فاگوسیتیک ماکروفاژهای جدا شده از گربه‌ها در پاسخ به قرار گرفتن در معرض آنتی ژن در حضور

ریزجلبک‌های موجود در جیره بلدرچین (۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) کیفیت تخم‌مرغ را افزایش داده و با عملکرد به عنوان یک محرک ایمنی و آنتی‌اکسیدانی، برای سلامت مصرف‌کننده مفید هستند. با این حال، آنها هیچ اثری بر تولید تخم‌مرغ نداشتند. این به این دلیل بود که مقدار اسیدهای چرب تک غیراشباع را افزایش داد که برای سلامت مصرف‌کننده مفید است و سطح اسیدهای چرب اشباع مضر را کاهش داد. علاوه بر این، سطح آنتی اکسیدان زرده تخم‌مرغ افزایش یافت که باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شد (Kharde, Shirbhate, Bahiram, & Nipane, 2012).

از سوی دیگر، اثر منفی در ۳۲ جوجه گوشتی تغذیه شده با مکمل *Spirulina* به میزان ۱۵ درصد برای دوره ۲ هفته (روز ۲۱ تا ۳۵)، در مقایسه با پرندگان بدون مکمل گزارش گردید. آنها این اثر منفی را به ویسکوزیته بالای گوارشی ناشی از ژله‌ای شدن پروتئین‌های غیرقابل هضم

لیپیدی غشای سلولی تأثیر می گذارد. پتانسیل آن برای درمان سلول های سرطانی عمدتاً در اثرات مهاري قابل توجه سلول های سرطانی در حالی که از سلول های طبیعی محافظت می کنند نهفته است (A. Anvar & Nowruzi, 2021).

همچنین اثرات مهاري بر مهاجرت و تهاجم سرطان پانکراس توسط عصاره *Spirulina* ارائه شده است. محققان نشان دادند که *Spirulina* ی غنی شده با سلنیوم پتانسیل ضد التهاب آن را بهبود می بخشد که این امر با کاهش سطح سیتوکین و اینترلوکین انجام می شود. علاوه بر این، خاصیت آنتی اکسیدانی آن از سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو با کاهش اکسید نیتریک (۶۴/۸۴ درصد) و محتوای مالون دی آلدئید (۶۹/۰۷ درصد) و افزایش سطح سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم های گلوکاتایون پراکسیداز محافظت می کند (Mirzaie et al., 2018). Se-SP همچنین به عنوان محرک رشد، آنتی اکسیدان، محرک سیستم ایمنی و ضد میکروبی (کاهش میکروارگانیزم های بیماری زا در خوراک و میکروبیوتای روده) در جوجه های گوشتی تحت استرس گرمایی استفاده می شود (Nowruzi & Beiranvand, 2024a). پتانسیل ضد التهابی *Spirulina* به التیام سوختگی پوست کمک می کند. در واقع کاربرد آن به طور قابل توجهی سطوح بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و ژن های مرتبط با فیروز که نقش اساسی در ترمیم پوست را دارد، بهبود می بخشد (Abouelezz, 2017).

اثرات پری بیوتیکی

اثر پری بیوتیکی *S. platensis* از ترکیبی غنی از الیگوساکاریدها که مصرف آن قابل استفاده در تقویت رشد میکرو فلور روده است ناشی می شود (Nowruzi, Jafari, Babaie, Motamedi, & Anvar, 2020).

Spirulina افزایش یافته است. عصاره پلی ساکارید *S. platensis* برای افزایش گلبول های سفید خون در یک سیستم خون ساز آسیب دیده در اثر تابش اثبات شده است (Alaqil & Abbas, 2023).

اثر تعدیل کننده ایمنی *Spirulina* روی موش از طریق افزایش تولید آنتی بادی IL-1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ مشاهده شد. در این رابطه، محققان که گروه های مرغی که از جیره های حاوی *Spirulina* تغذیه می شوند، وزن تیموس بالاتری نسبت به گروه کنترل دارند. به طور مشابه، در مقایسه با شاهد تیمار نشده، افزودن *S. platensis* در سطوح ۰٫۷ و ۰٫۹ گرم بر کیلوگرم جیره جوجه های گوشتی منجر به افزایش قابل توجه وزن تیموس و طحال شد (Chen et al., 2016). افزایش قابل توجه تعداد گلبول های سفید خون و افزایش فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها در جوجه های گوشتی تیمار شده با جلبک *S. platensis* نشان داد که سیستم ایمنی حیوانات تقویت شده است (Nowruzi & Bagheri, 2023). به گفته محققان تغذیه *S. platensis* فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژ را بر حسب میانگین تعداد گلبول های قرمز گوسفند در هر ماکروفاژ فاگوسیتی افزایش می دهد (Mirzaie, Zirak-Khattab, Hosseini, & Donyaie-Darian, 2018). افزایش پاسخ ایمنی از طریق القای نکروز تومور سنتز، فاگوسیتوز، و تولید اینترلوکین، ناشی از طیف گسترده ای از گروه های سولفات، استرهای سولفات، و باقی مانده های آمین موجود در پلی ساکاریدهای *S. platensis* است. همزمان، فعالیت آنتی اکسیدانی *S. platensis* نیز با فعالیت در برابر سلول های سرطان ریه مرتبط است (Kashi, Ghazi, & Nowruzi, 2024). عصاره ریز جلبک بر چرخه سلولی رده سلول های سرطان ریه A549، افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون



فعالیت پروبیوتیکی به ویژگی های ساختاری مختلف، از جمله وزن مولکولی، ترکیب باقیمانده قند، نوع پیوند بین مونوساکاریدها و استریشیمی، و درجه پلیمریزاسیون الیگوساکاریدها در غذاهای کاربردی مربوط می شود (Kaoud, 2015).

اثر بر اختلالات متابولسمی

ریزجلبکها به عنوان یک سوپر فود، یک درمان کمکی مفید به خصوص در درمان دیابت و پوکی استخوان است. خاصیت هیپوگلیسمی *S. platensis* با حضور کروم همراه است که زمانی که به پپتیدهایی که به گیرنده های انسولین متصل می شوند، فعالیت کاهش سطح گلوکز پلاسما را افزایش می دهد (Seyidoglu, Inan, & Aydin, 2017). علاوه بر این، خواص محافظت از کبد، محافظت از سلول های β در برابر آسیب رادیکال های آزاد، و توانایی افزایش ویتامین D در خون با این ریزجلبک ها همبستگی دارند این ویژگی ها می تواند شکل گیری استخوان را با افزایش بیان استئوکلسین و تعداد استئوسیت ها/استئوبلاست ها بهبود بخشد (S. Anvar & Nowruzi, 2022). بدین ترتیب، استفاده از آن همراه با داروی متفورمین باعث تحریک تکثیر استئوبلاست و جلوگیری از آپوپتوز استئوسیتوز می شود (S. A. A. Anvar, Nowruzi, & Afshari, 2023).

مکمل *Spirulina* به خصوص در دوران بارداری و شیردهی، اثرات محافظت کننده عصبی مفیدی را در برابر پیامدهای منفی سوء تغذیه، واکنش گلیوز و تخریب عصبی نشان داده است (Holman & Malau-Aduli, 2013). از نظر رژیم غذایی، مصرف *S. maxima* باعث افزایش اثر هیپولیپیدمیک در اضافه وزن، کاهش کل کلسترول، تری گلیسیرید، چربی بدن و شاخص توده بدنی میشود. با این حال، ممکن است پروفایل لیپیدی افراد با دیابت نوع ۲، سندرم متابولیک، اضافه وزن یا

چاقی را بهبود بخشد (Nowruzi & Beiranvand, 2024b). در این زمینه، خواص بیولوژیکی متعدد *Spirulina* و مشتقات آن می تواند فراتر از عملکرد غذایی و مکمل غذایی آن باشد و می تواند در زمینه پزشکی برای انواع مختلف عملکردهای درمانی، عمدتاً در برابر بیماری های مرتبط با تجمع رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو، مانند مولتیپل اسکلروزیس، آلزایمر، پارکینسون و قرار گرفتن در معرض نوروتوکسیک گسترش یابد (Kaoud, 2015).

اثرات آنتی اکسیدانی و اثر *S. platensis* بر کیفیت گوشت

از آنجایی که ریزجلبک ها منبع قابل توجهی از فیکوسیانین، یک رنگدانه آنتی اکسیدانی با کاهش فعالیت چربی خون هستند (Shafaei Bajestani, Anvar, Nowruzi, & Golestan, 2000)، پرندگان که با *Spirulina* تغذیه شدند، فعالیت آنتی اکسیدانی بهبود یافته ای را نشان دادند که یکی دیگر از مزایای خوراک *Spirulina* است. فیتوپگمنت های فیکوسیانین، کاروتن و زانتوفیل، توکوفرول ها، اسید لینولنیک و ترکیبات فنولیک نمونه هایی از رنگدانه های طبیعی هستند. در *Spirulina* خواص آنتی اکسیدانی قوی و فعالیت های مهار کننده قوی در برابر گونه های فعال اکسیژن مانند رادیکال های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن به اثبات رسیده است (Elbaz, Ahmed, Abdel-Maqoud, Badran, & Abdel-Moneim, 2022). محققان گزارش کردند که *Spirulina* به طور چشمگیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را تحریک می کند که از پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب DNA و از بین بردن رادیکال های آزاد جلوگیری می کند. با استفاده از سطوح ۰.۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر *Spirulina*، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی و محتوای تیروکسین (T4) به طور



چشمگیری در جوجه بلدرچین ژاپنی در حال رشد، افزایش یافت. با این حال، کلسترول پلاسما، لیپیدهای کل، فعالیت ALP، ALT و AST، سطوح پایین تری داشتند. علاوه بر این، تزریق *Spirulina* با دوزهای ۰٫۷۵-۳٫۵ میلی گرم در تخم مرغ در بلدرچین ژاپنی و ۲۵-۳۵ میلی گرم در تخم مرغ در پرورش دهندگان جوجه های گوشتی باعث افزایش جوجه ریزی جوجه ها شد. در بلدرچین، ۲٫۵ یا ۳٫۵ میلی گرم *Spirulina* به طور چشمگیری بیان HSP70 را کاهش داد و به طور قابل توجهی فعالیت کاتالاز را افزایش داد (Shanmugapriya, Babu, Hariharan, (Sivaneswaran, & Anusha, 2015).

علاوه بر این، گنجانیدن *Spirulina* در خوراک طیور بر پارامترهای کیفیت گوشت مانند رنگ، طعم، ترکیب اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه و پایداری اکسیداتیو تأثیر می گذارد. محققان نشان دادند که افزودن ۳ و ۴ درصد *Spirulina* به طور قابل توجهی محتوای اسید اولئیک، اسید پالمیتیک، اسید دوکوزاهگزانوئیک و اسید لینولئیک را در لاشه جوجه های گوشتی افزایش می دهد (Holman & Malau-Aduli, 2013). علاوه بر این، در طول دوره نگهداری ۳۰ روزه، افزودن ۴٪ *Spirulina* به طور قابل توجهی میزان پراکسید را کاهش داد. برای مدت نگهداری ۶۰ روزه، هر دو تیمار *Spirulina* به طور قابل توجهی شاخص های اکسیداسیون نیتروژن کل فرار (TVN) و اسید تیوباریتوریک (TBA) را کاهش دادند (Abed, Nowruz, & Anvar, 2025).

علاوه بر آن رنگ گوشت با گنجانیدن *Spirulina* در دوزهای بالا در خوراک، بهبود یافت که ممکن است به دلیل سطح بالای کاروتنوئیدها باشد. محققان دریافتند که وقتی *Spirulina* جایگزین ۵۰ درصد پروتئین سویا در

جیره جوجه های گوشتی شود، رنگ گوشت را می توان افزایش داد تا گوشت قرمز مایل به زرد تیره شود (Elbaz et al., 2022). تغذیه جوجه های گوشتی با *Spirulina* ۱۵ درصد، کاروتنوئیدهای کل و اسیدهای چرب اشباع شده را افزایش داد اما سطوح اسیدهای چرب غیراشباع n-3 و α -tocopherol کاهش یافت. با این وجود، محققان دیگر متوجه شدند که کیفیت سینه گوشت جوجه های گوشتی تغذیه شده با جیره های *Spirulina* (۰٫۲۵، ۰٫۵، ۰٫۷۵ یا ۱ درصد) به مدت ۳۵ روز به طور قابل ملاحظه ای تغییر نکرد (Sugiharto, Yudiarti, Isroli, & Widiastuti, 2018).

اثرات ضد بیماری زایی *S. platensis*

تغذیه با *Spirulina* منجر به درمان طیف گسترده ای از ویروس های آنفلوآنزا شد و از تشکیل پلاک های ویروسی ممانعت کرد. گزارش شده است که یک پلی ساکارید درون سلولی غنی از کلسیم به نام اسپیرولان موجود در *S. platensis* با جلوگیری از ورود ویروس به سلول های میزبان مختلف مورد استفاده، از تکثیر چندین ویروس در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می کند، سنتز نیتریک اکسید ماکروفاژ را افزایش می دهد و تولید سیتوکین را تحریک می کند (Abd El-Hady, Elghalid, Elnaggar, & Abd El-khalek, 2022). مرغ های گوشتی آلوده به ویروس آنفلوآنزای پرندگان H5N1 دچار نکروز قلبی شدند، اگرچه ۲۰ درصد از *Spirulina* هیچ اثر قابل تشخیصی در این مورد نداشت. با این حال، لکوسیت های مرتبط با عملکرد ایمنی را تقویت کرد که از مرگ و میر در مقابل ۳۰ درصد مرگ در گروه بدون مکمل جلوگیری کرد. در مورد بیماری نیوکاسل، اکثر تحقیقات نشان دادند که *Spirulina* بر چالش ویروسی در پرندگانی که واکسن های زنده، ضعیف و/یا غیرفعال دریافت کرده بودند، تأثیر داشت.



در نتیجه، اثر مکمل *Spirulina* به عنوان یک اثر محرک سیستم ایمنی دیده شد که به طور چشمگیری محافظت بالینی را برعهده داشت (Fathi, 2018).

سیانوباکتری ها را می توان منبع مناسبی برای تولید عوامل ضد میکروبی در نظر گرفت زیرا ترکیب ضد میکروبی خالص تولید شده توسط *S. platensis* در برابر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و *C. albicans*، به اثبات رسیده است (ANVAR & Nowruzi, 2022). عصاره های آلی و آبی *S. platensis* در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفتند و اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی وسیع الطیف را نشان دادند. نشان داد که بیشترین فعالیت بیولوژیکی آنها علیه اشیشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و اسپرزیلوس نایجر بود (Alibabai, Khajeh-Rahimi, & Nowruzi, 2023).

در مقایسه با اتانولی یا عصاره های آبی، عصاره متانولی فعالیت ضد باکتریایی برتری را در برابر همه سویه های باکتریایی آزمایش شده (باکتری های گرم مثبت، باکتری های گرم منفی و سویه کاندیدا)، به ویژه در برابر باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوک پنومونیه، باسیلوس سرئوس و انتروکوکوس فکاليس) از خود نشان داد. برای سویه های مختلف مورد بررسی، کمترین مقدار غلظت بازدارندگی اتانول و عصاره متانولی بین ۱۰۰-۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. به طور مشابه، در مقایسه با سایر عصاره ها، عصاره متانولی *Spirulina* محتوای فنلی کل بیشتری و فعالیت ضد باکتریایی بیشتری را نشان داد (Hajati & Zaghari, 2019).

اثر بخشی مکمل *S. platensis* در موارد بیماری های عفونی مختلف در طیور

پرندگانی که با جلبک تغذیه می شوند، ۲/۳ برابر بیشتر از پرندگانی که با جیره شاهد تغذیه می شوند، اوو سیست می ریزند. گنجاندن جلبک اثری بر سرعت رشد نداشت و از پرندگانی که با ایمریا تزریق شده بودند در برابر تغییراتی که ایمریا در سلول های T طحال ایجاد کرد محافظت نکرد. با این حال، جلبک ها به طور قابل توجهی از ارتفاع پرزهای روده در اوایل ۷ روز پس از عفونت محافظت کردند و یکپارچگی روده را در طول کوکسیدیوز حفظ کردند. برای واکسیناسیون از واکسن X10 - Coccivac B52 به صورت خوراکی در ۱۴ روزگی طیور استفاده شد (El-Shall et al., 2023). علاوه بر آن دانشمندان گزارش کردند که حداقل غلظت مهاري (MIC) عصاره متانولی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و *E. coli* به ترتیب ۱۲۸ گرم در میلی لیتر و ۲۵۶ گرم در میلی لیتر بود، در حالی که تأثیری بر کلبسیلا پنومونیه نداشت. با این وجود، عصاره استون *Spirulina* فعالیت بیولوژیکی قوی در برابر کلبسیلا پنومونیه و فعالیت متوسطی در برابر سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. با استفاده از عصاره اتانولی *S. platensis*، بازدارندگی قابل توجهی را علیه انتروکوکوس فکاليس و کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش انتشار دیسک نشان داد (Alwaleed, El-Sheekh, Abdel-Daim, & Saber, 2021). اثربخشی اثرات ضد باکتریایی *Spirulina* در داخل بدن ارزیابی شد و از آنجایی که افزودن ۱ و ۲ گرم *Spirulina* به ازای هر کیلوگرم رژیم غذایی به طور قابل توجهی عملکرد رشد، سطوح آنتی اکسیدانی و تولید سیتوکین ضد التهابی (IL-) 10 را افزایش میدهد. پاتوژن ها از مکانیسم های چسبندگی و تهاجم یکسانی برای حمله به روده افراد و حیوانات استفاده می کنند و عملکرد ضد باکتریایی *Spirulina* را می توان به توانایی آن در جلوگیری از



تحرك پاتوژن، تهاجم، تشكيل بيوفيلم و سنجش حد نصاب نسبت داد (Ahmadi, Anvar, Nowruzi, & Golestan, 2024). علاوه بر اين، مواد زيست فعال *Spirulina* نشان داده است كه ديواره سلولي باكتري را ضعيف مي كند و آن را نفوذپذيرتر مي كند، كه متعاقباً منجر به نشت محتويات سيتوپلاسمي مي شود. علاوه بر اين، زماني كه جوجه هاي گوشتي، واكسن X ۱۰ Coccivac-B52 را به صورت خوراكي در حالي كه با اجزاي خوراك مشتق شده از ريز جلبك ها تغذيه مي كردند، دريافت كردند، يکپارچگي روده پرندگان در طول كوكسيديوز حفظ شد و ارتفاع پرز روده تا ۷ روز پس از چالش محافظت شد (Abd El-Hady et al., 2022).

Spirulina همچنين يک اتصال دهنده قوي براي آفلاتوكسين ها در پرورش دهندگان جوجه هاي گوشتي است. اثر منفي ۳۰۰ ppb آفلاتوكسين بر سرعت رشد جوجه هاي گوشتي و وزن اندام هاي لنفاوي ممكن است تا حدي با افزودن *Spirulina* در سطح (۰/۰۵ درصد) کاهش يابد، اگرچه هيچ تاثير مثبتي بر مصرف خوراك، غلظت پروتئين سرم و وزن كبد، يا سطح كلسترول وجود نداشت. به همين ترتيب، گنجاندن *Spirulina* (۰/۰۲ درصد) در خوراك، تاثير مثبتي بر رشد و پاسخ ايمني سلولي در جوجه هاي تغذيه شده با آفلاتوكسين (۳۰۰ ppb) داشت. بنابر اين گنجاندن رژيم غذايي *Spirulina* براي محافظت در برابر ساير سموم توصيه مي شود (Qureshi, Kidd, & Ali, 1996).

اثرات *Spirulina* بر كمبودهاي تغذيه اي

Spirulina يک جزء پروتئيني جايگزين است كه توليد كنندگان به دليل ارزش غذايي زياد و ظرفيت آن در تقويت سيستم ايمني بدن همواره در نظر دارند. به عنوان مثال، افزودن *Spirulina* به جيره هاي مرغ كم

پروتئين، منجر به کاهش التهاب سيستميك شد كه نشان دهنده مناسب بودن آن به عنوان يک منبع پروتئين جايگزين است (Jamil, Akanda, Rahman, Hossain, & Islam, 2015). به عنوان مثال، افزودن *Spirulina* به جيره هاي مرغ كم پروتئين، منجر به کاهش التهاب سيستميك شد كه نشان دهنده مناسب بودن آن به عنوان يک منبع پروتئين جايگزين است (Jamil, Akanda, Rahman, Hossain, & Islam, 2015). مکمل غذايي *S. platensis* در مرغ هاي گوشتي، اثرات نامطلوب دماي بالاي محيط از جمله اختلال در سيستم آنتي اكسيداني آنزيمي، افزايش هورمون استرس و تغيير پروفایل ليپيدي را کاهش مي دهد (Nowruzi, et al., 2022). هنگامي كه به جوجه هاي تحت تنش گرمائي، *Spirulina* در آب آشاميدني يا خوراك داده شد، يک تغيير وابسته به دوز در پارامترهاي بهره وري، فزيولوژيكي و ايمني به وجود آمد. علاوه بر اين، تغذيه با *S. platensis* توانايي مرغ هاي گوشتي را براي تحمل گرما در روزهاي آخر بهبود بخشيد (Al-Khalaifah, Al-Nasser, & Surrayai, 2022) (جدول يک).

محدوديت استفاده از ريز جلبکها به عنوان مکمل غذايي طیور

طبق نظرات مصرف کنندگان، *Spirulina* علاوه بر تغيير كيفيت محصول، به ويژه رنگ گوشت، و همچنين بر عملکرد توليد مرغ و ماهي تاثير منفي گذاشت. يکي از چالش هاي عمده در مورد استفاده از *Spirulina* به عنوان افزودني خوراك اين است كه ژله اي شدن پروتئين هاي غير قابل هضم آن باعث مي شود پرندگان به دليل افزايش ويسکوزيته گوارشي عملکرد بدتري داشته باشند. به همين دليل ميزان استاندارد افزودن *Spirulina* در فراورده هاي گوشتي بايد همواره چك شود.



جدول ۱. بررسی اثرات ریز جلبکها در موارد کمبودهای تغذیه‌ای طیور (El-Shall et al., 2023)

جلبک/دوز	مسیر تجویز / مدت	پرنده ها	نقص تغذیه ای یا مدیریتی	نتایج اصلی
رژیم غذایی کم پروتئین (Low crude protein)				
۰/۱ گرم بر کیلوگرم <i>S. platensis</i>	تغذیه / ۱۴ - ۳۷ روزگی	جوجه های گوشتی نر راس ۷۰۸	۱۷ درصد رژیم غذایی کم پروتئین در مقایسه با رژیم غذایی پایه (۲۱٪) / در روزهای ۱۴ تا ۳۷ روزگی	رژیم LCP-SP اثرات رژیم غذایی کم پروتئین را کاهش داد و در نتیجه سطوح و نسبت مونوسیت ها مشابه با رژیم غذایی کنترل بود.
۱۰٪ <i>S. platensis</i>	تغذیه / روز پانزدهم - روز سی و پنجم	جوجه های گوشتی ماده راس ۷۰۸	۱۷ درصد رژیم غذایی کم پروتئین در مقایسه با رژیم غذایی پایه (۲۰٪) / در روزهای ۱۵ تا ۳۵ روزگی	جوجه های گوشتی که در جیره های خود با SP تغذیه می شوند، افزایش وزن بدنشان به میزان قابل توجهی کاهش یافت
مایکوتوکسین ها و سایر سموم				
۰/۰۲ درصد <i>S. platensis</i>	تغذیه / روز دهم - چهارم و پنجمین روز	جوجه های گوشتی تجاری	آفلاتوکسین (۳۰۰ ppb) روز دهم تا ۴۵ روزگی	SP تغذیه شده به جوجه هایی که در معرض آفلاتوکسین قرار گرفته بودند دارای مزایای مثبتی بر روی رشد آنها و پاسخ ایمنی سلولی بود، اما SP هیچ تاثیری بر وزن کبد، قلو، طحال یا چربی شکم نداشت.
۰/۰۵ درصد <i>S. platensis</i>	تغذیه / روز هشتم - ۴۲ روز	جوجه های گوشتی تجاری	آفلاتوکسین (۰/۳ ppb) روز دهم تا ۴۵ روزگی	SP کمی اثرات نامطلوب آفلاتوکسین را بر افزایش وزن بدن و وزن تیموس و طحال کاهش داد، اما اثرات آن را بر وزن کبد و کلیه، پروتئین های سرم یا کلسترول کاهش نداد.
۰/۱ درصد <i>S. platensis</i>	برای سه دوره ۲۱ روزه	مرغ مادر گوشتی	آفلاتوکسین ۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ ppb برای سه دوره، هر دوره با مدت زمان سه هفته در پرورش دهندگان جوجه های گوشتی از سن ۲۸ تا ۳۶ هفتگی.	SP وزن کبد یا کلیه، یا سنگدان را در گروه هایی که به تنهایی یا همراه با مقادیر مختلف AF تغذیه می شدند، تغییر نداد.
<i>S. platensis</i> در ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم در لیتر	<i>S. platensis</i> در ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم در لیتر	جوجه اردک نر	تری اکسید آرسنیک: ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آب آشامیدنی روزانه به مدت ۹۰ روز	کاهش تعداد کل گلبول های قرمز، هموگلوبین و PCV در گروه های تحت درمان با آرسنیک به علاوه SP کمتر از گروه های تحت درمان با آرسنیک بود.
<i>S. platensis</i> در دوز (۱۰ گرم بر کیلوگرم رژیم غذایی)	در رژیم غذایی به مدت دو هفته پس از درمان یا قبل از درمان	جوجه های گوشتی	اثر هیپاتوتوکسیک دیکلوفناک سدیم: ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک در روز ۲۱	در گروه های پیشگیری و درمان، میزان مرگ و میر از ۶۴ درصد در پرندگان شاهد به ترتیب به ۸ درصد و ۳۲ درصد کاهش یافت.
درمان پیشگیرانه باعث بهبود پارامترهای پایین هماتولوژیک، گلبول های سفید، تعداد لنفوسیت ها، انوزیتوفیل و مونوسیت ها و همچنین کاهش AST، ALP، اسید اوریک و کلسترول و همچنین استرس اکسیداتیو بهتر از گروه درمانی شد.				
استرس گرمایی				



مروری بر اثر مکمل غذایی ریز جلبکها بر رشد و ایمنی طیور... (نوروزی و همکاران) ۱۱.

<i>S. platensis</i> در جیره ۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵	از هفته چهارم تا هفته چهاردهم تغذیه	جوجه محلی سویه مصری Gimizah (سن ۴ هفته)	شرایط استرس گرمایی مزمن (۱ ± ۳۸ درجه سانتیگراد)	بدون تأثیر بر افزایش وزن بدن، غلظت‌های مختلف <i>Spirulina</i> به طور چشمگیری اثرات منفی استرس گرمایی بر مصرف خوراک، سیستم ایمنی، کل چربی‌ها، LDL، WBCs، RBCs، آلبومین، گلوبولین، کراتینین و آنزیم‌های کبدی ALT، AST را کاهش داد.
<i>S. platensis</i> در ۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵	از روز ۱۷ تا ۴۵ روزگی تغذیه کنید	جوجه های گوشتی	استرس گرمایی (۳۶ درجه سانتیگراد برای ۶ ساعت در روز) از سن ۳۸ تا ۴۴ روزگی	مکمل <i>Spirulina</i> پاسخ ایمنی هومورال و وضعیت آنتی اکسیدانی را افزایش داد در حالی که غلظت هورمون استرس و چندین نشانگر لیپیدی سرم را کاهش داد. با این حال، تأثیر قابل توجهی بر ویژگی های عملکردی نداشت.
<i>S. platensis</i> در ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵ و ۰،۰۱	به مدت ۶ هفته تغذیه	بلدرچین تخمگذار ژاپنی (۹۸ روزه)	استرس گرمایی (۸ ساعت از ۱ ± ۳۴ درجه سانتیگراد؛ ۶۰-۷۰٪ RH) به مدت ۶ روز	غلظت‌های مختلف <i>Spirulina</i> تأثیر قابل توجهی بر مصرف خوراک، وزن تخم مرغ و درصد تولید روزانه تخم مرغ نداشت. کمترین تعداد <i>E. coli</i> ، نسبت MDA خون، هتروفیل و نسبت H/L به طور قابل توجهی توسط SP در ۰،۵٪ به دست آمد.
<i>S. platensis</i> در ۱ و ۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵ درصد	از روز ۲۱ تا ۴۲ روزگی تغذیه کنید	جوجه های گوشتی	استرس گرمایی (۳۴ ± ۱ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت در روز)	SP سطح هموگلوبین، هماتوکریت و HDL را افزایش داد و سطح پراکسیداسیون LDL و لیپیدی را در مقایسه با گروه بدون مکمل به طور قابل توجهی کاهش داد.
<i>S. platensis</i> در ۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵ و ۰،۰۱ گرم در لیتر	آب آشامیدنی/صبح (۰۰:۰۶ تا ۰۰:۱۲) بعد از ظهر) به مدت ۶ هفته	جوجه های گوشتی سفید	این آزمایش در طول ماه های گرم و مرطوب تابستان (به مدت ۶ هفته) انجام شد.	این نه تأثیر منفی و نه مثبت بر عملکرد جوجه‌های گوشتی داشت، اما تأثیر قابل توجهی بر Hb، گلوبول‌های قرمز و رنگدانه ساق پا داشت. SP به میزان ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر باعث افزایش غلظت پروتئین خون و کاهش محتوای چربی سرم و ترانس آمینازها شد.
<i>S. platensis</i> در سطوح ۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵ و ۰،۰۱ گرم در لیتر	۰،۵ و ۰،۳ و ۰،۱ و ۰،۰۵ گرم در لیتر <i>Spirulina</i> به صورت جداگانه و در ترکیب با نانوذرات سلنیوم (SeNPs) در غلظت های ۰،۰۱ و ۰،۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم	به مدت ۵ هفته تغذیه کنید	جوجه های گوشتی راس ۳۰۸	به لطف ترکیبات SP و SeNPs، بهبودهای قابل توجهی در عملکرد رشد، پروفایل لیپید خون، پوشش لاشه و درصد بازده لاشه ایجاد شد.

چالش عمده دیگر در مورد استفاده از *Spirulina* به عنوان افزودنی خوراک، هزینه بسیار بالاتر آن در مقایسه با سایر مواد پروتئینی مانند کنجاله سویا است. با این حال، با بهبود کارایی تولید، *Spirulina* می‌تواند به دلیل هزینه بالاتر پودر ماهی، جایگزین پودر ماهی شود (Al-Khalaifah et al., 2022). دومین چالش عمده با

Spirulina محدودیت تولید در مقیاس بزرگ آن است زیرا در حال حاضر در مقیاس کوچکتر عمدتاً برای بخش مکمل های غذایی با استثنائات اندک تولید می شود. چالش سوم، تولید پایدار *Spirulina* در مقایسه با سایر مواد پروتئینی مانند سویا است که عمدتاً به حساسیت *Spirulina* به سیستم تولید و آب و هوای



- mykiss biosensor based on polyvinyl alcohol/chitosan nanocomposite using phycocyanin during refrigerated storage. Scientific reports, 15(1), 703.
3. Abouelezz, F. (2017). Evaluation of spirulina algae (*Spirulina platensis*) as a feed supplement for japanese quail: nutritritional effects on growth performance, egg production, egg quality, blood metabolites, sperm-egg penetration and fertility. Egyptian Poultry Science Journal, 37(3), 707-719.
 4. Ahmadi, A., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Golestan, L. (2024). Effect of phycocyanin and phycoerythrin on antioxidant and antimicrobial activity of refrigerated low-fat yogurt and cream cheese. Scientific reports, 14(1), 27661.
 5. Al-Batshan, H. A., Al-Mufarrej, S. I., Al-Homaidan, A. A., & Qureshi, M. (2001). Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. Immunopharmacology and immunotoxicology, 23(2), 281-289.
 6. Al-Khalaifah, H. S., Al-Nasser, A., & Surayai, T. (2022). Effects from dietary addition of sargassum sp., spirulina sp., or gracilaria sp. powder on immune status in broiler chickens. Frontiers in Veterinary Science, 9, 928235.
 7. Alaql, A. A., & Abbas, A. O. (2023). The effects of dietary *Spirulina platensis* on physiological responses of broiler chickens exposed to endotoxin stress. Animals, 13(3), 363.
 8. Alibabai, M., Khajeh-Rahimi, A.-E., & Nowruzi, B. (2023). A review of recent developments in the use of cyanobacteria and microalgae in improving the quality and increasing the shelf life of seafood products.
 9. Alwaleed, E. A., El-Sheekh, M., Abdel-Daim, M. M., & Saber, H. (2021). Effects of *Spirulina platensis* and *Amphora coffeaeformis* as dietary supplements on blood biochemical parameters, intestinal microbial population, and productive performance in broiler chickens.

منطقه نسبت داده می شود. بنابراین برای بهبود عملکرد *Spirulina* و پایدارتر کردن تولید آن به تحقیقات و توسعه جدی نیاز است. برای مثال برخی از ابتکارات تحقیقاتی با هدف بهبود پایداری تولید با استفاده از پساب بیوگاز یا فاضلاب به عنوان منبع تولید باید انجام گردد. علاوه بر این، تکنیک‌های پیشرفته نیز می‌توانند بهبود عملکرد و کیفیت پروتئین *Spirulina* را از طریق پرورش تسهیل کنند و در نهایت، اگرچه *Spirulina* نسبت بالایی از پروتئین خام دارد، بهبود کیفیت پروتئین می‌تواند از طریق تحقیقات اصلاحی و تغذیه/تولید امکان‌پذیر باشد. بنابراین، تحقیقات آتی با تمرکز بر تولید پایدار و پردازش و پذیرش محصول، باید مبادلات ترکیب *Spirulina* در جیره طیور را بررسی کند (Jamil et al., 2015).

نتیجه گیری

متابولیت‌های زیست فعال موجود در ریز جلبک‌ها به وفور یافت می‌شوند و به دلیل خواص دارویی خود مورد استفاده قرار می‌گیرند. محصولات طبیعی مستخرج از ریز جلبک‌ها بسیار مغذی و آنتی اکسیدانی هستند و توانایی بهبود عملکرد تولید را در رشد، جوجه ریزی و یا تولید تخم دارند. فعالیت‌های ضد میکروبی ریز جلبک‌ها باعث افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، بهبود بقا و نرخ رشد در ریز جلبک‌ها می‌شود. با این حال، مطالعات بیشتر در مورد دوز بهینه ریز جلبک‌ها برای گونه‌های مختلف طیور در سنین مختلف مورد نیاز است.

منابع

1. Abd El-Hady, A. M., Elghalid, O. A., Elnaggar, A. S., & Abd El-khalek, E. (2022). Growth performance and physiological status evaluation of *Spirulina platensis* algae supplementation in broiler chicken diet. Livestock Science, 263, 105009.
2. Abed, S., Nowruzi, B., & Anvar, S. A. A. (2025). Production of *Oncorhynchus*



- alginolyticus in shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 55, 690-698.
18. El-Shall, N. A., Jiang, S., Farag, M. R., Azzam, M., Al-Abdullatif, A. A., Alhotan, R., . . . Alagawany, M. (2023). Potential of *Spirulina platensis* as a feed supplement for poultry to enhance growth performance and immune modulation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1072787.
19. Elbaz, A. M., Ahmed, A. M., Abdel-Maqsoud, A., Badran, A. M., & Abdel-Moneim, A.-M. E. (2022). Potential ameliorative role of *Spirulina platensis* in powdered or extract forms against cyclic heat stress in broiler chickens. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(30), 45578-45588.
20. Fathi, M. A. (2018). Effect of dietary supplementation of algae meal (*Spirulina platensis*) as growth promoter on performance of broiler chickens. *Egyptian Poultry Science Journal*, 38(2), 375-389.
21. Hajati, H., & Zaghari, M. (2019). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance, carcass characteristics, egg traits and immunity response of Japanese quails. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(2), 347-357.
22. Holman, B., & Malau-Aduli, A. (2013). *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(4), 615-623.
23. Iry, N., Nowruzi, B., & Ghazi, S. (2023). Study of the effect of phycocyanin pigment on physicochemical, sensory, microbial and antioxidant properties of cheese. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 12(1), 55-76.
24. Jamil, A. R., Akanda, M. R., Rahman, M. M., Hossain, M. A., & Islam, M. S. (2015). Prebiotic competence of *Spirulina* on the production performance of broiler chickens.
25. Kaoud, H. A. (2015). Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. *specialty Environmental Science and Pollution Research*, 28, 1801-1811.
10. Anvar, A., & Nowruzi, B. (2021). Bioactive properties of spirulina: A review. *Microb. Bioact*, 4, 134-142.
11. Anvar, S., & Nowruzi, B. (2022). A review of microalgae as dietary and medicinal useful complements.
12. Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Afshari, G. (2023). A review of the application of nanoparticles biosynthesized by microalgae and cyanobacteria in medical and veterinary sciences.
13. Behjati, M., Ataee, M., Nowruzi, B., Anvar, S. A. A., & Ahari, H. (2025). STUDYING THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHYCOERYTHRIN TO INCREASE THE SHELF LIFE OF HAMBURGERS AT REFRIGERATOR TEMPERATURE. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 14(5), e11625-e11625.
14. Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Nikolakakis, I., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2016). *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46(1), 94-102.
15. Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. d. A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Branco, I. G., & Haminiuk, C. W. I. (2022). Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100134.
16. Chamari, M., Anvar, S. A. A., Pourahmad, R., Nowruzi, B., & Yousefi, S. (2024). Study of alginate-encapsulated phycoerythrin in promoting the biological activity of synbiotic ice cream with *Lactobacillus casei*. *Scientific reports*, 14(1), 15471.
17. Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., Tayag, C. M., Li, H.-F., Putra, D. F., Kuo, Y.-H., . . . Chang, Y.-H. (2016). *Spirulina* elicits the activation of innate immunity and increases resistance against *Vibrio*



- Microalgae. Journal of Biosafety, 16(3), 99-124.
33. Nowruzi, B., & Beiranvand, H. (2024a). A review of medical applications of cyanobacteria. Journal of Isfahan Medical School, 42(755), 69-83.
 34. Nowruzi, B., & Beiranvand, H. (2024b). A review of medical applications of cyanobacteria. Journal of Isfahan Medical School.
 35. Nowruzi, B., Jafari, M., Babaie, S., Motamedi, A., & Anvar, A. (2020). Spirulina: A healthy green sun with bioactive properties. Journal of Microbial World, 13(4), 322-348.
 36. Qureshi, M., Kidd, M., & Ali, R. (1996). Spirulina platensis extract enhances chicken macrophage functions after in vitro exposure. Journal of Nutritional Immunology, 3(4), 35-45.
 37. Satyaraj, E., Reynolds, A., Engler, R., Labuda, J., & Sun, P. (2021). Supplementation of diets with spirulina influences immune and gut function in dogs. Frontiers in Nutrition, 8, 667072.
 38. Selim, S., Hussein, E., & Abou-Elkhair, R. (2018). Effect of Spirulina platensis as a feed additive on laying performance, egg quality and hepatoprotective activity of laying hens. European Poultry Science, 82, 1-13.
 39. Seyidoglu, N., Inan, S., & Aydin, C. (2017). A prominent superfood: Spirulina platensis. Superfood and functional food the development of superfoods and their roles as medicine, 22, 1-27.
 40. Shafaei Bajestani, M., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Golestan, L. (2000). Production of Cheese and Ice Cream Enriched With Biomass and Supernatant of Spirulina platensis With Emphasis on Organoleptic and Nutritional Properties. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 18(2), 263-278.
 41. Shanmugapriya, B., Babu, S. S., Hariharan, T., Sivanewaran, S., & Anusha, M. (2015). Dietary administration of Spirulina platensis as journal of biological sciences, 1(2-2015), 1-6.
 26. Kashi, M. S., Ghazi, S., & Nowruzi, B. (2024). Industrial application of Natural Phycocyanin Edible Pigment isolated from Spirulina platensis in Preparation of fortified ice cream with emphasize on microbial and antioxidant properties. Iranian journal of food science and industry, 21(149).
 27. Khan, S., Mobashar, M., Mahsood, F. K., Javaid, S., Abdel-Wareth, A., Ammanullah, H., & Mahmood, A. (2020). Spirulina inclusion levels in a broiler ration: evaluation of growth performance, gut integrity, and immunity. Tropical Animal Health and Production, 52, 3233-3240.
 28. Kharde, S., Shirbhate, R., Bahiram, K., & Nipane, S. (2012). Effect of Spirulina supplementation on growth performance of broilers. Indian Journal of Veterinary Research (The), 21(1), 66-69.
 29. Mirzaie, S., Zirak-Khattab, F., Hosseini, S. A., & Donyaei-Darian, H. (2018). Effects of dietary Spirulina on antioxidant status, lipid profile, immune response and performance characteristics of broiler chickens reared under high ambient temperature. Asian-Australasian journal of animal sciences, 31(4), 556.
 30. Mohammad Shirazi, R. H. S., Tala, M., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., Saeidi, Z., & Negahban, M. (2021). Investigating Nitrate and Nitrite Concentrations in Drinking Water of Five Districts in Tehran and Assessing the Presence of Nitrate Reducing Bacteria. Journal of Chemical Health Risks, 11(3).
 31. Nowruzi, B. (2024). Industrial application of Natural Phycocyanin Edible Pigment isolated from Spirulina platensis in Preparation of fortified ice cream with emphasize on microbial and antioxidant properties. Journal of food science and technology (Iran), 21(149), 54-80.
 32. Nowruzi, B., & Bagheri, F. (2023). An Overview of the Probiotics, Prebiotics, and Metabiotics Functions of



- chicks. South African Journal of Animal Science, 48(1), 98-107.
43. Valikboni, S. Q., Anvar, S. A. A., & Nowruzi, B. (2024). Study of the effect of phycocyanin powder on physicochemical characteristics of probiotic acidified feta-type cheese during refrigerated storage. Nutrire, 49(2), 41.
- probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. Int. J. Recent Sci. Res, 6(2), 2650-2653.
42. Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., & Widiastuti, E. (2018). Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler

A review on the effect of microalgae dietary supplement on the growth and poultry immunity

S Bahareh Nowruzi^{1*} Tahereh Taghizadeh Ashrafi²

¹Associate professor, Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Food Hygiene, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 13 August 2024

Accepted: 11 June 2025

Abstract

Today, increasing drug resistance against various pathogens is a significant threat in the poultry industry. Meanwhile, microalgae are considered as food supplements for humans, animals, poultry and aquatic animals, which contain protein, vitamins, minerals, fatty acids, pigments and essential amino acids. In addition, they contain significant amounts of unique natural antioxidants, including polyphenols, carotenoids, and phycocyanin. Spirulina food supplement can have a beneficial effect on the intestinal microbial population, serum biochemical parameters, and growth performance of chickens, because it contains polyphenolic contents that have antibacterial effects and prevent bacterial motility, invasion, and biofilm formation. In addition, they play an important role in killing bacteria by directly affecting bacteria by weakening and making the cell walls more porous, resulting in the leakage of cytoplasmic content. Since microalgae have potential antiviral activities against some common human or animal viruses, they can also be effective against bird viruses. In this review article, the immunological effects of cyanobacteria as supplementary feed in poultry to increase growth, intestinal health and disease resistance will be investigated.

Keywords: antimicrobial activity, antiviral, nutrition, microalgae, poultry

* Corresponding Author: Bahareh Nowruzi

Address: Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Email: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir



بررسی ارتباط بین ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و بروز مقاومت به انسولین، یک مرور مکانیسمی

بهینا فروزانمهر^۱، محمدامین همتی^۱، مجید اسلامی^۲، حبیب یاری بیگی^{۳*}

۱ - کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲ - مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳ - گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴ - مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

چکیده

بیماری دیابت شایع‌ترین بیماری متابولیک در انسان است. این بیماری مزمن با بسیاری از موارد مرگ‌ومیر یا ناتوانی و کاهش کیفیت زندگی در انسان ارتباط مستقیم دارد و علیرغم تلاش‌های صورت گرفته شیوع آن همچنان رو به افزایش است. مطالعات نشان می‌دهند که دیابت از عوامل خطر اصلی بروز بیماری‌های قلبی عروقی است و افزایش شیوع آن مستقیماً موجب افزایش احتمال بروز این بیماری‌ها می‌گردد. بنابراین تحقیقات گسترده‌ای در خصوص زمینه‌های بروز این بیماری در سراسر جهان صورت گرفته است. در کنار فاکتورهایی همچون چاقی و کم تحرکی، مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب میکروبیوم روده ممکن است به تولید عوامل التهابی یا ضد التهابی کمک کند که می‌توانند به تنظیم عملکرد انسولین و سطح قند خون کمک کنند. در نتیجه، تغییرات در ترکیب میکروبیوم روده می‌توانند مستقیماً به تغییرات در سیگنالینگ انسولین و سطح قند خون منجر شده و زمینه‌ساز بروز دیابت می‌گردد. میکروبیوتای روده‌ای یک ترکیب پیچیده از میکروارگانیسم‌های ساکن در روده انسان است که فعالیت‌های فیزیولوژیک بسیاری را انجام می‌دهند. اما شواهد نشان می‌دهند که در بیماران دیابتی ترکیب میکروبیوم روده‌ای ممکن است با تغییراتی همراه باشد که می‌تواند به توازن متابولیک بدن و ایجاد مقاومت به انسولین کمک کند؛ بنابراین تغییر در ترکیب این فلور طبیعی می‌تواند موجب تغییر متابولیسم و بروز دیابت گردد. گرچه هنوز مکانیسم‌های میانجی به‌خوبی شناسایی نشده‌اند. بنابراین در مطالعه مروری حاضر برخی شواهد مربوط به نقش میکروبیوتای روده‌ای در بروز دیابت ارائه شده و مکانیسم‌های واسطه معرفی شده‌اند. از این مقاله نتیجه‌گیری شد که هر عاملی که منجر به تغییر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای گردد می‌تواند از مسیرهای مختلف معرفی شده زمینه‌ساز بروز دیابت باشد.

کلمات کلیدی: دیابت، مقاومت به انسولین، میکروبیوتای روده، التهاب، اکسیداسیون اسید چرب

*نویسنده مسئول: حبیب یاری بیگی

آدرس: مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

پست الکترونیک: habib.yari@yahoo.com

مقدمه

بیماری دیابت شیرین (Diabetes Mellitus: DM) شایع-ترین بیماری متابولیک در انسان بوده که با بروز اختلال در ترشح انسولین و یا نقص در پاسخ محیطی به آن بروز می کند (Galicia-Garcia et al., 2020, Banday et al., 2020). این بیماری مزمن با ایجاد اختلال در مسیرهای متابولیکی فیزیولوژیک در متابولیسم کربوهیدرات ها و لیپیدها موجب القای مسیرهای پاتولوژیک مانند مسیر هگروزآمین یا مسیر پلی اول می گردد (Banday et al., 2021, Ohiagu et al., 2020). در نتیجه القای این مسیرها مواد جانبی آسیب رسان مانند رادیکال های آزاد فراوان تولید شده که منشا بروز اختلال در عملکرد سلولی و بافتی در بسیاری بافت های بدن می باشد (Yaribeygi et al., 2021, Maruhashi and Higashi, 2020a). در واقع دیابت شیرین کنترل نشده عامل بروز یک سری وسیع از اختلالات تحت عنوان مشکلات دیابتی (diabetic complications) می باشد (Cole and Florez, 2020). در حال حاضر حدود ۵۵۰ میلیون فرد دیابتی در جهان وجود دارد و تخمین زده شده است که این میزان تا ۱۰ سال آینده حدوداً دوبرابر می گردد (Gregory et al., 2022, Lovic, 2022, Sun et al., 2022). همچنین بسیاری از موارد مرگ و میر در انسان به طور مستقیم یا غیرمستقیم ناشی از دیابت کنترل نشده می باشد (Sun et al., 2022, Smokovski and Smokovski, 2021, Gregory et al., 2022). در ایران شیوع این بیماری حدود ۱۵٪ می باشد که روند آن همچنان هم رو به افزایش است (Khamseh et al., 2021).

بیماری DM معمولاً به سه دسته اصلی شامل نوع ۱، نوع ۲ و دیابت بارداری طبقه بندی می شود (Genuth et al., 2021). دیابت نوع ۱ (T1DM) یا دیابت شیرین وابسته به

انسولین (IDDM) عمدتاً به دلیل کاهش انسولین گردش خون ناشی از نارسایی سلول های بتای پانکراس می باشد (Genuth et al., 2021). دیابت نوع ۲ (T2DM) یا دیابت شیرین غیروابسته به انسولین (NIDDM) که شایع ترین شکل DM است و حدود ۹۵٪ از کل موارد دیابت را شامل می شود، به مقاومت به انسولین در بافت های محیطی مربوط می گردد (Genuth et al., 2021). دیابت بارداری شکل دیگری از دیابت است که احتمالاً به دلیل تغییرات هورمونی در زنان باردار ایجاد می شود (Genuth et al., 2021). همچنین، اشکال دیگری از DM با شیوع کمتر مانند LADA^۱ (دیابت خودایمنی نهفته در بزرگسالان)، دیابت با شروع بلوغ جوانان (MODY^۲)، دیابت ثانویه به شرایط مختلف مانند پانکراتیت و دیابت ثانویه به برخی داروها مانند کورتیکواستروئیدها وجود دارد (Yaribeygi et al., 2020b).

همان طور که توضیح داده شد، T2DM رایج ترین شکل دیابت است و ارتباط نزدیکی با نقص در سیگنالینگ سلولی هورمون انسولین و مقاومت به انسولین در بافت های محیطی دارد (Yaribeygi et al., 2020b). مقاومت به انسولین در واقع بروز اختلال در کارکرد هورمون متابولیکی انسولین در بافت های محیطی می باشد (Yaribeygi et al., 2019). گرچه علت اصلی بروز مقاومت به انسولین شناسایی نشده است اما عوامل زیادی در بروز آن دخیل می باشند (Yaribeygi et al., 2019). یکی از این عوامل بروز که اخیراً مطالعات فراوانی بر روی آن انجام شده است میکروبیوتای روده ای می باشد (Caricilli and Saad, 2013, Gojda and Cahova, 2021). میکروبیوتای روده ای ترکیب فلور طبیعی بدن در روده ها می باشد که نقش بسیار مهمی در بسیاری روندهای

² Maturity-Onset Diabetes of the Young

¹ Latent Autoimmune Diabetes in Adults



فیزیولوژیک از جمله ساخت ویتامین‌ها و کنترل مسیرهای ایمنولوژیک دارد. این میکروبیوتا با نوعی تعادل دینامیک با میزبان انسان خود، یک اکوسیستمی را تشکیل می‌دهد که تأثیر قابل توجهی بر سلامت و بیماری‌های مختلف انسان دارد در کل، حفظ تعادل و سلامت میکروبیوتای روده‌ای از اهمیت بسیاری برخوردار است و تغییرات در این تعادل ممکن است به اختلالات مختلفی در سلامت انسان منجر شود (Hou et al., 2022). همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیب میکروبیوتای روده‌ای پاتولوژیک فعالیت هورمون انسولین را تحت تأثیر قرار داده و می‌تواند موجب بروز دیابت شیرین گردد (Yuan et al., 2021, He and Li, 2020). اما مسیرهای رابط بین میکروبیوتای روده و DM هنوز به درستی شناسایی نشده‌اند. بنابراین و با توجه به اهمیت موضوع ما در این مقاله مروری مکانیسمی سعی می‌کنیم برخی از مهمترین شواهد را ارائه داده و در مورد مسیرهای واسطه بحث کنیم.

مسیر سیگنالینگ انسولین و مقاومت به انسولین

مسیر سیگنالینگ انسولین (Insulin Signal Transduction: IST) با اتصال مولکول انسولین به زنجیره α گیرنده انسولین (Insulin Receptor: IR) که یک تیروزین کیناز عرض غشایی (transmembrane) متشکل از دو زنجیره α و β است آغاز می‌شود (شکل یک) (Saltiel, 2021). این اتصال باعث ایجاد تغییرات ساختاری در زنجیره β با فسفوریلاسیون خودکار در باقیمانده‌های تیروزین می‌شود و به دنبال آن رویدادهای پایین‌دستی با فعالیت پروتئین‌های مختلف از جمله بسترهای گیرنده انسولین (IRS^3)، پروتئین Shc (تبدیل کننده

(SHC) و پروتئین APS^4 فعال می‌شود که در نهایت یک محل اتصال مناسب برای اتصال IRS-1 فراهم می‌کنند (Saltiel, 2021). پروتئین IRS-1 فعال شده به $PI3K^5$ متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند و این کیناز نیز به نوبه خود تبدیل $PIP2$ (فسفاتیدیل ۴،۵-بیس فسفات) به $PIP3^6$ را کاتالیز می‌کند (Saltiel, 2021). آنزیم $PIP3$ خود یک فعال کننده قوی برای PKB (پروتئین کیناز B، همچنین به عنوان Akt) است که به نوبه خود ورود گلوکز به سلول‌ها را با لوکالیزاسیون GLUT-4 (ناقل گلوکز نوع ۴) تسهیل می‌کند (Saltiel, 2021, Yaribeygi et al., 2020b). هم-چنین گلیکوژن سنتاز کیناز (GSK) را مهار می‌کند که منجر به افزایش ذخیره گلیکوژن می‌شود. چندین نوع کیناز وابسته به انسولین مانند ERK1/2 (کیناز تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی ۲/۱)، پروتئین کیناز سی (PKC)، S6K1 (پروتئین ریبوزومی S6 کیناز بتا-۱)، SIK2 (سرین/ترئونین-پروتئین کیناز ۲) AKT، $mTOR^7$ و ROCK1 (پروتئین کیناز ۱ مرتبط با Rho) و انواع دیگر کینازها مانند AMPK (پروتئین کیناز فعال شده با AMP) و GSK3 (گلیکوژن سنتاز کیناز نوع ۳) نیز می‌توانند IRS ها را فسفریله کرده و آن‌ها را فعال کنند (شکل یک) (Saltiel, 2021, Yaribeygi et al., 2020b).

مقاومت به انسولین (IR) یک وضعیت پاتولوژیک پیچیده پاسخ سلولی نامناسب به هورمون انسولین در سلول‌های وابسته به انسولین (سلول‌های چربی و ماهیچه‌های قلبی) است (Yaribeygi et al., 2019). این حالت در بسیاری از اختلالات متابولیک مانند دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک مشاهده می‌شود و مسئول بسیاری از انحرافات متابولیک است (Yaribeygi et al., 2019, Gluvic et al., 2017).

⁶ Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
⁷ mammalian target of rapamycin

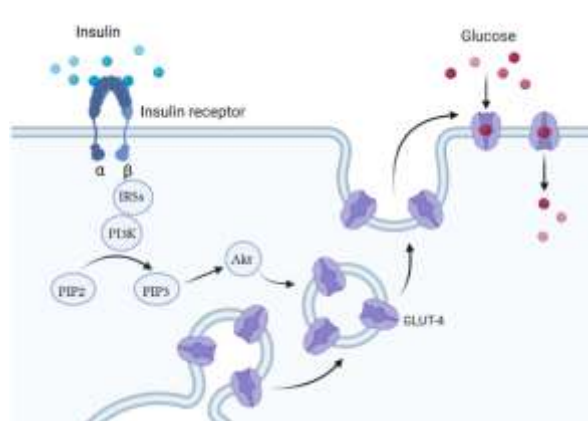
³ Insulin receptor substrate

⁴ adapter protein with a PH and SH2 domain

⁵ phosphoinositide 3-kinase



پیچیده شامل باکتری‌ها، یوکاریوت‌ها، ویروس‌ها و آرکی‌ها می‌باشند که اکثریت آن قابل کشت نیستند (Zoetendal et al., 2006). دلایل این محدودیت کشت عبارتند از: الزامات رشد ناشناخته‌ی باکتری‌ها، گزینش پذیری محیط مورد استفاده، استرس ناشی از روش‌های کشت، لزوم شرایط کاملاً بدون اکسیژن و مشکلات شبیه‌سازی برهم‌کنش باکتری‌ها با سایر میکروب‌ها و سلول‌های میزبان (Zoetendal et al., 2006). بنابراین، رویکرد جدیدی معرفی شد با عنوان توالی‌یابی مستقل از کشت، که تشخیص ژن‌های میکروبی و الگوهای مرتبط با بیماری را در میکروبیوتای روده انسان ممکن کرد (Shendure and Ji, 2008, Weinstock, 2012). با استفاده از این رویکرد جدید، شناسایی سه شاخه باکتریایی غالب در دستگاه گوارش انسان شامل Firmicutes و Actinobacteria های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی امکان پذیر گردید این گونه‌های باکتریایی مسئول بیشترین جمعیت میکروبیوتا هستند و به صورت هماهنگ با بدن میزبان عمل می‌کند و شرایطی را فراهم می‌کنند تا میزبان اعمال مهمی را انجام دهد که به تنهایی قادر به انجام آن‌ها نبوده‌است بنابراین برای متابولیسم میزبان و تنظیم شرایط فیزیولوژیک آن حیاتی هستند (Caricilli and Saad, 2013, Zoetendal et al., 2006). دسته Firmicutes به عنوان بزرگترین گروه باکتریایی شناخته می‌شود که ۲۰۰ جنس را شامل می‌شود که شامل لاکتوباسیلوس، مایکوپلاسما، باسیلوس و کلوستریدیوم می‌شود. علیرغم اینکه اکتینوباکتیریا نیز یک گروه غالب است، معمولاً توسط توالی‌یابی ژن RNA نادیده گرفته می‌شود و تنها با هیبریداسیون درجا فلورسنت^۸ (بهترین تکنیک برای مکان‌یابی توالی‌های



شکل ۱. مسیر سیگنالینگ انسولین در بافت‌های چربی یا عضلات اسکلتی

مقاومت به انسولین با حساسیت به انسولین در بافت‌های وابسته به انسولین ارتباط معکوس دارد و در نتیجه جذب و استفاده از گلوکز به عنوان سوبسترای متابولیک ترجیحی را کاهش می‌دهد (Gluvic et al., 2017). بنابراین هرگونه کاهش حساسیت به انسولین، بافت را با تغییرات متابولیکی گسترده و مقاومت به انسولین مواجه می‌کند (Gluvic et al., 2017). مقاومت به انسولین علت اصلی بروز دیابت نوع دو بوده که عمده‌ترین نوع دیابت در انسان می‌باشد (Gluvic et al., 2017).

میکروبیوتای روده ای

در انسان، حداقل ۱۰۰ تریلیون سلول میکروبی وجود دارد که مجموعاً میکروبیوتا نامیده می‌شوند، که در جوامع (کلنی‌ها) پیچیده و بافت‌های خاصی توزیع شده‌اند (Costello et al., 2009). میکروبیوتای روده یک سیستم پویا است و اعمال حیاتی مهمی را برای میزبان خود (انسان) انجام می‌دهد. به دلیل فراوان بودن و نقش مهمی که دارند اغلب به عنوان یک ارگان عملکردی در نظر گرفته می‌شوند و از آن‌ها به عنوان hidden organ نیز یاد می‌شود (Costello et al., 2009). این جامعه

⁸ fluorescent in situ hybridization



اختیاری افزایش می‌یابد، اکسیژن مصرف می‌کنند و یک محیط بی‌هوازی ایجاد می‌کنند (Dominguez-Bello et al., 1997, Bezirtzoglou, 2010). در هفته اول زندگی، این باکتری‌ها یک محیط کاهش‌دهنده تشکیل می‌دهند که به نفع میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی است (Bezirtzoglou, 1997). بعد از تولد رژیم غذایی مهم-ترین فاکتور در تعیین ترکیب میکروبیوتا خواهد بود. در این راستا نوزادانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند؛ نسبت به نوزادانی که شیر خشک استفاده می‌کنند، ترکیب میکروبیوتای متفاوتی خواهند داشت، بنابراین خوردن شیر مادر سبب افزایش شیوع باکتری‌های تولیدکننده لاکتات و استات می‌شود. به نظر می‌رسد که این فرآورده‌های متابولیکی رشد باکتری‌های بیماری‌زا را در روده محدود می‌کند، این در حالی است که مصرف شیر خشک سبب افزایش باکتری‌هایی مانند *Staphylococcus aureus* و *Bacteroides* می‌شود (Koenig et al., 2011).

ترکیب میکروبیوتای روده تا سنین پیری نسبتاً پایدار توصیف شده‌است (Claesson et al., 2011)، و این پایداری بدین معناست که متغیرهای متعددی که در ترکیب میکروبیوتای روده موثرند نسبتاً ثابت نگه داشته می‌شوند (Clemente et al., 2012). اما عوامل بسیاری هستند که می‌توانند این ترکیب را دگرگون کنند. به عنوان مثال، نشان داده شده است که تغییرات رژیم غذایی اثرات قابل توجهی بر روی میکروبیوتا دارد (Turnbaugh et al., 2009b, Leeming et al., 2019). در یک مطالعه حیوانی تغییر غذای موش‌ها به یک رژیم غذایی غربی با چربی و قند بالا، از یک رژیم غذایی کم-چرب و غنی از پلی‌ساکاریدهای گیاهی، میکروبیوتا را در عرض ۲۴ ساعت تغییر داد (Turnbaugh et al., 2009b). به همین ترتیب، تغییر رژیم غذایی پرچرب/کم

خاص (DNA) قابل تشخیص است (Zoetendal et al., 2006, Turnbaugh et al., 2006).

ترکیب (تنوع یا فراوانی گونه‌های خاص) میکروبیوتای دستگاه گوارش توسط فاکتورهای زیادی شکل می‌گیرد از آن قبیل می‌توان به مواردی همچون ژنتیک میزبان، نوع زایمان، جنس، سن، قد و وزن، رژیم غذایی، سیستم ایمنی، ترشحات دستگاه گوارش و مقدار سطح خونی مولکول‌های مختلف، تعداد گلبول‌های قرمز، خواب، سابقه بالینی، شرایط جغرافیایی و اجتماعی و اقتصادی، شرایط بهداشتی، سیگار کشیدن، استفاده از آنتی‌بیوتیک-ها و ترکیبات مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها مانند ملین‌ها، آنتی‌هیستامین‌ها و داروهای ضداسهال و متفورمین؛ اشاره کرد (Rowland et al., 2018).

استقرار اولیه میکروبیوتای روده در هنگام تولد شروع می‌شود، زمانی که نوزادان در معرض میکروب‌های متعدد از محیط‌های مختلف قرار می‌گیرند که به سرعت آن‌ها را اشغال می‌کند (Dominguez-Bello et al., 2010). بسته به حالت زایمان، نوزادان توسط میکروب‌های واژن یا پوست مادرشان کلونیزه می‌شوند بنابراین، نوع زایمان به عنوان مهمترین فاکتور در این مرحله محسوب می‌شود که تعیین می‌کند آیا باکتری‌هایی مانند *Lactobacillus*, *Prevotella* و *Sneathia* (باکتری-هایی که در کانال زایمان قرار دارند) یا باکتری‌هایی از قبیل *Staphylococcus* و *Propionibacterium* (باکتری‌هایی که از پوست مادر یا سایر افراد شرکت کننده در عمل سزارین منتقل می‌شوند) در نوزاد کلونیزه شوند (Dominguez-Bello et al., 2010, Rowland et al., 2018). دستگاه گوارش اول از همه توسط میکروارگانیسم‌های هوازی اختیاری و سپس توسط بی‌هوازی‌ها کلونیزه می‌شود (Dominguez-Bello et al., 2010). هنگامی که جمعیت باکتری‌های بی‌هوازی



مدتی در یک قفس قرار داده‌اند، ایجاد نمود (Elinav et al., 2011).

تأثیر ترکیب میکروبی دستگاه گوارش ما بر سیستم‌های خارج از روده نیز مشخص شده و اخیراً توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (Hillman et al., 2017). بسیاری از حالات بیماری در حال حاضر با عدم تعادل باکتری‌های روده همراه هستند که منشأ آنها به الگوهای کلونیزاسیون اولیه زندگی مربوط می‌شود (Hillman et al., 2017). بر اساس مطالعات موجود تغییر در تنوع یا ساختار میکروبیوتای روده که با اصطلاح dysbiosis شناخته می‌شود، می‌تواند فعالیت‌های متابولیکی را تحت تأثیر قرار دهد و منجر به اختلالات متابولیکی مانند چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت، اختلالات کلیوی و سکت قلبی شود. همان‌طور که مطالعات گسترده‌ی متاژنوم dysbiosis را با چاقی و دیابت مرتبط دانسته‌اند و یافته‌ی مشترک در این مطالعات کاهش میکروب‌های تولیدکننده بوتیرات همراه با افزایش پاتوژن‌های فرصت-طلب بوده‌است ضمن این که برای نقش dysbiosis در بروز مقاومت به انسولین و دیابت تیپ ۲ مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر در هوموستاز انرژی و متابولیسم گلوکز پیشنهاد شده‌است (Rewers and Ludvigsson, 2016). میکروبیوتای روده‌ای عملکردهای مهمی در سلامت و بیماری دارد (Hillman et al., 2017). این کلنی پیچیده در متابولیسم بدن و رفتارهای تغذیه‌ای نقش عمده دارد (Hillman et al., 2017). علاوه بر این یک محور موسوم به محور روده-مغز (Gut-Brain Axis) وجود دارد که ارتباط پیچیده-ای را بین میکروبیوم روده و سیستم عصبی مرکزی برقرار نموده و بر بسیاری فعالیت‌های بدن من جمله فعالیت‌های متابولیک و هومئوستازیس گلوکز و اشتها تأثیر می‌گذارد (Van de Wouw et al., 2017, Wachsmuth et al.,)

فیر باعث تغییرات قابل توجهی در میکروبیوتای روده در طی یک روز شد (Wu et al., 2011). همچنین مطالعات اخیر تغییرات در میکروبیوتای روده را با افزایش برداشت و ذخیره انرژی و افزایش ظرفیت تخمیر و جذب کربوهیدرات‌های هضم‌نشده مرتبط دانسته‌اند (Tannock, 2023, Singh et al., 2020). یکی دیگر از عوامل محیطی که می‌تواند ترکیب میکروبی روده را بشدت تغییر دهد، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها است (Lange et al., 2016). چندین مطالعه نشان داده‌اند که درمان با آنتی بیوتیک‌ها منجر به تغییرات عمده در ترکیب میکروبیوتای روده می‌شود (Keeney et al., 2014, Zimmermann and Curtis, 2019). پس از درمان با آنتی بیوتیک، کاهش مقاومت در برابر کلونیزاسیون مشاهده می‌شود که به میکروب‌های خارجی اجازه رشد می‌دهد و منجر به تغییرات دائمی در ساختار میکروبیوتا می‌شود (Zimmermann and Curtis, 2019). این تغییر حتی می‌تواند باعث بیماری شود (Clemente et al., 2012). اگرچه گونه‌های تغییر-یافته در بین افراد متفاوت است، اما برخی از آنها، ماه‌ها پس از درمان قادر به بهبودی نیستند و در بیشتر موارد مورد مطالعه، تنوع باکتریایی کاهش می‌یابد (Kim et al., 2017). در راستای تایید این دیدگاه که محیط برای ترکیب میکروبیوتای روده بسیار موثر است و گاهی اوقات حتی بر استعداد ژنتیکی غالب است (Caricilli et al., 2011)، مطالعه‌ای که دوقلوهای دوتخمکی و تک-تخمکی را مقایسه کرده است، نشان داد که تفاوت قابل توجه‌ای در شباهت در میکروبیوتای روده آنها وجود ندارد (Turnbaugh et al., 2009a). علاوه بر این، مطالعه‌ای دیگر نشان داد که می‌توان یک فنوتیپ نسبتاً یکسان را با تبادل میکروبیوتای روده‌ای مختلف بین موش‌هایی که به‌طور جداگانه بزرگ شده‌اند و پس از



(2022). بنابراین می‌تواند در بروز اختلالات متابولیکی مانند دیابت هم تاثیر داشته باشد (Wachsmuth et al., 2022).

از آنجایی که میکروبیوتای روده تعداد بسیار بیشتری از ژن‌ها را نسبت به انسان کدگذاری می‌کند، در نتیجه قادر به انجام انواع عملکردهای متابولیکی هستند که انسان قادر به انجام آن نیست یا فقط در ظرفیت محدود قادر به انجام آن است (Gomaa, 2020). باکتری‌های روده قادر به تولید انواع ویتامین‌ها، سنتز تمام اسیدآمین‌های ضروری و غیر ضروری و تولید صفرا هستند (Gomaa, 2020). علاوه بر این، میکروبیوم روده مسیرهای بیوشیمیایی حیاتی را برای متابولیسم کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم شامل پلی‌ساکاریدهای بزرگ مانند نشاسته‌های مقاوم، سلولز، همی سلولز، پکتین‌ها و صمغ‌ها فراهم می‌کند (Gomaa, 2020) که موجب بازیابی انرژی و سوبستراهای قابل جذب برای میزبان (در این‌جا انسان) و تامین انرژی و مواد مغذی برای رشد و تکثیر خود باکتری‌ها می‌شود (Gomaa, 2020).

میکروبیوتای روده نقش مهمی در توسعه سیستم ایمنی ایفا می‌کند و به حفظ هموستاز روده کمک می‌کند (Garrett et al., 2010). به عنوان مثال، آن‌ها برای ظهور زیر مجموعه‌های سلول T و تمایز سلول‌های B روده به سلول‌های پلازما تولیدکننده IgA ضروری هستند (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010). هم‌چنین سلول‌های اپیتلیوم روده با ارسال سیگنال به سیستم ایمنی ذاتی از طریق گیرنده‌های خاصی که مولکول‌های خاص مرتبط با باکتری‌ها را می‌شناسند و به آن‌ها متصل می‌شوند، از تهدیدات پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کنند و منجر به تولید پاسخ ایمنی میزبان و آزاد شدن پپتیدهای محافظ، سیتوکین‌ها و گلبول‌های سفید خون می‌شوند (Vyas and Ranganathan, 2012). در نتیجه

یک پاسخ محافظتی به باکتری‌های مهاجم و یک پاسخی انتهایی نسبت به ارگانیزم‌های بیماری‌زا ایجاد می‌گردد (Vyas and Ranganathan, 2012, Gomaa, 2020). عملکردهای متعدد دیگری برای میکروبیوتای روده تعریف شده‌اند، اما در ادامه به نقش این کلونی مهم در بروز مقاومت به انسولین و دیابت می‌پردازیم.

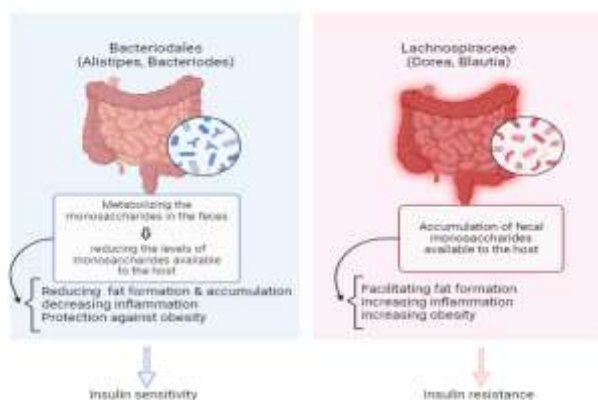
ارتباط بین میکروبیوتای روده با مقاومت به انسولین، چاقی و دیابت شیرین

نشانه‌های اولیه دخیل‌بودن میکروبیوتای روده در بروز اختلالات متابولیکی زمانی بود که موش‌های چاق، با جهش در ژن لپتین، دارای میکروبیوتای متفاوتی در مقایسه با موش‌های بدون جهش بودند (Ley et al., 2005). تحقیقات بیشتر نشان داد که نسبت Firmicutes به Bacteroidetes در میکروبیوتای روده موش‌های چاق به نفع Firmicutes تغییر یافته‌است، در حالی که موش‌های لاغر عمدتاً Bacteroidetes داشتند (Turnbaugh et al., 2006). هم‌چنین در مطالعات انسانی، محققان دریافتند که ترکیب میکروبیوتای روده در افراد چاق در مقایسه با افراد با وزن طبیعی تغییر کرده‌است (Tremaroli and Bäckhed, 2012). تحقیقات بیشتر نشان داد که تغییر ترکیب میکروبیوتای روده می‌تواند جزو ریسک فاکتورهای ایجاد دیابت نوع ۲ باشد (Qin et al., 2012). به عنوان مثال در یک مطالعه میکروبیوتای روده افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ تنها انحراف محدودی از گروه کنترل نشان داد و همین برای بروز دیابت کافی بود، اگرچه کاهش باکتری‌های تولیدکننده بوتیرات که ممکن است از نظر متابولیکی مفید باشد، نیز مشاهده شد (Qin et al., 2012).

عوامل مختلفی می‌توانند موجب به هم خوردن تعادل میکروبیوتای روده شوند (Wen and Duffy, 2017).



مطالعه ای نشان داده است که افراد مبتلا به مقاومت به انسولین سطوح بالایی از کربوهیدرات‌های مدفوع، به ویژه مونوساکاریدهایی را دارند که به راحتی در دسترس میزبان قرار می‌گیرند، مشخص شده‌است که این سطوح بالای مونوساکاریدها با متابولیسم کربوهیدرات میکروبی و القای تولید سیتوکین‌های التهابی توسط میزبان مرتبط است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها توسط میکروبیوتای روده، ارتباط معناداری با مقاومت به انسولین (IR) دارد (Takeuchi et al., 2023b). یکی از بررسی‌های انجام شده توسط محققان آن مطالعه شامل شناسایی باکتری‌های روده بود که هر گروه از باکتری‌ها برای متابولیسم گلوکز، رویکردهای منحصر به فردی را از جهت مقاومت به انسولین و حساسیت به انسولین، نشان دادند (شکل ۲) (Takeuchi et al., 2023a).



شکل ۲. نقش متابولیسم میکروبیوتا بر کربوهیدرات‌های مدفوع

پس از انجام یک توصیف جامع از میکروبیوتای روده، نشان داده شد که به عنوان مثال میکروبیوم Lachnospiraceae با فراوانی مونوساکاریدهای مدفوعی همراه است. علاوه بر این، یک همبستگی مثبت بین فراوانی بالا (Blautia, Lachnospiraceae Dorea) در میکروبیوتای روده و مقاومت به انسولین (IR) مشاهده

این عوامل شامل روش تولد نوزاد (نوع زایمان مادر)، تغذیه دوران نوزادی و کودکی، عوامل ژنتیکی، بروز عفونت‌های مختلف، مصرف داروها بخصوص آنتی بیوتیک‌های گوناگون، رژیم غذایی، و مصرف مواد غذایی حاوی پروبیوتیک میشوند (Wen and Duffy, 2017). البته تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد اما مطالعات متعدد نشان می‌دهد که رژیم غذایی پرچرب می‌تواند منجر به برهم خوردن تعادل میکروبیوتای روده شود که به افزایش نفوذپذیری روده و اندوتوکسمی متابولیک کمک می‌کند (Wen and Duffy, 2017). این به نوبه خود به التهاب درجه پایین و مقاومت به انسولین و در نهایت چاقی، دیابت و سایر اختلالات متابولیک کمک می‌کند. اگرچه قطعی نیست، اما تحقیقات قویاً نشان می‌دهد که مصرف باکتری‌های پروبیوتیک مانند باکتری‌های موجود در ماست و سایر محصولات شیر تخمیر شده نیز می‌تواند به طور مفیدی ترکیب میکروبیوم روده را تغییر دهد (Wen and Duffy, 2017).

در تحقیقات متعدد به اهمیت ارتباط مستقیم گونه‌های میکروبی با پاتوفیزیولوژی مقاومت به انسولین، چاقی و دیابت نوع ۲ پرداخته شده‌است و به طور کلی نشان داده شده‌است میکروبیوتا تعامل نزدیکی با سیستم‌های مختلف مانند سیستم‌های التهابی، کلیوی، قلبی عروقی و غدد درون ریز دارد؛ هم‌چنین با ترکیبات غذایی تعامل می‌کند، بر نفوذپذیری روده، متابولیسم گلوکز و لیپید، حساسیت به انسولین و هموستاز انرژی کلی در میزبان پستانداران تأثیر می‌گذارد (Gurung et al., 2020). به همین جهت به معرفی و بررسی مکانیسم‌های احتمالی ارتباط بین میکروبیوتا و مقاومت انسولین می‌پردازیم.

متابولیسم میکروبی کربوهیدرات‌های مدفوع

شد (Vacca et al., 2020). اهمیت متابولیسم میکروبی روده در تعدیل و تنظیم حساسیت به انسولین در روده‌ی انسان و موش‌های مبتلا به مقاومت به انسولین در افزایش باکتری از جنس *Blautia* و *Dorea* که از اعضای خانواده *Lachnospiraceae* هستند می‌باشد. این افزایش منجر به تغییر در متابولیسم کربوهیدرات می‌شود که در نهایت باعث تجمع مونوساکاریدهای مدفوعی می‌گردد که متعاقباً در دسترس میزبان قرار می‌گیرد و این تجمع مونوساکاریدها به تسهیل تشکیل چربی، القای التهاب و افزایش چاقی کمک می‌کند. این تغییرات در مجموع به افزایش مقاومت به انسولین کمک می‌کند (Takeuchi et al., 2023b). در مقابل، افرادی که غلظت بیشتری از *Bacteroidales* در روده داشتند، سطوح مونوساکاریدهای موجود در مدفوع میزبان را کاهش دادند. این یافته نشان می‌دهد که *Bacteroides* (یعنی *Bacteroides* و *Alistipes*) ممکن است نقش مهمی در ایجاد IR داشته باشند. تحقیقات اضافی در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که *Bacteroidales*، به ویژه *Alistipes indistinctus*، توانایی متابولیزه کردن مونوساکاریدهایی را دارد که در مدفوع افراد دارای مقاومت به انسولین ساخته می‌شوند. در واقع، به دلیل تفاوت متابولیسم *Alistipes* و *Bacteroides* در مقایسه با *Blautia* و *Dorea*، تجمع مونوساکارید در مدفوع بسیار کاهش می‌یابد. این به طور بالقوه به کاهش تجمع چربی، التهاب و محافظت در برابر چاقی کمک می‌کند (Baig et al., 2019, Dekker et al., 2010, Takeuchi et al., 2023b). در تایید این بررسی در همین مطالعه تأیید شد که وقتی *Alistipes indistinctus* به صورت خوراکی به موش‌هایی که رژیم غذایی پرچرب داشتند داده شد، کاملاً از ایجاد مقاومت به انسولین و چاقی جلوگیری کرد. یافته‌ها نشان می‌دهد که انتقال

باکتری‌های مرتبط با *indistinctus Alistipes* منجر به کاهش سطح مونوساکارید مدفوع، کاهش تجمع چربی، بهبود مقاومت به انسولین و کاهش سطح گلوکز خون می‌شود. از این رو، توصیه می‌شود که استراتژی‌های مداخله بالقوه با هدف کاهش مقاومت به انسولین با استفاده از گونه‌های خاص باکتری روده بررسی شود (Takeuchi et al., 2023b).

متابولیسم گلوکز

میکروبیوتای روده از طریق اثر بر هموستاز گلوکز و مقاومت به انسولین در اندام‌های متابولیک کلیدی، از جمله کبد، ماهیچه و بافت چربی، پتانسیل تأثیرگذاری بر دیابت نوع ۲ را دارد و می‌تواند بر هضم قند و سنتز هورمون‌های روده که این فرآیندهای فیزیولوژیکی را تنظیم می‌کنند، تأثیر بگذارد (Gurung et al., 2020). به عنوان مثال، *Bifidobacterium lactis*، یکی از پروبیوتیک‌هایی است که توانایی افزایش تولید گلیکوزن و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با گلوکونوزن کبدی را دارد. هم چنین *B. lactis* جابه‌جایی انتقال دهنده گلوکز-۴ (GLUT4) را افزایش می‌دهد و جذب گلوکز ناشی از انسولین را تسهیل کرد (Kim et al., 2014). برخی از گونه‌های *Lactobacilli* و *Akkermansia muciniphila* دارای فعالیت مهاری قوی آلفا گلوکوزیداز هستند که از تجزیه کربوهیدرات‌های پیچیده جلوگیری می‌کند و هیپرگلیسمی پس از غذا را کاهش می‌دهد (Dang et al., 2018). لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند مقاومت به انسولین را با افزایش سطح mRNA فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K)، سوپسترای گیرنده انسولین ۲ (IRS2)،

ها در روده می‌باشد (Plovier et al., 2017, Shen et al., 2018, Chang et al., 2017, Li et al., 2016, R. Chen et al., 2014, Al-Jameel, 2021). دسته intestinalis همچنین می‌تواند تولید IL-22 را افزایش دهد که یک سایتوکین ضدالتهابی است که برای بازگرداندن حساسیت به انسولین و کاهش دیابت شناخته شده است (Hoffmann et al., 2016, Wang et al., 2014). مهار سیتوکین‌ها و کموکاین‌های پیش التهابی راه دیگری است که توسط میکروب‌های مفید برای جلوگیری از التهاب استفاده می‌شود. گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس (*L. paracasei*, *L. plantarum*) می‌توانند IL-1 β ، پروتئین شیمیایی جذب کننده مونوسی-1، مولکول چسبندگی بین سلولی-1، IL-8، CD36 و پروتئین واکنشی C را کاهش دهند (Liu et al., 2018). *Roseburia* و *Faecalibacterium* باکتری‌های تولید کننده بوتیرات هستند و بوتیرات نیز به عنوان مهار کننده فعالیت NF-kB شناخته شده است. لاکتوباسیلوس کازئی و رزبوری روده ای سیتوکین پیش التهابی IFN- γ را کاهش می‌دهند (Inan et al., 2000, Kinoshita et al., 2002). *B. fragilis* و *L. paracasei* بیان IL-6 را مهار می‌کنند (Chang et al., 2017, Sun et al., 2017). میکروب‌های بالقوه مضر (patobionts) در T2D، مانند *Fusobacterium nucleatum* و *Ruminococcus gnavus* می‌توانند چندین سایتوکاین التهابی را افزایش دهند (Yang et al., 2017, Hall et al., 2017).

میکروبیوم روده با حفظ سلامت سلول‌های روده‌ای، اتصالات بین سلولی و یک لایه مخاطی محافظتی، نفوذپذیری این نقطه را تنظیم می‌کند. این امر احتمالاً با

AMPK، Akt2⁹ و سنتز گلیکوژن در کبد بهبود بخشد (Wang et al., 2017, Li et al., 2017). *Lactobacillus gasseri* BNR17 همچنین بیان GLUT-4¹⁰ را در عضله با اثر ضد دیابتی خود افزایش می‌دهد (Kang et al., 2013). میکروبیوتا و محصولات آنها می‌توانند هورمون‌ها و آنزیم‌های روده را نیز تعدیل کنند و مقاومت به انسولین و تحمل گلوکز را بهبود بخشند. بوتیرات می‌تواند به عنوان لیگاند برای گیرنده-های جفت شده با پروتئین G (GPCR41 و GPCR43) در روده عمل کند و باعث آزادسازی هورمون‌های روده GLP-1¹¹، PYY و GLP-2 از entero-endocrine cells شود (Allin et al., 2015).

تعدیل و تنظیم التهاب

دیابت شیرین با افزایش غلظت سیتوکین‌های پیش التهابی، کموکاین‌ها و پروتئین‌های التهابی مرتبط است. برخی از میکروب‌های روده و متابولیت‌های میکروبی، مانند لیپوبلی ساکاریدها، پتانسیل افزایش اندوتوکسمی متابولیک و ایجاد التهاب با درجه کم را دارند. برعکس، سایر باکتری‌ها ممکن است توانایی تحریک تولید سیتوکین‌ها و کموکاین‌های ضد التهابی را داشته باشند (Scheithauer et al., 2020, Gurung et al., 2020). بیان بیش از حد IL-10 در بافت عضلانی موجب جلوگیری از مقاومت به انسولین مرتبط با پیری می‌شود. در این بین گونه‌های مختلف میکروبی مانند *Roseburia*، *Akkermansia*، *Bacteroides fragilis*، *intestinalis*، *L. casei* و *Lactobacillus plantarum* *amuciniphila* موجب فعال شدن این سایتوکین می‌شوند و یکی از راه-های بالقوه افزایش متابولیسم گلوکز افزایش این باکتری

¹¹ Glucagon-like peptide-1

⁹ protein kinase B

¹⁰ Glucose transporter type 4



تهیه‌ی مواد مغذی مثل SCFA^{۱۲} ها به سلول‌های اپی‌تلیال صورت می‌گیرد. پروبیوتیک‌ها (شامل *استریتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) در محیط آزمایشگاه با استفاده از TNF آلفا و اینترفرون گاما از افزایش نفوذپذیری در سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای انسان جلوگیری می‌کنند (Al-Goblan et al., 2014). این امر اهمیت نقش باکتری‌های مشخص را در حفظ یک سد روده‌ای مقاوم بیان می‌کند. در مقایسه با مطالعات موشی، مطالعات انسانی زیادی در رابطه با غلظت LPS در گردش و نفوذپذیری روده انجام نشده‌است. افزایش نفوذپذیری روده در افراد مبتلا به دیابت تیپ ۲ و افراد مبتلا به اضافه‌وزن در مقایسه با افراد نرمال دیده شده‌است. در مداخله‌ای که بر روی یک گروه داوطلبان انجام شده‌است، متعاقب تغذیه با پاستای غنی از انسولین، کاهش نفوذ پذیری در روده دیده شده‌است. اما اطلاعاتی در رابطه با مارکرهای التهابی، متابولیسم گلوکز و میکروبیوم وجود ندارد (Al-Goblan et al., 2014).

اکسیداسیون اسیدهای چرب، سنتز و مصرف انرژی

افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و مصرف انرژی و کاهش سنتز اسیدهای چرب باعث بهبود چاقی و در نتیجه T2D می‌شود (Houmard, 2008, Gurung et al., 2020). نشان داده شده‌است که *Lactobacillus gasseri* با افزایش ژن‌های اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش ژن‌های مرتبط با سنتز اسیدهای چرب، احتمال بروز چاقی را کاهش می‌دهد (Kang et al., 2013). *Bacteroides*، *Akkermansia muciniphila*، *Lactobacillus gasseri*، *acidifaciens* گزارش

شده‌اند که اکسیداسیون اسیدهای چرب در بافت چربی را افزایش می‌دهند. به عنوان مثال، *Akkermansia muciniphila* سطوح 2-oleoyl glycerol (2-OG)، 2-palmitoylglycerol (2-PG)، 2-acylglycerol (2-AG) را در بافت چربی افزایش می‌دهد که باعث افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و تمایز سلول‌های چربی می‌شود (Everard et al., 2013). همچنین سطح سرمی مالون دی آلدئید^{۱۳}، نشانگر آسیب اکسیداتیو لیپیدها، توسط *Lactobacillus* و *Akkermansia muciniphila* در جوندگان دیابتی کاهش می‌یابد (Li et al., 2016, Zhang et al., 2018). بنابراین، بعضی اعضای میکروبیوتا با اثر مفید بر تعدیل متابولیسم اسیدهای چرب و مصرف انرژی در میزبان منجر به کاهش چاقی و T2D می‌شود. مقاومت به انسولین منجر به افزایش اسیدهای چرب در پلاسما، کاهش انتقال گلوکز به سلول‌های ماهیچه‌ای و همچنین افزایش تجزیه‌ی چربی‌ها شده که متعاقباً منجر به افزایش تولید گلوکز در کبد می‌شود که تمام این عوامل باعث افزایش قندخون می‌شوند. در واقع دیابت نوع ۲ ترکیبی از کاهش تولید انسولین از سلول‌های β -پانکراس و مقاومت به انسولین می‌باشد. چاقی با دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین ارتباط دارد که این ارتباط به دلیل افزایش ترشح اسیدهای چرب غیراشباع (NEFAS) از بافت چربی در افراد چاق می‌باشد که به دنبال آن این افزایش ترشح باعث اختلال عملکرد سلول‌های β -پانکراس و مقاومت به انسولین می‌شود (Karpe et al., 2011).

نفوذپذیری روده

¹² Short-chain fatty acids

¹³ Malondialdehyde (MDA)



یا کبد عملکرد انسولین را دچار اختلال می نمایند، برای مثال $TNF-\alpha$ با افزایش فسفریلاسیون سرین موجود بر روی insulin receptor substrate-1 موجب غیرفعالسازی آن می شود. آغاز این فرایند مخرب با تغییرات حاصل شده در جمعیت میکروبی روده و افزایش باکتری های گرم منفی که در دیواره خود LPS دارند و سپس افزایش سطح سرمی LPS همراه است که در ادامه با اشغال TLR-4 توسط LPS، موجب شکل گیری پاسخ های التهابی از طریق تولید سایتوکاین های پیش التهابی و فراخوانی سلول های التهابی می شود. علاوه بر این، افزایش سطوح LPS می تواند سبب افزایش نفوذپذیری سد اپی تلیال روده و یا افزایش جذب شیلومیکرون از اپی تلیوم شود (Cani et al., 2008).

بحث و نتیجه گیری نهایی

دیابت شایع ترین بیماری متابولیک در انسان است که با بسیاری از موارد مرگ و میر رابطه مستقیم دارد. این بیماری مزمن یک عامل خطر مهم برای بیماری های قلبی عروقی بوده و نقش پررنگی در کاهش کیفیت زندگی و طول عمر فرد مبتلا دارد. تحقیقات بسیاری در خصوص عوامل زمینه ای ایجادکننده آن انجام گرفته است، اما بنظر می رسد نقش میکروبیوتای روده ای در این زمینه به خوبی پرداخته نشده است. مطالعه مروری حاضر با ارائه برخی شواهد نشان می دهد که ترکیب میکروبیوتای روده ای می تواند از ۵ مسیر مختلف موجب القای مقاومت به انسولین و دیابت گردد. بر این اساس ترکیب میکروبیوتای روده با تعدیل التهاب و پروفایل سایتوکین های التهابی، تنظیم متابولیسم کربوهیدرات های مدفوع و نیز متابولیسم کلی گلوکز، اثرگذاری بر

افزایش نفوذپذیری روده از ویژگی های T2D است. در نتیجه، محصولات میکروبی روده در این بیماری به جریان خون منتقل می شود و منجر به اندوتوکسمی متابولیک می شود (Cani et al., 2007, Gurung et al., 2020). B. dorei و Bacteroides vulgatus، دو گونه با مزایای بالقوه برای دیابت نوع ۲ هستند که بیان ژن های اتصال محکم (tight junction) را در روده بزرگ تعدیل می کنند. این تنظیم منجر به کاهش نفوذپذیری روده، کاهش تولید لیپوپلی ساکاریدها (LPS) و بهبود اندوتوکسمی در مدل موش می شود (Yoshida et al., 2018). بوتیرات تولید شده توسط Faecalibacterium Roseburia، قادر به کاهش نفوذپذیری روده از طریق ناقلان سروتونین و مسیرهای $PPAR-\gamma$ ^{۱۴} می باشد (Kinoshita et al., 2002). پروبیوتیک دیگر، Akkermansia muciniphila، نفوذپذیری روده را با استفاده از وزیکول های خارج سلولی کاهش می دهد که اتصالات محکم روده را از طریق فعال سازی AMPK^{۱۵} در اپی تلیوم بهبود می بخشد (Chelakkot et al., 2018). بنابراین، برخی ترکیب های میکروبیوتای روده ای که بالقوه موجب مقاومت به انسولین و القای دیابت نوع ۲ می شوند؛ می توانند از طریق مکانیسم هایی که منجر به افزایش نفوذپذیری روده، جذب لیپوپلی ساکارید (LPS) و فعال شدن مسیرهای التهابی و در پایان اختلال در سیگنال دهی انسولین می شوند مقاومت به انسولین و دیابت را ایجاد نمایند (Takeuchi et al., 2023b). در مدل های چاقی حضور بافت های چربی بیان سایتوکاین های پیش التهابی همچون $TNF-\alpha$ ^{۱۶}، IL-1 و IL-6 را افزایش می دهد. این سایتوکاین ها در ماهیچه های اسکلتی، بافت های چربی و

¹⁶ Tumour Necrosis Factor alpha

¹⁴ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

¹⁵ AMP-activated protein kinase



6. BEZIRTZOGLU, E. 1997. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*, 3, 173-177.
7. CANI, P. D., AMAR, J., IGLESIAS, M. A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., TUOHY, K. M., CHABO, C., WAGET, A., DELMEE, E., COUSIN, B., SULPICE, T., CHAMONTIN, B., FERRIERES, J., TANTI, J. F., GIBSON, G. R., CASTEILLA, L., DELZENNE, N. M., ALESSI, M. C. & BURCELIN, R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, 1761-72.
8. CANI, P. D., BIBILONI, R., KNAUF, C., WAGET, A., NEYRINCK, A. M., DELZENNE, N. M. & BURCELIN, R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 1470-1481.
9. CARICILLI, A. M., PICARDI, P. K., DE ABREU, L. L., UENO, M., PRADA, P. O., ROPELLE, E. R., HIRABARA, S. M., CASTOLDI, Â., VIEIRA, P. & CAMARA, N. O. 2011. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology*, 9, e1001212.
10. CARICILLI, A. M. & SAAD, M. J. 2011. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients*, 5, 829-851.
11. CERF-BENSUSSAN, N. & GABORIAU-ROUTHIAU, V. 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*, 10, 735-744.
12. CHANG, Y. C., CHING, Y. H., CHIU, C. C., LIU, J. Y., HUNG, S. W., HUANG, W. C., HUANG, Y.

اکسیداسیون اسیدهای چرب و لیپیدها و تنظیم نفوذپذیری روده می‌تواند دیابت را القا نماید. بنابراین هر عاملی که موجب برهم خوردن تعادل میکروبیوتای روده ای گردد (مانند ترکیبات غذایی صنعتی یا استرس مزمن) می‌تواند یک عامل خطر برای بروز دیابت نیز باشد.

منابع

1. AL-GOBLAN, A. S., AL-ALFI, M. A. & KHAN, M. Z. 2014. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 587-591.
2. AL-JAMEEL, S. S. 2021. Association of diabetes and microbiota: An update. *Saudi J Biol Sci*, 28, 4446-4454.
3. ALLIN, K. H., NIELSEN, T. & PEDERSEN, O. 2015. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, 172, R167-77.
4. BAIG, S., PARVARESH RIZI, E., CHIA, C., SHABEER, M., AUNG, N., LOH, T. P., MAGKOS, F., VIDAL-PUIG, A., SEET, R. C. S., KHOO, C. M. & TOH, S. A. 2019. Genes Involved in Oxidative Stress Pathways Are Differentially Expressed in Circulating Mononuclear Cells Derived From Obese Insulin-Resistant and Lean Insulin-Sensitive Individuals Following a Single Mixed-Meal Challenge. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 256.
5. BANDAY, M. Z., SAMEER, A. S. & NISSAR, S. 2020. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna journal of medicine*, 10, 174-188.



- GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *science*, 326, 1694-1697.
- 19.DANG, F., JIANG, Y., PAN, R., ZHOU, Y., WU, S., WANG, R., ZHUANG, K., ZHANG, W., LI, T. & MAN, C. 2018. Administration of *Lactobacillus paracasei* ameliorates type 2 diabetes in mice. *Food Funct*, 9, 3630-3. ۶۳۹
- 20.DEKKER, M. J., SU, Q., BAKER, C., RUTLEDGE, A. C. & ADELI, K. 2010. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, E685-94.
- 21.DOMINGUEZ-BELLO, M. G., COSTELLO, E. K., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., FIERER, N. & KNIGHT, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 11971-11975.
- 22.ELINAV, E., STROWIG, T., KAU, A. L., HENAO-MEJIA, J., THAISS, C. A., BOOTH, C. J., PEAPER, D. R., BERTIN, J., EISENBARTH, S. C. & GORDON, J. I. 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145, 745-757.
- 23.EVERARD, A., BELZER, C., GEURTS, L., OUWERKERK, J. P., DRUART, C., BINDELS, L. B., GUIOT, Y., DERRIEN, M., MUCCIOLI, G. G., DELZENNE, N. M., DE VOS, W. M. & CANI, P. D. 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-
T. & CHUANG, H. L. 2017. TLR2 and interleukin-10 are involved in *Bacteroides fragilis*-mediated prevention of DSS-induced colitis in gnotobiotic mice. *PLoS One*, 12, e0180025.
- 13.CHELAKKOT, C., CHOI, Y., KIM, D. K., PARK, H. T., GHIM, J., KWON, Y., JEON, J., KIM, M. S., JEE, Y. K., GHU, Y. S., PARK, H. S., KIM, Y. K. & RYU, S. H. 2018. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp Mol Med*, 50, e450.
- 14.CHEN, P., ZHANG, Q., DANG, H., LIU, X., TIAN, F., ZHAO, J., CHEN, Y., ZHANG, H. & CHEN, W. 2014. Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Nutrition*, 30, 1061-8.
- 15.CLAESSON, M. J., CUSACK, S., O'SULLIVAN, O., GREENE-DINIZ, R., DE WEERD, H., FLANNERY, E., MARCHESI, J. R., FALUSH, D., DINAN, T. & FITZGERALD, G. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4586-4591.
- 16.CLEMENTE, J. C., URSELL, L. K., PARFREY, L. W. & KNIGHT, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148, 1258-1270.
- 17.COLE, J. B. & FLOREZ, J. C. 2020. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews nephrology*, 16, 377-390.
- 18.COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N.,



- N. 2020. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590.
32. HALL, A. B., YASSOUR, M., SAUK, J., GARNER, A., JIANG, X., ARTHUR, T., LAGOUDAS, G. K., VATANEN, T., FORNELOS, N., WILSON, R., BERTHA, M., COHEN, M., GARBER, J., KHALILI, H., GEVERS, D., ANANTHAKRISHNAN, A. N., KUGATHASAN, S., LANDER, E. S., BLAINEY, P., VLAMAKIS, H., XAVIER, R. J. & HUTTENHOWER, C. 2017. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med*, 9, 103.
33. HE, F.-F. & LI, Y.-M. 2020. Role of gut microbiota in the development of insulin resistance and the mechanism underlying polycystic ovary syndrome :a review. *Journal of ovarian research*, 13, 1-13.
34. HILLMAN, E. T., LU, H., YAO, T. & NAKATSU, C. H. 2017. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and environments*, 32, 300-313.
35. HOFFMANN, T. W., PHAM, H. P., BRIDONNEAU, C., AUBRY, C., LAMAS, B., MARTIN-GALLAUSIAUX, C., MOROLDO, M., RAINTEAU, D., LAPAQUE, N., SIX, A., RICHARD, M. L., FARGIER, E., LE GUERN, M. E., LANGELLA, P. & SOKOL, H. 2016. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *Isme j*, 10, 460-77.
36. HOU, K., WU, Z.-X., CHEN, X.-Y., WANG, J.-Q., ZHANG, D., XIAO, C., ZHU, D., KOYA, J. B., WEI, L. & LI, J. 2022. Microbiota induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9066-71.
24. GALICIA-GARCIA, U., BENITO-VICENTE, A., JEBARI, S., LARREA-SEBAL, A., SIDDIQI, H., URIBE, K. B., OSTOLAZA, H. & MARTÍN, C. 2020. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21, 6275.
25. GARRETT, W. S., GORDON, J. I. & GLIMCHER, L. H. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, 140, 859-870.
26. GENUTH, S. M., PALMER, J. P. & NATHAN, D. M. 2021. Classification and diagnosis of diabetes.
27. GLUVIC, Z., ZARIC, B., RESANOVIC, I., OBRADOVIC, M., MITROVIC, A., RADAK, D. & R ISENOVIC, E. 2017. Link between metabolic syndrome and insulin resistance. *Current vascular pharmacology*, 15, 30-39.
28. GOJDA, J. & CAHOVA, M. 2021. Gut microbiota as the link between elevated BCAA serum levels and insulin resistance. *Biomolecules*, 11, 1414.
29. GOMAA, E. Z. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113, 2019-2040.
30. GREGORY, G. A., ROBINSON, T. I., LINKLATER, S. E., WANG, F., COLAGIURI, S., DE BEAUFORT, C., DONAGHUE, K. C., HARDING, J. L., WANDER, P. L. & ZHANG, X. 2022. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 10, 741-760.
31. GURUNG, M., LI, Z., YOU, H., RODRIGUES, R., JUMP, D. B., MORGUN, A. & SHULZHENKO,



- microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological reviews*, 279, 90-105.
44. KIM, S. H., HUH, C. S., CHOI, I. D., JEONG, J. W., KU, H. K., RA, J. H., KIM, T. Y., KIM, G. B., SIM, J. H. & AHN, Y. T. 2014. The anti-diabetic activity of *Bifidobacterium lactis* HY8101 in vitro and in vivo. *J Appl Microbiol*, 117, 834-45.
45. KINOSHITA, M., SUZUKI, Y. & SAITO, Y. 2002. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPARgamma activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 827-31.
46. KOENIG, J. E., SPOR, A., SCALFONE, N., FRICKER, A. D., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., ANGENENT, L. T. & LEY, R. E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4578-4585.
47. LANGE, K., BUERGER, M., STALLMACH, A. & BRUNS, T. 2016. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Digestive Diseases*, 34, 260-268.
48. LEEMING, E. R., JOHNSON, A. J., SPECTOR, T. D. & LE ROY, C. I. 2019. Effect of diet on the gut microbiota: rethinking intervention duration. *Nutrients*, 11, 2862.
49. LEY, R. E., BÄCKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the national academy of sciences*, 102, 11070-11075.
50. LI, X., WANG, E., YIN, B., FANG, D., CHEN, P., WANG, G., ZHAO, J., ZHANG, H. & CHEN, W. 2017. Effects of *Lactobacillus casei* CCFM419 on insulin resistance and gut microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7, 135.
37. HOUMARD, J. A. 2008. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294, R1111-6.
38. INAN, M. S., RASOULPOUR, R. J., YIN, L., HUBBARD, A. K., ROSENBERG, D. W. & GIARDINA, C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, 118, 724-34.
39. KANG, J. H., YUN, S. I., PARK, M. H., PARK, J. H., JEONG, S. Y. & PARK, H. O. 2013. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One*, 8, e54617.
40. KARPE, F., DICKMANN, J. R. & FRAYN, K. N. 2011. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*, 60, 2441-2449.
41. KEENEY, K. M., YURIST-DOUTSCH, S., ARRIETA, M.-C. & FINLAY, B. B. 2014. Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. *Annual review of microbiology*, 68, 217-235.
42. KHAMSEH, M. E., SEPANLOU, S. G., HASHEMI-MADANI, N., JOUKAR, F., MEHRPARVAR, A. H., FARAMARZI, E., OKATI-ALIABAD, H., RAHIMI, Z., REZAIANZADEH, A. & HOMAYOUNFAR, R. 2021. Nationwide prevalence of diabetes and prediabetes and associated risk factors among Iranian adults: analysis of data from PERSIAN cohort study. *Diabetes Therapy*, 12, 2921-2938.
43. KIM, S., COVINGTON, A. & PAMER, E. G. 2017. The intestinal



- M.-E., MAITER, D., LOUMAYE, A., HERMANS, M. P., THISSEN, J.-P., BELZER, C., DE VOS, W. M. & CANI, P. D. 2017. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*, 23, 107-113.
57. QIN, J., LI, Y., CAI, Z., LI, S., ZHU, J., ZHANG, F., LIANG, S., ZHANG, W., GUAN, Y. & SHEN, D. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490, 55-60.
58. REWERS, M. & LUDVIGSSON, J. 2016. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, 387, 2340-2348.
59. ROWLAND, I., GIBSON, G., HEINKEN, A., SCOTT, K., SWANN, J., THIELE, I. & TUOHY, K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57, 1-24.
60. SALTIEL, A. R. 2021. Insulin signaling in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 131.
61. SCHEITHAUER, T. P. M., RAMPANELLI, E., NIEUWDORP, M., VALLANCE, B. A., VERCHERE, C. B., VAN RAALTE, D. H. & HERREMA, H. 2020. Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol*, 11, 571731.
62. SHEN, Z., ZHU, C., QUAN, Y., YANG, J., YUAN, W., YANG, Z., WU, S., LUO, W., TAN, B. & WANG, X. 2018. Insights into *Roseburia intestinalis* which alleviates experimental colitis type 2 diabetic mice. *Benef Microbes*, 8, 421-432.
51. LI, X., WANG, N., YIN, B., FANG, D., JIANG, T., FANG, S., ZHAO, J., ZHANG, H., WANG, G. & CHEN, W. 2016. Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM0236 on hyperglycaemia and insulin resistance in high-fat and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *J Appl Microbiol*, 121, 1727-1736.
52. LIU, W. C., YANG, M. C., WU, Y. Y., CHEN, P. H., HSU, C. M. & CHEN, L. W. 2018. *Lactobacillus plantarum* reverse diabetes-induced Fmo3 and ICAM expression in mice through enteric dysbiosis-related c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *PLoS One*, 13, e0196511.
53. LOVIC, D., PIPERIDOU, A., ZOGRAFOU, I., GRASSOS, H., PITTARAS, A. & MANOLIS, A. 2020. The growing epidemic of diabetes mellitus. *Current vascular pharmacology*, 18, 104-109.
54. MARUHASHI, T. & HIGASHI, Y. 2021. Pathophysiological association between diabetes mellitus and endothelial dysfunction. *Antioxidants*, 10, 1306.
55. OHIAGU, F. O., CHIKEZIE, P. C. & CHIKEZIE, C. M. 2021. Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control. *Biomedical Research and Therapy*, 8, 4243-4257.
56. PLOVIER, H., EVERARD, A., DRUART, C., DEPOMMIER, C., VAN HUL, M., GEURTS, L., CHILLOUX, J., OTTMAN, N., DUPARC, T., LICHTENSTEIN, L., MYRIDAKIS, A., DELZENNE, N. M., KLIEVINK, J., BHATTACHARJEE, A., VAN DER ARK, K. C. H., AALVINK, S., MARTINEZ, L. O., DUMAS,



- 2023a. Gut microbial carbohydrate metabolism contributes to insulin resistance. *Nature*, 621, 389-395.
- 69.TAKEUCHI, T., KUBOTA, T., NAKANISHI, Y., TSUGAWA, H., SUDA, W., KWON, A. T., YAZAKI, J., IKEDA, K., NEMOTO, S., MOCHIZUKI, Y., KITAMI, T., YUGI, K., MIZUNO, Y., YAMAMICHI, N., YAMAZAKI, T., TAKAMOTO, I., KUBOTA, N., KADOWAKI, T., ARNER, E., CARNINCI, P., OHARA, O., ARITA, M., HATTORI, M., KOYASU, S. & OHNO, H. 2023b. Gut microbial carbohydrate metabolism contributes to insulin resistance. *Nature*, 621, 389-395.
- 70.TANNOCK, G. W. 2023. Understanding the gut microbiota by considering human evolution: a story of fire, cereals, cooking, molecular ingenuity, and functional cooperation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, e00127-22.
- 71.TREMAROLI, V. & BÄCKHED, F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 242-249.
- 72.TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A. & AFFOURTIT, J. P. 2009a. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
- 73.TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-1031.
- 74.TURNBAUGH, P. J., RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., KNIGHT, R. & pathology by inducing anti-inflammatory responses. *J Gastroenterol Hepatol*, 33, 1751-1760.
- 63.SHENDURE, J. & JI, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26, 1135-1145.
- 64.SINGH, R. P., HALAKA, D. A., HAYOUKA, Z. & TIROSH, O. 2020. High-fat diet induced alteration of mice microbiota and the functional ability to utilize fructooligosaccharide for ethanol production. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 376.
- 65.SMOKOVSKI, I. & SMOKOVSKI, I. 2021. Burden of diabetes prevalence. *Managing Diabetes in Low Income Countries: Providing Sustainable Diabetes Care with Limited Resources*, 1-12.
- 66.SUN, H., SAEEDI, P., KARURANGA, S., PINKEPANK, M., OGURTSOVA, K., DUNCAN, B. B., STEIN, C., BASIT, A., CHAN, J. C. & MBANYA, J. C. 2022. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 183, 109119.
- 67.SUN, K. Y., XU, D. H., XIE, C., PLUMMER, S., TANG, J., YANG, X. F. & JI, X. H. 2017. *Lactobacillus paracasei* modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. *Cytokine*, 92, 1-11.
- 68.TAKEUCHI, T., KUBOTA, T., NAKANISHI, Y., TSUGAWA, H., SUDA, W., KWON, A. T.-J., YAZAKI, J., IKEDA, K., NEMOTO, S. & MOCHIZUKI, Y.



- 81.WEINSTOCK, G. M. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489, 250-256.
- 82.WEN, L. & DUFFY, A. 2017. Factors influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes. *The Journal of nutrition*, 147, 1468S-1475S.
- 83.WU, G. D., CHEN, J., HOFFMANN, C., BITTINGER, K., CHEN, Y.-Y., KEILBAUGH, S. A., BEWTRA, M., KNIGHTS, D., WALTERS, W. A. & KNIGHT, R. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334, 105-108.
- 84.YANG, Y., WENG, W., PENG, J., HONG, L., YANG, L., TOIYAMA, Y., GAO, R., LIU, M., YIN, M., PAN, C., LI, H., GUO, B., ZHU, Q., WEI, Q., MOYER, M. P., WANG, P., CAI, S., GOEL, A., QIN, H. & MA, Y. 2017. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*, 152, 851-866.e24.
- 85.YARIBEYGI, H., FARROKHI, F. R., BUTLER, A. E. & SAHEBKAR, A. 2019. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of cellular physiology*, 234, 8152-8161.
- 86.YARIBEYGI, H., SATHYAPALAN, T., ATKIN, S. L. & SAHEBKAR, A. 2020a. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- 87.YARIBEYGI, H., SATHYAPALAN, T., MALEKI, GORDON, J. I. 2009b. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1, 6ra14-6ra14.
- 75.VACCA, M., CELANO, G., CALABRESE, F. M., PORTINCASA, P., GOBBETTI, M. & DE ANGELIS, M. 2020. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8.
- 76.VAN DE WOUW, M., SCHELLEKENS, H., DINAN, T. G. & CRYAN, J. F. 2017. Microbiota-gut-brain axis: modulator of host metabolism and appetite. *The Journal of nutrition*, 147, 727-745.
- 77.VYAS, U. & RANGANATHAN, N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterology research and practice*, 2012.
- 78.WACHSMUTH, H. R., WENINGER, S. N. & DUCA, F. A. 2022. Role of the gut-brain axis in energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 54, 377-392.
- 79.WANG, G., LI, X., ZHAO, J., ZHANG, H. & CHEN, W. 2017. *Lactobacillus casei* CCFM419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism. *Food Funct*, 8, 3155-3164.
- 80.WANG, X., OTA, N., MANZANILLO, P., KATES, L., ZAVALA-SOLORIO, J., EIDENSCHENK, C., ZHANG, J., LESCH, J., LEE, W. P., ROSS, J., DIEHL, L., VAN BRUGGEN, N., KOLUMAM, G. & OUYANG, W. 2014. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature*, 514, 237-41.



microbiota of Chinese obese children and adolescents with and without insulin resistance. *Frontiers in endocrinology*, 12, 636272.

90. ZHANG, L., QIN, Q., LIU, M., ZHANG, X., HE, F. & WANG, G. 2018. *Akkermansia muciniphila* can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress and inflammation, and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathog Dis*, 76.

91. ZIMMERMANN, P. & CURTIS, N. 2019. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota-a systematic review. *Journal of Infection*, 79, 471-489.

92. ZOETENDAL, E. G., VAUGHAN, E. E. & DE VOS, W. M. 2006. A microbial world within us. *Molecular microbiology*, 59, 1639-1650.

M., JAMIALAHMADI, T. & SAHEBKAR, A. 2020b. Molecular mechanisms by which SGLT2 inhibitors can induce insulin sensitivity in diabetic milieu: A mechanistic review. *Life sciences*, 240, 117090.

88. YOSHIDA, N., EMOTO, T., YAMASHITA, T., WATANABE, H., HAYASHI, T., TABATA, T., HOSHI, N., HATANO, N., OZAWA, G., SASAKI, N., MIZOGUCHI, T., AMIN, H. Z., HIROTA, Y., OGAWA, W., YAMADA, T. & HIRATA, K. I. 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*, 138, 2486-2498.

89. YUAN, X., CHEN, R., ZHANG, Y., LIN, X., YANG, X. & MCCORMICK, K. L. 2021. Gut



The relationship between intestinal microbiota composition and the incidence of insulin resistance, a mechanistic review

Behina Foroozanmehr¹, Mohammad Amin Hemmati¹, Majid Eslami^{2,3}, Habib Yaribeygi^{4*}

1. Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2. Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

3. Department of Bacteriology and Virology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

4. Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Received: 21 April 2024 Accepted: 27 August 2024

Abstract

Diabetes is the most common metabolic disease in humans. This chronic disease is directly related to many cases of death or disability and reduced quality of life in humans, despite the efforts made, its prevalence continues to increase worldwide. Studies show that diabetes is one of the main risk factors for the occurrence of cardiovascular diseases, and increasing its prevalence directly increases the probability of these diseases. Therefore, extensive research has been done on the causes of this disease worldwide. Along with factors such as obesity and physical inactivity, studies have shown that the composition of the gut microbiome may contribute to the production of inflammatory or anti-inflammatory factors that can help regulate insulin action and blood sugar levels. As a result, changes in the composition of the gut microbiome can directly lead to changes in insulin signaling and blood sugar levels and lead to diabetes. The intestinal microbiota is a complex combination of microorganisms living in the human intestine that perform many physiological activities. However, the evidence shows that in diabetic patients, the composition of the intestinal microbiome may be associated with changes that can help the metabolic balance of the body and create insulin resistance, so a change in the composition of this natural flora can cause a shift in metabolism and the occurrence of diabetes. However, the mediating mechanisms have not been well identified yet. Therefore, in the present review, some evidences related to the role of intestinal microbiota in the occurrence of diabetes have been presented and mediating mechanisms have been introduced. The present article shows that any factor that leads to a change in the composition of the intestinal microbiota can be the cause of diabetes among the various pathways introduced.

Keywords: Diabetes mellitus, Insulin resistance, Intestinal microbiota, Inflammation, Fatty acid oxidation

* Corresponding Author: h. Yaribeygi

Address: Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Email: habib.yari@yahoo.com; ORCID: 0000-0002-1706

مروری بر اپیدمیولوژی سرطان پستان در انسان و نقش بالقوه ویروس لوکوز گاوی در رخداد آن

محمد آراد زندیه^۱، سعید بکایی^{*}

۱- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، بخش اپیدمیولوژی و بیماری های مشترک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۲

چکیده

سرطان پستان به عنوان شایع ترین سرطان در میان زنان و از مهمترین علل مرگ به دلیل سرطان می باشد. این بیماری به دلیل برهمکنش میان عوامل ژنتیکی و درونی با عوامل محیطی رخ می دهد. تشخیص زود هنگام آن از طریق روش های غربالگری همچون ماموگرافی می باشد، اما عدم تشخیص به موقع آن سبب مرگ و متاستاز آن به ارگان های مختلف بدن می شود. عوامل عفونی همچون ویروس لوکوز گاوی که عامل بیماری لوکوز انزوتیک در جمعیت گاوی می باشد و به عنوان یک عامل خطر احتمالی در وقوع سرطان پستان در انسان مطرح شده است. در این مطالعه مروری نقلی با جست و جوی واژه های «سرطان پستان» همراه با «اپیدمیولوژی» و «سرطان پستان» همراه با «لوکوز گاوی یا ویروس لوکوز گاوی» و به فارسی در پایگاه های داده ی فارسی در بازه ی زمانی ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۲ و معادل لاتین کلید واژه ها در پایگاه های داده انگلیسی در سال های ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۳ جست و جو و مقاله های مربوطه استخراج شدند. عواملی همچون ژنتیک، جنسیت، سن، محیط زندگی، آبستنی، رفتار فرد و عوامل عفونی از جمله مهمترین عوامل خطر رخداد سرطان پستان می باشند. در برخی از مطالعات انجام شده بر روی عوامل عفونی همچون ویروس بیماری لکوز گاوی که در شیر گاو یافت می شود، مشاهده شده است که ژن این ویروس در پستان های سرطانی یافت شده است. همچنین در برخی از مطالعات این عامل را به عنوان یک عامل خطر در وقوع سرطان پستان انسانی مطرح کرده اند اما در مطالعات دیگر این عامل در بافت سرطانی پستانی یافت نکردند و احتمال سرطان زایی آن را رد شده است. از این رو با توجه نقش احتمالی این ویروس در وقوع سرطان پستان انسانی پیشنهاد می شود تا مطالعات اپیدمیولوژیک جامع و مطالعات آزمایشگاهی کاربردی در جهت تشخیص و بررسی روند سرطان زایی این ویروس انجام شود.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، اپیدمیولوژی، ویروس لوکوز گاوی، بیماری لوکوز گاو

^{*} نویسنده مسئول: سعید بکایی

آدرس: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، بخش اپیدمیولوژی و بیماری های مشترک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیک: sbokaie@ut.ac.ir

مقدمه

سرطان به عنوان یک مشکل عمده در بهداشت عمومی تلقی می شود. این بیماری یکی از دلایل عمده مرگ و میر و کاهش امید به زندگی در کشورهای جهان تلقی می گردد. در سه چهارم از کشورهای دنیا سرطان علت اول یا دوم مرگ قبل از سن ۷۰ سالگی می باشد (Bray, Laversanne et al. 2021). این بیماری اولین دلیل مرگ در بین زنان ۲۰ تا ۵۹ ساله است (Rastegar, Ashtiani et al. 2013). سالانه بیش از ۲,۳ میلیون مورد سرطان پستان رخ می دهد که آن را به شایع ترین سرطان در میان بزرگسالان و شایع ترین سرطان در زنان و دومین سرطان شایع در میان مردان و زنان تبدیل کرده است، به طوریکه میزان بروز آن، ۲۲۶۱۴۱۹ نفر در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است که این رقم حدود ۱۱,۷ درصد از کل سرطان ها بر اساس محل سرطان را شامل می شود. در سال ۲۰۲۲ نیز سرطان پستان بعد از سرطان ریه در آمریکا دومین علت مرگ به دلیل سرطان تلقی گردید (Pal, Nandave et al. 2021, Sung, Ferlay et al. 2021, Siegel, Miller et al. 2022, WHO 2023). سرطان پستان به عنوان یک بیماری هتروژن در اثر رشد غیر طبیعی سلول ها، تغییرات ژنتیکی در DNA و همچنین تغییرات اپی ژنتیکی به وجود می آید. این تغییرات در DNA سلول ها، قابل توارث هست که این بیانگر نقش ژنتیکی و انتقال ارثی سرطان می باشد (Pal, Nandave et al. 2021, Saha, Solomon et al. 2021). سرطان پستان به طور کلی به بر همکنش بین ژنتیک و محیط زندگی افراد بستگی دارد. عوامل خطر محیطی همچون: اشعه های یونیزه کننده (مانند رادون، گاما و اشعه ی ایکس)، عوامل شیمیایی محیطی موجود در هوا، آب، غذا، خاک و محصولات مصرفی و مصرف طولانی مدت تنباکو و همچنین عوامل خطر ذاتی یا فردی مانند

جنسیت، افزایش سن، استروژن، سابقه خانوادگی، جهش های ژنی و سبک زندگی ناسالم را می توان به عنوان مهمترین عوامل خطر موثر بر رخداد سرطان پستان ذکر کرد (Majeed, Aslam et al. 2014, Kispert and McHowat 2017, Melkonian, Henley et al. 2020). نقش عوامل خطر ویروسی در رخداد این بیماری نیز از جمله عواملی هست که امروزه مورد بحث زیادی می باشد. که هدف این مقاله تاکید بر نقش این عوامل خطر می باشد. ویروس لوکوز گاوی که عامل بیماری لوکوز انزووتیک گاوی از خانواده ی دلتا ویروس ها می باشد. این بیماری در گاو به شدت مسری می باشد و سبب لمفوسارکوما می شود، به علاوه در گله های گاو شیری اغلب بیماری به صورت مخفی دیده می شود و سبب خسارت اقتصادی عمده به گله می شود، مشکلاتی همچون افت تولید شیر و ناکارآمدی سیستم تولید مثلی (Kettmann, Portetelle et al. 1976, Aida, Murakami et al. 2013). شیوع سرمی این بیماری در برخی از مناطق بین ۰ تا ۱۵ درصد و نسبت عفونت در برخی از گله ها تا ۲۲ درصد نیز گزارش شده است. بر اساس مطالعات رابطه مستقیمی بین افزایش سن و زایش و افزایش عفونت وجود دارد (Tolouei, Taghipour et al. 2014, Hassanpour, Nadalian et al. 2009).

سرطان پستان به سه شکل بروز پیدا می کند: سرطان درجا، سرطان تهاجمی و سرطان همراه با متاستاز (جمعی از نویسندگان ۱۴۰۰). بنا بر طبقه بندی WHO سرطان پستان به دو نوع یعنی سرطان غیرتهاجمی (درجا) و سرطان تهاجمی طبقه بندی می شود. رشد در داخل مجاری بدون نفوذ به غشای پایه به عنوان کارسینوم درجا شناخته می شود (Deshpande, Pandey et al. 2017). سرطان پستان از جمله سرطان هایی می باشد که می تواند به اندام های دوردست مانند استخوان، کبد، ریه و مغز



نتایج و بحث

شاخص های توزیع و جمعیت شناختی سرطان پستان

رخداد سرطان ارتباط مستقیمی با شاخص های اقتصادی و اجتماعی و همچنین شاخص توسعه ی کشور ها دارد (Gersten and Wilmoth 2002). به طوریکه در کشور هایی با شاخص توسعه انسانی بالاتر میزان بروز و مرگ و میر سرطان از کشور هایی با شاخص توسعه ی پایین بالاتر است. تخمین زده می شود به طور کلی نیمی از موارد و ۵۸,۳ درصد از مرگ و میرهای ناشی از سرطان در سال ۲۰۲۰ در آسیا رخ داده است (Sung, Ferlay et al. 2021). در ۹۵ درصد از کشورها، سرطان پستان اولین یا دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان زنان است. با این حال بقای سرطان پستان به طور گسترده ای بین کشورها و در داخل کشور ها به طور نابرابری توزیع شده است. نزدیک به ۸۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان پستان و دهانه رحم در کشورهای کم درآمد و متوسط رخ می دهد (WHO 2023). در میان زنان، سرطان پستان ۱ مورد از هر ۴ مورد سرطان و ۱ مورد از ۶ مورد مرگ ناشی از سرطان را به خود اختصاص می دهد، و از نظر بروز در اکثریت قریب به اتفاق کشورها (۱۵۹ کشور از ۱۸۵ کشور) و از نظر مرگ و میر در ۱۱۰ کشور رتبه اول را به خود اختصاص داده است. البته استثنائاتی وجود دارد همچون کشور هایی مانند استرالیا/نیوزیلند، اروپای شمالی، آمریکای شمالی، و چین (بخشی از آسیای شرقی)، که سرطان ریه و در بسیاری از کشورهای جنوب صحرای آفریقا که سرطان دهانه رحم رتبه اول مرگ و میر را دارند. سرطان پستان بیشترین سرطانی می باشد که تشخیص داده شده است (۱۱,۷٪ از کل سرطان ها) و بیشترین رخداد و مرگ و میر را در میان زنان دارد به ترتیب ۲۴,۵٪ و ۱۵,۵٪ از

متاستاز دهد که همین متاستاز عمدتاً علت عدم درمان آن می باشد. تشخیص زودهنگام بیماری می تواند منجر به پیش آگهی خوب و درصد بقای بالا شود. (DeSantis, Fedewa et al. 2016). تشخیص زود هنگام سرطان پستان کلید اصلی مبارزه با این بیماری می باشد، هر چه زمان تشخیص طولانی تر شود بقای نسبی بیماری پایین تر می آید. جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و درمان های کمکی به عنوان راهکار هایی جهت مدیریت این سرطان می باشند، با این حال اثرات نامطلوب شیمی درمانی بر بافت های سالم پستان و افزایش مقاومت دارویی و بی ثمر بودن جراحی در سرطان هایی که متاستاز داده اند از دلایل مهم شکست درمان سرطان پستان می باشد (Zhao, Jin et al. 2021, Zhu and Li 2021).

مواد و روش ها

در این مطالعه مروری نقلی با جست و جوی واژه های «سرطان پستان» همراه با «اپیدمیولوژی» و «سرطان پستان» همراه با «لوکوز گاوی یا ویروس لوکوز گاوی» به فارسی در پایگاه های داده ی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) و بانک اطلاعات نشریات کشور (Magiran) در بازه ی زمانی ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۲ جست و جو و مقاله های مربوطه استخراج شدند. همچنین واژه های «Breast Cancer» همراه با «Epidemiology» و «Bovine Leukemia Virus» همراه با «Breast Cancer» به زبان انگلیسی در پایگاه های داده ی Science، Google Scholar، Pubmed، Direct در بازه ی زمانی ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۳ جستجو و مقاله های مربوطه استخراج شدند. سپس بر اساس مطالعه ی انجام شده مقالات مناسب منتخب و مورد بررسی قرار گرفتند و تنها از مقالاتی که دارای دسترسی آزاد بودند و به زبان انگلیسی و فارسی بودند، استفاده گردید.



موثر بر رخداد سرطان پستان ذکر کرد (Kispert and McHowat 2017, Melkonian, Henley et al. 2020). عوامل خطر متعددی مانند جنسیت، افزایش سن، استروژن، سابقه خانوادگی، جهش های ژنی و سبک زندگی ناسالم وجود دارد که می تواند احتمال ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد (Majeed, Aslam et al. 2014). در ذیل به تفصیل هر یک از این عوامل توصیف خواهند شد.



شکل ۲- شیوع سرطان در جهان (آمریکا، کانادا، استرالیا و کشورهای اروپایی بیشترین شیوع سرطان پستان را نشان می دهند).



شکل ۳- عوامل خطر موثر بر سرطان پستان

نقش ژن های مرتبط با سرطان پستان
ژن های زیادی در ارتباط با سرطان پستان شناسایی شده است. جهش و تکثیر غیر طبیعی هر دو ژن سرطان زایی و ضدسرطان زایی نقش کلیدی در فرآیندهای شروع و

کل سرطان ها را در سال ۲۰۲۰ شامل می شود (Sung, Ferlay et al. 2021). میزان بروز سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه در آمریکای جنوبی، آفریقا و در آسیا به سرعت در حال افزایش است. همچنین در کشورهای آسیایی با درآمد بالا (ژاپن و جمهوری کره)، که میزان ها از نظر تاریخی پایین است این افزایش بروز نیز دیده می شود. تغییرات چشمگیر در سبک زندگی، محیط های اجتماعی، فرهنگی و ساخته شده توسط اقتصادهای رو به رشد و افزایش نسبت زنان در نیروی کار صنعتی بر شیوع عوامل خطر سرطان پستان تأثیر گذاشته است، به تعویق انداختن فرزندآوری و داشتن فرزندان کمتر، بیشتر شدن سطوح اضافه وزن بدن و کم تحرکی از عوامل خطر مهمی هست که در ابتلا به سرطان پستان نقش دارد (Bray, McCarron et al. 2004, Heer, Harper et al. 2020, Joko-Fru, Jedy-Agba et al. 2020). در کشور هایی با بیشترین شیر غیر پاستوریزه وقوع سرطان پستان بالاتر می باشد (Globocan 2012, Khan, Abubakar et al. 2022). که تأکیدی است بر اهمیت احتمالی عوامل خطر عفونی که از طریق شیر غیر پاستوریزه منتقل می شوند.

عوامل خطر سرطان پستان

سرطان پستان یک بیماری تک علتی نیست بلکه عوامل مختلفی در رخداد آن نقش دارند، اما تعیین کردن تمامی این علت ها و نقش عوامل ژنتیکی و محیط زندگی بر رخداد آن به سختی قابل ارزیابی می باشد. عوامل خطر ژنتیکی که متحمل تغییرات نمی شوند، ژن های جهش یافته ای همچون BRCA1 و BRCA2 و دیگر ژن ها، عوامل خطر محیطی، اشعه های یونیزه کننده مانند رادون، گاما و اشعه ی ایکس، عوامل شیمیایی محیطی موجود در هوا، آب، غذا، خاک و محصولات مصرفی و مصرف طولانی مدت تنباکو را می توان از مهمترین عوامل خطر

پیشرفت تومور دارند. امروزه درمان سرطان بر اساس ژن مرسوم شده است (Ashrafizadeh, Hushmandi et al., 2020). یکی از این ژن ها ژن BRCA یک و دو می باشد. دو ژن BRCA1 و BRCA2 دو ژن ضدسرطان زایی معروف برای سرطان پستان هستند (Bane, Beck et al. 2007, Sánchez, Paul et al. 2017). جهش هایی که در این دو ژن رخ می دهد قابل توارث به نسل بعدی می باشد، از این رو خطر سرطان پستان را در نسل های بعدی تا حد زیادی افزایش می دهد. در مجموع حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد از سرطان های ارثی پستان و ۵ تا ۱۰ درصد از کل سرطان های پستان ناشی از جهش های این دو ژن است (Balmana, Diez et al. 2011). یک متآنالیز توسط Chen نشان داد که نسبت خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان بالای ۷۰ سال حامل جهش های BRCA1 یا BRCA2 به ترتیب ۵۷٪ و ۴۹٪ است (Chen et al. 2007, Parmigiani).

نقش سن، عوامل تولید مثلی و سبک زندگی بر سرطان پستان

علاوه بر جنسیت، افزایش سن یکی از مهم ترین عوامل خطر سرطان پستان است، بروز سرطان پستان ارتباط زیادی با افزایش سن دارد. در سال ۲۰۱۶، تقریباً ۹۹,۳ و ۷۱,۲ درصد از کل مرگ و میرهای مرتبط با سرطان پستان در آمریکا به ترتیب در زنان بالای ۴۰ و ۶۰ سال گزارش شده است. بنابراین، انجام غربالگری ماموگرافی قبل از موعد در زنان ۴۰ ساله یا بزرگتر ضروری است (Siegel, Miller et al. 2018). نزدیک به یک چهارم موارد سرطان پستان مربوط به سابقه خانوادگی است. یک مطالعه کوهورت روی بیش از ۱۱۳۰۰۰ زن در بریتانیا نشان داد که خطر ابتلا به این بیماری در زنانی که یکی از بستگان درجه اول آنها مبتلا به سرطان پستان است، ۱,۷۵ برابر بیشتر از زنان بدون هیچ بستگان مبتلا

هستند. علاوه بر این خطر در زنان دارای دو یا چند بستگان درجه اول مبتلا به سرطان پستان ۲,۵ برابر بیشتر می شود (Brewer, Jones et al. 2017). عوامل تولید مثلی مانند قاعدگی زودرس، یائسگی دیررس، سن دیررس در اولین بارداری و آبستنی کم می توانند خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهند. هر یک سال تاخیر در یائسگی خطر ابتلا به سرطان پستان را تا ۳ درصد افزایش می دهد. هر یک سال تاخیر در قاعدگی یا هر تولد اضافی خطر ابتلا به سرطان پستان را به ترتیب ۵ یا ۱۰ درصد کاهش می دهد (Washbrook 2006, Dall and Britt 2017). سبک زندگی مدرن مانند مصرف بیش از حد الکل و مصرف بیش از حد چربی در رژیم غذایی می تواند خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد. مصرف الکل سطح هورمون های مرتبط با استروژن را در خون افزایش می دهد و مسیرهای گیرنده استروژن را تحریک کند. یک متآنالیز بر اساس ۵۳ مطالعه اپیدمیولوژیک نشان داد که مصرف ۳۵ تا ۴۴ گرم الکل در روز می تواند خطر ابتلا به سرطان پستان را تا ۳۲ درصد، با افزایش ۷,۱ درصدی RR برای هر ۱۰ گرم الکل اضافی در روز افزایش دهد (Hamajima, Hirose et al. 2002). تاکنون، شواهد نشان می دهد که سیگار کشیدن، به ویژه در سنین پایین، خطر بیشتری در بروز سرطان پستان دارد (Catsburg, Miller et al. 2015, Kispert and McHowat 2017).

نقش عوامل عفونی و نقش ویروس لوکوز گاوی بر وقوع سرطان پستان

نقش عوامل عفونی به عنوان عامل خطری برای سرطان اخیراً در برخی از سرطان های حیوانات مطرح شده است (Selgrad, Malfertheiner et al. 2008, Efird, Davies et al. 2014). عوامل عفونی همچون ویروس هپاتیت B و C، ویروس اپشتین بار، ویروس پاپیلومای



انسانی، ویروسی بیماری ایدز و عوامل باکتریایی همچون هلیکوباکتر پیلوری و استرپتوکوکوس بویس به عنوان عوامل عفونی موثر بر رخداد سرطان ها ذکر شده اند. به طور کلی این عوامل با ۱۰ درصد از انواع سرطان ها مرتبط هستند، تخمین زده می شود هفت ویروس مسبب ۱۰ تا ۱۵ از سرطان ها می باشد (Burd 2003, Moore and Chang 2010, De Martel, Ferlay et al. 2012, Alibek, Mussabekova et al. 2013, De Flora and La Maestra 2015). ساز و کار رخداد سرطان از طریق این عوامل در مقالات متعددی ذکر شده است. مورالز و همکاران HPV، HBV و EBV را به عنوان یک کارسینوژن بیان کرده که از طریق مهار اپوپتوز در سلول های سرطان سبب نامیرایی آن ها شده است. به نوعی این ویروس ها با تغییرات ژنتیکی که در ژنوم سلول ایجاد می کنند سبب رشد بی رویه ی این سلول ها می شوند. ویروس هپاتیت C و هلیکوباکتر پیلوری التهاب طولانی مدت در بدن ایجاد می کند. که از طریق تغییر در سلول های ایمنی و واسطه های ایمنی سبب رخداد سرطان می شود (Lemon and McGivern 2012, Moore and Chang 2017). همچنین نقش احتمالی عوامل عفونی در بروز سرطان پستان مطرح شده است، عواملی همچون ویروس اپشتین بار، ویروس پاپیلوما ی انسانی و دیگر کاندید ها مطرح می باشد.

اخیراً لوکوز گاوی به عنوان فاکتور خطر سرطان پستان نیز مطرح شده است (Whitley, Gunst et al. 2014, Buehring, Shen et al. 2015). ویروس لوکوز گاوی از خانواده رتروویروس ها می باشد، که در گاو بیماری لوکوز انزوئوتیک را ایجاد می کند، همچنین آنتی بادی این ویروس در بوفالو ها نیز گزارش شده است (KARGAR, BOKAEI et al. 2002). در این خانواده ویروس های دیگری همچون HTLV-I و HTLV-II، به عنوان عامل خطری در سرطان ها مطرح شده اند، همچنین

این ویروس ها با توجه به اینکه به صورت افقی و عمودی به انسان ها منتقل می شوند به عنوان یک بیماری ژئونوز نیز مطرح هستند، ویروس ایدز نیز به طور غیر مستقیم و از طریق کاهش ایمنی زایی بدن به عنوان عاملی موثر در رخداد سرطان مطرح هست. در نهایت بحث هایی در خصوص سرطان زایی دیگر رتروویروس های پستانداران مطرح می باشد، از این رو نقش احتمالی ویروس لوکوز گاوی در رخداد سرطان پستان بیشتر می گردد (Voisset, Weiss et al. 2008, Biswas, Kaidarova et al. 2010, Munro and Houldcroft 2016). از طرفی دیگر ویروس لوکوز گاوی با دارا بودن پروتئین Tax برای سلول های میزبان انکوژن است. Tax با مهار ترمیم DNA و اختلال در مکانیسم های کنترل رشد سلولی باعث تومور زایی می شود. BLV دارای مناطق ژنوم رتروویروسی معمولی است: LTR (ناحیه محرک)، gag (آنتی ژن اختصاصی گروه، ناحیه کپسید)، pol (پلیمراز، ناحیه رونویسی معکوس، که یک کپی DNA از ژنوم BLV RNA را سنتز می کند) و env (پوشش)، این ویروس بسیار مشابه HTLV-1 می باشد که هر دوی این ویروس ها در خانواده دلتاویریده می باشد. (Aida, Murakami et al. 2013) فرضیه ای که برای سرطان زایی BLV ارائه می گردد به مانند فرضیه ای هست که برای سرطان زایی لوکمی سلول های T توسط HTLV-1 مطرح می شود که نقش پروتئین Tax در این زمینه قابل بحث می باشد (Rosewick, Durkin et al. 2017). در همین زمینه یکی دیگر از کاندیدهای مهم ویروس تومور غدد پستانی موش می باشد که به عنوان مدلی برای انکوژنی در سرطان پستان مطرح می باشد این ویروس از طریق شیر منتقل می شود (Jackson and Little 1933). ویروس توموری غدد پستانی موش، از طریق شیر مادر به توله ها منتقل می شود، به همین دلیل اولین بار این عامل



هایی مانند PCR در تشخیص DNA این ویروس ها می تواند موثر باشد، اما این روش ها منفی های کاذب نیز دارند. از طرفی کم بودن این ژنوم ها این بحث را نیز محتمل می کند که مقدار ژنوم آن قدر کم است که توان سرطان زایی نداشته باشد (Vinner, Mourier et al. 2015).

در طول ۵۰ سال اخیر مطالعات متعددی بر روی نقش ویروس لوکوز گاوی بر سرطان پستان انجام شده است. هر چند که همچنان نقش و پتانسیل این ویروس به عنوان یک بیماری زئونوز همچنان متناقض می باشد، اما توالی های ژنی ویروس لوسمی گاوی توسط PCR در سرطان پستان انسان شناسایی شده است (Rosewick, Momont et al. 2013). مطالعات آزمایشگاهی انجام شده توانایی این ویروس در سرطان زایی را نشان داده است (Brujeni, Poorbazargani et al. 2010, Mesa, Ulloa et al. 2013). در مطالعه ی مسا و همکاران، ۳۵ درصد در گروه بیماران سرطانی و ۴۳ درصد در گروه شاهد ژن BLV را در نمونه های بافت پستانی یافت شد (Mesa, Ulloa et al. 2013). در مطالعه ی شرنگل و همکاران که در برزیل انجام گرفت و مشابه مطالعه ی قبلی بود، ژن BLV در ۳۰ درصد از بافت های پستانی سرطانی یافت شد در صورتی که این میزان برای بافت های پستانی سالم ۱۳ درصد بود (Schwingel, Andreolla et al. 2019). همچنین در مطالعه ی بوهرینگ این میزان در بافت پستانی سرطانی ۵۹ درصد و در بافت پستانی سالم ۲۹ درصد به دست آمد (Buehring, Shen et al. 2015). تمامی این مطالعات فرضیه ی نقش احتمالی این ویروس در تومور زایی سرطان پستان را تقویت می کند. البته لازم به ذکر است در مطالعه ی مسا این ارتباط رد می شود اما در دیگر مطالعات این ارتباط از لحاظ آماری معنی دار بوده است.

سرطانی را فاکتور شیر نامیدند. عامل این بیماری یک رتروویروس RNA دار است که به MMTV معروف شده است. این ویروس در اندام های مختلفی از موش مانند غدد پستانی، پروستات، غدد بزاقی و سیستم لنفاوی دیده شده است. همچنین در گونه های پستانداران دیگری همچون انسان، سگ، گربه و میمون نیز شناسایی شده است (Bittner 1936, Szabo, Haislip et al. 2005, Dudley, Golovkina et al. 2016). تحقیقات گسترده ای در زمینه اثبات نقش این ویروس در ایجاد سرطان پستان انجام شده است. با شناسایی RNA ای در سرطان پستان انسان که همولوگ با ویروس MMT بود، در اثبات این نقش اهمیت گسترده ای داشت (Axel, Schlom et al. 1972). این تومور به عنوان مدلی برای سرطان پستان انسان در موش می باشد. در بررسی Lawson و همکاران در ارتباط با نقش ویروس های انکوژن بر روی سرطان پستان، با استفاده از مدل علیتی هیل ویروس های، ویروس تومور غدد پستانی، ویروس لوکوز گاوی، ویروس پاپیلومای انسانی و ویروس اپشتین بار بررسی شد. بر اساس اصول علیتی هیل؛ الف) مواد ژنتیکی ویروسی در بافت های سرطانی وجود دارد، اما به ندرت در بافت های طبیعی وجود دارد، ب) ویروس قادر است سلول های طبیعی را به سلول های بدخیم تبدیل کند، ج) مکانیسم انکوژنیک ویروسی شناخته شده است، و د) راه های انتقال ویروس شناسایی شده است (Hill 1965, Lawson, Salmons et al. 2018). یکی از مشکلاتی که بر سر راه این دست از پژوهش ها می باشد، این است که ژنوم های رتروویروسی به ندرت از ۱۰-۱۲ کیلوباز فراتر می روند و از این رو بخش کوچکی از ژنوم سلول میزبان آلوده را تشکیل می دهند. از این رو سلول آلوده ممکن است تنها بخش کوچکی از نسخه های ژنوم ویروسی را دارا باشد، استفاده از روش



BLV در تومور های پستان با شیوع ۹۵,۹ درصدی در شهر میناس گراسیس برزیل یافت شد. این مطالعه بیشترین ارتباط BLV با سرطان پستان و بیشترین شیوع BLV در تومور های پستان را نشان می دهد (Delarmelina, Buzelin et al. 2020).

البته لازم به ذکر است مطالعات متناقضی همچون مطالعه ای که شامل ۴۴۳۳ تومور و ۱۹ نوع سرطان، برای ویروس های شناخته شده و جدید انجام گرفت (Tang, Alaei-Mahabadi et al. 2013) و مطالعه ای دیگر که در چین انجام شد، محققین نتوانستند ژن BLV را از نمونه های سرطان پستان بیابند، و هیچ آزمایش سرولوژیکی مثبتی نیز یافت نشد (Zhang, Jiang et al. 2016). در مطالعه ی Gillet و همکاران توالی یابی ژنوم کامل ۵۱ نمونه سرطان پستان نشان می دهد که تومورها فاقد DNA ویروس لوکوز گاوی هستند (Gillet and Willems 2016). این مطالعات به شدت علیه نقش علیتی ویروس ها در بروز سرطان هستند. این ویروس لوکوز گاوی ممکن است فقط در بافت سرطانی پستان در سطوح بسیار پایین وجود داشته باشد و از طرفی از نظر رونویسی بی صدا باشد و یا ممکن است فقط در مناطق محدود جغرافیایی یافت شود (Munro and Houldcroft 2016).

یکی دیگر از مواردی که در صورت تایید این رابطه ی احتمالی باید در نظر گرفت، همبستگی بین مصرف شیر و گوشت به عنوان یکی از راه های انتقال این ویروس به انسان در جوامع می باشد. از این رو مطالعات متعددی بر این همبستگی تاکید کرده اند، کشور بولیوی به عنوان یکی از کشور هایی می باشد که از لحاظ مصرف شیر در دنیا مطرح شده، همچنین شیوع سرطان پستان در این کشور و کشور های همسایه خود خیلی پایین می باشد (Gao, Kouznetsova et al. 2020). مغولستان مثال

همچنین آنتی بادی این ویروس در خون انسان یافت شده است (Buehring, Philpott et al. 2003, NIKBAKHT, Rabbani et al. 2010, Buehring, DeLaney et al. 2019). با مطالعه ای بر روی بافت اپیتلیوم پستان افراد سالم و بیمار، ۲۹٪ از افراد سالم، ۳۸٪ از افراد پیش از حاد، ۵۹٪ از افراد با اوضاع وخیم بیماری از نظر BLV مثبت بودند (Buehring, Kramme et al. 1994). این مطالعه زمینه را برای مطالعات بیشتر ایجاد کرد. در مطالعه ای دیگر در پاناما در ۵۹ درصد از نمونه های سرطانی و ۳۸ درصد از نمونه های پیش سرطانی ژن gag یافت شد (Villalobos-Cortáez 2017). در مطالعه ای دیگر ژن های BLV در ۲۶,۸ درصد از نمونه های بیماران سرطان پستان و ۱۰ درصد از نمونه های بدون سرطان مثبت بودند. یافته های این مطالعه به صورت به شدت معنی دار ارتباط بین حضور ژن BLV و سرطان پستان را با نسبت شانس، ۳,۸۸۹، نشان داد. در این مطالعه قطعات ژن های gag و tax تکثیر شدند. همچنین بروز BLV پس از شیمی درمانی ۳,۵٪ بود، در حالی که میزان بروز در موارد سرطان پستان سمت چپ و راست تقریباً برابر بود (Khan, Abubakar et al. 2022). دیگر مطالعاتی همچون مطالعه ی Berkeley در کالیفرنیا نشان داد که ۷۴٪ از افراد از نظر سرولوژیکی نسبت به BLV مثبت بوده اند، هرچند این مطالعه دلیلی بر رد یا اثبات سرطان زایی این ویروس نمی باشد (Buehring, Philpott et al. 2003). در کلمبیا ۴۰,۵٪ از افراد ژن gag یافت شد (NIKBAKHT, Rabbani et al. 2010). ۴۴٪ از نمونه های بیرمنگام، آلاباما، پنسیلوانیا، اوهایو، اوکلند و کالیفرنیا نیز مثبت تلقی شدند (Buehring, Shen et al. 2014)، ۸۰٪ از زنان استرالیایی دارای سرطان پستان ویروس لوکوز گاوی یافت شد (Buehring, Shen et al. 2017) بالاترین درصد شیوع



دیگری است که سرطان پستان در این منطقه بسیار پایین است، البته در سال های اخیر شیوع آن در مناطق شهری نسبت به روستایی افزایش قابل توجهی پیدا کرده است که این می تواند به دلیل دسترسی بیشتر به لبنیات و فرآورده های گوشتی از گاو های اروپایی در مناطق شهری باشد، نه در مناطق روستایی، که در آن گاومیش بومی مغولی بیشتر از گاو ها برای غذا و مصرف رایج است. البته اشاره شده که گاو های بومی مغولی در انتشار این بیماری به مانند گاو های اروپایی، Bos taurus، (Troisi, Altantsetseg et al. 2012, Gao, Kouznetsova et al. 2020, al. 2012, Gao, Kouznetsova et al. 2020, Troisi, Altantsetseg et al. 2012, Gao,) (Kouznetsova et al. 2020). اما از طرف دیگر در

کشوری مانند هند بروز سرطان پستان در دهه های گذشته اندکی افزایش یافته است. هند کشوری با مصرف بسیار کم گوشت گاو به دلیل ادیانی است که خوردن گوشت یا گوشت گاو را ممنوع می کند. اما نوشیدن شیر و لبنیات مجاز است. از سال ۱۹۸۵ تا ۲۰۱۰، بروز سرطان سینه در هند افزایش یافت. در همین بازه زمانی، مصرف شیر از سال ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۵ ۲/۴ برابر شد. این نشان می دهد که مصرف شیر می تواند با سرطان پستان مرتبط باشد (Zur Hausen and de Villiers 2015). علاوه بر این، ژاپن و کره را که بررسی کنیم مشاهده می شود که سرطان پستان در این دو کشور بالا می باشد و در چند سال اخیر نسبتاً به شدت افزایش یافته است.

جدول ۱. مطالعات انجام شده در زمینه ارتباط بین ویروس لوکوز گاوی و سرطان پستان

محققین	شرح مطالعه انجام شده	ارتباط بین ویروس لوکوز گاوی و سرطان پستان	رفرنس
Buehring و همکاران	افراد بیمار از نظر داشتن BLV در بافت پستانی مثبت بودند.	ارتباط وجود دارد	(Buehring, Kramme et al. 1994)
Villalobos-CortÃ	در ۵۹ درصد از بافت های پستانی بیماران ژن gag یافت شد	ارتباط وجود دارد	(Villalobos-CortÃ 2017)
Khan و همکاران	در ۲۶٫۸ درصد از نمونه ی بیماران سرطان پستان ژن BLV یافت شد و نسبت شانسی بین سرطان پستان و حضور ژن BLV، ۰٫۳ محاسبه شد.	ارتباط وجود دارد	(Khan, Abubakar et al. 2022)
Buehring و همکاران	۸۰٪ از زنان استرالیایی دارای سرطان پستان ویروس لوکوز گاوی یافت شد	ارتباط وجود دارد	(Buehring, Shen et al. 2017)
Delarmelina E و همکاران	شیوع BLV در تومور های پستان با شیوع ۹۵٫۹ درصدی در شهر میناس گراسیس برزیل	ارتباط وجود دارد	(Delarmelina, Buzelin et al. 2020)
Tang و همکاران	بررسی ارتباط ۴۴۳۳ تومور و ۱۹ نوع سرطان، برای ویروس های شناخته شده و جدید انجام گرفت	ارتباطی وجود ندارد	(Tang, Alaei-Mahabadi et al. 2013)
Zhang و همکاران	یافتن ژن BLV در نمونه های سرطان پستان	ارتباطی وجود ندارد	(Zhang, Jiang et al. 2016)
Gillet و همکاران	توالی یابی ژنوم کامل ۵۱ نمونه سرطان پستان	ارتباطی وجود ندارد	(Gillet and Willems 2016)



ویروسی لوکوز گاوی در فرآورده های خام دامی و بافت انسانی به عنوان یک عامل موثر و محتمل می تواند تاثیر گذار باشد.



شکل ۴- ستون های اصلی در درمان پیشگیری و کنترل سرطان پستان

نتیجه گیری

پرسش در ارتباط با نقش بالقوه ی ویروس لوکوز گاوی در وقوع سرطان پستان در انسان همچنان به عنوان یک مسئله ی مهم و اجتناب ناپذیر مطرح می باشد. از طرفی با توجه به اهمیت بالای سرطان پستان به عنوان یک بیماری شایع در میان جوامع پیشرفته و در حال توسعه و نقش احتمالی این ویروس در بروز سرطان این مسئله را حیاتی تر می کند اما از طرف دیگر عدم وجود مطالعات جامع با حجم نمونه ی مناسب، یا عدم اجرای مطالعه به صورت ملی، نتایج متفاوت به دست آمده از مطالعات، روش های مختلف اندازه گیری و عدم وجود مطالعات کافی تجربی بر روی نقش این ویروس بر وقوع سرطان پستان نتیجه گیری کلی و نهایی را سخت می کند. ویروس لوکوز گاوی و شیوع آن به شدت به عوامل بهداشتی در محیط های دامداری ها و گله های گاو شیری بستگی دارد، از این رو سطح پایین بهداشت در گاوداری ها به طور کلی بر شیوع بالا و مخفی ویروس لوکوز گاوی اثر گذار می باشد. علاوه بر این کنترل بهداشت و این بیماری در گاوداری ها و همچنین با توجه به مصرف مستمر محصولات لبنی در طول عمر افراد

میزان بروز سرطان کولورکتال و پستان در دو کشور در دهه های گذشته به شدت افزایش یافته است. در سال های گذشته، احتمالاً به دلیل نرخ بالای عدم تحمل لاکتوز، لبنیات یک ماده پایدار یا محبوب در کشورها نبود، اما اخیراً با جهانی شدن، مصرف لبنیات در ژاپن و کره به شدت افزایش یافته است. همچنین به محبوبیت مصرف گوشت خام در ژاپن و کره، یعنی غذای شابو شابو نیز باید توجه کرد (Gao, Kouznetsova et al. 2020). داده های ثبت سرطان سوئد نشان داد که افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز نسبت به خانواده نزدیک خود که از نظر ژنتیکی با آنها مرتبط هستند و محیط های مشابهی دارند، سطوح کمتری از بروز سرطان سینه داشتند (Ji, Sundquist et al. 2015). این یک یافته مهم است.

پیشگیری و کنترل سرطان پستان

بر اساس چارچوبی که سازمان جهانی بهداشت^۱ برای کنترل و پیشگیری از سرطان پستان مطرح کرده است، کشورها باید سه رکن را در سلامت جامعه ی خود ارتقا دهند که این ارکان شامل تشخیص زودهنگام، تشخیص به موقع و مدیریت جامع سرطان پستان می باشد (WHO 2023). بر اساس توصیه سازمان جهانی بهداشت کشورها سه ستون اصلی برای کنترل بیماری مطرح شده است: ۱. برای تمرکز بر برنامه های تشخیص زودهنگام سرطان پستان باید حداقل ۶۰ درصد سرطان های پستان را در مراحل اولیه تشخیص بدهند تا درمان به موقع انجام گیرد، ۲. درمان باید ظرف سه ماه پس از اولین مراجعه شروع شود ۳. مدیریت سرطان پستان به گونه ای انجام گیرد که حداقل ۸۰ درصد بیماران درمان توصیه شده خود را تکمیل کنند (WHO 2023). انجام پایش و مراقبت بر وجود عوامل عفونی همچون

^۱ WHO

- tumour virus RNA." *Nature* **235**(5332): 32-36.
6. Balmana, J., O. Diez, I. Rubio and F. Cardoso (2011). "BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines." *Annals of Oncology* **22**: vi31-vi34.
 7. Bane, A. L., J. C. Beck, I. Bleiweiss, S. S. Buys, E. Catalano, M. B. Daly, G. Giles, A. K. Godwin, H. Hibshoosh and J. L. Hopper (2007). "BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays." *The American journal of surgical pathology* **31**(1): 121-128.
 8. Biswas, H. H., Z. Kaidarova, G. Garratty, J. W. Gible, B. H. Newman, J. W. Smith, A. Ziman, J. L. Fridley, R. A. Sacher and E. L. Murphy (2010). "Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection." *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999) **54**(3): 290.
 9. Bittner, J. J. (1936). "SOME POSSIBLE EFFECTS OF NURSING ON THE MAMMARY GLAND TUMOR INCIDENCE IN MICE." *Science* **84**(2172): 162.
 10. Bray, F., M. Laversanne, E. Weiderpass and I. Soerjomataram (2021). "The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide." *Cancer* **127**(16): 3029-3030.
 11. Bray, F., P. McCarron and D. M. Parkin (2004). "The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality." *Breast cancer research* **6**(6): 1-11.
- جامعه کنترل و پایش مستمر گاوداری های آلوده به لکوز گاوی و کنترل شیر و محصولات لبنی از وجود ژن های ویروس لکوز گاوی به جز اهمیتی که در بحث سلامت و ارتقای بهداشتی دامداری های دارد، با توجه به نقش آن و ارتباط احتمالی آن در بروز سرطان پستان انسانی این معضل را به عنوان یک مسئله ی بهداشت عمومی نیز مطرح می کند.
- منابع**
۱. جمعی از نویسندگان (۱۴۰۰). مرجع اپیدمیولوژی بیماریهای شایع ایران جلد سوم سرطان ها.
 2. Aida, Y., H. Murakami, M. Takahashi and S.-N. Takeshima (2013). "Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus." *Frontiers in microbiology* **4**: 328.
 3. Alibek, K., A. Mussabekova, A. Kakpenova, A. Duisembekova, Y. Baiken, B. Aituov, N. Karatayeva and S. Zhussupbekova (2013). "Childhood cancers: what is a possible role of infectious agents?" *Infectious agents and cancer* **8**(1): 1-9.
 4. Ashrafizadeh, M., K. Hushmandi, E. Rahmani Moghadam, V. Zarrin, S. Hosseinzadeh Kashani, S. Bokaie, M. Najafi, S. Tavakol, R. Mohammadinejad and N. Nabavi (2020). "Progress in delivery of siRNA-based therapeutics employing nano-vehicles for treatment of prostate cancer." *Bioengineering* **7**(3): 91.
 5. Axel, R., J. Schlom and S. Spiegelman (1972). "Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary



- "Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development". *PLoS One* **12**(6): e0179367.
19. Buehring, G. C., H. M. Shen, H. M. Jensen, K. Y. Choi, D. Sun and G. Nuovo (2014). "Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue." *Emerg Infect Dis* **20**(5): 772-782.
 20. Buehring, G. C., H. M. Shen, H. M. Jensen, D. L. Jin, M. Hudes and G. Block (2015). "Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study." *PloS one* **10**(9): e0134304.
 21. Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." *Clinical microbiology reviews* **16**(1): 1-17.
 22. Catsburg, C., A. B. Miller and T. E. Rohan (2015). "Active cigarette smoking and risk of breast cancer." *International journal of cancer* **136**(9): 2204-2209.
 23. Chen, S. and G. Parmigiani (2007). "Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**(11): 1329.
 24. Dall, G. V. and K. L. Britt (2017). "Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk." *Frontiers in oncology* **7**: 110.
 25. De Flora, S. and S. La Maestra (2015). "Epidemiology of cancers of infectious origin and prevention strategies." *Journal of preventive medicine and hygiene* **56**(1): E15.
 12. Brewer, H. R., M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth and A. J. Swerdlow (2017). "Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure." *Breast cancer research and treatment* **165**: 193-200.
 13. Brujeni, G. N., T. T. Poorbazargani, S. Nadin-Davis, M. Tolooie and N. Barjesteh (2010). "Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle." *The Journal of Infection in Developing Countries* **4**(09): 576-579.
 14. Buehring, G., P. M. Kramme and R. D. Schultz (1994). "Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **71**(3): 359-365.
 15. Buehring, G. C., A. DeLaney, H. Shen, D. L. Chu, N. Razavian, D. A. Schwartz, Z. R. Demkovich and M. N. Bates (2019). "Bovine leukemia virus discovered in human blood." *BMC infectious diseases* **19**(1): 1-10.
 16. Buehring, G. C., S. M. Philpott and K. Y. Choi (2003). "Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus." *AIDS research and human retroviruses* **19**(12): 1105-1113.
 17. Buehring, G. C., S. M. Philpott and K. Y. Choi (2003). "Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus." *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**(12): 1105-1113.
 18. Buehring, G. C., H. Shen, D. A. Schwartz and J. S. Lawson (2017).



33. Gersten, O. and J. R. Wilmoth (2002). "The cancer transition in Japan since 1951." *Demographic Research* 7: 271-306.
34. Gillet, N. A. and L. Willems (2016). "Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA." *Retrovirology* 13. ۷۰ : (۱)
35. Globocan, W. (2012). "Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012." Int Agency Res Cancer.
36. Hamajima, N., K. Hirose, K. Tajima, T. Rohan, E. Calle, C. Heath, R. Coates, J. Liff, R. Talamini and N. Chantarakul (2002). "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease." *British journal of cancer* 87(11): 1234-1245.
37. Hassanpour, M., M. Nadalian, S. Safi, R. Madani and S. Bokaie (2014). "Epidemiological survey of bovine leukemia virus (BLV) infection and its effective factors emphasis ELISA & nested PCR in dairy herds around Babol city (North of Iran) as a Caspian climate." *European Journal of Zoological Research* 3(1): 166-171.
38. Heer, E., A. Harper, N. Escandor, H. Sung, V. McCormack and M. M. Fidler-Benaoudia (2020). "Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study." *The Lancet Global Health* 8(8): e1027-e1037.
26. De Martel, C., J. Ferlay, S. Franceschi, J. Vignat, F. Bray, D. Forman and M. Plummer (2012). "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis." *The lancet oncology* 13(6): 607-615.
27. Delarmelina, E., M. A. Buzelin, B. S. Souza, F. M. Souto, J. M. Bicalho, R. J. F. Câmara, C. F. Resende, B. L. Bueno, R. M. Victor, G. C. F. Galinari, C. B. Nunes, R. C. Leite, A. Costa É and J. Reis (2020). "High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil." *PLoS One* 15(10): e0239745.
28. DeSantis, C. E., S. A. Fedewa, A. Goding Sauer, J. L. Kramer, R. A. Smith and A. Jemal (2016). "Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women." *CA: a cancer journal for clinicians* 66(1): 31-42.
29. Deshpande, T. M., A. Pandey and S. Shyama (2017). "Breast cancer and etiology".
30. Dudley, J. P., T. V. Golovkina and S. R. Ross (2016). "Lessons Learned from Mouse Mammary Tumor Virus in Animal Models." *Ilar j* 57(1): 12-23.
31. Efird, J. T., S. W. Davies, W. T. O'Neal and E. J. Anderson (2014). "Animal viruses, bacteria ,and cancer: a brief commentary." *Frontiers in public health* 2: 14.
32. Gao, A., V. L. Kouznetsova and I. F. Tsigelny (2020). "Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis." *Microbial Pathogenesis* 149: 104417.



45. Khan, Z., M. Abubakar, M. J. Arshed, R. Aslam, S. Sattar, N. A. Shah, S. Javed, A. Tariq, N. Bostan and S. Manzoor (2022). "Molecular investigation of possible relationships concerning bovine leukemia virus and breast cancer." *Scientific Reports* **1**. ۴۱۶۱ : (۱) ۲
46. Kispert, S. and J. McHowat (2017). "Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer." *Breast Cancer: Targets and Therapy*: 127-132.
47. Lawson, J. S., B. Salmons and W. K. Glenn (2018). "Oncogenic viruses and breast cancer: mouse mammary tumor virus (MMTV), bovine leukemia virus (BLV), human papilloma virus (HPV), and epstein–barr virus (EBV)." *Frontiers in oncology* **8**: 1.
48. Lemon, S. M. and D. R. McGivern (2012). "Is hepatitis C virus carcinogenic?" *Gastroenterology* **142**(6): 1274-1278.
49. Majeed, W., B. Aslam, I. Javed, T. Khaliq, F. Muhammad, A. Ali and A. Raza (2014). "Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**(8): 3353-3358.
50. Melkonian, S. C ,S. J. Henley, V. Senkomago, C. C. Thomas, M. A. Jim, A. Apostolou and M. Saraiya (2020). "Cancers associated with human papillomavirus in american indian and alaska native populations—United States, 2013–2017." *Morbidity and Mortality Weekly Report* **69**(3). ۱۲۸۳ : (۷)
51. Mesa, G., J. C. Ulloa, A. M. Uribe and M. F. Gutierrez (2013). "Bovine
39. Hill, A. B. (1965). *The environment and disease: association or causation?*, Sage Publications.
40. Jackson, R. B. and C. Little (1933). "The existence of non-chromosomal influence in the incidence of mammary tumors in mice." *Science* **78**. ۴۶۶-۴۶۵ : (۲۰۲۹)
41. Ji, J., J. Sundquist and K. Sundquist (2015). "Lactose intolerance and risk of lung, breast and ovarian cancers: aetiological clues from a population-based study in Sweden." *British journal of cancer* **112**(1): 149-152.
42. Joko-Fru, W. Y., E. Jedy-Agba, A. Korir, O. Ogunbiyi, C. P. Dzamalala, E. Chokunonga, H. Wabinga, S. Manraj, A. Finesse and N. Somdyala (2020). "The evolving epidemic of breast cancer in sub-Saharan Africa: Results from the African Cancer Registry Network." *International Journal of Cancer* **147**(8): 2131-2141.
43. KARGAR, M. R., S. BOKAEI and M. MESHKOT (2002). "SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR ANTIBODIES AGAINST BLV, BH4, BVD, IBR, P13 AMONG BUFFALO IN CENTER OF BUFFALO SPERM PREPARATION IN OROMIEH".
44. Kettmann, R., D. Portetelle, M. Mammerickx, Y. Cleuter, D. Dekegel, M. Galoux, J. Ghysdael, A. Burny and H. Chantrenne (1976). *Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus? Modern Trends in Human Leukemia II: Biological, Immunological, Therapeutical and Virological Aspects*, Springer.



- determinant of leukemogenesis." *Nature communications* **8**(1): 15264.
59. Rosewick, N., M. Momont, K. Durkin, H. Takeda, F. Caiment, Y. Cleuter, C. Vernin, F. Mortreux, E. Wattel and A. Burny (2013). "Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(6): 2306-2311.
 60. Saha, T., J. Solomon, A. O. Samson and H. Gil-Henn (2021). "Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer." *Journal of Clinical Medicine* **10**(16): 3498.
 61. Sánchez, H., M. W. Paul, M. Grosbart, S. E. van Rossum-Fikkert, J. H. Lebbink, R. Kanaar, A. B. Houtsmuller and C. Wyman (2017). "Architectural plasticity of human BRCA2–RAD51 complexes in DNA break repair." *Nucleic acids research* **45**(8): 4507-4518.
 62. Schwingel, D., A. P. Andreolla, L. M. Erpen, R. Frandoloso and L. C. Kreutz (2019). "Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil." *Scientific reports* **9**(1): 2949.
 63. Selgrad, M., P. Malfertheiner, L. Fini, A. Goel, C. R. Boland and L. Ricciardiello (2008). "The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer." *Journal of Cellular Physiology* **216**(2): 378-388.
 64. Siegel, R. L., K. D. Miller, H. E. Fuchs and A. Jemal (2022). "Cancer statistics, 2022." *CA: a cancer journal for clinicians* **72**(1): 7-33.
 65. Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2018). "Cancer statistics, leukemia virus gene segment detected in human breast tissue".
 52. Moore, P. S. and Y. Chang (2010). "Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology." *Nature reviews cancer* **10**(12): 878-889.
 53. Moore, P. S. and Y. Chang (2017). "Common commensal cancer viruses." *PLoS pathogens* **13**(1): e1006078.
 54. Munro, A. C. and C. Houldcroft (2016). Human cancers and mammalian retroviruses: should we worry about bovine leukemia virus?, *Future Medicine*. **11**: 163-166.
 55. NIKBAKHT, B. G., M. Rabbani, M. Emam and E. Rezaatofghi (2010). "Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples".
 56. Pal, A. K., M. Nandave and R. K. Gautam (۲۰۲۱) Chapter 31 - Advances in delivery of nanomedicines and theranostics for targeting breast cancer. *Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer*. K. Dua, M. Mehta, T. de Jesus Andreoli Pinto et al., Academic Press: 387-407.
 57. Rastegar, H., H. A. Ashtiani, S. Anjarani, S. Bokaei, A. Khaki and L. Javadi (2013). "The role of milk thistle extract in breast carcinoma cell line (MCF-7) apoptosis with doxorubicin." *Acta Medica Iranica*: 591-598.
 58. Rosewick, N., K. Durkin, M. Artesi, A. Marcais, V. Hahaut, P. Griebel, N. Arsic, V. Avettand-Fenoel, A. Burny and C. Charlier (2017). "Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early



71. Villalobos-CortÃ, A. (2017). "Enzootic bovine leukosis and the risk to human health." *African Journal of Biotechnology* **16**(15): 763-770.
72. Vinner, L., T. Mourier, J. Friis-Nielsen, R. Gniadecki, K. Dybkaer, J. Rosenberg, J. L. Langhoff, D. F. S. Cruz, J. Fonager and J. M. Izarzugaza (2015). "Investigation of human cancers for retrovirus by low-stringency target enrichment and high-throughput sequencing." *Scientific reports* **5**(1): 13201.
73. Voisset, C., R. A. Weiss and D. J. Griffiths (2008). "Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**(1): 157-196.
74. Washbrook, E. (2006). "Risk factors and epidemiology of breast cancer." *Women's Health Medicine* **3**(1): 8-14.
75. Whitley, C., K. Gunst ,H. Müller, M. Funk, H. Zur Hausen and E.-M. de Villiers (2014). "Novel replication-competent circular DNA molecules from healthy cattle serum and milk and multiple sclerosis-affected human brain tissue." *Genome announcements* **2**(4): e00849-00814.
76. WHO. (2022) .("WHO launches new roadmap on breast cancer." from <https://www.who.int/news/item/03-02-2023-who-launches-new-roadmap-on-breast-cancer>.
77. Zhang, R., J. Jiang, W. Sun, J. Zhang, K. Huang, X. Gu, Y. Yang, X. Xu, Y. Shi and C. Wang (2016). "Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese 2018." *CA: a cancer journal for clinicians* **68**(1): 7-30.
66. Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* **71**(3): 209-249.
67. Szabo, S., A. M. Haislip, V. Traina-Dorge, J. M. Costin, B. E. Crawford, 2nd, R. B. Wilson and R. F. Garry (2005). "Human, rhesus macaque, and feline sequences highly similar to mouse mammary tumor virus sequences." *Microsc Res Tech* **68**(3-4): 209-221.
68. Tang, K.-W., B. Alaei-Mahabadi, T. Samuelsson, M. Lindh and E. Larsson (2013). "The landscape of viral expression and host gene fusion and adaptation in human cancer." *Nature Communications* **4**(1): 2513.
69. Tolouei, M., B. T. Taghipour, B. G. R. NIKBAKHT, Z. Khaki, S. Bokaei and I. Ashrafi (2009). "AN ABATTOIR SURVEY ON PREVALENCE OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS VIRUS INFECTION AND ASSOCIATED CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND FLOW CYTOMETRIC FINDINGS IN HOLESTEIN CATTLE IN TEHRAN".
70. Troisi, R., D. Altantsetseg, G. Davaasambuu, J. Rich-Edwards, D. Davaalkham, S. Tretli, R. N. Hoover and A. L. Frazier (2012). "Breast cancer incidence in Mongolia." *Cancer Causes & Control* **23**: 1047-1053.



- breast cancer cells via regulating SOX4." Journal of Oncology 2021.
80. Zur Hausen, H. and E. M. de Villiers (2015). "Dairy cattle serum and milk factors contributing to the risk of colon and breast cancers." International journal of cancer 137 (4): 959-967.
- patients." Breast Cancer Research **18**: 1-2.
78. Zhao, Y., L.-J. Jin and X.-Y. Zhang (2021). "Exosomal miRNA-205 promotes breast cancer chemoresistance and tumorigenesis through E2F1." Aging (Albany NY) **13**(14): 18498.
79. Zhu, X. and L. Li (2021). "Circ-DONSON knockdown inhibits cell proliferation and radioresistance of



A Review on Epidemiology of Breast Cancer in Humans and the Potential Role of Bovine Leukemia Virus on Its Occurrence

Mohammad Arad Zandieh¹ and Saeid Bokaei^{1*}

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 03 July 2023 Accepted: 02 February 2025

Abstract

Breast cancer is the most common cancer among women and one of the causes of death due to cancer. This disease occurs due to the interaction between genetic and internal factors with environmental factors. Its early detection is through screening methods such as mammography, but not detecting it in time causes death and metastasis to different organs of the body. Infectious factors such as bovine leukosis virus, which is the causative agent of bovine enzootic leukosis disease in cattle population and has been proposed as a possible risk factor in breast cancer in humans. In this descriptive review study, searching for the words "breast cancer" along with "epidemiology" and "breast cancer" along with "bovine leukemia" and in Farsi in Persian databases in the period from 1399 to 1402 And English equivalents of words were searched in English databases in the years 2018 to 2023 and related articles. Factors such as genetics, gender, age, living environment, pregnancy, the results of individual behavior and infectious agents are among the most important risk factors for breast cancer. In a number of studies conducted on infectious agents such as bovine leukosis disease, which is found in cow's milk, it is observed that this virus is found in cancerous breasts. Also, in some studies, this factor has been raised as a risk in human-caused breast cancer, but in other studies, this factor was not found in breast cancer tissue and showed the possibility of its carcinogenesis. Therefore, considering the possible role of this virus in human breast cancer, it is suggested to carry out comprehensive epidemiological studies and practical laboratory studies to diagnose and investigate the cancer process of this virus.

Keywords: Breast Cancer, Epidemiology, Bovine Leukemia Virus, Bovine Leukosis

* Corresponding Author: Saeid Bokaei

Address: Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Email: sbokaie@ut.ac.ir.

بررسی ایمنی زایی واکسن روغنی تب برفکی فرموله شده با ادجوان‌های روغنی در مقایسه با ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید در بز

سید محمود عظیمی دزفولی^{۱*}، مسعود مقدم پور^۲

۱-دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن های تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی،

آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۲-استاد یار بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی،

آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۹

چکیده

در مناطقی که بیماری تب برفکی اندمیک می باشد، همانند ایران، موثرترین راه کنترل پیشگیری از بیماری واکسیناسیون است. در حال حاضر واکسن تب برفکی در دو طیف پایه آبی و روغنی بصورت تجاری تولید شده و در اختیار دامداران قرار دارد. در مطالعه حاضر میزان پاسخ ایمنی همورال و مدت دوام آن متعاقب تجویز واکسن مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق واکسن های آزمایشی با ادجوان روغنی B62 و واکسن دارای ادجوان ISA61 و واکسن دارای ژل آلومینیوم هیدروکساید در دام هدف (بز) مورد مقایسه قرار گرفت. واکسیناسیون گروه ها در دو نوبت و با فاصله ۲۸ روز انجام شد. نمونه گیری از دام های تحت آزمایش در روز های صفر، ۲۸، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۱۰ انجام شد. بررسی ایمنی همورال دام ها با استفاده از روش خنثی سازی سرم انجام شد. به جهت تعیین اختلاف معنی دار در نتایج گروه ها از روش های آماری استفاده شد. عیار آنتی بادی حاصل از واکسن های دارای ادجوان های روغنی B62 و ISA61 و ژل آلومینیوم هیدروکساید تا روز ۶۰ افزایش یکسانی را نشان دادند ولی از روز ۶۰ عیار سرمی گروه دریافت کننده ژل آلومینیوم هیدروکساید کاهش یافت ولی دو گروه های که ادجوان B62 و ISA61 دریافت کرده بودند تا روز ۲۱۰ عیار بالایی نشان دادند. بررسی های آماری نتایج عیار سرمی در آزمایش خنثی سازی سرم (SN) اختلاف معنی دار را بین گروه واکسن های دارای ادجوان های روغنی B62 و ISA61 با سایر گروه ها از روز ۶۰ تا پایان تحقیق را نشان داد و میانگین عیار خنثی سازی حدود ۲/۶ گزارش شد.

کلمات کلیدی: تب برفکی، ژل آلومینیوم هیدروکساید، ادجوان روغنی، واکسن روغنی

*نویسنده مسئول: سید محمود عظیمی دزفولی

آدرس: بخش تحقیق و تولید واکسن های تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)،

کرج، ایران.

پست الکترونیک: m.azimi@rvsri.ac.ir

مقدمه

تب برفکی (FMD) یک بیماری بسیار عفونی دام و از نظر اقتصادی برای دامدار و صنعت دامداری ویرانگر است. عامل این بیماری ویروسی از خانواده پیکورناویریده بوده و یک بیماری واگیردار در حیوانات زوج سم ایجاد میکند که خسارات آن در تامین بهداشت، رفاه و تولید فرآورده های دامی قابل توجه و بسیار سنگین میباشد. مهمترین و اصلی ترین راه ورود ویروس به بدن از طریق دستگاه تنفسی است (Ahmadzadeh, H.1390; Alexandersen, S, et al. 2003; Alexandersen, S. Mowat, N. 2005; Aftosa, F. (2007; Bachrach, H. L. 1968; Brown, F. 2003 واکسن تب برفکی با پایه روغنی و آبی رایج ترین نوع واکسن های مورد استفاده در بین دامداران می باشند. این دو دسته از ادجوان ها هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند. از ویژگی های بسیار مهم و مورد انتظار ادجوان ها افزایش طول دوره ایمنی و افزایش قدرت پاسخ ایمنی محافظت کننده می باشد. (Moghadam Pour, M. (1385 (Moghadam Pour, M. et al 1385 انجام شده حاکی از آن است که واکسن های دارای ادجوان روغنی دارای مزایایی مانند بالا بودن طول دوره ایمنی و کاهش دفعات واکسیناسیون نسبت به نوع آبی می باشند. طبق مطالعات انجام شده ادجوان روغنی علاوه بر افزایش طول دوره ایمنی، قادر به تحریک ایمنی همورال به شکل مطلوب می باشند (Barnett, P.V. et al 2002; Bartels, T. et al 1994; Blancou, J. 2003 هدف از این تحقیق ارزیابی پاسخ ایمنی همورال و بررسی طول دوره ایمنی، متعاقب تجویز واکسن های تهیه شده از ادجوان روغنی B۶۲ و ISA61 در مقایسه با واکسن پایه آبی می باشد.

مواد و روش کار

آنتی ژن

جهت تولید آنتی ژن از کشت مونولایر سلول BHK استفاده شد. مراحل کار بطور خلاصه به این صورت بود که ابتدا چهار عدد فلاسک ۱۷۵ cm² سلول مونولایر BHK تهیه شد. هر یک از فلاسک ها با 100 ml محیط کشت RPMI1640، 5% FBS، 100 mg/ml پنی سیلین و استرپتومایسین کشت شده و بمدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از این مدت کلیه فلاسک ها به بیش از ۹۰٪ رشد رسیدند. هر یک از فلاسک ها با 100/1 MOI از ویروس O2016 با عیار ۶/۸ × ۱۰^۶ TCID₅₀/ml تلقیح شدند. پس از ۱۸ ساعت تمامی فلاسک ها تخریب سلولی (CPE) را نشان دادند. سوسپانسیون ویروسی حاصل در حجم ۴۰۰ میلی لیتر جمع آوری شده و توسط سانتریفوژ (۳۰۰۰ rpm/دقیقه/ ۴۰ درجه سانتیگراد) شفاف سازی شد. غیر فعال سازی ویروس با اتیلن آمین (binary ethylenimine) با غلظت ۴/۲ میلی مول در مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد انجام شد. باقی مانده اتیلن آمین مصرف نشده در سوسپانسیون ویروسی توسط تیوسولفات سدیم با غلظت ۵ میلی مول خنثی شد (Bahnmann HG. 1973).

ادجوان ها

در این تحقیق دو نوع ادجوان روغنی در کنار ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید با یکدیگر مقایسه شده اند. ادجوان های روغنی شامل ادجوان ISA61 تولید شده توسط شرکت Seppic فرانسه و ادجوان تولید داخل با نام B۶۲ بود. ادجوان های داخلی از سازمان دامپزشکی پروانه تولید اخذ کرده است (Moghadam Pour, M. (1385 - Moghadam Pour, M. et al 1385). ادجوان آبی یا آلومینیوم هیدروکساید در موسسه رازی تولید



دام ها انجام شد. لازم به ذکر است که بز ها در ۴ گروه (A,B,C,D) دسته بندی شدند. در هر گروه سه راس دام در نظر گرفته شده و در برنامه واکسیناسیون دو نوبت تلقیح با فاصله ۲۸ روز انجام گردید (جدول ۲).

جدول ۲- گروه های دام تحت آزمایش

گروه ها	A	B	C	D
نوع ادجوان واکسن	B۶۲	ISA 61	Alum	Ag

برنامه نمونه گیری

اخذ نمونه از گروه های تحت آزمایش توسط لوله های خلاء دار و تحت شرایط کنترل شده در ۸ مرحله در روز های اول و روزهای ۲۸، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ انجام گردید. نمونه های بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در شرایط استریل سرم آنها جدا گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا انجام آزمایش خنثی سازی ویروس نگهداری گردیدند.

آزمایش خنثی سازی ویروس (Seroneutralization test):

آزمایش خنثی سازی ویروس جهت تعیین عیار آنتی بادی خنثی کننده ویروس تب برفکی در سرم دام ها انجام گردید. بطور خلاصه مراحل کار در این آزمون به شرح ذیل صورت گرفت. ابتدا جهت غیرفعال کردن عوامل مداخله گر در تست، سرمها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از محیط کشت RPMI از سرم ها رقت های سریالی تهیه گردید. به دو گوده از پلیت ۹۶ خانه، ۵۰ میکرولیتر سرم مجهول (دو گوده برای هر رقت سرم) اضافه گردید. در ادامه ۵۰ میکرولیتر ویروس O2016 با عیار 2×10^3 (TCID₅₀/ml) به هر گوده اضافه گردید. پلیت ها بمدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون

شده و در تهیه واکسن پایه آبی تب برفکی بصورت تجاری استفاده می گردد. در این مطالعه یک گروه از دام ها بعنوان گروه کنترل منفی، آنتی ژن ویروس تب برفکی را بدون افزودن ادجوان دریافت کردند. واکسن پایه آبی (ژل آلومینیوم هیدروکساید):

از ویروس غیر فعال شده و ژل آلومینیوم هیدروکساید و ساپونین (۰/۴ گرم در لیتر) برای تهیه واکسن پایه آبی استفاده شد. در فرمولاسیون واکسن پایه آبی از ۳۰٪ ژل آلومینیوم هیدروکساید و ۷۰٪ آنتی ژن استفاده شد و غلظت نهایی ژل آلومینیوم هیدروکساید ۶۵/۱ (w/v)٪ تنظیم گردید.

واکسنهای پایه روغنی

در مطالعه حاضر از ادجوان های روغنی ISA61 و B ۶۲ برای تولید واکسن روغنی استفاده شد. در فرمولاسیون های نهایی واکسن های روغنی تولید شده، نسبت فاز آبی (آنتی ژن) به فاز روغنی (ادجوان) ۵۰٪ (w/w) بوده است.

جدول ۱- فرمولاسیون واکسن ها

حجم نهایی (گرم)	مقدار ادجوان گرم و درصد	مقدار آنتی ژن گرم و درصد	نسبت W/O	نوع ادجوان
۱۰۰	۵۵	۴۵	۴۵/۵۵	B۶۲
۱۰۰	۵۵	۴۵	۴۵/۵۵	ISA61
۱۰۰	۳۰	۷۰	۳۰/۷۰	Alum
۱۰۰	صفر	۱۰۰	-	Ag

گروه بندی دام ها

در این مطالعه از بز نر بعنوان دام هدف جهت ارزیابی و مقایسه قدرت ایمنی زایی واکسن های تجربی استفاده شد. دام های تحت آزمایش در محدود سنی ۶ الی ۱۲ ماه بودند. برای حصول اطمینان از عدم مواجهه قبلی دام های تحت آزمایش با ویروس تب برفکی یا واکسن تب برفکی قبل از شروع آزمایش، آزمون SN بر روی سرم



میانگین تغییرات عیار آنتی بادی در دام های تحت آزمایش در روز های مختلف در نمودار شماره ۱ و در شکل عددی در جدول ۳ نمایش داده شده است.

۱- گروه A و B: عیار سرمی آنتی بادی این دو گروه از روز اول شروع آزمایش تا آخر دوره تقریباً همسان بوده و فقط در گروه B در روز ۱۸۰ به ۲/۱۷ در برابر ۲/۵ کاهش نشان داد ولی در نمونه ۲۱۰ روزگی با گروه A مطابق شد. با توجه به روند ثابت آنتی بادی احتمالاً در صورت ادامه نمونه گیری میزان آنتی بادی تا مدت ها افت نمی کرد ولی بخاطر محدودیت امکانات تحقیق متوقف گردید. عیار سرمی این دو گروه در ماه اول به نتیجه بالای ۲/۰ رسید و پس از دریافت نوبت دوم واکسن در ماه دوم به عیار ۲/۵ افزایش یافت.

۲- گروه C: افزایش عیار سرمی گروه C تا روز ۶۰ پس از واکسیناسیون با شیب ملایم تری نسبت به دو گروه قبل افزایشی بوده است. همانطور که در نمودار مشخص است در روز ۲۸ مقدار عیار سرمی کمتر از ۱/۵ بوده و در اثر واکسن نوبت دوم به عیار ۲/۵ افزایش پیدا کرد. عیار آنتی بادی این گروه بعد از ۶۰ روزگی دچار افت شده و در روز ۱۵۰ کاهش یافته و تا پایان دوره تحقیق بدون کاهش در همین سطح ادامه داشته است. مجموعاً عیار سرمی این گروه از دو گروه B & A ضعیف تر بوده ولی از دو گروه D & E عملکرد بهتری داشته است.

۳- گروه D: این گروه بعنوان کنترل مثبت به منظور بررسی افزایش عیار آنتی بادی مختص آنتی ژن تب برفکی در نظر گرفته شده بود. همانطور که مشخص است عیار ایمنی در این گروه پس از واکسن نوبت اول به متوسط ۰/۷ افزایش یافته و پس از نوبت دوم واکسیناسیون به ۰/۹ صعود کرد ولی پس از آن سیر نزولی داشته است.

سلولی IBR-S2 با غلظت ۱/۶×۱۰۶ در هر میلی لیتر اضافه گردید و در انکوباتور دارای گاز CO2 قرار داده شدند و پس از ۷۲ ساعت از نظر وجود آثار CPE توسط میکروسکوپ بررسی گردیدند. بطور کلی رقتی از سرم که بتواند در نیمی از گوده ها مانع ایجاد CPE شود بعنوان عیار آنتی بادی خنثی کننده در نظر گرفته می شود و جهت تعیین میزان دقیق عیار آنتی بادی از روش Reed and Muench استفاده گردید (Li, G. et al 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل های نتایج عیار آنتی بادی توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام گردید.

نتایج

بررسی میکروسکوپی

مشاهده آثار مرگ سلولی (CPE) در گوده های کشت سلول با استفاده از میکروسکوپ اینورت نشان دهنده عدم وجود یا پائین بودن عیار آنتی بادی خنثی کننده ویروس تب برفکی تلقی گردید. این موارد بعنوان سرم منفی بودن دام در نظر گرفته شد. گوده هایی که سلول بصورت تک لایه پس از ۷۲ مشاهده گردید و آثار مرگ سلولی را نشان ندادند، بعنوان مورد سرم مثبت در نظر گرفته شدند. در نهایت عیار دقیق آنتی بادی خنثی کننده توسط فرمول Reed and Muench محاسبه گردید (شکل ۱).

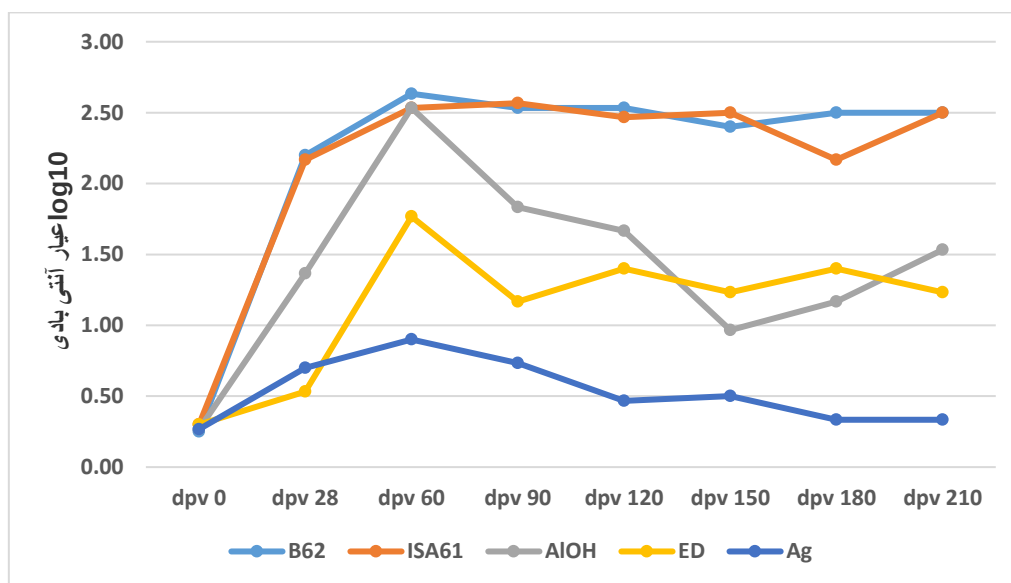
شکل ۱- تصویر سلول BA اولیه (سمت راست) و سلول با آثار مرگ سلولی (سمت چپ) با بزرگ نمای ۵ برابر



بررسی مقادیر عددی عیار آنتی بادی گروه ها

جدول ۳- عیار آنتی بادی در آزمون SN (log10) در گروه های تحت آزمایش

گروه ها	ادجوانها	شماره دام	روز خونگیری							
			۱ - واکسن اول	۲۸ واکسن دوم	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰	۲۱۰
A	B۶۲	۱	۰/۲	۲/۱	۲/۵	۲/۷	۲/۷	۲/۴	۲/۴	۲/۵
		۲	۰/۲۵	۲/۳	۲/۶	۲/۶	۲/۵	۲/۷	۲/۸	۲/۶
		۳	۰/۳	۲/۲	۲/۸	۲/۳	۲/۴	۲/۱	۲/۳	۲/۴
B	ISA61	۴	۰/۳	۲/۴	۲/۹	۲/۳	۲/۶	۲/۵	۲/۴	۲/۲
		۵	۰/۳	۲/۰	۲/۶	۲/۸	۲/۳	۲/۷	۲	۲/۸
		۶	۰/۳	۲/۱	۲/۱	۲/۶	۲/۵	۲/۳	۲/۱	۲/۵
C	Alum	۷	۰/۲	۱/۳	۲/۷	۲	۱/۹	۱	۱/۳	۱/۵
		۸	۰/۳	۱/۴	۲/۶	۱/۷	۱/۵	۰/۸	۱	۱/۷
		۹	۰/۳	۱/۴	۲/۳	۱/۸	۱/۶	۱/۱	۱/۲	۱/۴
D	FMDV Ag	۱۳	۰/۳	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۴
		۱۴	۰/۳	۰/۷	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۳	۰/۳	۰/۳
		۱۵	۰/۲	۰/۶	۰/۹	۰/۶	۰/۳	۰/۷	۰/۲	۰/۳



نمودار ۱- مقایسه میانگین عیار آنتی بادی توسط واکسن های تهیه شده از ادجوان های مختلف در روزهای پس از واکسیناسیون در دام های تحت آزمایش

تا ۶۰ روز پس از واکسیناسیون افزایشی بوده و در گروه های A, B و C حدود ۲/۵ را نشان داد مگر گروه D که میانگین عیار کمتر از یک بود. نتایج سرمی گروه های A, B تقریباً از ۹۰ تا ۲۱۰ روزگی بصورت ثابت در حدود ۲/۵ ماند ولی در گروه های C و D نتایج نزولی شد و

تجزیه و تحلیل آماری

طبق نتایج آزمون ANOVA یک طرفه، اختلاف معنی داری در میانگین عیار ایمنی زایی گروه A, B و گروه کنترل D در روز اول واکسیناسیون مشاهده نشد ($P < 0.05$). میانگین عیار آنتی بادی تمام گروه ها از اول



در روز ۲۱۰ میانگین نتایج گروه C ۱/۵۳ رسیده و در گروه D ۰/۳۳ کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). اختلاف میانگین عیار آنتی بادی گروه های مختلف در ۱۲۰ روز پس از واکسیناسیون کاملاً معنی دار بود میانگین عیار آنتی بادی گروه های A, B بصورت معناداری بیشتر از همه ی گروه های دیگر بود اما اختلاف میانگین عیار آنتی بادی نتایج گروه های A, B معنادار نبود. میانگین عیار آنتی بادی گروه C بصورت معناداری نسبت به گروه های A, B کمتر و از D بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۱).

بحث

بیماری تب برفکی یکی از بیماریهای مهم واگیردار حیوانات زوج سم میباشد که جهت کنترل آن از واکسیناسیون استفاده می شود. بنابراین تهیه واکسنهای کارآمد دارای اهمیت ویژه ایی است

(Bittle, J. L. et al 1982; DiMarchi, R. G. et al 1986; Li, G. et al 2001) در سال های اخیر انواع مختلفی از ادجوان ها برای تقویت پاسخ ایمنی به واکسن های تب برفکی اضافه شده و مورد مطالعه قرار گرفته است. این ادجوان ها شامل روغن های معدنی، ساپونین ها (Quil-A)، لیگاندهای گیرنده Toll مانند (TLR)، سایتوکاین ها، لیپوزوم ها و غیره می باشد. مطالعات زیادی در حوزه ادجوان های روغنی و استفاده آنها در واکسن تب برفکی صورت گرفته است. اثربخشی یک ادجوان روغنی به جمع شدن در محل تزریق، ناقل مناسب برای انتقال آنتی ژن در سراسر سیستم لنفاوی و انتشار آهسته آنتی ژن با تحریک سلول های تولید کننده آنتی بادی نسبت داده می شود. Yimei Cao و همکارانش پیرامون پیشرفت های اخیر ادجوان های واکسن ویروس تب برفکی تحقیقاتی فراوانی انجام دادند (Cao Y. 2014). در سال ۲۰۱۳ Getu Ayele و همکارانش طی آزمایشی تولید آنتی بادی توسط واکسن

ها با ادجوان های مختلف را مورد ارزیابی قرار دادند. در این آزمایش از ادجوان های مختلف از قبیل ژل هیدروکسید آلومینیم و واکسن روغنی سه ظرفیتی شامل تایپ های SAT2, O, A در گاوها استفاده شد (Ayele G. et al 2023, 2022). گروه هایی که دارای ادجوان روغنی بودند نتایج بسیار بهتری نسبت به سایر گروهها داشتند. واکسن های آبی حاوی Al(OH)₃/saponin برای استفاده در خوک ها ایده آل نیستند، زیرا کارایی محافظتی آنها در این گونه کم است (Alexandersen, S. Mowat, N. 2005). در حال حاضر، واکسن های امولسیون دوگانه روغنی برای پیشگیری از بیماری تب برفکی ترجیح داده می شوند، زیرا می توانند برای محافظت از همه گونه های حساس دامی استفاده شوند و برای واکسیناسیون اضطراری ایده آل هستند. Montanide ISA-201 و ISA-206، یک ادجوان مبتنی بر روغن معدنی است که توسط شرکت Seppic فرانسه عرضه می شود (Amanda, L. et al 2005). در سال ۱۳۸۳ شوشتری و همکاران طی مطالعه ای دو نوع واکسن تب برفکی تهیه کردند که تنها تفاوت بین آنها ادجوان موجود در آنها بود به طوری که در یک نوع واکسن تب برفکی ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید + ساپونین و در دیگری ادجوان روغنی مورد استفاده قرار گرفت. آنها به این نتیجه رسیدند که واکسن تب برفکی با ادجوان روغنی می تواند به عنوان یک واکسن مطلوب با طول دوره آنتی بادی بیشتر از واکسن تب برفکی با ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید مورد استفاده قرار گیرد. شوشتری گزارش کرده است که واکسن حاوی یاور روغنی هم از نظر عیار آنتی بادی نهایی و هم از نظر دوام عیار ایمنی بالاترین میزان را دارا بوده و هم به دلیل خصوصیات فیزیکی و تولید آن آسانتر از واکسن آبی می باشد. در سال ۲۰۱۴



Dong Li ، و همکارانش کارایی واکسن FMD خوک ای مولسیون شده را با روغن کمکی ISA 201 VG یا ISA 206 VG مقایسه کردند. Min Eun Park و همکارانش پیرامون تقویت پاسخ های ایمنی واکسن بیماری تب برفکی با استفاده از ترکیب های کمکی جدید روغن / ژل در خوک ها و بزها تحقیقاتی را به ثمر رساندند (گزارش منتشر نشده Park ME, 2014). در سال ۲۰۱۳، Pervaiz Dar و همکارانش به این نتیجه رسیدند که ادجوان واکسن ISATM 201 در سال ۲۰۱۴ باعث بهبود پاسخ های ایمنی و محافظت در گاو می شود (Dar P. , et al 2013). هدف این تحقیق، بررسی قدرت ایمنی زایی و طول دوره ایمنی واکسن روغنی تب برفکی حاوی ادجوان های تولید داخل B ۶۲ در مقایسه با ادجوان خارجی بود. در این پژوهش عملکرد واکسن های دارای ادجوان تولید داخل در مقابل واکسن روغنی دارای ادجوان ISA61 و واکسن آبی حاوی ژل آلومینیوم هیدروکساید در بز بررسی گردید. عیار های آنتی بادی بر علیه تب برفکی گروه های تحت آزمایش در روز اول قبل از واکسیناسیون اول بسیار پایین و بر اساس نتایج بدست آمده از نمونه های روز ۲۸ و ۶۰ پس از واکسیناسیون، میانگین عیار آنتی بادی گروه های A و B و C (واکسن های حاوی ادجوان B ۶۲، ISA61 و آلومینیوم هیدروکساید) بصورت معناداری بیشتر از گروه D (گروه کنترل) بود ($P < 0.05$) و ضمناً میانگین عیار آنتی بادی این سه گروه در این دو مرحله اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($P < 0.05$). از روز ۶۰ الی ۹۰ پس از واکسیناسیون عیار آنتی بادی گروه C سقوط کرده ولی میانگین عیار آنتی بادی گروه های A و B بصورت معناداری بیشتر از همه ی ادجوان های مذکور بود ($P < 0.05$) اما بین گروه های A و B اختلاف معنادار وجود نداشت ($P < 0.05$). بر اساس

نتایج عیار سرمی روز ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ پس از واکسیناسیون، میانگین عیار آنتی بادی گروه A و B بصورت معناداری بیشتر از همه ی گروه های ادجوان های مذکور بوده هیچگونه کاهشی تا پایان دوره تحقیق (۷ ماهه) نشان ندادند ($P < 0.05$) ولی میانگین عیار سرمی گروه C پس از کاهش در ۹۰ روز پس از تلقیح، کاهش دیگری نداشتند و بصورت معناداری نسبت به نتایج گروه کنترل (آنتی ژن) بیشتر بودند ($P < 0.05$). ۶ ماه پس از واکسیناسیون دوم عیار سرمی دو گروه A و B حدود ۲/۵ بوده و نتیجه گروه C حدود ۱/۵ را نشان داد. عیار سرمی گروه کنترل کمتر از ۰/۵ بود. نتایج گروه کنترل مشخص کرد که هیچگونه بیماری در طول تحقیق در گروه ها اتفاق نیفتاده و تنها متغیر ادجوان های واکسن های مصرف شده بوده است.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق مشخص شد عیار آنتی بادی در گروه دریافت کننده واکسن تهیه شده از ادجوان های روغنی B۶۲ و ISA61 نسبت به گروه های دیگر، بخصوص گروه دریافت کننده ادجوان آبی ژل آلومینیوم هیدروکساید و بدون ادجوان بیشتر است. نکته دیگر اینکه پاسخ ایمنی نسبت به هر دو ادجوان روغنی B۶۲ و ISA61 تقریباً یکسان است. لذا میتوان کارایی این دو ادجوان را در مطالعات بیشتر بررسی نموده و در صورت تایید نهایی در تولید واکسن تب برفکی پیشنهاد نمود.

تشکر و تقدیر

بدینوسیله از شرکت دانش بنیان زیست فناوریان پژوه البرز تولید کننده ادجوان (یاور) B ۶۲ و همکاری موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در اجرای این پروژه کمال تشکر را دارد.

منابع



11. Bahnemann HG. (1973) The inactivation of foot and mouth disease virus by ethyleneimine and propyleneimine. *Zbl Vet Med*; B20:356-60.
12. Barnett, P.V. Cox, S.J. Aggarwal, N. Gerber, H. and McCullough, K.C. (2002) Further studies on the early protective responses of pigs following immunization with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine*, 20: 3197-3208.
13. Bartels, T. Schafer, H. Liebermann, H. Burger, R. Beyer, J. (1994) T-lymphocyte responses in guinea pigs vaccinated with foot and mouth disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 40: 213-223.
14. Bittle, J. L. Houghten, R. A., Alexander, H. Shinnick, T. M. Sutcliffe J. G. Lerner, R. A. Rowlands D. J., and Brown F. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.
15. Blancou, J. (2003) History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. *World Organisation for Animal Health Paris*, 362 pp Brooksby, J.B. 1982. foot and mouth disease virus. *Interviol*. 18, 1-23.
16. Brown, F. (2003) The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research*, 91: 3-7.
17. Cao Y. (2014) Adjuvants for foot-and-mouth disease virus vaccines: recent progress, *Expert Rev Vaccines* . 13 (11):1377-85.
18. Cox, S.J. Aggarwal, N. Statham, R.J. Barnett, P.V. (2003) Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 21, 254:1336-1347.
1. Abol Abbas, L.K. Lichman, A. Puber, J. (2003) *Cellular and molecular immunology*. 5ed.
2. Aftosa, F. (2007) *Foot and Mouth Disease. The center for food security and public health*.
3. Ahmadzadeh, H. (1390) New type of foot and mouth disease. *Agriculture and food industry weekly*. sixth year Number 90 (In Persian)
4. Alexandersen, S. Mowat, N. (2005) Foot-and-mouth disease: Host range and pathogenesis. *Current Concepts In Endometriosis*, 288: 9-42.
5. Alexandersen, S. Zhang, Z. Donaldson, A.I. and Garland, A.J. (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot and mouth disease. *J. Comp. Pathol*. 129: 1-36.
6. Allen, S. David, N. M. (2003) Coordinate Cytokine Gene Expression In Vivo following Induction of Tuberculous Pleurisy in Guinea Pigs. *American Society for Microbiology*, 71: 4271-4277.
7. Amanda, L. Barnarda, A.A. Sarah, C. Barnett, P. Birte, K. Summerfielda, A. Kenneth, C. (2005) Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 23, 287: 1037-1047.
8. Ayele G. et al (2023) Combined Adjuvant Formulations Enhanced an Immune Response of Trivalent Foot and Mouth Disease Vaccine in Cattle, *Vet Med (Auckl)*. ; 14: 47-62.
9. Ayele G. et al (2022) Evaluation of different adjuvant formulations of trivalent Foot and Mouth Disease vaccine in 2022 DOI:10.21203/rs.3.rs-1975001/v1
10. Bachrach, H. L. (1968) Foot-and-mouth disease. *Annu. Rev. Microbiol*, 22: 201-244.



- data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.
25. Moghadam Pour, M. (1384) Comparison of two types of domestic and foreign oil adjuvant, 14th Iranian Veterinary Congress, 23rd of February 2006, Tehran, Razi Conference Center, Iran University of Medical Sciences(In Persian)
 26. Moghadam Pour, M. Ebrahimi, M. M. Mohammad Pour, N. (1385) Research on the production of adjuvant used in poultry vaccines, the first student conference on chemical applications in industry, November 9-11, 2007, Department of Chemistry, Isfahan University(In Persian)
 27. Park ME, Lee SY, Kim RH, Ko MK, Lee KN, Kim SM, Kim BK, Lee JS, Kim B, Park JH.(2014) Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats. *Vaccine.*, 8;32 (40):5221-7.
 28. Tizard, A. (1389) *Veterinary Immunology*. Translation: Shimi, A. The second edition of Nourbakhsh Tehran, Publishing House.
 19. Dar P. , Kalaivanan R., Sied N., Mamo B., Kishore S., Suryanarayana V.V.S., Kondabattula G,(2013) Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle *Vaccine* ,18 ;31(33):3327-32.
 20. DiMarchi, R. G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, N. Mowat.(1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 232:639–641.
 21. Fenner, F. J. Gibbs, P. J. Murphy, Rott, F. A. R. Studdert, M. J. White, D. O. (1993) *Veterinary virology*, 403–430.
 22. Lei, C. Yang, J. Hu, J. Sun, X. (2021)On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity, *Virol Sin.* 2021 36(1): 141–144.
 23. Li, G. Li, Y. Yan, W. XU Q., WU Y., XIE Y., You U. and Zheng Z .(2001) CpG DNA enhances the immune responses elicited by the DNA vaccine against foot and mouth disease virus in guinea pigs. *Chinese Science Bulletin* 46:1376-1379.
 24. Livak, K.J. Schmittgen, T.D.(2001) Analysis of relative gene expression



Assay the antibody titer and duration of immunogenicity of foot-and-mouth oil vaccine containing domestic adjuvants compared to imported adjuvant and aluminum gel in livestock (goats)

Seied Mahmod Azimi - E-Zfoli¹, Masoud Moghaddam Pour², Majid Eslami^{2,3}, Habib Yaribeygi^{4*}

1. Associate Professor, FMD Vaccine Research and Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarek), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran;

2. Assistant Professor of Department of Research and Production Poultry Viral Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarak), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (m.moghaddam@rvsri.ac.ir)

Received: 19 November 2024 Accepted: 21 Jun 2025

Abstract

Foot and mouth disease is one of the infectious diseases in the livestock industry. In areas where FMD disease is endemic such as Iran the most effective way to control and prevent the disease is vaccination. At present, FMD vaccine is commercially produced in two types of Alum and oil-based. In the present study, the level of humoral immune response and its duration following the administration of a vaccine prepared with an domestic oil adjuvant compared to a vaccine with an imported adjuvant and a vaccine with aluminum gel in target animals (goats) were investigated. Vaccination of the groups was done on two occasions with an interval of 28 days. Sampling of the tested animals was done on days zero, 28, 60, 90, 120, 150, 180 and 210. The humoral immunity of animals was investigated using serum neutralization method. The titer of antibody obtained from vaccines with oil adjuvants B 62 (group A) and ISA61 (group B) and aluminum hydroxide gel (group C) showed the same increase until day 60, but from day 60 the serum titer of group C decrease. The group D during the research period could not have the good titer and quickly lost the low titer obtained on the 60th day. Statistical analysis of the results of serum titer in the serum neutralization test (SN) showed a significant difference between the group of vaccines with oil adjuvants B 62 and ISA61 and other groups from the 60th day to the end of the research. The neutralization rate of the above-mentioned two groups A&B were reported to be about 2.6.

The groups C and D performed very poorly in increasing the immunity level and also the length of the immunization period compared to the groups A and B. In total and considering the lack of decrease in the immunity level after 210 days (7 months). In the first group (A) was inoculated with domestic adjuvant, compared to other foot-and-mouth disease vaccines, they can be of great help to the livestock industry to deal with foot-and-mouth disease. In total, considering the increase in the appropriate immunity rate up to approximately 7 months in the first group (B 62) which had a domestically produced adjuvant, compared to other groups under test, this type of vaccine can be great help to control FMD in animal husbandry industry.

Keywords: FMD, aqueous aluminum hydroxide vaccine, oil adjuvant, oil vaccine

* Corresponding Author: Seied Mahmod Azimi

Address: Associate Professor, FMD Vaccine Research and Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarek), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: m.azimi@rvsri.ac.ir

جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از موش‌های موجود در یک دامداری دارای راکتور سلی استان تهران

خشایار منصوری^۱، نادر مصوری^۲، مهدی بابائی^۳، شجاعت دشتی پور^۴

- ۱- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، سمنان، ایران
- ۲- دانشیار میکروبیولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
- ۳- کارشناس ارشد بیوشیمی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
- ۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۷

چکیده

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عامل بیماری سل می‌باشد که باعث عوارض و مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. بررسی احتمال سرایت مایکوباکتریوم به حیواناتی مانند موش حائز اهمیت می‌باشد، چرا که در اثر انتقال باکتری به موش، جمعیت موش‌های آلوده در دامداری زیاد می‌شود و امکان حذف کل جمعیت دامی واحد را فراهم می‌سازد. از این رو، ابزار انگشت نگاری DNA برای بهبود تشخیص سل توسعه یافته‌اند و از تکنیک‌های تاپینگ مولکولی برای تشخیص و پیگیری گسترش آن استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم از موش‌های موجود در دامداری‌های دارای راکتور سلی بود. پنج عدد موش از گاوداری آلوده به مایکوباکتریوم بوویس در سال ۱۳۹۷ انتخاب شدند. جهت بررسی وجود مایکوباکتریوم، نمونه‌ها در محیط لوین‌اشتاین-جانسون کشت داده شدند. برای تعیین هویت جدایه‌ها از تکنیک PCR براساس قطعه 16S rRNA و IS6110 استفاده گردید. در نهایت، با استفاده از RD-تاپینگ گونه مایکوباکتریوم تعیین هویت شد. با کشت نمونه‌ها و بررسی لام حاصل از آن مشخص شد که پنج موش آلوده با مایکوباکتریوم بودند. PCR برای 16S rRNA و IS6110 به ترتیب باند ۵۴۳ و ۲۴۵ جفت‌باز را نشان داد که تعلق جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را اثبات نمود. تکنیک RD-تاپینگ وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در جدایه‌ها را تایید کرد. از این مطالعه نتیجه‌گیری شد که حیواناتی مانند موش می‌توانند باعث انتقال گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به فارم‌ها و سایر موجودات زنده شوند.

کلمات کلیدی: سل، موش، مایکوباکتریوم، RD-تاپینگ، RFLP-PCR

*نویسنده مسئول: نادر مصوری

آدرس: آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
پست الکترونیک: nmosavari@gmail.com

مقدمه

سل یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که سالانه باعث مرگ و میر بسیاری در سراسر جهان شده است و امروزه نیز یکی از معضلات بهداشت جهانی می‌باشد (۳). از آنجا که کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در انسان باعث بیماری می‌شود. بنابراین، تشخیص آنها بسیار حیاتی می‌باشد. گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم BCG، مایکوباکتریوم میکروتی، مایکوباکتریوم افریکانوم، مایکوباکتریوم کانتی، مایکوباکتریوم کاپری، مایکوباکتریوم پنی‌پدی، مایکوباکتریوم مونثی، مایکوباکتریوم اورینگیس، مایکوباکتریوم سوریکاته هستند که کند رشد بوده و کلنی‌های آنها رنگدانه ندارند (۷). همچنین از نظر ژنومی در سطح نوکلئوتید ۹۹/۹ درصد شبیه به هم هستند و بیشترین تفاوت آنها در پلی مورفیسم توالی‌های بزرگ ژنی می‌باشد (۱۲). تقسیم‌بندی اعضاء کمپلکس بر اساس پاتوژنیستی، جغرافیای متفاوت، مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک ها می‌باشد (۱).

سل گاوی در ایران هاپواندمیک بوده و کنترل آن محدود به گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی است و تنها بخش محدودی از گاوهای کل کشور تحت پوشش برنامه تست و کشتار می‌باشند. از طرفی نسبت بالایی از مسلولان انسانی مبتلا به شکل خارج ریوی سل هستند. به دلیل عدم ایجاد پاسخ در برخی از حالت‌های بیماری، شیوع و گسترش آن در سطح گله به شکل پنهان اتفاق است و در اثر انتقال باکتری توسط حیوانات کوچکی مانند موش بوده است. به طوری که اگر جمعیت موش های آلوده در دامداری زیاد گردد، در یک غفلت

ناگهانی امکان حذف کل جمعیت دامی واحد را فراهم می‌سازد (۱).

مایکوباکتریوم بویس عامل حدود ۳/۱ درصد سل انسانی، ۲/۱ درصد سل ریوی و ۹/۴ درصد سل غیر ریوی در جهان، می‌باشد (۵). گونه موش ول (Vol) و برخی از حیوانات وحشی مخزن بیماری سل می‌باشند و همین تعدد گونه ریشه‌کنی را با مشکل روبرو کرده است (۱، ۶ و ۱۴). کنترل سل بخصوص سل گاوی در کشور ما محدود به گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی است و تنها بخش محدودی از گاوهای کل کشور تحت پوشش برنامه تست و کشتار می‌باشند. شناسایی عوامل مؤثر مانند اندازه گله، سطح سواد دامدار، حصارکشی اطراف گاوداری، امکان ورود حیوانات وحشی به فارم، رفت و آمد آزادانه حیوانات اهلی (سگ و گربه) در فارم، وضعیت بهداشتی فارم و وجود موش، بر آلودگی گاوداری‌های تحت پوشش برنامه غربال‌گری حائز اهمیت است. در این راستا، افزایش همه جانبه برنامه غربال‌گری بر اساس فرضیات این تحقیق، اهرم‌های دیگر کنترل بیماری علاوه بر تأکید بر لزوم تداوم برنامه تست و کشتار (با در نظر گرفتن حداکثر ممکن جمعیت تحت پوشش) در مناطق اقلیمی مختلف توصیه می‌شود (۸).

از آنجایی که مایکوباکتریوم‌های پاتوژن دوره انکوباسیون طولانی دارند، تشخیص آزمایشگاهی آنها با مشکلاتی مواجه است به نحوی که تعیین هویت و حساسیت دارویی بین باکتری‌ها، مستلزم گذشت مدت زمان ۲ تا ۴ ماه می‌باشد. لذا به کارگیری روش‌های نوین جهت تشخیص سریع و دقیق این بیماری و گونه‌های مختلف آن بسیار حائز اهمیت است.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژنوم خود نواحی کد کننده و غیر کد کننده زیادی را از دست داده است که از این تغییرات به وجود آمده می‌توان برای شناسایی بین



نمونه‌های موش در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت

به دلیل خطرناک بودن مایکوباکتریوم‌ها، کشت در آزمایشگاه رفرانس سل گاوی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی کرج با سطح ۳ ایمنی زیستی و با استفاده از هود بیولوژیک با رعایت تمامی روش‌های صحیح میکروب‌شناسی و آزمایشگاهی (GLP) صورت گرفت. پس از انجام کشت تمام مواد آلوده ضد عفونی یا اتوکلاو شدند. ابتدا کبد، ریه و طحال از تمامی نمونه‌ها جداسازی شد و بعد از همگن شدن، آلودگی زدایی و خنثی‌سازی، بر روی محیط کشت لوین‌اشتاین-جانسون حاوی گلیسرین و پیرووات کشت داده شدند و سپس به مدت هشت هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. با گذشت زمان انکوباسیون و ظاهر شدن به تدریج کلونی‌ها در سطح محیط‌های کشت، از تمامی کلونی‌ها لام تهیه شد و وجود باسیل‌های اسیدفست با روش ذیل نلسون توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۱۱ و ۱۳).

استخراج DNA

به روش ون‌سولینگن و همکاران DNA ژنومی نمونه‌های رشد یافته بدون هیچ گونه شکستگی استخراج شد (۱۵). در این روش ابتدا سوسپانسیون تهیه شده از کلونی‌های رشد یافته تحت اثر آنزیم لیزوزیم قرار گرفتند. سپس با استفاده از سدیم دودسیل سولفات و آنزیم پروتئیناز K پیکره باکتری تخریب و DNA باکتری آزاد شد. به هر میکروتیوب سدیم کلرید ۵ مولار و ستیل تری‌متیل-آمونیم بروماید اضافه شد. در مرحله بعد ایزوآمیل الکل-کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز رویی که حاوی DNA است به میکروتیوب جدید انتقال یافت. در ادامه

سویه‌های مختلف باکتری شناسایی شود. بنابراین برای آگاه شدن از خط سیر میکروارگانیزم و سویه‌ها می‌توان از تفاوت‌های ژنتیکی آنها استفاده نمود (۲). در این رابطه، می‌توان از روش‌هایی مانند RD-تایپینگ استفاده نمود. با بررسی‌های انجام گرفته، مشخص شده است که در ژنوم مایکوباکتریوم‌ها مناطقی به نام منطقه حذف شده (RD) وجود دارد که وجود یا فقدان این مناطق ژنتیکی از نظر تکاملی معنادار و به صورت هدفمند انجام می‌پذیرد و براساس آن می‌توان سیر تکاملی پیدایش گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از یک نمونه اجدادی بیان کرد. با انجام PCR و به کار گیری لوکوس‌های RD1، RD4، RD9 و RD12 امکان تشخیص افتراقی میان اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به صورت قطعی فراهم می‌گردد (۱۶).

امروزه تکنیک‌های جدید مولکولی زیادی وجود دارند که به شناسایی دقیق و متمایز نمودن جدایه‌های مایکوباکتریوم با ویژگی و حساسیت بالا کمک می‌کنند که در این میان می‌توان به روش‌های انگشت نگاری DNA یا آنالیز به روش پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود شونده (RFLP) اشاره کرد (۲). با استفاده از تکثیر ژن توسط قطعه IS6110 می‌توان عضویت آن‌ها را در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشخص نمود. لذا هدف از این مطالعه جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم از موش‌های موجود در یک دامداری دارای راکتور سلی در استان تهران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

نمونه‌ها شامل پنج عدد موش (رت وحشی) از دامداری آلوده به سل استان تهران بدست آمد که در سال ۱۳۹۷ تست توبرکولین گاوهای آن مثبت اعلام شده بود.

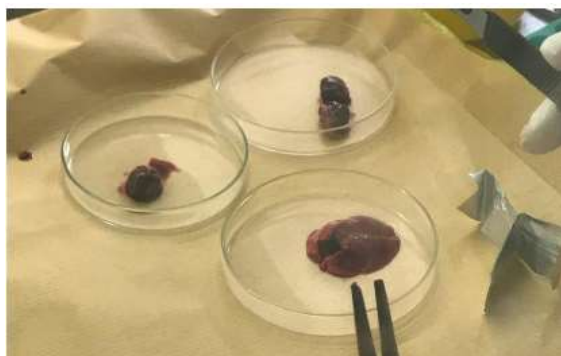


دقیقه پایان یافت. در آزمون‌های تعیین هویت، کنترل مثبت شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و کنترل منفی مایکوباکتریوم/ویوم بود.

آزمون RD-typing جهت تمایز اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از نواحی متغیر RD که شامل چهار ناحیه RD1، RD4، RD9 و RD12 می‌باشند. توالی پرایمرها (۴ دسته ۳ تایی) و اساس کار به روش Warren انجام گرفت (۱۶).

یافته‌ها

جداسازی کبد، ریه و طحال تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت (شکل ۱). با کشت نمونه‌ها در محیط لوین اشتاین-جانسون مقادیر کافی از توده باکتری بدست آمد. رشد کلنی باکتری با ظاهری خشن، مومی، فاقد رنگدانه، مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۱- جداسازی کبد، ریه و طحال تمامی نمونه‌های موش

با استفاده از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، مشخص گردید که ۵ نمونه کشت مثبت، به ترتیب متعلق به جنس مایکوباکتریوم (با بانندی در محدوده ۵۴۳ جفت باز؛ شکل ۳) و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (با بانندی در محدوده ۲۴۵ جفت باز؛ شکل ۴) بودند.

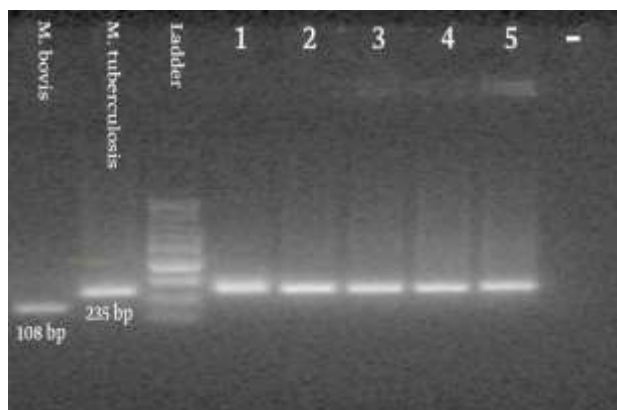
با استفاده از ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد سرد کلاف‌های DNA در کف میکروتیوب رسوب داده شد. در نهایت DNA استخراج شده برای استفاده در مراحل بعدی ذخیره شد. ارزیابی کیفی و کمی استخراج DNA، به ترتیب با استفاده از الکتروفورز (Bio-Rad, USA) و دستگاه نانودراپ (Thermo scientific nanodrop 1000, USA) انجام گرفت.

آزمون‌های تعیین هویت

برای اطمینان از لحاظ جنس و قرارگیری باکتری‌های جداشده در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110 استفاده شد (۱۵). تکثیر در ۳۰ چرخه، برای مراحل واسرشت سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه)، واسرشت سازی (۹۴ درجه سانتی گراد، یک دقیقه)، اتصال (۶۰ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) و طولیل سازی (۷۲ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) و طولیل سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) صورت گرفت.

در آزمون RD-تایپینگ، هر میکروتیوب شامل هفت میکرولیتر مستر میکس (آمپلیکون)، یک میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده (با غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر)، دو میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۳۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر آب مقطر استریل با حجم نهایی در هر واکنش برابر با ۱۲ میکرولیتر بود. تکثیر در چرخه دمایی، با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه شروع شد و با دمای واسرشت سازی ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای طولیل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه ادامه یافت. این چرخه ۴۵ مرتبه تکرار شد و با دمای نهایی طولیل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰

با استفاده از آزمون RD9، مشخص گردید که ۵ نمونه مثبت، متعلق به جنس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (با باندی در محدوده ۲۳۵ جفت باز؛ شکل ۵) بودند.



شکل ۵- الکتروفورز محصول RD9 (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)

بحث و نتیجه‌گیری

سل یک بیماری مشترک می‌باشد و انسان علاوه بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند در اثر آلودگی به مایکوباکتریوم بویس نیز به سل زئونوز مبتلا گردد. با توجه به نقش حیوانات بخصوص گاو در انتقال این بیماری به انسان، وجود این نوع سل در جامعه و میزان فراوانی آن از شاخص‌های معرف سطح بهداشت جامعه محسوب می‌گردد و به همین دلیل باید نقش حیواناتی مانند گاو یا موش را در انتقال بیماری مهم دانست (۲). علی‌رغم تلاش برای درمان و ریشه‌کنی سل، متأسفانه هنوز یک بیماری مهم عفونی در سطح جامعه انسانی می‌باشد.

میزان فراوانی سل در گله‌های گاو ایران در طول ۵۰ سال گذشته در نتیجه اجرای برنامه کنترل و به دلیل انجام تست و کشتار در گاوهای توبرکلین مثبت روند کاهشی داشته و از ۵ درصد در سال ۱۳۵۱ به ۰/۲ درصد در سال ۱۳۹۰ رسیده است (۸). میزان وضعیت بهداشتی در کشورهای مختلف را می‌توان از میزان آلودگی افراد آن



شکل ۲- کشت نمونه‌ها و ایجاد پرگنه‌های مربوط به رشد نمونه‌ها بر روی محیط لوین-اشتاین-جانسون



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR-16S rRNA (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR-IS6110 (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)

کشور به مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داد (۸)، در انگلستان و اروپا به ترتیب این میزان ۵/۰ و ۴/۱ درصد (۵) و در آمریکای لاتین بین ۴۳/۰ و ۱ درصد بوده است (۴).

در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بین یک شخص با بیماری ریوی و یک حیوان بررسی شده است. در واقع با استفاده از این روش مشخص شد که به طور مثال سگ عامل انتقال توبرکلوزیس به انسان بوده است و سگ‌های بیمار قابلیت انتقال توبرکلوزیس به انسان را دارند و می‌توانند به عنوان منبع انتقال توبرکلوزیس به انسان مطرح باشند که باید به این مسئله اذعان نمود، که کنترل سل در حیوانات می‌تواند تا حد بالایی از انتقال آن در بین افراد ممانعت کند و در کاهش این بیماری موثر باشد (۱۰).

در مطالعه حاضر نیز با استفاده از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، مشخص گردید که ۵ نمونه کشت مثبت در موش، به ترتیب متعلق به جنس مایکوباکتریوم و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. در نهایت با استفاده از آزمون RD9، مشخص گردید که ۵ نمونه مثبت، متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند. در نتیجه با توجه به این نتایج می‌توان دامدارها و دامداری‌های آلوده را شناسایی کرد و از انتقال بیماری در بین افراد ممانعت نمود.

در مطالعه لونی و همکاران در سال ۲۰۱۷، نقش موش در حضور عامل سل در گاوداری‌های آلوده در استان خوزستان به اثبات رسید. آن‌ها با استفاده از تست توبرکولین، از تعداد ۴۰ کانون آلوده به سل گاوی ۱۶ نمونه موش از دامداری‌های آلوده به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انتخاب کردند و با

استفاده PCR توسط 16S rRNA جنس مایکوباکتریایی جدایه‌ها را تأیید نمودند. سپس با استفاده از قطعه الحاقی IS6110، تعلق جدایه‌ها به اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را مشخص کردند. لونی و همکاران، فقط عضو کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را تشخیص دادند و گونه مورد نظر را تعیین نکردند. اما در مطالعه حاضر علاوه بر هم‌خوانی نتایج با پژوهش آن‌ها، گونه مورد نظر (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) نیز با روش RD-تایپینگ تعیین شد (۸).

در مطالعه‌ای در سال ۱۹۳۷، توبرکولوزیس برای اولین بار در جوندگان وحشی کشف شد و همچنین در این مطالعه میزان شیوع مایکوباکتریوم میکروتی به میزان ۱۱ درصد در Bank vole، میزان شیوع ۲ درصدی در Wood mice و ۵/۱ درصدی در حشره خوارها به دست آمد (۲).

پالمر و همکاران در سال ۲۰۰۶، توانستند مشخص کنند که اپوسوم در انتقال مایکوباکتریوم بوویس نقش دارد و توانستند مایکوباکتریوم بوویس را در صاریغ، گورکن اروپایی، بوفالوی آفریقایی، گراز وحشی و آهوی دم سفید شناسایی کنند (۱۲).

ارگات و همکاران در سال ۲۰۱۳، توانستند مایکوباکتریوم بوویس را از طریق PCR- IS6110 و اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping) از نمونه بافتی و شیر گاو و بز جداسازی و تعیین هویت کردند (۵).

در ایران، بر روی ۱۵ عدد موش از دامداری آلوده به مایکوباکتریوم آزمایش انجام شد که مشخص شد سه عدد از جدایه‌ها آلوده به مایکوباکتریوم میکروتی و دو عدد از جدایه‌ها آلوده به مایکوباکتریوم کانزاسی می‌باشند (۹).



Tuberculosis in dairy farms covered by the tuberculin screening test: A herd level case control study. *Iranian Journal of Epidemiology*, 10: 15-24.

2. Alizadeh, K., Mosavari, N. and Nazari, R. (2018). Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from rodents of infected cattle husbandry. *Veterinary Researches and Biological Products*, 31: 74-86. <https://doi.org/10.22092/vj.2017.110383.1302>
3. Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L. and Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58: 9-12. PMID: PMC5432783
4. Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J. and Griffin, J. (1999). Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3217-3222. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3217-3222.1999>
5. Ereqat, S., Nasereddin, A., Levine, H., Azmi, K., Al-Jawabreh, A., Greenblatt, C.L., Abdeen, Z. and Bar-Gal, G.K. (2013). First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS neglected tropical diseases*, 7: 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002417>
6. Kipar, A., Burthe, S.J., Hetzel, U., Rokia, M.A., Telfer, S., Lambin, X., Begon, M. and Bennet, M. (2014). *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host,

در مطالعه دیگر که در ایران انجام گرفت، از ۱۰۰ عدد موشی که از دامداری آلوده به مایکوباکتریوم جدا شد ۶ عدد از آنها آلوده به مایکوباکتریوم بوویس بودند (۲).
در مطالعه اکبرین و همکاران، مشخص شد که وجود موش در انتقال و آلودگی با مایکوباکتریوم بوویس در گله‌های گاو شیری نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (۱).

نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه برای اولین بار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از گاوداری آلوده به مایکوباکتریوم بوویس از طریق کبد، ریه و طحال جدا سازی شد. در این رابطه نقش موش در حضور عامل سل در گاوداری آلوده به اثبات رسید و مشخص گردید که این جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعلق دارد، لذا اهمیت نقش جوندگانی مانند موش در سل دامی و متعاقب آن در سل انسانی به اثبات رسید. در نهایت، می‌توان اظهار داشت که اثبات مخازن نگهداری باکتری‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در جوندگان از نظر بهداشت عمومی و خطر گردش بیماری سل بین جوندگان، حیوانات و انسان بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق آنها را یاری کردند، بخصوص اعضای آزمایشگاه رفرانس سل گاوی تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Akbarein, H., Bahanan, A., Bokaie, S., Mosavar, N., Rahimi-Foroushani, A., Sharifi, H., Makenali, A.S., Rokni, N.D., Marhamati-Khameneh, B. and Broumanfar, S. (2014). Determinants of bovine



11. Mosavari, N., Karimi, A., Tadayon, K., Shahhosseini, G., Zavarani Hosseini, A. and Babaie, M. (2021). Evaluation of heating and irradiation methods for production of purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Razi Institute*, 75: 439-449.
<https://doi.org/10.22092/ari.2019.123082.1238>
12. Palmer, M.V. (2006). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. *Emerging Infectious Disease*, 12: 1306-1310.
<https://doi.org/10.3201/eid1208.060526>
13. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2st Edition. Iowa State University Press: 44-56.
14. Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H.P., Lauria, S., Mannino, R. and Mantegani, P. (2013). Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 401-411.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.038737-0>
15. van Soolingen, D., de Haas, P.E., Kremer, K. (2001). Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. *Methods in Molecular Medicine*, 54: 165-203.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7:165>. PMID: 21341076.
16. Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G. and van Helden, P.D. the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Veterinary Pathology*, 51: 903-914.
<https://doi.org/10.1177/0300985813513040>
7. Lekko, Y. M., Ooi, P. T., Omar, S., Mazlan, M., Ramanoon, S.Z., Jasni, S., Jesse, F. and Che-Amat, A. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* complex in wildlife: Review of current applications of antemortem and postmortem diagnosis. *Veterinary world*, 13, 1822-1836.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1822-1836>. PMID: 33132593
8. Loni, R., Mosavari, N., Tadayon, K., Keshavarz, R., Ghaem-Maghamsi, S., Dashtipour, S. and Mohammad Taheri, M. (2017). Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria from rodents of infected cattle farms in Khuzestan province. *Journal of Veterinary Microbiology*, 13: 109-119.
9. Moradi, E., Mosavari, N., Tebianian, M., Tadayon, K., Ghaderi, R., Soleymani-Babadi, K., Mohammad Taheri, M., Dashtipour, S., Loni, R., Moradi Garavand, M., Keshavarz, P., Azarvandi, A. and Aref Pajoochi, R. Pest rodents as the essential elements of *Mycobacterium bovis* controlling programs. *International Journal of Mycobacteriology*, 4: 137-144.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.09.007>
10. Moravkova, M., Slany, M., Trcka, I., Havelkova, M., Svobodova, J., Skoric, M., Heinigeova, B. and Pavlik, I. (2011). Human-to-human and human-to-dog *Mycobacterium tuberculosis* transmission studied by IS6110 RFLP analysis: a case report. *Veterinárni Medicína*, 56: 314-317.



International Journal of
Tuberculosis And Lung Disease, 10:
818-822. PMID: 16850559
17.

(2006). Differentiation of
Mycobacterium tuberculosis
complex by PCR amplification of
genomic regions of difference. The



Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* from mice in a farm with tuberculosis reactor in Tehran province

Khashaiar Mansouri¹, Nader Mosavari², Mahdi Babaie³, Shojaat Dashtipour⁴

- 1- PhD of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Semnan, Iran
- 2- Associate Professor of Microbiology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
- 3- Master of Biochemistry, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
- 4- Master of Biotechnology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 03 March 2021

Accepted: 07 August 2024

Abstract

Mycobacterium tuberculosis complex, the agent of tuberculosis, causes morbidity and mortality particularly in developing countries. It is important to investigate the possibility of mycobacterium transmission to animals such as mice, because as a result of the bacterial transmission to mice, the population of infected mice increases in animal husbandry and makes it possible to eliminate the entire livestock population.

DNA-fingerprinting tools have been developed to improve tuberculosis case detection and control. Molecular typing techniques allow to detect and follow *M. tuberculosis* complex. The aim of this study was to isolate and identify of *Mycobacterium* from mice with tuberculosis reactors. Five mice are selected from a *Mycobacterium bovis*-infected farm in 2019. To investigate the presence of *Mycobacterium*, the samples are cultured in Löwenstein-Jensen medium. PCR technique based on 16S rRNA and IS6110 fragment is used to identity of the isolates. Finally, *Mycobacterium* species are identified using RD-typing. After examining the resulting slide from the cultured samples, it is found that five mice are infected with *Mycobacterium*. Results of 16S rRNA and IS6110 PCR analysis shows the presence of 543 and 245 bp bands respectively, which supports that the isolates belonged to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The RD-typing technique confirms the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in isolates. Animals such as mice can transmit various species of *Mycobacterium tuberculosis* complex to other farm animals and living organisms.

Keywords: Tuberculosis, Mice, *Mycobacterium*, RFLP-PCR, RD Typing

* Corresponding Author: Nader Mosavari

Address: Associate Professor of Microbiology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, E-mail: nmosavari@gmail.com

بررسی آلودگی و تعیین مقاومت ضد میکروبی آרקوباکتر در مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد

حسین نیایش^۱، ابراهیم رحیمی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد شهرکرد، شهرکرد، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۹

چکیده

آرکوباکترها، از جمله گرم منفی های هوازی هستند که سبب گاستروانتریت در انسان می شوند که از منبع آن ها خاک بوده و توانایی بالایی در مقاومت آنتی بیوتیکی دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی و تعیین مقاومت ضد میکروبی آرکوباکتر در مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد می باشد. در این مطالعه تعداد ۱۵۰ نمونه مواد غذایی از نقاط مختلف شهرستان شهرکرد به صورت تصادفی جمع آوری و به آزمایشگاه کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد جهت ارزیابی بار میکروبی، مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی ژنها انتقال داده شد. نمونه ها مطابق روش استاندارد مورد آزمایش قرار گرفتند. سطح معنی داری در مطالعه حاضر، $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۱۵۰ نمونه مواد غذایی مورد آزمایش ۱۰/۶۶ درصد به آرکوباکتر آلودگی داشتند. میزان آلودگی در آب شرب ۲ نمونه (۵ درصد)، گوشت کبابی ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، سالاد ۳ نمونه (۷/۵ درصد) و شیر سنتی ۴ نمونه (۱۰) بود. نتایج نشان داد که ژن *pldA* در ۸۷/۵ درصد نمونه های آلوده به آرکوباکتر با بیشترین فراوانی یافت شد، در حالی که ژن *cadF* در ۷۵ درصد نمونه ها با فراوانی کمتر تشخیص داده شد. باتوجه به آلودگی تمامی نمونه های این مطالعه و احتمال انتقال آلودگی به انسان و ایجاد عوارضی مثل گاستروانتریت، همچنین مصرف بالای گوشت بخصوص گوشت کبابی در رستوران های بین راهی به نظر می رسد در اخذ تدابیر برای کنترل آلودگی به این باکتری از چرخه تولید تا مصرف گوشت، سالاد و شیر خام و پخت کامل گوشت، جوشاندن شیر قبل از مصرف باید دقت کافی به عمل آید.

کلمات کلیدی: آرکوباکتر، مقاومت آنتی بیوتیکی، ایمنی غذایی، شهرکرد

*نویسنده مسئول: ابراهیم رحیمی

آدرس: استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

اعضای جنس آرکوباکتر بدون اسپور، آئروتولرانت، گرم منفی، خمیده به شکل میله‌ای، S یا مارپیچی متحرک با تازۀ منفرد، قطبی، بدون غلاف هستند و توانایی رشد در حضور اکسیژن و دمای بین ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد را دارد که آرکوباکتر را از کمپیلوباکتر متمایز می‌سازد. این ارگانیسم‌ها از نظر متابولیکی خنثی هستند و نیاز به محیط‌های غنی بلادآگار یا شکلات آگار برای رشد دارد. آرکوباکترها به طور طبیعی دردستگاه گوارش اردک، خوک، گراز، خوک ماده بامشکلات تولیدمثلی، جنین مرده خوک و طیف وسیعی از حیوانات اهلی هستند. علاوه بر این مخازن طبیعی، آرکوباکترها از بیماران مبتلا به باکتری، اندوکاردیت، پریتونیتوانتریتو اسهال جدا شده‌اند. به دلیل افزایش هشداردهنده شیوع بیماری‌ها در سال‌های اخیر در سراسر جهان عفونت‌های ناشی از غذا اهمیت بیشتری پیدا کردند [۱-۴].

مطالعات نشان داده‌اند که فراوان ترین عوامل باکتری‌های دخیل در همه گیری‌ها و مسمومیت های غذایی به ترتیب عبارتند از اشیریشیاکولای، سالمونلا، کامپیلوباکتر، یرسینیا انتروکلیتیکا، باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم پرفرنژنس، کلستریدیوم بوتولونیوم، آرکوباکتر بودند [۵، ۶]

طی سال‌های اخیر آرکوباکتر^۱ در سراسر جهان به عنوان یک پاتوژن غذایی نوظهور شناخته شده و کمیسیون بین-المللی میکروبیولوژیکی مواد غذایی (ICMSF) این باکتری را خطر جدی برای سلامتی انسان ارزیابی کرده است. آرکوباکتر در ابتدا از بافت جنین سقط شده گاو [۷] و بعداً از جنین خوک [۸، ۹] جداسازی شد. آرکوباکترها به عنوان عوامل ایجادکننده اسهال، ورم

پستان و سقط جنین در حیوانات و باکتری می (وجود عفونت باکتریایی در جریان خون)، اندوکاردیت (التهاب درون شامه قلب)، پریتونیت (التهاب صفاق)، گاستروانتریت (التهاب معده‌ای-روده‌ای) و اسهال در انسان شناخته می‌شود [۱۰، ۱۱]. حضور آن‌ها در نمونه خون مبتلایان به سیروز و آپاندیسیت گانگرونوز [۱۲] وضعیت را پیچیده تر می‌کند. سه گونه آرکوباکتر به نام های بوتزلر، کریوفیلوس، اسکیروی بیشتر با مشکلات بالینی همراه هستند به این دلیل که ارگانیسم‌های آرکوباکتر در نمونه‌های مدفوع حیوانات سالم و انسان‌ها یافت می‌شوند و بر آوردن فرضیه کوچ غیر ممکن است آسیب شناسی و بیماری‌زایی آن‌ها مورد اختلاف است [۱۳-۱۸].

سالاد غذایی است که پیش از غذا به عنوان پیش غذا، پس از غذای اصلی به عنوان یک وعده مجزا، همراه با غذای اصلی، یا خود به عنوان یک وعده غذای اصلی مصرف می‌شود. تکه‌های سبزیجات، میوه، گوشت، تخم مرغ، یا دانه با سس سالاد ترکیب می‌شود. ساده ترین تعریف سالاد ترکیبی متنوع از انواع سبزیجات است که همراه نمک، روغن، سرکه یا آبلیمو خورده می‌شود، اما امروزه دیگر این تعریف برای سالاد کافی نیست، چون در حال حاضر از انواع گوشت سفید و قرمز، حبوبات، پنیر، غلات، میوه و صیفی جات در سالاد استفاده می‌شود و به همین دلیل این پیش غذا نیاز به بازتعریف و طبقه‌بندی جدیدی دارد [۱۹].

رشد سریع تکنولوژی، علاوه بر تهی ساختن اجتماعات از منابع اولیه با بکار گرفتن هزاران ترکیب شیمیائی جدید و ورود قسمتی از این ترکیبات به صورت پس آب به محیط زیست مساله آلودگی محیط را پیش از بیش

¹ International Commission on Microbiological Specification Foods



پیچیده تر کرده است. آلودگی های کشاورزی ناشی از مصرف بارور کننده زمین های زراعی با موادی که به عنوان دفع آفات گیاهی به کار می رود و ورود این مواد به طبیعت از طریق شستشوی زمین های زراعتی و گیاهان نیز در آلودگی آب ها نقش مهمی داشته و بعضی از این آلودگی ها، حتی با روش های معمولی تصفیه آب قابل حذف شدن نیستند [۲۰]؛ از دیگر منابع پروتئینی با اهمیت در تغذیه انسان شیر است. مصرف سرانه شیر در ایران رو به کاهش نهاده است؛ با این وجود مصرف سالانه شیر و لبنیات در دنیا ۱۲۰ کیلوگرم می باشد در حالی که در ایران در سال ۱۳۹۸ این مقدار به زیر ۲۰ کیلوگرم کاهش داشته است، شیر خام به لحاظ دارا بودن تمامی مواد غذایی مورد نیاز رشد میکروارگانیسم ها محیط مطلوبی جهت رشد و تاثیر عوامل مخرب میکروبی و به تبع آن فساد این ماده غذایی محسوب می شود. به جهت ردیابی آلودگی های شاخص در فراورده های لبنی ابتدا باید از گاوداری ها پایش باکتریولوژیکی شیر را مشخص کرد [۲۱، ۲۲].

کباب، از دیرباز یکی از غذاهای محبوب و دلخواه ایرانیان بوده است. پورعباس قلی و همکاران در سال ۱۳۹۶ در مطالعه در تنکابن دریافتند که میزان آلودگی گوشت های کبابی، از مجموع ۱۴۰ نمونه، ۲۰ نمونه به آرکوباکتر آلودگی داشتند [۲۳]. آرکوباکتر عامل بیماری زای مشترک بین انسان و حیوانات است و از طریق آب و مواد غذایی انتقال می یابد. این میکروارگانیسم از غذاهایی با منشا حیوانی به خصوص طیور، حیوانات ذبح شده، شیر، انواع صدف های دو کفه ای و همچنین از آب فاضلاب، نمونه های مدفوع گونه های مختلف جدا شده است در ایران در وضعیت آلودگی به این باکتری اطلاعات جامع در دسترس نیست. گونه معروف و بیماری زای این باکتری در انسان آرکوباکتر بوتزلی

است که به عنوان خطرناک ترین گونه برای سلامت انسان از سوی کمیسیون شاخص های میکروبیولوژی مواد غذایی و اخیرا به عنوان پاتوژن مهم زئونوتیک شناسایی شده است [۱۶]. با توجه به مخاطرات ذکر شده در خصوص عوارض درگیری با آرکوباکتر، هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی و تعیین مقاومت ضد میکروبی آرکوباکتر در مواد غذایی عرضه شده در شهرستان شهرکرد می باشد.

مواد و روش کار

نمونه گیری

تعداد ۱۵۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه گوشت مرغ کباب شده، ۴۰ نمونه سالاد سبزیجات، ۴۰ نمونه شیر سنتی از مناطق مختلف و مراکز عرضه و ۴۰ نمونه آب شرب به صورت تصادفی نمونه گیری و در شرایط سترون به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد شهرکرد انتقال داده شد.

روش جستجوی آرکوباکتر

نمونه ها به لوله های حاوی محیط کشت پریستون (میرمدیا، ایران) منتقل و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از گذشت زمان مورد نظر در شرایط استریل به کمک لوپ استریل بر روی محیط CAMP کمپیلوباکتر غنی شده با خون گوسفند دفیبرینه شده که هر ویال مکمل حاوی آنتی بیوتیک هایی مانند ونکومایسین ۲ میلی گرم، پلی میکسین ۰/۰۵ میلی گرم، تری متوپریم ۱ میلی گرم بود، کشت خطی داده شد. سپس محیط های کشت در داخل انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ۷۲-۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از یک دوره گرم خانه گذاری پلیت ها جهت شناسایی آرکوباکترها مورد ارزیابی قرار گرفتند.



جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های هدف آرکوباکتر در واکنش PCR

منبع	اندازه محصول (Pb)	توالی پرایمر	ژن هدف
[۲۵]	(۲۰۳)	5'-AGTTGTTGTGAGGCTCCAC-3' 5'-GCAGACACTAATCTATCTCTAAATCA-3'	16srRNA
	(۲۸۳)	5'-TTACTCCTACACCGTAGT-3' 5'-AAACTATGCTAACGCTGGTT-3'	cadF
	(۲۹۳)	5'-TTGACGAGACAATAAGTGCAGC-3' 5'-CGTCTTTATCTTTGCTTTCAGGGA-3'	pldA
	(۳۳۰)	5'-CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG-3' 5'-TCCACCAGTGCTACTTCCTATA-3'	tlyA

فرانسه) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برآورد شد. DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد و به عنوان یک الگو برای PCR استفاده شد [۲۵].

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تست آنتی‌بیوگرام به روش diffusion_Disk انجام گرفت. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۱/۵ مک‌فارلند، در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک‌های آنتی-بیوگرام، شامل آمپی‌سیلین (AM)، پنی‌سیلین (PEN)، جنتامایسین (GM)، سولفامتاکسازول (SXT) و آموکسی‌کلاو (AMC) روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص گردید [۲۶].

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از مجموع ۱۵۰ نمونه مواد غذایی مورد آزمایش ۱۶ نمونه (۱۰/۶۶ درصد) به آرکوباکتر آلودگی داشتند. مطابق جدول (۱) بین مواد غذایی نمونه‌گیری شده و میزان آلودگی به آرکوباکتر رابطه معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$).

بر روی محیط کشت پایه، کلنی باکتری به شکل محدب، صاف، شفاف، بدون رنگ تا کرم به اندازه ۲-۴ میلی‌متر مشاهده شد. تمامی کلنی‌های مشکوک جهت شناسایی اولیه آرکوباکتر مورد آزمایشات میکروبی مانند رنگ-آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قند گلوکز قرار گرفتند. با مشاهده باسیل‌های خمیده در رنگ آمیزی گرم، متحرک بودن باکتری به روش لام مستقیم، مثبت شدن تست اکسیداز و منفی شدن تست تخمیر قند گلوکز، می‌توان تا حدود بسیار زیادی به جداسازی و شناسایی جنس آرکوباکتر مطمئن شد. در مرحله بعد با استفاده از تست‌های فنوتیپی شامل تست‌های تولید اوره آز، رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط میکروآئروفیلیک و رشد در مک‌کانگی آگار بود و لذا گونه آرکوباکتر شناسایی شد [۲۴].

آماده سازی DNA

پس از رشد باکتری، یک کلنی از آن در ۱ میلی لیتر آب استریل حل و سانتریفیوژ شد (۱۳۰۰۰rpm). سپس DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Qiagen، Courtaboeuf، فرانسه) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. خلوص و غلظت DNA با استفاده از نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, Illkirch،

جدول ۱- میزان آلودگی آرکوباکتر در گوشت مرغ کبابی، شیر سنتی، سالاد و آب شرب

نوع ماده غذایی	تعداد نمونه	میزان آلودگی	عدم آلودگی
آب شرب	۴۰	(۵ درصد) ۲ نمونه	(۹۵ درصد) ۳۸ نمونه
شیر سنتی	۴۰	(۱۰ درصد) ۴ نمونه	(۹۰ درصد) ۳۶ نمونه
سالاد	۴۰	(۷/۵ درصد) ۳ نمونه	(۹۲/۵ درصد) ۳۷ نمونه
گوشت مرغ کبابی	۳۰	(۲۳/۳۳ درصد) ۷ نمونه	(۷۶/۷ درصد) ۲۳ نمونه
مجموع	۱۵۰	(۱۰/۶۶ درصد) ۱۶ نمونه	(۸۹/۳۳) ۱۳۴ نمونه
سطح معنی داری	-	۰/۱۰۱ ^{ns}	

شیوع آرکوباکتر در آب شرب ۱۱ درصد بود [۲۷]، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقتی ندارد.

جدول ۳- فراوانی ژن های آرکوباکتر

آرکوباکتر	تعداد نمونه	<i>cadF</i> (283bp)	<i>pldA</i> (293bp)	<i>tlyA</i> (330bp)
مجموع	۱۶	(۷۵٪) ۱۲	(۸۷/۵٪) ۱۴	(۸۱/۲۵٪) ۱۳

در همین راستا Sciortino و همکاران در تحقیقی بر روی شیوع آرکوباکتر در آب شرب گزارش دادند که از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۲۷ نمونه به آرکوباکتر آلودگی داشته است [۲۸]، که بسیار فراتر از مطالعه حاضر می-باشد. در مطالعه‌ای در کشور نپال بر روی شیوع آرکوباکتر در نمونه‌های آب شرب، از مجموع ۲۸۶۰ نمونه، ۹۹ نمونه (۳/۴۶ درصد) به آرکوباکتر آلودگی داشته است که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۹]. در مطالعه‌ای مشابه توسط نیوا و همکاران (۲۰۱۳) که در اسپانیا *A. butzleri*، *A. cryaerophilus* و *A. skirrowii* با شیوع کلی ۷۳/۳ درصد، از نمونه صدف، ۵۵ درصد نمونه‌های مرغ ۴۲/۸ درصد نمونه‌های شیر تازه گاو، ۱۰ درصد گوشت خوک و گوشت گاو

جدول ۲- وضعیت مقاومت جدایه‌های آرکوباکتر

نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف

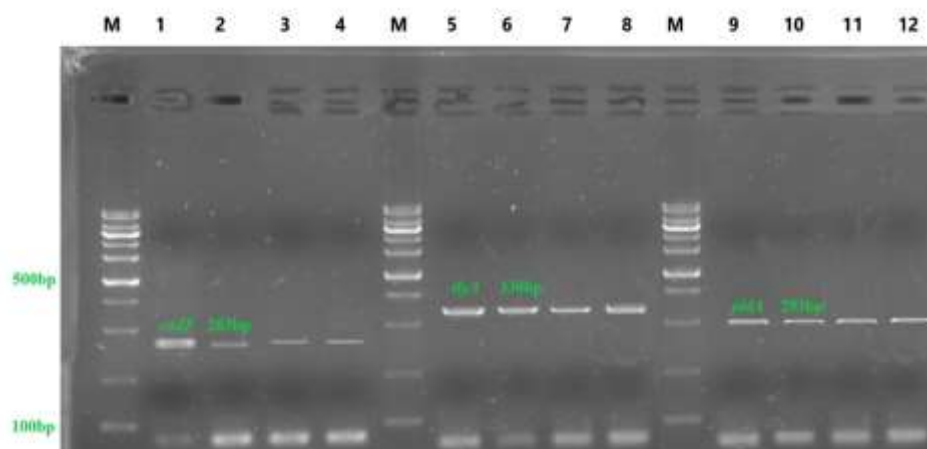
نوع آنتی بیوتیک			
SXT	GM	PEN	AM
(۵)	۵۰ (۸)	(۱۱)	(۱۰)
آرکوباکتر			

طبق نتایج به دست آمده، میزان آلودگی در آب شرب ۲ نمونه (۵ درصد)، گوشت کبابی ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، سالاد ۳ نمونه (۷/۵ درصد) و شیر سنتی ۴ نمونه (۱۰) بود. مطابق جدول (۲)، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های به دست آمده از آرکوباکتر نسبت به آنتی بیوتیک‌ها به ترتیب، بیشترین مقدار برای آمپی سیلین ۱۰ جدایه (۶۲/۵ درصد)، پنی سیلین ۱۱ جدایه (۶۸/۷۵ درصد)، جنتامایسین ۸ جدایه (۵۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت برای سولفامتاکسازول ۵ جدایه (۳۱/۵ درصد) بود. آنالیزهای آماری نشان داد که بین جدایه‌های مختلف اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p > 0.05$).

بحث

در تحقیقی که توسط Hidalgo و همکاران در مطالعه‌ای بر روی شیوع آرکوباکتر در آب شرب نشان دادند که





شکل ۱. واکنش PCR. فراوانی ژنهای *cadF*، *tlyA*، *pldA* و آرکوباکتر در نمونه‌های مختلف غذایی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۴-۱: ژن *cadF* (۲۸۳ جفت باز)، چاهک ۸-۵: ژن *tlyA* (۳۳۰ جفت باز)، چاهک ۱۲-۹: ژن *pldA* (۲۹۳ جفت باز).

بنابراین درمان عفونت‌های مربوطه را پیچیده می‌کند و شایع‌ترین گونه این جنس آرکوباکتر بوتزلری در محصولات گوشتی (مرغ، خوک، گوشت گاو، بره)، شیر، پنیر و صدف یافت می‌شود [۴].

مطالعه Marta و همکاران در ایتالیا بر روی آلودگی شیرهای سنتی عرضه شده در ایتالیا دریافتند که از مجموع ۴۸۴ نمونه، ۶۴ نمونه (۱۳/۲ درصد) به آرکوباکتر آلودگی داشتند [۳۳]، که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد. در تحقیق حاضر شیوع آلودگی به آرکوباکتر ۷/۵ درصد بود. تحقیق لامعی و همکاران (۲۰۲۲)، در مطالعه‌ای بر روی شیوع آرکوباکتر در شیرخام عرضه شده در شهرستان اصفهان، گزارش دادند که از مجموع ۳۵۰ نمونه، ۱۸ نمونه (۵/۱۴ درصد) آلودگی داشتند [۳۴]، که تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در برزیل مطالعه‌ای با شیوع آرکوباکتر در لبنیات توسط Bravo (۲۰۲۰)، انجام شد که گزارش دادند از مجموع ۱۰۷ نمونه شیر خام، ۱۷ نمونه (۷/۴۹

درصد جدا شد [۳۰]، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر ارتباطی ندارد.

در گزارشی توسط مایلز (۲۰۱۰) شیوع انواع آرکوباکتر در شیر نمونه‌گیری شده از مخازن گاو میزان آلودگی به آرکوباکتر را ۵ درصد (۳۹۶/۲۰) ارزیابی کرد [۳۱]، در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آرکوباکتر در شیر سنتی ۴ نمونه (۱۰ درصد) بود که ارتباط نزدیکی وجود ندارد. مطالعه‌ای توسط آیدین و همکاران (۲۰۰۷) در ترکیه نشان دادند که میزان ۳۷ درصد از نمونه‌های گوشت گاو چرخ کرده آلوده به آرکوباکتر بودند [۳۲]، که در این مطالعه میزان آلودگی ۲۳/۳ درصد بود که ارتباطی بین آنها وجود ندارد. در تحقیقی توسط Choi & Lee سال ۲۰۱۳ نشان دادند که انتریت ناشی از خوردن غذای آلوده به آرکوباکتر می‌تواند خود محدود کننده باشد با این وجود، شدت و طولانی شدن علائم ممکن است نیاز به درمان آنتی بیوتیکی داشته باشد، که ممکن است تحت تأثیر مقاومت آنتی بیوتیکی (متعدد) سویه قرار گیرد،

درصد) به آرکوباکتر آلودگی داشتند [۳۵]، که تا حدودی با مطالعه حاضر همسو است.

Mudadu و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای بر روی آلودگی برخی مواد غذایی به آرکوباکتر دریافتند که از نمونه‌های آب شرب هیچ آلودگی به آرکوباکتر یافت نشد، اما ۲۲/۹ درصد از نمونه‌های شیر خام به این باکتری آلوده بودند [۳۶] که با مطالعه حاضر همسو نمی‌باشد. گزارش Mottola و همکاران (۲۰۲۰)، در ایتالیا بر روی شیوع آرکوباکت در مواد غذایی عرضه شده در ایتالیا نشان دادند که از ۷۵ نمونه، ۱۸ نمونه (۲۴ درصد) مواد غذایی به آرکوباکتر آلودگی داشتند [۳۷] در حالی که در مطالعه حاضر ۱۰/۸۳ درصد به آرکوباکتر آلودگی داشتند؛ بنابراین با مطالعه نامبرده همسو نیست.

در گزارش Houf و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که غذاهای خام یا حداقل فرآوری شده معمولاً منبع اصلی عفونت آرکوباکتر در کشورهای صنعتی محسوب می‌شوند و در غذاهای با منشأ حیوانی منبع اولیه آلودگی، مدفوع در مراحل مختلف تولید باشد [۳۸]. در یک مطالعه از ایالات متحده در سال ۱۹۹۸ توسط Atabay و همکاران صورت پذیرفت، که طی آن آرکوباکتر بوتزتری و آرکوباکتر کری آئروفیلوس و آرکوباکتر اسکیروی از لاشه‌های مرغ کشتارگاه‌ها و جوجه‌های خرده فروشی جدا شدند ۴۰ درصد بودند [۳۹]، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت ندارد؛ در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آرکوباکتر در گوشت مرغ کباب شده ۲۳/۳ درصد بود. گزارش دیگری توسط نامبرده در سال ۲۰۰۲ در کشتارگاه‌های مرغ بلژیک صورت گرفت که دریافتند ۹۵ درصد پوست گردن نمونه‌های جمع آوری شده جوجه‌ها به ترتیب بعد فرایند تهی‌سازی و سرد کردن از نظر حضور آرکوباکتر مثبت اعلام شد. این محققان پی‌بردند که آرکوباکتر در پوست

گردن جوجه‌های گوشتی قبل و بعد فرایند چیلینگ شایع‌تر از کمپیلوباکتر است [۴۰]، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی ندارد. مطالعه‌ی Lura Maria و همکاران (۲۰۱۱) با هدف جداسازی آرکوباکتر بوتزتری از لاشه‌های مرغ در کاستاریکا اجرا شد، در نتیجه آن سویه‌های آرکوباکتر بوتزتری برای اولین بار با میزان ۴۵ درصد از لاشه‌های مرغ در کاستاریکا جداسازی و شناسایی شد [۴۱] که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت ندارد. در تحقیقی که توسط پورعباسقلی و همکاران در سال ۱۳۹۹ با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت ضد میکروبی آرکوباکتر بوتزتری جدا شده از لاشه مرغ در کشتارگاه‌های شهرستان تنکابن انجام شد، نتایج آرکوباکتر ۱۴/۲۸ درصد آلودگی داشت [۴۲] که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد.

در تحقیق Yuan و همکاران (۲۰۲۱)، بر روی شیوع آرکوباکتر در گوشت مرغ دریافتند که از مجموع ۶۰ نمونه نمونه ۱۶ (۲۷ درصد) به آرکوباکتر آلودگی داشتند [۴۳]، اما در مطالعه حاضر شیوع آلودگی در گوشت مرغ، ۲۳/۳ درصد بود که تا حدودی همسو می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Vidal و همکاران (۲۰۲۱)، در شیلی بر روی آلودگی گوشت مرغ به آرکوباکتر انجام دادند دریافتند که ۴۱/۶ درصد نمونه‌ها به آرکوباکتر آلوده بودند [۴۴]، که در مطالعه حاضر ۲۳/۳ درصد به آرکوباکتر آلودگی وجود داشت، بنابراین متفاوت‌تر از مطالعه حاضر است. در مطالعه Jribi و همکاران (۲۰۲۰)، در تونس بر روی شیوع آرکوباکتر در گوشت پرندگان گزارش دادند که از مجموع ۲۵۰ نمونه، ۱۰/۴ درصد از نمونه‌ها به آرکوباکتر آلوده بودند [۴۵]، که با مطالعه حاضر مطابقتی ندارد. در ترکیه توسط YESİLMEN و همکاران (۲۰۲۲)، بر روی آلودگی گوشت‌های عرضه شده در شهر دیاربکر دریافتند از



latinoamericanos de nutricion, 2013. 63(2): p. 164-172.

6. Collado, L. and M.J. Figueras, Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical microbiology reviews*, 2011. 24(1): p. 174-192.
7. Dhama, K., et al., Beneficial effects of probiotics and prebiotics in livestock and poultry: the current perspectives. *Intas Polivet*, 2008. 9(1): p. 1-12.
8. Ellis, W., et al., Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *The Veterinary Record*, 1977. 100(21): p. 451-452.
9. Ellis, W., et al., Isolation of spirillum-like organisms from pig fetuses. *Veterinary Record*, 1978.
10. Jiang, Z.-D., et al., Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, 2010. 48(4): p. 1417-1419.
11. Ceriotti, F., et al., Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012.
12. Ferreira, S., et al., Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical reviews in microbiology*, 2016. 42(3): p. 364-383.
13. Lau, S., et al., Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Molecular Pathology*, 2002. 55(3): p. 182.
14. Gill, K., Aerotolerant *Campylobacter* strain isolated from a bovine preputial sheath washing. *The Veterinary Record*, 1983. 112(19): p. 459.
15. Kiehlbauch, J., et al., *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals

مجموع ۲۵ نمونه گوشت مرغ؛ ۵۱/۳۳ درصد به آروکوباکتر آلودگی داشتند [۴۶]، که با مطالعه حاضر ارتباطی ندارد.

نتیجه گیری نهایی

از دلایل آلودگی مواد غذایی به آروکوباکتر می توان در معرض قرار گرفتن مواد غذایی با منابع آلوده کننده اشاره کرد. لذا باتوجه به آلودگی ۱۰/۶۶ درصدی در نمونه های این مطالعه به آروکوباکتر و احتمال انتقال آلودگی به انسان و ایجاد عوارضی مثل گاسترو انتریت، همچنین مصرف بالای گوشت بخصوص گوشت کبابی در رستوران های بین راهی و فاقد نظارت های بهداشتی به نظر می رسد در اخذ تدابیر برای کنترل آلودگی به این باکتری از چرخه تولید تا مصرف گوشت، سالاد و شیر خام و پخت کامل گوشت، جوشاندن شیر قبل از مصرف باید دقت کافی به عمل آید.

منابع

1. Samie, A., et al., Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *Journal of Infection*, 2007. 54(6): p. 558-566.
2. Deb, R. and S. Chakraborty, Trends in veterinary diagnostics. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 2012. 3(1): p. 1.
3. Hsueh, P.-R., et al., Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(2): p. 489-491.
4. Lee, M.H. and C. Choi, Survival of *Arcobacter butzleri* in Apple and Pear Purees. *Journal of food Safety*, 2013. 33(3): p. 333-339.
5. Calvo, G., M.L. Arias, and H. Fernandez, *Arcobacter*: a foodborne emerging pathogen. *Archivos*



- from poultry meat during slaughterhouse and retail stores in Tonekabon. *Journal of Food Microbiology*, 2018. 4(4): p. 1-7.
24. Uljanovas, D., et al., Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Arcobacter* species isolated from human stool samples, foods of animal origin, ready-to-eat salad mixes and environmental water. *Gut Pathogens*, 2021. 13(1): p. 1-16.
 25. Jribi, H., et al., Prevalence of putative virulence genes in *Campylobacter* and *Arcobacter* species isolated from poultry and poultry by-products in Tunisia. *Journal of food protection*, 2017. 80(10): p. 1705-1710.
 26. Heidarzadi, M.A., et al., *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene*, 2021. 11(2(42)): p. 81-90.
 27. Hidalgo, A.L.R., et al., Survival capacity of *Arcobacter butzleri* at different incubation temperatures in drinking water. *Bioscience Journal*, 2022. 38(e38032): p. 1981-3163.
 28. Sciortino, S., et al., Occurrence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* spp. recovered from aquatic environments. *Antibiotics*, 2021. 10(3): p. 288.
 29. Ghaju Shrestha, R., Y. Tanaka, and E. Haramoto, A review on the prevalence of *arcobacter* in aquatic environments. *Water*, 2022. 14(8): p. 1266.
 30. Nieva-Echevarria, B., et al., Prevalence and genetic diversity of *Arcobacter* in food products in the north of Spain. *Journal of food protection*, 2013. 76(8): p. 1447-1450.
 31. Milesi, S., Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in food of animal origin [PhD Thesis]. Doctoral with diarrheal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991. 29(2): p. 376-385.
 16. De Oliveira, S., et al., Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 1997. 57(4): p. 347-354.
 17. Figueras, M.J., et al., *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Systematic and applied microbiology*, 2011. 34(2): p. 105-109.
 18. Patyal, A., et al., Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transboundary and emerging diseases*, 2011. 58(5): p. 402-410.
 19. Momeni Shahraki, M., A. Shakerian, and E. Rahimi, Study the prevalence rate and antibiotic resistance pattern of the *Staphylococcus aureus* strains isolated from different types of vegetables and salads in Chaharmahal VA Bakhtiari province in Spring, 2017. *Journal of Food Microbiology*, 2018. 5(3): p. 56-64.
 20. Water, U., Water and climate change. The United Nations World Water Development Report; UNESCO: Paris, France, 2020.
 21. Fusco, V., et al., Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020. 19(4): p. 2013-2049.
 22. Paul, A.A., et al., Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020. 60(18): p. 3005-3023.
 23. Ghimi Rad, M., Isolation and identification of *Arcobacter butzleri*



- Journal of Applied Microbiology, 1998. 84(6): p. 1007-1016.
40. HOUF, K., et al., Occurrence and Distribution of Arcobacter Species in Poultry Processing. Journal of Food Protection, 2002. 65(8): p. 1233-1239.
 41. Arias, M.L., A. Cid, and H. Fernández, Arcobacter butzleri: first isolation report from chicken carcasses in Costa Rica. Brazilian Journal of Microbiology, 2011. 42: p. 703-706.
 42. Pourabbasgholi, Z., et al., Isolation, Identification and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Arcobacter Butzleri isolated from chicken carcass in Tonekabon. Research and Innovation in Food Science and Technology, 2022. 11(1): p. 83-94.
 43. Wang, Y.Y., et al., Genetic characteristics and antimicrobial susceptibility of Arcobacter butzleri isolates from raw chicken meat and patients with diarrhea in China. Biomed. Environ. Sci, 2021. 34: p. 1024-1028.
 44. Vidal-Veuthey, B., et al., Antimicrobial resistance and virulence genes profiles of Arcobacter butzleri strains isolated from back yard chickens and retail poultry meat in Chile. Letters in Applied Microbiology, 2021. 72(2): p. 126-132.
 45. Jribi, H., et al., Occurrence and antibiotic resistance of Arcobacter species isolates from poultry in Tunisia. Journal of food protection, 2020. 83(12): p. 2080-2086.
 46. YEŞİLMEN, S., et al., Prevalence and Antibiotic Resistance of Arcobacter spp. Isolates from Meats, Meat Products, and Giblets. Acta Veterinaria Eurasia, 2022. 48(2).
 - Program in Animal Nutrition and Food Safety. Milan, Italy: University of Milan, 2010.
 32. Aydin, F., et al., Prevalence and distribution of Arcobacter species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. Journal of applied microbiology, 2007. 103(1): p. 27-35.
 33. Marta, C., et al., Large genetic diversity of Arcobacter butzleri isolated from raw milk in Southern Italy. Food microbiology, 2020. 89: p. 103403.
 34. Lameei, A., et al., Genotyping, antibiotic resistance and prevalence of Arcobacter species in milk and dairy products. Veterinary Medicine and Science, 2022. 8(4): p. 1841-1849.
 35. Cruzado-Bravo, M.L., et al., Occurrence of Arcobacter spp. in Brazilian Minas frescal cheese and raw cow milk and its association with microbiological and physicochemical parameters. Food Control, 2020. 109: p. 106904.
 36. Mudadu, A., et al., Detection of Arcobacter spp. in environmental and food samples collected in industrial and artisanal sheep's milk cheese-making plants. Food Control, 2021. 126: p. 108100.
 37. Mottola, A., et al., Arcobacter species detection in Italian composite foods. LWT, 2020. 134: p. 110161.
 38. Houf, K. and R. Stephan, Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen Arcobacter from human stool. Journal of Microbiological Methods, 2007. 68(2): p. 408-413.
 39. Atabay, A., C. Corry, and O. On, Diversity and prevalence of Arcobacter spp. in broiler chickens.



Investigating the contamination and determining the antimicrobial resistance of *Arcobacter* in food products supplied in Shahrekord County

Hossein niayesh¹, Ebrahim Rahimi^{2*}

1. PhD student in food hygiene, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran

2. Department of Food Hygiene, Shahrekord Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Arcobacter are gram-negative or aerobic bacteria that cause gastroenteritis in humans, whose source is soil, and they have a high ability to resist antibiotics. The purpose of the present study is to evaluate the contamination with heavy metals and *Arcobacter* in meat, salad, raw milk and drinking water in Shahrekord city and to measure the antibiotic resistance of the isolates. In this study, 150 food samples were randomly collected from different parts of Shahrekord city and transferred to the quality control laboratory of Shahrekord Islamic Azad University to evaluate the microbial load, antibiotic resistance and heavy metal levels. The samples were tested according to the standard method. $P < 0.05$ was considered as a significant level in the present study. The results showed that 10.66% of the 150 food samples tested were contaminated with *Arcobacter*. The level of contamination in drinking water was 2 samples (5%), grilled meat was 7 samples (23.33%), salad was 3 samples (7.5%), and traditional milk was 4 samples (10%). The results showed that the *pldA* gene was found in 87.5% in *Arcobacter* with the highest frequency, while the *cadF* gene was detected in 75% with the lowest frequency. Considering the contamination of all the samples of this study and the possibility of the infection being transmitted to humans and causing complications such as gastroenteritis, as well as the high consumption of meat, especially grilled meat in roadside restaurants, it seems necessary to take measures to control the contamination of this bacteria from the cycle. From production to consumption of meat, salad and raw milk, and complete cooking of meat, boiling of milk before consumption must be done carefully.

Keywords: *Arcobacter*, Antibiotic resistance, Heavy metals, Shahrekord

* Corresponding Author: Ebrahim Rahimi

Address: Department of Food Hygiene, Shahrekord Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: ebrahimrahimi55@yahoo.com



بررسی اثر داروی گیاهی کالیک بر عفونت تجربی خوراکی سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی

مأنده تاجی^۱، حمید استاجی^{۲*}، سحر غفاری خلیق^۳، سید حسام الدین عمادی چاشمی^۴

۱- دانش آموخته دانشکده پرديس علوم فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

چکیده

سالمونلاتیفی موریوم یکی از سروتپ‌های رایج سالمونلا می‌باشد که اغلب با سلامت عمومی و زیان اقتصادی در سطح جهان ارتباط دارد. افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع سویه‌های مقاوم توجه به داروهای گیاهی و مواد ضد میکروبی طبیعی را بیشتر نموده است. درمان ترکیبی یک استراتژی برای مقابله با مقاومت ضد میکروبی می‌باشد. شربت ضدسرفه تجاری سازی کالیک شامل مواد موثره آویشن‌باغی، شیرین بیان و انیسون می‌باشد. در بروشور شربت کالیک ذکر شده دارای خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی است و در درمان مشکلات گوارشی موثر است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی شربت کالیک و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين و هم‌چنین اثر ترکیبی این دو ماده در درمان و کنترل عفونت سالمونلاتیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی می‌باشد. در این پژوهش ۴۰ جوجه یک روزه راس ۳۰۸ با سویه استاندارد سالمونلاتیفی موریوم القا عفونت شدند. پس از تلقیح خوراکی باکتری به جوجه‌ها به صورت تصادفی به گروه‌های مساوی ۱- بدون درمان، ۲- درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومايسين، ۳- درمان با کالیک و ۴- اریترومايسين و کالیک تقسیم شدند. ۲۴ ساعت پس از القاء عفونت ۵ جوجه از هر گروه در روزهای چهار و دوازده پس از انجام مرگ با ترحم مورد بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق شمارش کلنی و آزمون Realtime-PCR کمی و هم‌چنین بررسی‌های هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری از بافت کبد و طحال و رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین قرار گرفتند. نتایج حاصل از شمارش کلنی و Realtime-PCR در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد گروه کنترل بیشترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود. پس از آن بیشترین میزان باکتری به گروه کالیک و گروه اریترومايسين اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود. در نهایت کمترین میزان باکتری مربوط به گروه درمان با کالیک و اریترومايسين اختصاص داشت. نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی نشان داد گروه کنترل بیشترین آسیب به بافت‌ها را داشت و اختلاف معنی‌داری میان گروه کنترل و سایر گروه‌ها مشاهده شد. سایر گروه‌های مورد مطالعه به جز عارضه نکروز کبدی در گروه ترکیب اریترومايسين و کالیک روز دوازده که اختلاف معنی‌داری با سه گروه دیگر داشت، نتایج مشابهی از خود نشان دادند. بر طبق نتایج، داروی گیاهی کالیک عملکرد مشابهی با اریترومايسين دارد و به صورت هم‌افزایی با اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتری سالمونلاتیفی موریوم موثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک اریترومايسين، سالمونلاتیفی موریوم، شربت کالیک®، گیاهان دارویی، qPCR

*نویسنده مسئول: حمید استاجی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران؛ ایمیل: hstaji@semnan.ac.ir

مقدمه

در ایران به طور عمده، پاتوژن‌های انتروباکتری مانند سروواریهای *سالمونلا*، *شیگلا دیسانتریا* و *اشریشیا کلی* (Staji et al., 2018) به طور معمول پایش می‌شوند. *سالمونلا* تیفی موریوم یکی از سروتیپ‌های رایج *سالمونلا* می‌باشد که باعث عفونت دستگاه گوارش انسان و باعث علائم مختلفی در حیوانات آلوده می‌شود (Javan et al., 2012). با این حال، برخی از سویه‌های *سالمونلا* تیفی موریوم، علاوه بر ایجاد گاستروانتریت موضعی، قادر به ایجاد عفونت‌های سیستمیک هستند این باکتری‌ها در روده کوچک تکثیر می‌شوند و از دیواره روده فراتر می‌روند و به عقده‌های لنفاوی مزانتریک و از آن‌جا به کبد و طحال می‌رسند و تکثیر می‌شوند (Haimovich and Venkatesan, 2006; Staji et al., 2016). استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از این ضد میکروبی‌ها منجر به ایجاد سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو شده است و به همین علت پژوهشگران به دنبال جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند (Abd El-Hack et al., 2022). متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی به دلیل اثرات ضد میکروبی مانند مکانیسم اختلال در غشا پاتوژن، فعال سازی سلول‌های سیستم ایمنی و ترویج باکتری‌های مهم در روده تاثیر گذار هستند (Diaz-Sanchez et al., 2015). مطالعات زیادی اثرات مفید عصاره و اسانس گیاهی را بر عملکرد طيور ثبت کرده‌اند (Abdelli et al., 2021).

کالیک نام تجاری دارو انسانی و ساخت ایران (محصول شرکت داروسازی نو تک فار) می‌باشد که جهت مواردی چون تسکین سرفه، برونشیت، سرماخوردگی و آنفلوآنزا، به صورت شربت به انسان تجویز می‌گردد. داروی مذکور حاوی عصاره شیرین بیان، آویشن باغی و انیسون می‌باشد که دارای مواد موثره مهمی مانند گلیسیریزین، تیمول و

کارواکرول است. همان‌طور که در بروشور شربت کالیک آمده است به دلیل مواد موثره متفاوت گیاهان به کار رفته در این دارو و اثرات گوارشی آن‌ها، این شربت در گاستریت و پیشگیری و درمان زخم‌های گوارشی نیز سودمند می‌باشد.

گیاه شیرین بیان دارای خواص ضد میکروبی است و بر روی پارامترهای عملکرد، رشد، سلامتی و تخم گذاری طيور معمولاً از طریق مکمل‌های افزودنی خوراک تاثیر می‌گذارد و هضم و اشتها را در جوجه‌های گوشتی بهبود می‌بخشد (Alagawany et al., 2019). در تحقیقی که توسط Reda و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی بلدرچین ژاپنی صورت گرفت، مشخص شد مکمل شیرین بیان منجر به کاهش قابل توجهی کلیفرم‌ها، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* در تعداد کل باکتری‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد (Reda et al., 2021). در آزمایش Park و همکاران، نشان داده شد که آمپی سیلین و جنتامایسین که به عنوان یک درمان ترکیبی برای درمان لیستریوز استفاده می‌شوند، اثر هم‌افزایی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نداشت اما حضور ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان باعث کاهش ۳۲ برابری حداقل غلظت مهاري جنتامایسین شد. علاوه بر این، هم‌افزایی ضد میکروبی با عصاره شیرین بیان، جدایه های بالینی لیستریا مونوسیتوژنز مقاوم به جنتامایسین را نسبت به جنتامایسین حساس کرد (Park et al., 2022). آویشن که دارای مواد موثره تیمول و کارواکرول است بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر ضد باکتریایی دارد (Adam Kowalczyk et al., 2020). نتایج پژوهشی Eslami و همکاران در فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن بر روی جوجه‌های گوشتی نژاد راس آلوده به *سالمونلا* تیفی موریوم ATCC ۱۴۰۲۸ بعد از هفت روز درمان از طریق گاوژ نشان داد مصرف ۱



جیره آغازین بود که طبق دستور العمل شرکت تولید کننده انجام گرفت. آب نیز بدون محدودیت در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت.

تهیه و القا باکتری سالمونلا

القا عفونت ابتدا با سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم ATCC14028 با دوز عفونی کننده ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۶ (Colony Forming Unit) CFU باکتری که طی مراحل مقدماتی و در طرحی پایلوت و قبل از انجام آزمون اصلی، که مجدداً اندازه‌گیری شد انجام گرفت. (Lopes et al., 2016) سپس دوز عفونی کننده به‌دست آمده، به‌صورت خوراکی و از طریق گاوآذ چینه‌دان به جوجه‌ها (توسط سوند معدی) منتقل گردید و عفونت به‌صورت تجربی در آن‌ها ایجاد شد.

گروه‌های آزمایشی

پس از القا عفونت، جوجه‌ها به‌صورت تصادفی در چهار گروه آزمایشی (هر گروه شامل ۱۰ جوجه) با رنگ آمیزی متمایز شدند. در گروه یک مداخله‌ای در طول دوره آزمایش صورت نگرفت. در گروه دوم پس از گذشت ۲۴ ساعت از القا سالمونلوز در جوجه‌ها، درمان به‌وسیله آنتی بیوتیک اریترومايسين (رویان دارو، سمنان)، با دوز ۰/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر با فاصله ۲۴ ساعت به مدت دوازده روز انجام شد. در گروه سوم تجویز داروی گیاهی کالیک (نوتک فار، تهران) که شامل ترکیبات آویشن، شیرین بیان (شیرین بیان استاندارد شده بر مبنای ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر) و انیسون می‌باشد با دوز ۵۰ میکرولیتر با فاصله ۲۴ ساعت یک بار در طی مدت دوازده روز از طریق گاوآذ به جوجه خورانیده شد. در گروه چهارم تجویز کالیک و اریترومايسين به‌صورت خوراکی با دوزهای فوق به‌صورت همزمان صورت گرفت.

میلی‌لیتر اسانس آویشن با دوز ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دو بار در روز با فاصله ۱۲ ساعت از رشد سالمونلا تیفی موریوم جلوگیری کرد (Eslami et al., 2022). Du و همکاران نشان دادند که کارواکرول و تیمول در مقابل پاتوژن‌های مهم طیور مانند سالمونلا، اشریشیاکلی و کلوستریدیوم پرفرنزنس می‌تواند موثر باشند (Du et al., 2015). در نتایج Mahady و همکاران، نشان داده شد عصاره متانولی دانه‌های انیسون در شرایط آزمایشگاهی از رشد هلیکوباکتر پیلوری جلوگیری کرد. این آزمایش مشخص کرد انیسون می‌تواند یک ترکیب بالقوه مفید در درمان بیماری‌های گوارشی باشد (Mahady et al., 2005).

به خوبی ثابت شده که ترکیبات شربت کالیک مانند تیمول و کارواکرول در آویشن باغی (Adam et al., 2020)، گلیسیریزین در شیرین بیان (Alagawany et al., 2019) و ترانس آنتول در انیسون (Sun et al., 2019) دارای خواص ضد میکروبی است و تاثیر بسیار زیادی در مشکلات گوارشی دارند. این تحقیق با هدف بررسی داروی گیاهی کالیک و آنتی بیوتیک اریترومايسين و هم‌چنین اثر هم‌افزایی کالیک با اریترومايسين در درمان و کنترل عفونت سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش

مکان، جامعه و شرایط مورد مطالعه

این مطالعات در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انجام شد. در این مطالعه تعداد ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد راس ۳۰۸ (کد اخلاق IR.SU.REC.1402.7) با میانگین وزن بین ۹۵ تا ۱۰۰ گرم تهیه شد. محیط نگهداری جوجه‌ها محیطی با درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت $5 \pm 60\%$ بود. تغذیه جوجه‌ها نیز در سه روز اول جیره پیش آغازین و از سه روزگی به بعد



نمونه گیری

پس از شروع تجویزها در روزهای چهارم و دوازدهم، ۵ جوجه از هر گروه (۵ جوجه برای روز چهارم و ۵ جوجه برای روز دوازدهم) پس از مرگ با ترخم، مورد بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق شمارش کلنی در محیط کشت SS آگار (Salmonella Shigella Agar) و بلاد آگار و آزمون Real-Time PCR کمی و هم‌چنین بررسی‌های هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری از بافت کبد و طحال و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین قرار گرفتند.

شمارش بار میکروبی به روش کلنی کانت

بافت‌های کبد و طحال گروه‌های مختلف آزمایشی به گونه‌ای که جمع وزنی بافت‌های هر گروه ۱ گرم باشد برش داده شد و رقت ۱۰۳ تهیه گردید و سپس به جهت کشت باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از سه رقت تمام گروه‌های آزمایشی با پنج بار تکرار از هر رقت برداشته شد و به محیط کشت‌ها اضافه گردید و سپس به وسیله پخش کننده شیشه‌ای استریل شده، کشت سطحی داده شد. همین رویه برای تمام گروه‌ها انجام گردید (Zhou et al., 2017). پلیت‌ها با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت شمارش کلنی‌های محیط کشت بلاد آگار و سالمونلا شیگلا آگار (SS) انجام شد.

آزمایش Real Time PCR

ابتدا برای کنترل مثبت از باکتری سالمونلا تیفی موریوم رقت ۰/۱ از نیم مک فارلند (McFarland) تهیه شد و سپس علاوه بر رقت اولیه، رقت سازی به صورت (۱:۱۰)، (۱:۱۰۰)، (۱:۱۰۰۰)، (۱:۱۰۰۰۰) به عنوان ۲، ۳، ۴ و ۵ تهیه گردید و توسط روش فنول-کلروفرم ایزو آمیل الکل استخراج شد و برای کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد و نمونه‌ها در جهت کالیره کردن دستگاه Real-

Time PCR در دستگاه قرار گرفتند (Gerivani et al., 2020). پس از این مرحله فرآیند مولکولی ردیابی و تشخیص DNA سالمونلا در بافت‌های کبد و طحال صورت گرفت. ابتدا استخراج DNA به روش فنول کلروفرم ایزو آمیل الکل از بافت کبد و طحال انجام شد (Huang et al., 2021). نمونه‌های بافت کبد و طحال هر مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر لحاظ شدند. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی مستر میکس (Sina Green HS-Qpcr Mix, 2X) Sinaclon (تهران)، ۱ میکرولیتر آغازگر رو به جلو با توالی GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA مربوط به DNA سالمونلا، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس به توالی GGTAGAAATTCCTCCAGCGGGTACTGG مربوط به DNA سالمونلا و ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل در تعداد نمونه‌ها ضرب شد و در میکروتیوپ‌های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط شدند و سپس در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شد و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده هر نمونه به میکروتیوپ‌ها اضافه و در دستگاه قرار داده شد (Staji et al., 2015; Gerivani et al., 2020). چرخه‌های حرارتی جهت تکثیر DNA سالمونلا در ترموسایکلر Rotor Gene Q (Qiagen Hilden، آلمان) شامل دناتوره شدن اولیه طی ۱ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴ دقیقه، دناتوره شدن نهایی ۴۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت توسعه نهایی طی ۱ چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۰ دقیقه تمدید شد. در مطالعه حاضر با به کار گرفتن نشانگر فلورسنت سبز به نام سایبر گرین (Sybergreen)



در نهایت با بررسی نتایج میکروبیولوژی حاصل از روش Realtime-PCR و شمارش کلنی در محیط کشت سالمونلا شینگلا آگار (SS) و بلاد آگار و تعیین درجه آسیب وارد شده به بافت‌های کبد و طحال بین گروه‌های مختلف تحت آزمایش، آنالیز آماری با نرم افزار One-way ANOVA با مقیاس ($P < 0.05$) صورت گرفت.

نتایج

شمارش باکتری

نتایج حاصل از شمارش بار میکروبی به روش کلنی کانت در محیط سالمونلا شینگلا آگار (SS) (شکل ۱) و بلاد آگار (شکل ۲) در بافت کبد و طحال در روزهای چهار و دوازده با استفاده از نرم افزار آماری One-Way ANOVA نشان داد که گروه کنترل بیشترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. پس از آن به ترتیب گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين و گروه داروی گیاهی کالیک اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود. در نهایت کمترین میزان باکتری مربوط به گروه چهارم یعنی گروه درمان با ترکیب کالیک و اریترومايسين اختصاص داشت که با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) که این نتایج نشان می‌دهد شربت کالیک توانسته میزان باکتری را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد و تاثیری مشابه با گروه درمان آنتی‌بیوتیک اریترومايسين داشته باشد و ترکیب آنتی بیوتیک اریترومايسين و شربت کالیک موفق‌ترین گروه در کاهش میزان باکتری بود.

آزمون Realtime-PCR

قبل از انجام آزمون، رقت سازی از DNA استاندارد در جهت کالیبره کردن دستگاه Real-Time PCR بر اساس چرخه آستانه صورت گرفت که نتایج قابل قبول بود (شکل ۳).

در واکنش، چرخه‌ای از واکنش که در آن محصول مورد نظر ردیابی می‌شود تحت عنوان چرخه آستانه (Cycle threshold) تعیین گردید.

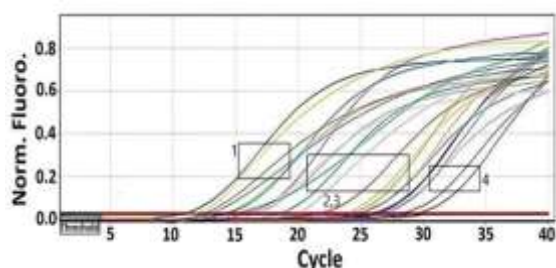
مطالعه هیستوپاتولوژی

مراحل تهیه لام بافتی

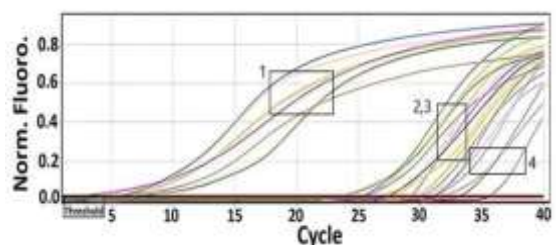
بعد از نمونه گیری با اندازه مناسب از بافت کبد و طحال، نمونه‌ها در ظرف‌های نمونه گیری محتوی محلول فرمالین ۱۰٪ نگهداری شدند و به صورت جداگانه کد گذاری شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از جداسازی نمونه‌ها، فرمالین ظرف‌های نمونه گیری مجدداً عوض شدند. در نهایت جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، ظرف‌های حاوی نمونه بافت کبد و طحال به بیمارستان سینا تهران برای ادامه پروسه که شامل آبگیری (به وسیله الک)، شفاف سازی (به وسیله گزلیل) و آغشته سازی (به وسیله پارافین) و سپس قالب گیری، برش و رنگ آمیزی و در نهایت مونتاژ لام و لامل می‌باشد انتقال داده شدند (Lopes et al., 2016).

بررسی لام‌های رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین ائوزین برای نیمه کمی کردن اطلاعات هیستوپاتولوژی از روش درجه بندی استفاده شد که به صورت تصادفی در چهار شان میکروبی با درشت نمایی یا لنز ۴۰ در پنج لام از هر گروه آزمایشی مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری قرار گرفت که دو عارضه نکروز و التهاب در کبد و دو عارضه تخلیه بافتی و هموسیدروزیس در طحال مورد بررسی قرار گرفت. هر عارضه به صورت جداگانه در لام‌ها بررسی گردید به این صورت که اگر در هیچ شان عارضه ای دیده نشد درجه آن ۰ می‌شود و اگر در یک شان عارضه دیده شد درجه آن ۱ و اگر دو شان عارضه دیده شد درجه آن ۲ و اگر در ۳ شان عارضه دیده شد درجه آن ۳ و اگر در ۴ شان عارضه دیده شد درجه آن ۴ می‌شود.

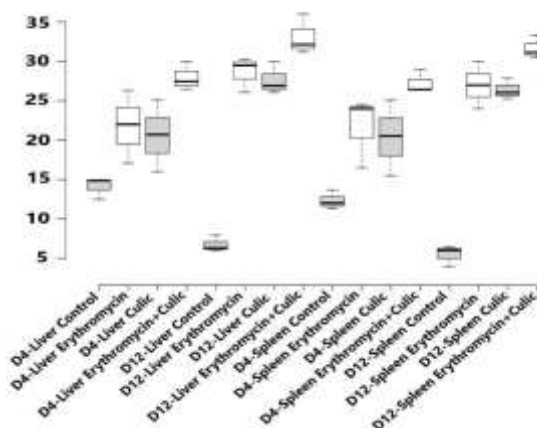




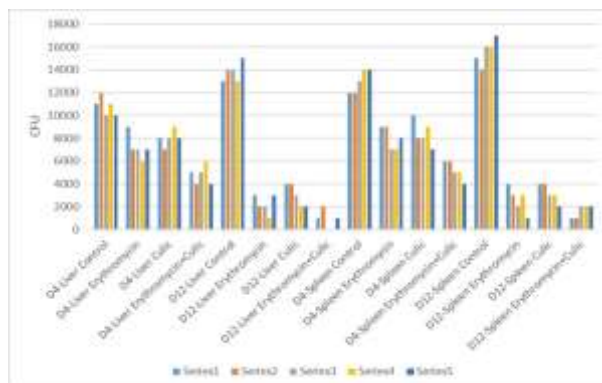
شکل ۴. منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های مختلف آزمایشی ۱- منحنی‌های گروه کنترل. ۲ و ۳- منحنی‌های گروه درمان اریترومایسین و گروه درمان کالیک. ۴- منحنی‌های گروه درمان کالیک و اریترومایسین در روز چهار. تعداد سیکل‌ها روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی بر روی محور عمودی نشان داده شده است.



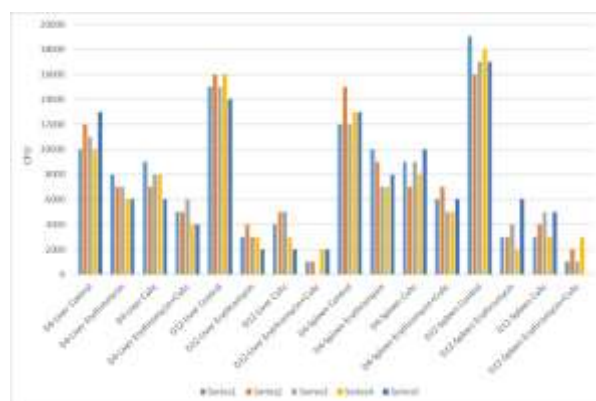
شکل ۵. منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های مختلف آزمایشی مختلف ۱- منحنی‌های گروه کنترل. ۲ و ۳- منحنی‌های گروه درمان اریترومایسین و گروه درمان کالیک. ۴- منحنی‌های گروه درمان کالیک و اریترومایسین در روز دوازده. تعداد سیکل‌ها روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی بر روی محور عمودی نشان داده شده است.



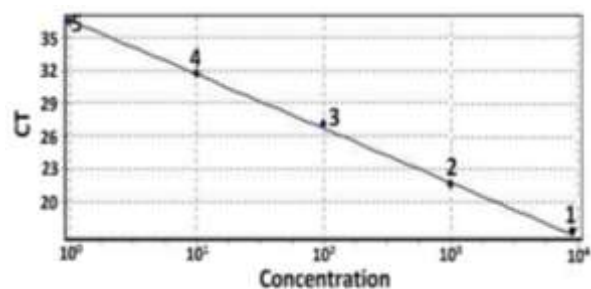
شکل ۶. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری اعداد CT در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی و محور عمودی بیانگر مقدار چرخه آستانه است.



شکل ۱. نمودار گرافیکی مقایسه آماری نتایج حاصل از شمارش باکتری در محیط کشت بلاد آگار در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ (محور افقی بیانگر گروه‌های مختلف آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری)



شکل ۲. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری حاصل از شمارش باکتری در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ (محور افقی گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری)



شکل ۳. رقت سازی از DNA کنترل مثبت، انجام آزمون Real-Time PCR و رسم نمودار استاندارد در جهت تنظیم دستگاه. محور افقی بیانگر غلظت و محور عمودی بیانگر چرخه آستانه

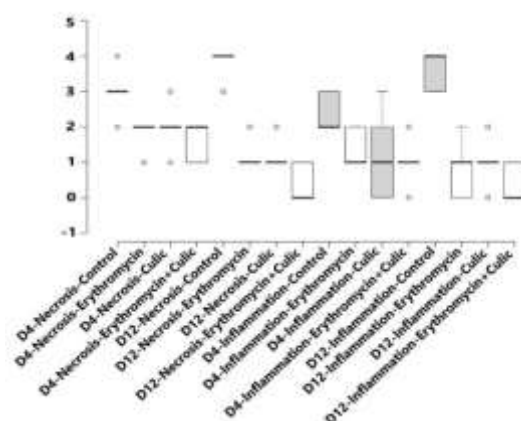
معنی داری مشاهده نشد و بهترین درمان در گروه ترکیب کالیک و اریترومايسين بود که اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهد شربت کالیک به صورت هم‌افزایی با اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتری سالمونلاتیفی موریوم موثر می‌باشد.

هیستوپاتولوژی

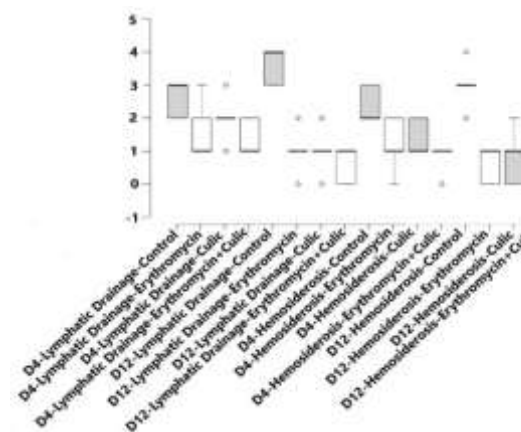
پس از درجه بندی آسیب شناسی دو عارضه نکروز و التهاب کبد (شکل ۷) و دو عارضه تخلیه بافتی و هموسیدروزیس طحال (شکل ۸) در گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه، آنالیز با نرم افزار آماری One-way ANOVA صورت گرفت که نشان داد گروه کنترل بیشترین آسیب به بافت کبد و طحال را داشت و اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها مشاهده شد. سایر گروه‌های مورد مطالعه به جز عارضه نکروز کبدی در روز دوازده، نتایج مشابهی از خود نشان دادند و اختلاف معنی داری میان سایر گروه‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$). در مشاهده عارضه نکروز کبدی در ۵ لام از گروه‌های مختلف آزمایشی مشخص شد در روز دوازدهم گروه چهارم که ترکیب آنتی بیوتیک اریترومايسين و داروی گیاهی کالیک بود اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها داشت ($P > 0.05$). بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد داروی گیاهی کالیک عملکرد مشابهی با آنتی بیوتیک اریترومايسين دارد که در کاهش عفونت سالمونلایی موثر است.

بحث

در این پژوهش شربت کالیک که شامل مواد موثره گیاهان دارویی آویشن باغی، شیرین بیان و انیسون است به منظور درمان و کنترل عفونت سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ مورد مطالعه قرار گرفته است که مشاهده شد گروه شربت کالیک توانست به



شکل ۷. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری آسیب شناسی نکروز و التهاب بافت کبد در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی تعیین درجه آسیب شناسی است.



شکل ۸. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری تخلیه لنفوسیستی و هموسیدروز بافت طحال در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی تعیین درجه آسیب شناسی است.

منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سویه استاندارد سالمونلاتیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های درمانی مختلف دستگاه Realtime-PCR در بافت کبد و طحال روز چهار (شکل ۴) و روز دوازده (شکل ۵) به دست آمد. نتایج آماری در روز چهار و در روز دوازده در بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل ۶) درمان در گروه داروی گیاهی کالیک صورت گرفته و اختلاف معنی داری با گروه کنترل داشت. در گروه داروی گیاهی کالیک و گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين اختلاف

میزان قابل توجهی باکتری سالمونلا تیفی موریوم را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد و گروه کالیک اختلاف معنی داری با گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين نداشت و گروه ترکیب کالیک و اریترومايسين نتیجه بهتری نسبت به سایر گروه‌ها از خود نشان داد.

در آزمایشی که توسط Staji و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد که ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار را با استفاده از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و کریشر وایر استئومیلیت القا و سپس درمان در گروه‌های مختلف آزمایشی آغاز گردید. نتایج بررسی‌ها توسط Realtime-PCR و هیستوپاتولوژی نشان داد که کاهش تعداد باکتری در درجه اول در گروه درمان با اریترومايسين و بزاق زالو و در درجه دوم در گروه اریترومايسين با اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. هم‌چنین با بررسی مقاطع پاتولوژی اختلاف معنی دار مشخصی از نظر یافته‌های پاتولوژی در گروه درمان با اریترومايسين و بزاق زالو با سایر گروه‌ها وجود داشت. بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد که ترکیبات بزاق زالو این توانایی را دارند که به صورت هم‌افزایی با آنتی بیوتیک اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتریایی موثر باشند (Gerivani et al., 2020) که طبق پژوهش حاضر که با بررسی Realtime-PCR و هیستوپاتولوژی صورت گرفت شربت کالیک همراه با آنتی بیوتیک اریترومايسين توانست در کاهش جمعیت باکتری سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی به صورت هم‌افزایی موثر باشد. Mi-Hyang lee و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند عصاره اسکیزاندر را به میزان ۵ میلی گرم در موش‌های نر آلوده به سالمونلا تیفی موریوم می‌تواند میزان مرگ و میر و علائم بالینی شدید مانند بی حالی موش‌ها را نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش دهد و هم‌چنین آزمایشات هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری

بافت‌های کبد و طحال و رنگ آمیزی هماتوکسین ائوزین نشان داد گروه درمان با عصاره، آسیب بافتی ناشی از عفونت سالمونلایی را به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش می‌دهد. (Lee et al., 2006) همان‌طور که در نتایج هیستوپاتولوژی این پژوهش هم مشاهده شد علائم آسیب شناسی در بافت کبد و طحال جوجه‌هایی که تحت درمان با شربت کالیک برای مقابله علیه عفونت سالمونلا تیفی موریوم قرار گرفتند به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کردند. آزمایشی که توسط Hyun Ae Kwon و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جهت تاثیر ضد میکروبی سه عصاره متانولی کوپتیس جاپونیکا، آلو سیاه و شیساندر چینیسیس در جوجه‌های گوشتی آلوده با استافیلوکوک گالینارم JOL420 انجام شد نشان داد گروه درمان با عصاره‌های گیاهی به ندرت علائم بالینی و آسیب بافتی را در بافت‌هایی مانند کبد، طحال و کلیه از خود نشان دادند و هم‌چنین این ترکیبات اثرات قابل توجهی در مرگ و میر داشتند (Kwon et al., 2008) که نتایج هیستوپاتولوژی این تحقیق هم نشان داد داری گیاهی کالیک که شامل عصاره‌های آویشن و شیرین بیان و انیسون است به میزان قابل توجهی توانست آسیب بافتی ناشی از عفونت سالمونلا تیفی موریوم را در جوجه‌های گوشتی نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. در پژوهشی که توسط Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت مشاهده شد مکمل جیره غذایی جوجه‌های گوشتی به صورت ترکیبی با آویشن می‌تواند عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی را بهبود بخشد و شیوع عفونت سالمونلا هایدلبرگ را کاهش دهد و کاندید مناسبی در پیشگیری و درمان آنتریت نکروتیک ناشی از کلستریدیوم پرفرنژنس که یک بیماری روده‌ای در طیور است شود (Lee et al., 2003) که در این پژوهش هم



شربت کالیک که یکی از جزءهای آن آویشن است باعث کاهش عفونت سالمونلایی در جوجه‌های گوشتی شد. در تحقیق دیگری که توسط Cruss و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد گزارش کردند که اسانس تیمول و کارواکرول موجود در گیاه آویشن می‌توانند جمعیت سکومی سالمونلا و کمپیلوباکتر ژرونی را در جوجه‌ها کاهش دهند (Cross et al., 2007) که هم‌چنین در بروشور شربت کالیک آمده است این داروی گیاهی شامل مواد موثره تیمول و کارواکرول است که می‌تواند نتیجه گرفت در کاهش عفونت سالمونلایی می‌تواند موثر باشد. آزمایشی توسط Geravand و همکاران در سال ۲۰۲۱، با هدف تاثیر شیرین بیان در جوجه گوشتی یک روزه انجام شد. نتایج نشان داد شیرین بیان می‌تواند هورمون‌های تیروئید را بهبود و جمعیت برخی از باکتری‌های بیماری‌زای بالقوه را در روده جوجه‌های گوشتی کاهش دهد و هم‌چنین مشاهده شد مصرف شیرین بیان تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها در ارتقاء عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی باشد (Geravand et al., 2021) که نتیجه این مطالعات بیانگر تاثیر مثبت شیرین بیان بر ویژگی و عملکرد طیور می‌باشد. نتایج آزمایش Al mofleh و همکاران در سال ۲۰۰۷، توسط مطالعه بافت شناسی نشان داد زخم معده حاد در موش‌های صحرایی که توسط مواد شیمیایی مضر مختلفی به جهت درمان با انیسون ایجاد کردند به‌طور قابل توجهی آسیب مخاطی معده ناشی از عوامل نکروز کننده و ایندومتاسین را توانست مهار کند. اثر ضد زخم بیشتر از نظر بافت شناسی تایید شد و سوسپانسیون انیسون تاثیرات زیادی بر روی معده و مخاط معده داشت که نشان دهنده تاثیر انیسون بر مشکلات گوارشی است (Al Mofleh et al., 2007). پژوهشی دیگر توسط Abudabos و همکاران در سال

۲۰۱۶ صورت گرفت که نشان داد مواد افزودنی خوراکی گیاهی مانند فیتوژنیک، اسانس تیمول، انیسون و ... اثری مشابه آنتی بیوتیک آویلامایسین بر رشد و مشخصات بیوشیمیایی جوجه‌های گوشتی داشت. (Abudabos et al., 2016) مطالعه ای توسط Changcheng و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان داد اسانس انیسون ستاره و دارچین می‌تواند به‌طور قابل توجهی عفونت‌های سالمونلا پولورووم و سالمونلا گیو را در جوجه‌های زرد کاهش دهد و هم‌چنین به‌طور قابل توجهی توانست کاهش وزن بدن ناشی از عفونت‌های سالمونلا پولورووم، سالمونلا گیو و سالمونلا کنتاکی را در جوجه‌ها کاهش دهد (Li et al., 2022) که مانند پژوهش حاضر نشان دهنده تاثیر ضد میکروبی انیسون بر عفونت سالمونلا می‌باشد.

اختلاف نتایج هیستوپاتولوژی با آزمون Realtime-PCR و شمارش کلنی در بافت کبد و طحال می‌تواند به این دلیل باشد که تغییرات مولکولی زودتر از تغییرات سلولی حادث می‌شوند و در مطالعات اختلافات بافتی با میکروسکوپ نوری محدودیت وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج ذکر شده می‌توان بیان کرد که داروی گیاهی کالیک در درمان جوجه‌های گوشتی تلقیح شده با سالمونلا تیفی موریوم موثر می‌باشد و ترکیب کالیک و آنتی بیوتیک اریترومایسین بهترین روش مقابله با باکتری سالمونلا تیفی موریوم در مطالعه حاضر است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Abd El-Hack, M.E. et al. (2022) "Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production,"



- days of age,” *British poultry science*, 48(4), pp. 496–506. doi: 10.1080/00071660701463221 PMID: 17701503
8. Diaz-Sanchez, S. *et al.* (2015) “Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production,” *Poultry science*, 94(6), pp. 1419–1430. doi: 10.3382/ps/pev014 PMID: 25744321
9. Du, E. *et al.* (2015) “In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*,” *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/S40104-015-0055-7 PMID: 26705471
10. Eslami, N., Anzabi, Y. and Nourazar, M.A. (2022) “The Role of *Thymus Vulgaris* Essential Oil on the Rate of Fecal Excretion of *Salmonella Typhimurium* in Broilers Infected with Bacteria,” 6(4), pp. 157–167. doi: 10.22034/JZD.2022.15683
11. Geravand, M. *et al.* (2021) “Growth performance, ascites sensitivity, and ileal microbiota as affected by licorice essential oil in broiler chicken diets,” *Livestock Science*, 251, p. 104670. doi: 10.1016/j.livsci.2021.104670
12. Gerivani Hamid; Rassouli, Maryam; Ghazaleh, Nooshin; Vayeghan, Abbas Javaheri, B.S. (2020) “Co-administration of Erythromycin and Leech Salivary Extract Alleviates Osteomyelitis in Rats Induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*,” *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2020/04/30, 33(04), pp. 243–251. doi: 10.1055/s-0040-1703008 PMID: 32356297
13. Haimovich, B. and Venkatesan, M.M. (2006) “*Shigella* and *Poultry Science*, 101(4), p. 101696. doi: 10.1016/j.psj.2022.101696 PMID: 35150942
2. Abdelli, N., Solà-Oriol, D. and Pérez, J.F. (2021) “Phytogenic feed additives in poultry: Achievements, prospective and challenges,” *Animals*, 11(12). doi: 10.3390/ani11123471 PMID: 34944248
3. Abudabos, A.M. *et al.* (2016) “The effect of phytogenic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*,” *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), pp. 24151–24157. doi: 10.1007/s11356-016-7665-2 PMID: 27646442
4. Adam Kowalczyk, I.F. and Martyna Przychodna, Sylwia Sopata, A.B. (2020) “Selected Therapeutic Applications,” *Molecules*, (25), pp. 4125–4142. doi: 10.3390/molecules25184125 PMID: 32917001
5. Javan, A.J., Staji, H., Ghazvinian, K., Vayeghan, A.J., Salimi, M.R. and Mahdavi, A., 2012. Prevalence of *Salmonella* spp. in the quail egg interior contents: a provincial study,” *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(3), p. 191. doi: 10.22059/IVJM.2012.3007
6. Al Mofleh, I.A. *et al.* (2007) “Aqueous suspension of anise ‘*Pimpinella anisum*’ protects rats against chemically induced gastric ulcers,” *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(7), p. 1112. doi:10.3748/wjg.v13.i7.1112 PMID: 17373749
7. Cross, D.E. *et al.* (2007) “The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28



- by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum,” *Veterinary Journal*, 214, pp. 40–46. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.05006 PMID: 27387725
20. Mahady, G.B. *et al.* (2005) “In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders,” *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(11), pp. 988–991. doi: 10.1002/ptr.1776 PMID: 16317658
21. Park, M. *et al.* (2022) “Antimicrobial Synergy between Aminoglycosides and Licorice Extract in *Listeria monocytogenes*,” *Pathogens*, 11(4), p. 440. doi: 10.3390/pathogens11040440 PMID: 35456115
22. Reda, F.M. *et al.* (2021) “Dietary effect of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on quail performance, carcass, blood metabolites and intestinal microbiota,” *Poultry Science*, p. 101266. doi: 10.1016/j.psj.2021.101266 PMID: 34225203
23. Staji, H. *et al.* (2015) “Distribution of Shiga toxin genes subtypes in B1 phylotypes of *Escherichia coli* isolated from calves suffering from diarrhea in Tehran suburb using DNA oligonucleotide arrays,” *Iranian Journal of Microbiology*, 7(4), pp. 191–197. PMID: 26697157
24. Staji, H. *et al.* (2016) “Phylogenetic Grouping and Assessment of Virulence Genotypes, With Antibiotic Resistance Patterns, of *Escherichia Coli* Strains Implicated in Female Urinary Tract Infections,” *International Journal of Enteric Salmonella: Death as a means of survival*,” *Microbes and Infection*, 8(2), pp. 568–577. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.002 PMID: 16297650
14. Huang, C. *et al.* (2021) “Development of a rapid *Salmonella* detection method via phage-conjugated magnetic bead separation coupled with real-time PCR quantification,” *Lwt*, 142(January), p. 111075. doi:10.1016/j.lwt.2021.111075
15. Kwon, H.A. *et al.* (2008) “Evaluation of antibacterial effects of a combination of *Coptidis Rhizoma*, *Mume Fructus*, and *Schizandrae Fructus* against *Salmonella*,” *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), pp. 180–183. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.020 PMID: 18675484
16. Lee, K.-W. *et al.* (2003) “Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens,” *British poultry science*, 44(3), pp. 450–457. doi: 10.1080/0007166031000085508 PMID: 12964629
17. Lee, M.H. *et al.* (2006) “Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*,” *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), pp. 270–275. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.004 PMID: 16876280
18. Li, C. *et al.* (2022) “The Use of Star Anise-Cinnamon Essential Oil as an Alternative Antibiotic in Prevention of *Salmonella* Infections in Yellow Chickens,” *Antibiotics*, 11(11). doi: 10.3390/antibiotics11111579 PMID: 36358233
19. Lopes, P.D. *et al.* (2016) “Experimental infection of chickens



spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes,” *Cogent Biology*, 5(1), p. 1673688. doi:

10.1080/23312025.2019.1673688

Zhou, Z. *et al.* (2017) “Combination of erythromycin and curcumin alleviates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis in rats,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG), pp. 1–6. doi: 10.3389/fcimb.2017.00379 PMID: 28884090

Pathogens, 4(1). doi: org/10.17795/ijep31609

25. Staji, H., Birgani, S.F. and Raeisian, B. (2018) “Comparative clustering and genotyping of *Campylobacter jejuni* strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis,” *Annals of Microbiology*, 68(11), pp. 755–762. doi: org/10.1007/s13213-018-1380-9

26. Sun, W., Shahrajabian, M.H. and Cheng, Q. (2019) “Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant



Effect of Culic[®] Herbal Medicine on Experimental Oral Salmonella Typhimurium Infection in Broilers

Maedeh Taji¹, Hamid Staji^{2*}, Sahar Ghaffari Khaligh³, Seyed Hesamodin Emadi Chashmi⁴

1- Graduated from the Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

Received: 10 June 2024 Accepted: 27 August 2024

Abstract

Salmonella typhimurium is one of the common serotypes of *Salmonella*, which is often associated with public health and economic losses worldwide. Combination therapy is a strategy to deal with antimicrobial resistance. The anti-cough syrup of Culic[®] commercialization includes effective ingredients of *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra* and *Pimpinella anisum*. Culic[®] syrup has antimicrobial and antiviral properties and is effective in treating digestive problems. The aim of this study is to investigate the antibacterial effect of Culic[®] syrup and the antibiotic erythromycin, as well as the combined effect of these two substances in the treatment and control of *S. typhimurium* infection in broilers. In this study, 40 one-day-old chicks of Ross 308 were infected with the standard strain of *S. typhimurium*. After oral inoculation of bacteria, chickens were randomly divided into equal groups: 1- no treatment, 2- treatment with erythromycin antibiotic, 3- treatment with Culic[®] and 4- erythromycin and Culic[®]. 24 hours after the induction of infection, 5 chickens from each group were subjected to microbiological examinations through colony counting and quantitative Real-Time PCR test and histopathological examinations after hematoxylin-eosin staining. The results of colony counting and Realtime-PCR in the studied groups showed that the control group had the highest bacterial load. After that, the highest bacterial load was assigned to the Culic[®] group and the erythromycin group, and the difference between these two groups was not significant. Finally, the lowest bacterial load was assigned to the treatment group with Culic[®] and erythromycin. The results of histopathology showed that the control group had the most tissue damage and a significant difference was observed between the control group and other groups. Other studied groups showed similar results, except the complication of liver necrosis in the erythromycin and Culic[®] group on the twelfth day, which had a significant difference with the other three groups. Therefore, Culic[®] herbal medicine has the same function as erythromycin and is effective in reducing the population of *S. typhimurium* bacteria synergistically with erythromycin.

Keywords: Antibiotic Erythromycin, *Salmonella Typhimurium*, Culic[®] Syrup, Herbal Medicines, qPCR

* Corresponding Author: Hamid Staji

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

Email: hstaji@semnan.ac.ir

فراوانی ژن های *omp T*، *iss* و *pap GII* در اشریشیاکلی های جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در شهر تبریز

فرناز جعفری^۱، سامان مهدوی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱

چکیده

کلی باسیلوز یکی از بیماری های بسیار شایع در صنعت پرورش طیور می باشد که سالیانه موجب بروز خسارات اقتصادی زیادی می گردد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی فراوانی ژن های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در شهر تبریز بود. ۱۰۰ نمونه باکتری اشریشیاکلی جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور (در سال ۱۴۰۰) با روش های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی بصورت فنوتیپی تعیین هویت شدند. سپس فراوانی ژن های *omp T*، *iss* و *pap GII* در این جدایه ها به روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فراوانی ژن های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری های اشریشیاکلی مورد آزمایش بترتیب ۳۳ درصد، ۱۴ درصد و ۲۲ درصد بود. همچنین یک درصد از جدایه های مورد آزمایش حاوی هر سه ژن مذکور بودند. ۲۳ نمونه منفی از نظر حضور ژن های مورد مطالعه مشاهده شد. با توجه به حضور ژن های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از طیور می توان نتیجه گیری کرد که این ژن ها می توانند به عنوان عوامل موثر در عفونت های خارج روده ای باکتری مطرح باشند. همچنین ژن *iss* به دلیل دارا بودن بیشترین میزان فراوانی در بین ژن های مورد مطالعه، با احتمال بیشتری می تواند بطور بالقوه به عنوان مهمترین عامل بیماریزایی در اشریشیاکلی های جدا شده از طیور معرفی شود.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، کلی باسیلوز طیور، ژن های حدت

*نویسنده مسئول سامان مهدوی

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

پست الکترونیک: S.Mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

مقدمه

توجه باشد (Bauchart et al., 2010; Jeffrey et al., 2002). ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی شایع بین APEC و UPEC شامل ژن افزایش بقای سرمی (iss)، ژن‌های پیلی مرتبط با پیلونفریت (*pap GII*) و پروتئین غشای بیرونی (*omp T*) هستند که ویژگی‌های مشترک خود را نشان می‌دهند (Zhao et al., 2009). شایع‌ترین ژن-های /شریشیاکلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در ایران عبارتند از: *pap GII* و *iut A*, *iss*, *omp T*, *hly F* (Kafshdouzan et al., 2013). عامل اصلی در پاتوژن باکتری /شریشیاکلی، توانایی این باکتری برای چسبیدن به بافت میزبان و کلونیزه شدن در آن است (Monroy et al., 2005). در فیمبریه، فیمبرین *pap G* در نوک رشته انتهای فیمبریه قرار گرفته و امکان اتصال باکتری به پذیرنده‌های اختصاصی میزبان را فراهم می‌سازد و به همین دلیل آن را تحت واحد چسبندگی (Adhesin) می‌نامند (Cortés et al., 2010). ژن *pap GII* شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت مجاری ادراری می‌باشد که مهم‌ترین عامل حدت آن، فیمبریه *p* است. /شریشیاکلی یوروپاتوژن، انواع مختلفی از Adhesin مانند آدزین‌های پیلی *pap* را بیان می‌کند که واسطه اتصال به سطح سلول‌های اپی‌تلیال مجاری ادراری هستند (Jantunen et al., 2006; Sunwoo et al., 2000). ژن *iss* به عنوان معمول‌ترین ژن کدکننده APEC، شایع‌ترین عامل حدت در جدایه‌های /شریشیاکلی می‌باشد (Najafi et al., 2019). به علت این که شکل بروز کلی‌باسیلوز طیور اکثراً سپتی سمی است و این عامل حدت، نقش مهمی در پاتوژن این بیماری دارد (Zhao et al., 2009) مقاومت سرمی در بسیاری از انواع میکروارگانیسم‌های پاتوژن مهم است و یکی از ارزش‌ترین فاکتورهای حدت باکتریایی جهت مطالعه به ویژه در بیماری کلی‌باسیلوز طیور محسوب می‌شود (Johnson et al., 2008). ژن *iss*

/شریشیاکلی بیماری‌زای پرندگان APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) زیر مجموعه‌ای از گروه بزرگ باکتری‌هایی است که /شریشیاکلی بیماری‌زای خارج روده‌ای ExPEC (Extraintestinal *Escherichia coli*) نامیده می‌شود (Ghanbarpour et al., 2010). /شریشیاکلی بیماری‌زای خارج روده‌ای (ExPEC) عامل ایجادکننده کلی‌باسیلوز در طیور و نیز عفونت‌های مختلف در انسان می‌باشد که از این جمله می‌توان به عفونت‌های دستگاه ادراری، مننژیت نوزادان و سپسیس اشاره کرد (Mellata, 2013). جدایه‌های بیماری‌زای پرندگان، بیماری‌های مختلفی در طیور ایجاد می‌کنند. کلی‌باسیلوز رایج‌ترین عفونت باکتریایی در گله‌های طیور می‌باشد که خسارت‌های اقتصادی زیادی ایجاد می‌کند (Azizpour and Ghazaei, 2020; Russo and Johnson., 2003). /شریشیاکلی‌های بیماری‌زای پرندگان نقش مهمی به عنوان پاتوژن منتقله از راه خوراک بر عهده دارند و فراورده‌های طیور، منبع مناسبی از ExPEC از جمله جدایه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند (Johnson et al., 2008). سویه‌های بیماری‌زای این باکتری جزء میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش بوده و در شرایط استرس محیطی و تضعیف سیستم ایمنی باعث ایجاد بیماری کلی‌باسیلوز می‌شوند. حدود ۱۵-۱۰ درصد از کلیفرم‌های روده مربوط به سروتیپ‌های بیماری‌زا هستند (Akond et al., 2015; Dissanayake et al., 2008). تحقیقات نشان داده است که سویه‌های APEC و ExPEC مخزن ژنی مشابهی در خصوص ژن‌های حدت دارند. بنابراین فرضیاتی مانند ژئونوز بودن سویه‌های APEC و ExPEC و نیز معرفی سویه APEC به عنوان مخزن برای ژن‌های وابسته به حدت ExPEC در انسان می‌تواند قابل



مرک، کشور آلمان) (Azizpour, 2022; Rodriguez- Siek et al., 2005).

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی به روش جوشاندن انجام شد. استخراج DNA روی ۱۰۰ ایزوله کشت شده *اشریشیا کلی* در محیط کشت قلب مغز (BHI) آگار (شرکت مرک، کشور آلمان) در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. ۳-۵ کلنی از هر نمونه در لوله ۱/۵ میلی لیتری اپندورف حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE استریل ریخته شد و با استفاده از شیکر کاملاً مخلوط شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد، به طوری که سطح آب جوش، دو سوم ویال‌ها را پوشش داد. در نهایت، ویال‌ها با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۵-۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی ویال‌های حاوی DNA برای آزمایش PCR به اپندورف استریل منتقل شد (Ahmadi et al., 2019). بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه‌های نانودراپ و الکتروفورز بر روی آگارز ۱/۵ درصد انجام شد.

شناسایی مولکولی ژنهای مورد مطالعه

به منظور بررسی فراوانی ژن‌های مورد مطالعه از روش Multiplex PCR استفاده شد. مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۴ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۳ میکرولیتر dNTPs (۲۵mM)، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۳/۵ میکرولیتر DNA پلیمرز Taq و ۱ میکرولیتر DNA الگو انجام شد.

بیان کننده پروتئین ISS است که کدکننده پروتئین آتروباکترین بوده و باعث افزایش پایداری *اشریشیا کلی* و مقاومت سرمی این باکتری در برابر سیستم کمپلمان میزبان می‌شود. ژن *omp T* سبب بیان *omp T* می‌شود که پروتئازی است که غیرفعال‌سازی کلی‌سین را بر عهده دارد (Sunwoo et al., 2006). اگرچه عملکرد فیزیولوژیکی *omp T* نامشخص است، ولی در پاتوژنز *اشریشیا کلی* نقش دارد و می‌تواند پپتیدهای ضد میکروبی را غیرفعال کند (Okuno et al., 2004). با توجه به اهمیت ژن‌های ذکر شده و نقش آنها در حداث باکتری *اشریشیا کلی*، مطالعه اخیر با هدف بررسی فراوانی ژن‌های *omp T*، *iss* و *pap GII* در *اشریشیا کلی*‌های جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در شهر تبریز انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی نمونه‌ها

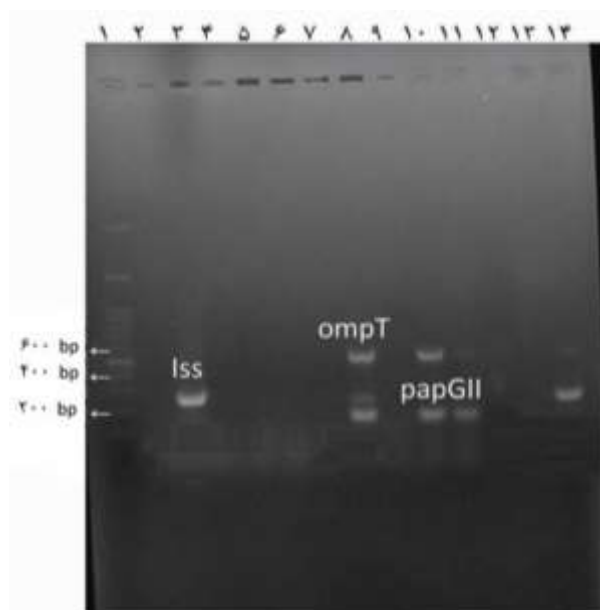
در این تحقیق، ۱۰۰ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور (از ۱۵ مزرعه پرورش طیور گوشتی) بین ماه‌های فروردین تا آبان ۱۴۰۰ در شهر تبریز برای کار تحقیقی اخیر در نظر گرفته شد. بعد از کالبدگشایی طیور مبتلا و مشاهده علائم کلی‌سپتیسمی، در شرایط استریل، با سوآپ از ترشحات سطح بافت و با ایجاد شکاف با لوپ، قسمتی از بافت کبد و قلب در محیط مکانیکی آگار کشت داده شد. پس از ۲۴-۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های صاف لاکتوز مثبت انتخاب شده و پس از رنگ آمیزی باکتری‌ها به روش گرم، آزمایشات تکمیلی بیوشیمیایی جهت تایید تشخیص فنوتیپی باکتری‌های *اشریشیا کلی* صورت گرفت که شامل موارد زیر بود: SIM، سیمون سترات آگار، متیل رد (Methyl TSI)، وژ پروسکائر (Voges Proskauer)، (red) و ژ پروسکائر (Triple Sugar Iron agar) و اوره آگار (شرکت



جدول ۱- توالی و ویژگی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژنهای مورد مطالعه در نمونه‌های /شریشیا کلی

ژن	توالی	اندازه محصول (bp)	منبع
<i>Omp T</i>	F: ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	۵۵۹	Zhao et al., 2009
<i>iss</i>	F: CAGCAACCCGAACCACTTGATG	۳۲۳	Zhao et al., 2009
<i>Pap GII</i>	F: GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	۱۹۰	Zhao et al., 2009

عامل اصلی کلی باسیلوز در پرندگان می‌باشد (Azizpour and Ghazaei, 2020).



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR Multiplex جدایه‌های /شریشیا کلی مورد مطالعه. شماره ۱: مارکر (۱۰۰bp)، شماره ۲: کنترل منفی، شماره ۸: کنترل مثبت، شماره‌های ۳، ۱۰، ۱۱ و ۱۴: نشان‌دهنده حضور ژنهای مورد آزمایش.

جدول ۲- فراوانی ژنهای مورد مطالعه و فراوانی با هم بودن این ژنها در یک جدایه

ژن	تعداد	الگوی حضور	تعداد
<i>iss</i>	۳۳	<i>iss + omp T</i>	۱
<i>Omp T</i>	۱۴	<i>iss + papG</i>	۲
<i>Pap</i>	۲۲	<i>Omp T +</i>	۴
فاقد ژن	۲۳	<i>iss + omp T</i>	۱
جمع	۱۰۰		

این پاتوتیپ باکتریایی به دنبال عفونتهای اولیه ویروسی و مایکوپلاسمایی، به صورت ثانویه بروز کرده و موجب

واکنش PCR با شرایط دمایی ۴ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به مدت ۱ ساعت بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. از باکتری /شریشیا کلی ATCC 10536 به عنوان کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل، به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که از ۱۰۰ نمونه باکتری /شریشیا کلی مورد مطالعه، ۳۳ نمونه (۳۳ درصد) دارای ژن *iss*، ۲۲ نمونه (۲۲ درصد) حاوی ژن *pap GII* و ۱۴ نمونه (۱۴ درصد) دارای ژن *omp T* بودند (شکل ۱). تنها یک نمونه (۱ درصد) از جدایه‌های /شریشیا کلی مورد آزمایش حاوی هر سه ژن مورد مطالعه بودند. ۲۳ جدایه /شریشیا کلی فاقد هر یک از ژنهای حدت مورد آزمایش بودند (جدول ۲).

بحث

/شریشیا کلی بیماریزای پرندگان (APEC) یکی از مهمترین عوامل عفونی در پرورش طیور گوشتی و نیز

کلی‌سپتی‌سمی شده و می‌تواند خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت طیور وارد سازد (Kwon et al., 2009; Nakazato et al., 2008). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سویه‌های APEC نقش مهمی را به‌عنوان یک پاتوژن غذازاد بازی می‌کنند و محصولات طیور می‌توانند منبع مجموعه‌ای از EXPEC از جمله سویه‌های عامل بیماری‌های انسانی باشند. بنابراین، کنترل کلی‌باسیلوز مشکل جدی در آینده خواهد بود که برای سلامت انسان و حیوانات مفید است (Johnson et al., 2008). برخی از مطالعات، مشاهداتی مبنی بر انطباق‌پذیری سویه‌های APEC در میزبان انسانی و همچنین انتقال پلاسمیدهای آنها ارائه نموده است. از طرفی، مطالعات دیگری نیز تشابهات فیلوژنتیکی، ژنوتیپی و سروتیپی را در بین سویه‌های APEC و ExPEC انسانی مشتق شده از عفونت‌های دستگاه ادراری و منتزیت نوزادان نشان داده است (Mokady et al., 2005; Moulin-Schouleur et al., 2006). نتایج تحقیق اخیر نشان داد که فراوانی ژن‌های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری‌های /شریشیاکلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در شهر تبریز به ترتیب ۳۳ درصد، ۱۴ درصد و ۲۲ درصد بود. همچنین تنها یک جدایه مورد آزمایش، بطور همزمان دارای هر سه ژن مذکور بود. این مطالعه برای اولین بار بر روی فراوانی ژن‌های مذکور در باکتری‌های /شریشیاکلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در شهر تبریز انجام شده است. ناطقی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که فراوانی ژن *iss* در باکتری‌های /شریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری انسان و جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز به ترتیب ۱۱ درصد و ۹۶/۴۳ درصد بود (Nateghi et al., 2010). قربانی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که فراوانی ژن *iss* در باکتری‌های

/شریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت‌های مجرای ادراری در انسان و موارد جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور به ترتیب ۵/۷ درصد و ۱۱/۴ درصد بود (Ghorbani et al., 2021). کفشدوزان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فراوانی ژن‌های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری‌های /شریشیاکلی جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور به ترتیب ۶۸/۲ درصد، ۷۳ درصد و ۱۷/۶ درصد بود (Kafshdouzan et al., 2013). قنبرپور و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ۱۴/۰۶ درصد از باکتریهای /شریشیاکلی جدا شده از موارد سلولیت طیور در ایران حاوی ژن *pap GII* بودند (Ghanbarpour et al., 2010). نجفی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که فراوانی ژن‌های *omp T*، *iss* و *pap GII* در باکتری‌های /شریشیاکلی جدا شده از کلی‌باسیلوز طیور به ترتیب ۸۹ درصد، ۶۳ درصد و ۶۷ درصد بود (Najafi et al., 2019). تفاوت فراوانی ژن‌های *omp T*، *iss* و *pap GII* در نمونه‌های جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در این مطالعه نسبت به سایر مطالعات نشان دهنده اختلاف در پراکندگی ژن‌های حدت مذکور در بین سویه‌های مختلف /شریشیاکلی می‌باشد که این امر احتمالاً از تفاوت‌های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه‌های جدا شده (مواد غذایی، انسان و دام) ناشی می‌شود. از طرف دیگر لازم به ذکر است که حضور ژن‌های حدت مورد مطالعه در این تحقیق به معنی بیان ژن‌های مذکور و بیماریزایی بیشتر این جدایه‌ها نیست. ضروری است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد تا اهمیت بالینی این شاخصه‌های حدت را در میزبان‌ها ارزیابی نماید و مشخص نمایند که طیور به عنوان منبع ژن‌های حدت در جوامع انسانی و بالعکس مطرح می‌باشند.

نتیجه‌گیری



- cream cheese. Scientific reports, 14(1), 27661.
5. Al-Batshan, H. A., Al-Mufarrej, S. I., Al-Homaidan, A. A., & Qureshi, M. (2001). Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. Immunopharmacology and immunotoxicology, 23(2), 281-289.
 6. Al-Khalaifah, H. S., Al-Nasser, A., & Surayai, T. (2022). Effects from dietary addition of sargassum sp., spirulina sp., or gracilaria sp. powder on immune status in broiler chickens. Frontiers in Veterinary Science, 9, 928235.
 7. Alaqil, A. A., & Abbas, A. O. (2023). The effects of dietary *Spirulina platensis* on physiological responses of broiler chickens exposed to endotoxin stress. Animals, 13(3), 363.
 8. Alibabai, M., Khajeh-Rahimi, A.-E., & Nowruzi, B. (2023). A review of recent developments in the use of cyanobacteria and microalgae in improving the quality and increasing the shelf life of seafood products.
 9. Alwaleed, E. A., El-Sheekh, M., Abdel-Daim, M. M., & Saber, H. (2021). Effects of *Spirulina platensis* and *Amphora coffeaeformis* as dietary supplements on blood biochemical parameters, intestinal microbial population, and productive performance in broiler chickens. Environmental Science and Pollution Research, 28, 1801-1811.
 10. Anvar, A., & Nowruzi, B. (2021). Bioactive properties of spirulina: A review. Microb. Bioact, 4, 134-142.
 11. Anvar, S., & Nowruzi, B. (2022). A review of microalgae as dietary and medicinal useful complements.
 12. Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Afshari, G. (2023). A review of the application of nanoparticles biosynthesized by microalgae and cyanobacteria in medical and veterinary sciences.
 13. Behjati, M., Ataee, M., Nowruzi, B., Anvar, S. A. A., & Ahari, H. (2025). STUDYING THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

در این تحقیق، فراوانی ژن *iss* نسبت به ژنهای *omp T* و *pap GII* در نمونه‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور بیشتر بود که با نتایج اکثر مطالعات همخوانی دارد و با احتمال بیشتری می‌تواند به عنوان مهمترین عامل بیماری‌زایی در باکتری‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور معرفی شود. همچنین حضور ژن‌های حدت مورد مطالعه در باکتری‌های /شریشیا کلی جدا شده از طیور به ویژه ژن *iss*، می‌تواند به عنوان عامل موثر در حضور خارج روده‌ای این جدایه‌ها مطرح باشد.

سپاسگزاری

از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق، همکاری و مساعدت داشتند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Abd El-Hady, A. M., Elghalid, O. A., Elnaggar, A. S., & Abd El-khalek, E. (2022). Growth performance and physiological status evaluation of *Spirulina platensis* algae supplementation in broiler chicken diet. Livestock Science, 263, 105009.
2. Abed, S., Nowruzi, B., & Anvar, S. A. A. (2025). Production of *Oncorhynchus mykiss* biosensor based on polyvinyl alcohol/chitosan nanocomposite using phycocyanin during refrigerated storage. Scientific reports, 15(1), 703.
3. Abouelezz, F. (2017). Evaluation of spirulina algae (*Spirulina platensis*) as a feed supplement for japanese quail: nutritritional effects on growth performance, egg production, egg quality, blood metabolites, sperm-egg penetration and fertility. Egyptian Poultry Science Journal, 37(3), 707-719.
4. Ahmadi, A., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Golestan, L. (2024). Effect of phycocyanin and phycoerythrin on antioxidant and antimicrobial activity of refrigerated low-fat yogurt and



20. Fathi, M. A. (2018). Effect of dietary supplementation of algae meal (*Spirulina platensis*) as growth promoter on performance of broiler chickens. *Egyptian Poultry Science Journal*, 38(2), 375-389.
21. Hajati, H., & Zaghari, M. (2019). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance, carcass characteristics, egg traits and immunity response of Japanese quails. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(2), 347-357.
22. Holman, B., & Malau-Aduli, A. (2013). *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(4), 615-623.
23. Iry, N., Nowruzi, B., & Ghazi, S. (2023). Study of the effect of phycocyanin pigment on physicochemical, sensory, microbial and antioxidant properties of cheese. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 12(1), 55-76.
24. Jamil, A. R., Akanda, M. R., Rahman, M. M., Hossain, M. A., & Islam, M. S. (2015). Prebiotic competence of *Spirulina* on the production performance of broiler chickens.
25. Kaoud, H. A. (2015). Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. *specialty journal of biological sciences*, 1(2-2015), 1-6.
26. Kashi, M. S., Ghazi, S., & Nowruzi, B. (2024). Industrial application of Natural Phycocyanin Edible Pigment isolated from *Spirulina platensis* in Preparation of fortified ice cream with emphasize on microbial and antioxidant properties. *Iranian journal of food science and industry*, 21(149).
27. Khan, S., Mobashar, M., Mahsood, F. K., Javaid, S., Abdel-Wareth, A., Ammanullah, H., & Mahmood, A. (2020). *Spirulina* inclusion levels in a broiler ration: evaluation of growth performance, gut integrity, and immunity. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 3233-3240.
- OF PHYCOERYTHRIN TO INCREASE THE SHELF LIFE OF HAMBURGERS AT REFRIGERATOR TEMPERATURE. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 14(5), e11625-e11625.
14. Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Nikolakakis, I., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2016). *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46(1), 94-102.
15. Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. d. A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Branco, I. G., & Haminiuk, C. W. I. (2022). Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100134.
16. Chamari, M., Anvar, S. A. A., Pourahmad, R., Nowruzi, B., & Yousefi, S. (2024). Study of alginate-encapsulated phycoerythrin in promoting the biological activity of synbiotic ice cream with *Lactobacillus casei*. *Scientific reports*, 14(1), 15471.
17. Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., Tayag, C. M., Li, H.-F., Putra, D. F., Kuo, Y.-H., . . . Chang, Y.-H. (2016). *Spirulina* elicits the activation of innate immunity and increases resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 55, 690-698.
18. El-Shall, N. A., Jiang, S., Farag, M. R., Azzam, M., Al-Abdullatif, A. A., Alhotan, R., . . . Alagawany, M. (2023). Potential of *Spirulina platensis* as a feed supplement for poultry to enhance growth performance and immune modulation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1072787.
19. Elbaz, A. M., Ahmed, A. M., Abdel-Maqsood, A., Badran, A. M., & Abdel-Moneim, A.-M. E. (2022). Potential ameliorative role of *Spirulina platensis* in powdered or extract forms against cyclic heat stress in broiler chickens. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(30), 45578-45588.



- Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(9):2799-2805.
35. Dissanayake, D. R., Wijewardana, T. G., Gunawardena, G. A., Poxton, I. R. (2008). Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups. *Veterinary Microbiology*, **132**: 355-363.
 36. Ghanbarpour, R., Salehi, M., Oswald, E. (2010). Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. *Comparative Clinical Pathology*, **19**: 147-153.
 37. Ghorbani, A. R., Khoshbakht, R., Kaboosi, H., Shirzad- Aski, H., Peyravii Ghadikolaii, F. (2021). Phylogenetic relationship and virulence gene profiles of avian pathogenic and uropathogenic *Escherichia coli* isolated from avian colibacillosis and human urinary tract infections (UTIs). *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**(3): 203-208.
 38. Jantunen, M. E., Siitonen, A., Koskimies, O., Wikstrom, S., Karkkainen, U., Salo, E., Saxen, H. (2000). Predominance of class II papG allele of *Escherichia coli* in pyelonephritis in infants with normal urinary tract anatomy. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 1822-1824.
 39. Jeffrey, J., Nolan, L., Tonooka, K., Wolfe, S., Giddings, C., Horne, S. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian diseases*, **46**(1):48-52.
 40. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J.,
 28. Kharde, S., Shirbhate, R., Bahiram, K., & Ahmadi, M., Dadashzadeh, S., Ghaniei, A. (2019). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates implicated in poultry colibacillosis and human urinary tract infection. *Journal of Veterinary Microbiology*, **15**(1): 109-118. (In Persian)
 29. Akond, M. A., Alam, S., Hassan, S. M. R., Shirin, M. (2015). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet Journal of Food Safety*, **11**: 19-23ce.
 30. Azizpour, A. (2022). A survey of *Escherichia coli* contamination in eggs of Ardabil and determination of their antibiotic resistance. *Veterinary Researches and Biological Products*, **34**(4): 112-120. (In Persian)
 31. Azizpour, A., Ghazaei, C. (2020). Evaluation of antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in Ardabil Province, Iran. *International Journal of Basic Science in Medicine*, **5**(4):125- 130.
 32. Bauchart, P., Germon, P., Bree, A., Oswald, E., Hacker, J., Dobrindt, U. (2010). Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli*--search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis*, **49**(3): 105-115.
 33. Chuba, P. J., Leon, M. A., Banerjee, A., Palchaudhuri, S. (1989). Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Molecular and General Genetics*, **216**: 287-292.
 34. Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M. (2010).



- Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., Blanco, J. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(10): 3484-3492.
48. Najafi, S., Rahimi, M., Nikousefat, Z. (2019). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian origin: Detection of the most common virulence-encoding genes. *Veterinary Research Forum*, **10**(1): 43-49.
49. Nakazato, G., de Campos, T. A., Stehling, E. G., Brocchi, M., da Silveira, W. D. (2009). Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, **29**(7): 479-486.
50. Nateghi, F., Jafarpour, M., Nazemi, A. (2010). A survey for detection of eight correlated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in human uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbial World*, **3**(3): 169-176. (In Persian)
51. Okuno, K., Yabuta, M., Ooi, T., Kinoshita, S. (2004). Utilization of *Escherichia coli* outer-membrane endoprotease ompT variants as processing enzymes for production of peptides from designer fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 76-86.
52. Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., Nolan, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, **151**:2097– 2110.
53. Russo, T. A., Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic
- Rosenberger, S. C., Nolan, L. K. (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3987- 3996.
41. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(8):2360-9.
42. Kafshdouzan, Kh., Zahraei-Salehi, T., Nayeri, B., Madadgar, O., Yamasaki, S., Hinenoya, A., Yasuda, N. (2013). Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, **7**(1): 1-6.
43. Kwon, S. G., Cha, S. Y., Choi, E. J., Kim, B., Song, H. J., Jang, H. K. (2008). Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*, **38**(4): 179-188.
44. Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Diseases*, **10**:916–932.
45. Mokady, D., Gophna, U., Ron, E. Z. (2005). Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(1): 66-73.
46. Monroy, M. A., Kno`bl, T., Bottino, J. A., Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. (2005) Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **28**: 1-15.
47. Moulin-Schouleir, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, A.,



- Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(9):2799-2805.
8. Dissanayake, D. R., Wijewardana, T. G., Gunawardena, G. A., Poxton, I. R. (2008). Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups. *Veterinary Microbiology*, **132**: 355-363.
 9. Ghanbarpour, R., Salehi, M., Oswald, E. (2010). Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. *Comparative Clinical Pathology*, **19**: 147-153.
 10. Ghorbani, A. R., Khoshbakht, R., Kaboosi, H., Shirzad- Aski, H., Peyravii Ghadikolaii, F. (2021). Phylogenetic relationship and virulence gene profiles of avian pathogenic and uropathogenic *Escherichia coli* isolated from avian colibacillosis and human urinary tract infections (UTIs). *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**(3): 203-208.
 11. Jantunen, M. E., Siitonen, A., Koskimies, O., Wikstrom, S., Karkkainen, U., Salo, E., Saxen, H. (2000). Predominance of class II papG allele of *Escherichia coli* in pyelonephritis in infants with normal urinary tract anatomy. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 1822-1824.
 12. Jeffrey, J., Nolan, L., Tonooka, K., Wolfe, S., Giddings, C., Horne, S. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian diseases*, **46**(1):48-52.
 13. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L. K. (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a problem. *Microbes and Infection*, **5**:449-456.
 1. Sunwoo, H. H., Wang, W. W., Sim, J. S. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157 Ahmadi, M., Dadashzadeh, S., Ghaniei, A. (2019). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates implicated in poultry colibacillosis and human urinary tract infection. *Journal of Veterinary Microbiology*, **15**(1): 109-118. (In Persian)
 2. Akond, M. A., Alam, S., Hassan, S. M. R., Shirin, M. (2015). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet Journal of Food Safety*, **11**: 19-23ce.
 3. Azizpour, A. (2022). A survey of *Escherichia coli* contamination in eggs of Ardabil and determination of their antibiotic resistance. *Veterinary Researches and Biological Products*, **34**(4): 112-120. (In Persian)
 4. Azizpour, A., Ghazaei, C. (2020). Evaluation of antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in Ardabil Province, Iran. *International Journal of Basic Science in Medicine*, **5**(4):125- 130.
 5. Bauchart, P., Germon, P., Bree, A., Oswald, E., Hacker, J., Dobrindt, U. (2010). Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli*--search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis*, **49**(3): 105-115.
 6. Chuba, P. J., Leon, M. A., Banerjee, A., Palchaudhuri, S. (1989). Cloning and DNA sequence of plasmid determinant iss, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Molecular and General Genetics*, **216**: 287-292.
 7. Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M. (2010).



21. Najafi, S., Rahimi, M., Nikousefat, Z. (2019). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian origin: Detection of the most common virulence-encoding genes. *Veterinary Research Forum*, **10**(1): 43-49.
22. Nakazato, G., de Campos, T. A., Stehling, E. G., Brocchi, M., da Silveira, W. D. (2009). Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, **29**(7): 479-486.
23. Nateghi, F., Jafarpour, M., Nazemi, A. (2010). A survey for detection of eight correlated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in human uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbial World*, **3**(3): 169-176. (In Persian)
24. Okuno, K., Yabuta, M., Ooi, T., Kinoshita, S. (2004). Utilization of *Escherichia coli* outer-membrane endoprotease ompT variants as processing enzymes for production of peptides from designer fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 76-86.
25. Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., Nolan, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, **151**: 2097-2110.
26. Russo, T. A., Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, **5**: 449-456.
27. Sunwoo, H. H., Wang, W. W., Sim, J. S. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunology letters*, **106**(2): 191-3.
28. Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q., Liu, X. (2009). Comparison of virulence rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3987-3996.
14. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(8): 2360-9.
15. Kafshdouzan, Kh., Zahraei-Salehi, T., Nayeri, B., Madadgar, O., Yamasaki, S., Hinenoya, A., Yasuda, N. (2013). Distribution of virulence associated genes in isolated *Escherichia coli* from avian colibacillosis. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, **7**(1): 1-6.
16. Kwon, S. G., Cha, S. Y., Choi, E. J., Kim, B., Song, H. J., Jang, H. K. (2008). Epidemiological prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* differentiated by multiplex PCR from commercial chickens and hatchery in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*, **38**(4): 179-188.
17. Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Diseases*, **10**: 916-932.
18. Mokady, D., Gophna, U., Ron, E. Z. (2005). Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(1): 66-73.
19. Monroy, M. A., Kno'bl, T., Bottino, J. A., Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. (2005). Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **28**: 1-15.
20. Moulin-Schouleur, M., Schouleur, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., Blanco, J. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(10): 3484-3492.



- Microalgae. Journal of Biosafety, 16(3), 99-124.
61. Nowruzi, B., & Beiranvand, H. (2024a). A review of medical applications of cyanobacteria. Journal of Isfahan Medical School, 42(755), 69-83.
 62. Nowruzi, B., & Beiranvand, H. (2024b). A review of medical applications of cyanobacteria. Journal of Isfahan Medical School.
 63. Nowruzi, B., Jafari, M., Babaie, S., Motamedi, A., & Anvar, A. (2020). Spirulina: A healthy green sun with bioactive properties. Journal of Microbial World, 13(4), 322-348.
 64. Qureshi, M., Kidd, M., & Ali, R. (1996). Spirulina platensis extract enhances chicken macrophage functions after in vitro exposure. Journal of Nutritional Immunology, 3(4), 35-45.
 65. Satyaraj, E., Reynolds, A., Engler, R., Labuda, J., & Sun, P. (2021). Supplementation of diets with spirulina influences immune and gut function in dogs. Frontiers in Nutrition, 8, 667072.
 66. Selim, S., Hussein, E., & Abou-Elkhair, R. (2018). Effect of Spirulina platensis as a feed additive on laying performance, egg quality and hepatoprotective activity of laying hens. European Poultry Science, 82, 1-13.
 67. Seyidoglu, N., Inan, S., & Aydin, C. (2017). A prominent superfood: Spirulina platensis. Superfood and functional food the development of superfoods and their roles as medicine, 22, 1-27.
 68. Shafaei Bajestani, M., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., & Golestan, L. (2000). Production of Cheese and Ice Cream Enriched With Biomass and Supernatant of Spirulina platensis With Emphasis on Organoleptic and Nutritional Properties. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 18(2), 263-278.
 69. Shanmugapriya, B., Babu, S. S., Hariharan, T., Sivanewaran, S., & Anusha, M. (2015). Dietary administration of Spirulina platensis as factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*, 155(Pt 5): 1634-1644.
 54. : H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunology letters*, 106(2):191-3.
 55. Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q., Liu, X. (2009). Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*, 155(Pt 5): 1634-1644.
 56. Nipane, S. (2012). Effect of Spirulina supplementation on growth performance of broilers. Indian Journal of Veterinary Research (The), 21(1), 66-69.
 57. Mirzaie, S., Zirak-Khattab, F., Hosseini, S. A., & Donyaei-Darian, H. (2018). Effects of dietary Spirulina on antioxidant status, lipid profile, immune response and performance characteristics of broiler chickens reared under high ambient temperature. Asian-Australasian journal of animal sciences, 31(4), 556.
 58. Mohammad Shirazi, R. H. S., Tala, M., Anvar, S. A. A., Nowruzi, B., Saeidi, Z., & Negahban, M. (2021). Investigating Nitrate and Nitrite Concentrations in Drinking Water of Five Districts in Tehran and Assessing the Presence of Nitrate Reducing Bacteria. Journal of Chemical Health Risks, 11(3).
 59. Nowruzi, B. (2024). Industrial application of Natural Phycocyanin Edible Pigment isolated from Spirulina platensis in Preparation of fortified ice cream with emphasize on microbial and antioxidant properties. Journal of food science and technology (Iran), 21(149), 54-80.
 60. Nowruzi, B., & Bagheri, F. (2023). An Overview of the Probiotics, Prebiotics, and Metabiotics Functions of



- chicks. South African Journal of Animal Science, 48(1), 98-107.
71. Valikboni, S. Q., Anvar, S. A. A., & Nowruzi, B. (2024). Study of the effect of phycocyanin powder on physicochemical characteristics of probiotic acidified feta-type cheese during refrigerated storage. Nutrire, 49(2), 41.
- probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. Int. J. Recent Sci. Res, 6(2), 2650-2653.
70. Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., & Widiastuti, E. (2018). Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler

Frequency of *omp T*, *iss* and *pap GII* genes in *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis in Tabriz city

Farnaz Jafari¹, Saman Mahdavi^{2*}

1- MSc, Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

Received: 19 August 2023

Accepted: 30 September 2024

Abstract

Colibacillosis is one of the most common diseases in the poultry industry, which causes a lot of economic losses every year. The aim of this research was to study of the frequency of *omp T*, *iss* and *pap GII* genes in *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis in Tabriz city. 100 samples of *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis (in 2021) were phenotypically identified by biochemical and staining methods. Then, the frequency of *omp T*, *iss* and *pap GII* genes in these isolates was investigated by Multiplex PCR method. The results showed that the frequency of *iss*, *omp T* and *pap GII* genes in the tested *Escherichia coli* samples were 33%, 14% and 22%, respectively. Also, 1% of the tested isolates contained all three mentioned genes simultaneously. 23 negative samples were observed in terms of the presence of studied genes. Considering the presence of *iss*, *omp T* and *pap GII* genes in *Escherichia coli* isolated from poultry, it can be concluded that these genes can be effective factors in the extraintestinal infections. Also, *iss* gene, due to having the highest frequency among the studied genes, can potentially be introduced as the most important pathogenic factor in *Escherichia coli* isolated from poultry.

Keywords: *Escherichia coli*, Poultry colibacillosis, Virulence genes

* Corresponding Author: Saman Mahdavi

Address: Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

E. mail: S.Mahdavi@iau-maragheh.ac.ir



طراحی و بهینه سازی برون تنی پروتئین Loa22 در سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرو جهت استفاده در واکسن نو ترکیب

مهدی قره خانی^۱، محمد فائزی قاسمی^۲، پژواک خاکی^{۳*}، مجید اسمعیلی زاده^۴، مجید تیبانیان^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

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

۳- دانشیار، بخش میکروبی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۴- دانشیار، بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۵- دانشیار، بخش ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

چکیده

لپتوسپیروز که توسط گونه های بیماریزای لپتوسپیرو ایجاد می شود، یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که پیامدهای بهداشت عمومی قابل توجهی دارد. توسعه یک واکسن نو ترکیب موثر علیه لپتوسپیروز به دلیل ماهیت پیچیده پاتوژن و پروتئین های غشاء خارجی آن (OMPs) کماکان بصورت یک چالش باقی مانده است. پروتئین غشاء خارجی Loa22 به دلیل خواص ایمنی زایی آن به عنوان یک واکسن بالقوه مطرح شده است. هدف این مطالعه بررسی کاربرد بیوانفورماتیک و ایمونوآفورماتیک در مطالعه پروتئین Loa22، توضیح ویژگی های ساختاری و عملکردی آن، و ارزیابی پتانسیل آن به عنوان یک واکسن کاندید برای لپتوسپیروز است.

بر اساس یافته های این تحقیق، با همترازی چند توالی، پروتئین Loa22 در سویه های مختلف لپتوسپیروهای بیماریزا، بین ۹۸-۱۰۰ درصد همگرایی نشان داد. ارزیابی ویژگی های مختلف این پروتئین، آن را یک آنتی ژن ایمنی زا، غیر توکسیک و غیر حساسیت زا نشان داد که می تواند پاسخ ایمنی قابل توجهی را در برابر عفونت لپتوسپیروا القاء کند. همچنین بر اساس پیش بینی ها، نشان داده شد که پروتئین Loa22 ساختاری پایدار، محلول و دارای نواحی آنتی ژنی منطبق با اپی توپ های سلول T و B دارد که در تمام ایزوله ها حفاظت شده است و می تواند بعنوان واکسنی نو ترکیب و یا با استفاده از اپی توپ های ایمونوژن آن در ترکیب با اپی توپ های ایمونوژن سایر پروتئین های حفاظت شده غشاء خارجی لپتوسپیرو در طراحی واکسنی مولتی اپی توپ در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروز، لپتوسپیرو، پروتئین Loa22، بیوانفورماتیک، ایمونوآفورماتیک

*نویسنده مسئول: دکتر پژواک خاکی

آدرس: بخش میکروبی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران.

پست الکترونیک: khakipejvak53@gmail.com

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام با توزیع جهانی است که عامل آن اسپروکت‌هایی از جنس لپتوسپیرا می باشد. لپتوسپیروز عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و نیز مناطق معتدل پر باران شیوع بیشتری دارد. منبع اصلی آن جوندگان و حیوانات وحشی می باشند که لپتوسپیراها را در ادرار خود دفع می کنند. این بیماری در انسان و در تمام پستانداران اهلی و وحشی بروز می کند (Adler, 2015). انسان بواسطه قرارگیری در معرض آب آلوده و یا حیواناتی که بطور مزمن آلوده می باشند، تبدیل به میزبان تصادفی می شود، بطوریکه در دنیا سالانه بیش از یک میلیون مورد ابتلا گزارش می شود (Fraser and Brown, 2017).

این بیماری در انسان، درجات مختلف از شدت شامل یک بیماری تب دار خود محدود شونده تا نارسایی کلیوی، کبدی و تظاهرات ریوی شدید را سبب می شود. عمده مشکل مرتبط با لپتوسپیروز، تشخیص صحیح و سریع بیماری است که بدلیل علایم متعددی است که غالباً با دیگر بیماری‌های تب دار و خونریزی دهنده اشتباه گرفته می شود (Hidalgo et al., 2020).

از اولین مطالعات درباره واکسن بر علیه لپتوسپیروز تاکنون، واکسن‌های تجاری عمدتاً از نوع واکسن‌های کشته، بطور گسترده در دامپزشکی استفاده می شوند که از محدودیت‌های زیادی از جمله عدم ایجاد ایمنی پایدار، عوارض جانبی متعدد ناشی از اجزای باقیمانده محیط و لیپولی ساکراید لپتوسپیرال و ایجاد سطح پایینی از ایمنی متقاطع رنج می برند (Adler, 2015).

مطالعات ژنومی که منجر به تعیین توالی کامل ژنوم گونه‌های مختلف لپتوسپیرا اعم از بیماریزا و محیطی شده، مبنایی برای درک بیماریزایی سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا فراهم کرده است. همچنین، مطالعه خصوصیات عملکردی غشاء خارجی و پروتئین‌های

سیتوپلاسمی، راه را برای جستجوی عوامل تشخیصی و کاندیداهای جدید احتمالی واکسن هموارتر کرده است (Cerqueira et al., 2011). از سوی دیگر، واکسینولوژی معکوس (RV) با رویکرد برون تنی (In-silico) با استفاده از این توالی‌های ژنومی، پیش‌بینی اولیه تقریباً دقیقی در مورد کاندیداهای واکسن ارائه می کند. با استفاده از این روش می توان تمام آنتی‌ژن‌های بالقوه کدگذاری شده توسط ژنوم را صرف نظر از فراوانی، مرحله بیان و ایمنی‌زایی آنها شناسایی کرد (Dellagostin et al., 2017).

در سال های اخیر، شناسایی پروتئین‌های ایمونوژنیک غشاء بیرونی لپتوسپیرا که در میان گونه‌های بیماریزا حفاظت شده‌اند به موضوعی مهم در تحقیقات لپتوسپیریایی در راستای توسعه واکسن‌های نو ترکیب با خاصیت حفاظت متقاطع تبدیل شده است (Grassmann et al., 2017).

غشاء بیرونی لپتوسپیرا با داشتن فسفولیپدها، LPS و سه نوع مختلف پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) شناخته می شود (Haake and Matsunaga, 2010). لیوپروتئین‌ها، پروتئین‌های تراغشایی و پروتئین‌های سطح غشایی؛ سه گروه پروتئین‌های غشاء خارجی لپتوسپیراها هستند (Hsu and Yang, 2022). لذا با گسترش و پیشرفت علوم وابسته به بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، واکسن‌هایی بر پایه پروتئین نو ترکیب ممکن است جایگزینی برای واکسن‌های کلاسیک جهت پیشگیری از لپتوسپیروز باشد.

چندین پروتئین غشاء خارجی لپتوسپیرا از جمله لیوپروتئین‌هایی مانند LipL21، LipL36، LipL41 و LigB به عنوان آنتی‌ژن‌های بالقوه واکسن، ارزیابی شده اند (Monaris et al., 2015). دو فاکتور مهم در ارزیابی این پروتئین‌ها بعنوان عوامل بیماریزایی در لپتوسپیراها؛ موقعیت سطحی این پروتئین‌ها و بیان آنها در طول



مطالعات فیلوژنتیکی

آنالیز توالی کامل پروتئین (Complete Coding Sequence) Loa22 از سرووارهای بومی و غیر بومی مورد مطالعه در این تحقیق، با استفاده از سرور آنالیز BlastP از ابزارهای پایگاه داده NCBI و نرم افزار 17 DNASTAR Lasergene انجام گردید و درصد شباهت و واگرایی توالی پروتئین Loa22 مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ORF در توالی پروتئین Loa22

برای پیش بینی چارچوب باز خوانش (Open Reading Frames) در توالی پروتئین Loa22 از سرور ExpASy استفاده شد. این سرور چارچوب باز خوانشی که طول بلندتری دارد را بعنوان ORF اصلی و کد کننده پروتئین گزارش می کند.

بررسی حضور و جایگاه سیگنال پپتید

برای پیش بینی حضور و بررسی جایگاه توالی سیگنال پپتید از سرور SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) و ابزار SignalP استفاده شد. در انتهای سیگنال پپتید ناحیه برشی قرار دارد که در بعضی پروتئین‌ها در حین یا پس از جایگیری در محل هدف، برش می خورد. در باکتری های گرم منفی وجود سیگنال پپتید باعث قرارگیری پروتئین در غشاء داخلی یا منطقه پری پلاسمی می شود و یا ترشحی بودن پروتئین را مشخص می کند.

پیش بینی ساختار دوم پروتئین Loa22

برای پیش بینی ساختار دوم پروتئین هدف از سرور آنالیز GOR4 (https://npsa-npsa.ibcp.fr/NPSA/npsa_gor4.html) استفاده شد. این سرور، با انجام محاسبات، موقعیت و نحوه قرارگیری آمینواسیدهای درگیر در انواع مارپیچ‌ها، دورها، پل‌ها و در نهایت ساختار ثانویه پروتئین هدف را پیش‌بینی می کند.

عفونت پستانداران بوده است (Raja and Natarajaseenivasan, 2015). آنتی‌ژن‌های در معرض سطح، بدلیل موقعیت مکانی که دارند، احتمالاً در تعامل اصلی میزبان- پاتوژن، چسبندگی و/یا تهاجم دخیل هستند. این میانکنش‌ها با اتصال باکتری به بافت هدف، پاسخ‌های ایمنی و در نهایت ورود به بافت‌های میزبان دنبال می‌شوند (Haake and Zückert, 2015, Dhayabaran et al., 2020).

لیپوپروتئین Loa22 از خانواده پروتئین‌های ompA غشاء بیرونی لیتوسپیرا است که اولین بار توسط محققان ژاپنی با استفاده از روش فیوژن phoA و سپس با روش ایمونوبلاتینگ با استفاده از سرم موش‌های در حال بهبودی شناسایی و نشان داده شد که توالی آن بشدت حفاظت شده است (Koizumi and Watanabe, 2003, Ristow et al., 2007). در این مطالعه طی آنالیزهای برون‌تنی، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی، ساختارها، موقعیت مکانی، مارپیچ‌های گذرنده، آنتی‌ژنیسته، توالی سیگنال و اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در توالی پروتئین Loa22 در راستای امکان استفاده از آن در طراحی واکسنی نو ترکیب بر علیه لیتوسپیروز مورد پیش‌بینی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی توالی پروتئین Loa22

هجده توالی پروتئین Loa22 مربوط به سرووارهای بومی لیتوسپیرا، در کنار دیگر توالی‌های ثبت شده تا تاریخ ۱۳ سپتامبر ۲۰۲۱ در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI، جهت مطالعات بیوانفورماتیک استخراج شد. همچنین با استفاده از همترازی توالی سرووار بومی کانیکولا؛ با بیش از ۵۰ توالی کامل ژنومی (کروموزوم I) سرووارهای مختلف لیتوسپیراهای پاتوژن موجود در بانک ژنومی NCBI، هفده توالی جهت مطالعه جامع‌تر استخراج شد.



پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین Loa22

بررسی و شناسایی ساختار سه بعدی پروتئین ها یک منبع بسیار مهم از اطلاعات برای درک عملکرد و فعالیت پروتئین ها، میانکنش آنها با لیگاند، پروتئین، DNA و همچنین درک اثرات جهش ها می باشد. روش مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین بر اساس توالی آمینواسیدی راهکار در مواردی است که ساختار کریستالوگرافی شده ای در مورد پروتئین هدف وجود ندارد. به روزترین ابزار مدل سازی که توسط گوگل ارائه شده Alphafold (alphafold21_predict_colab.ipynb) نام دارد که از طریق یک نرم افزار رابط بنام ChimeraX نیز قابل دسترسی است (Jumper et al., 2021). این سرور همچنین از هوش مصنوعی آنلاین Dali server (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>) برای پیش بینی ساختار پروتئین هدف بهره می گیرد. سرور Dali با استفاده از بهترین مدل (best model) پیش بینی شده، ساختارهای مشابه به پروتئین هدف را شناسایی و نتایج را بصورت تفاوت در آمینواسیدها (درصد Identity)، تفاوت در ساختار (عدد RMSD) و در نهایت برآیند تمام محاسبات (عدد Z) گزارش می کند.

تعیین محل قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء

برای پیش بینی محل و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء باکتری؛ توالی آمینواسیدی این پروتئین با استفاده از سرور آنلاین DeepTMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepTMHMM>) مورد بررسی قرار گرفت. این سرور در حال حاضر بهترین برنامه پیش بینی غشایی است که از یک مدل پنهان مارکوف (Hidden Markov Model) برای پیش بینی مارپیچ های گذرنده در توالی های پروتئینی استفاده می کند (Hallgren et al., 2022).

پیش بینی اپی توپ های سلول T

برای یافتن اپی توپ هایی در پروتئین هدف که توسط سلول T سیستم ایمنی (T Cell Epitopes) شناسایی می شوند، از دو سرور مختلف استفاده شد. سرور Net CTL 1.2 (<http://services.healthtech.dtu.dk>) با ۱۲ سوپرتایپ HLA (A1, A2, A3, A4, A26, B7, B8, B27, B39, B44, B58, B62 Immune) و سرور IEDB (Epitope Database Analysis Resource) با ۵۰ سوپرتایپ مختلف HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C و HLA-C) جهت پیش بینی اپی توپ های احتمالی (۹ مری) در ساختار پروتئین Loa22 مربوط به MHC-I بررسی شد. حد آستانه (Threshold) در سرور NetCTL بر اساس حساسیت و اختصاصیت مورد نیاز مطالعه، بین ۱/۲۵-۰/۵ متغیر است. هر چه آستانه بالاتری را انتخاب کنیم، نتایج کمتر اما موثرتر خواهد بود. با استفاده از سرور IEDB بر پایه روش SMM، اپی توپ هایی با IC50 کمتر از ۲۰۰ انتخاب شدند. هر چه عدد کوچکتري داشته باشیم تطابق اپی توپ با آلل انتخابی بیشتر می باشد.

جهت بررسی آلل های MHC-II، لوکوس HLA-DR بدلیل تنوع وسیع تر نسبت به سایر HLA ها انتخاب شد. از آنجا که تاکنون هیچ سروری آلل های MHC-II دامی را جهت پیشگویی اپی توپ های آنتی ژنیک سلول T ارائه نکرده است؛ آللهای MHC انسانی مشابه با آللهای دامی به عنوان آللهای معادل برای پیشگویی اپی توپ های مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل اینکه MHC-II شیار بازتری نسبت MHC-I دارد لذا برای پیش بینی افینیتی اتصال، طول اپی توپ ها بین ۱۲-۱۸ آمینواسید انتخاب شد. از آنجائیکه سرور IEDB بطور پیش فرض آمینواسیدهای اول، دوم و آخر هر اپی توپ را بعنوان متصل به MHC (Masked) در نظر می گیرد،



لذا هسته ۹-۱۲ مری از آمینواسیدها (Core Peptide) برای شناسایی شدن توسط TCR در دسترس هستند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B

سلول‌های B سیستم ایمنی هم توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های خطی و هم فضایی را دارد. برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی و آمینواسیدها در اپی‌توپ‌های ناپیوسته سلول B در توالی پروتئین Loa22 از سرور آنلاین BepiPred-3.0 (DTU Health tech) با استفاده از الگوریتم LM و حد آستانه مفروض (۰/۵) استفاده شد (Clifford et al., 2022).

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های فضایی از سرور IEDB Conformational B cell prediction Tool Ellipro Discotope - Prediction of epitopes from protein structure ابزار و حد آستانه پیش فرض ۷/۷- با اختصاصیت ۷۵٪ استفاده شد. برای شناسایی اپی‌توپ‌های فضایی نمی‌توان از توالی خطی پروتئین استفاده کرد. بنابراین ساختار کریستالوگرافی شده پروتئین‌ها از پایگاه داده پروتئین‌ها مانند پایگاه داده Uniprot (PDB) جهت پیش‌بینی مورد نیاز است. در صورتی که پروتئین هدف کریستالوگرافی نشده (مانند پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق)، از ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده استفاده می‌شود.

پیش‌بینی آلرژنیستی، توکسیستی و آنتی‌ژنیستی
جهت پیش‌بینی آلرژنیستی، حلالیت و آنتی‌ژنیستی پروتئین Loa22 توالی آمینواسیدی این پروتئین قبل و بعد از بهینه‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان آلرژن بودن پروتئین بر اساس الگوریتم‌های دو سرور AllerTop و AllergenFP مورد ارزیابی قرار گرفت. این دو سرور هم بر اساس متد مورد استفاده جهت پیشگویی و نیز درصد صحت عمل آنها متفاوت هستند. صحت پیش‌بینی سرور AllergenFP حدود ۸۷/۹٪ و سرور AllerTop حدود ۸۷/۷٪ است.

بررسی و پیش‌بینی نواحی توکسیک در پروتئین اصلی و توترکیب Loa22 با استفاده از سرور ToxinPred براساس روش SVM (Swiss-Prot) با حد آستانه صفر و E-value برابر با ۰/۱ انجام شد.

برای پیش‌بینی آنتی‌ژنیستی یا میزان تحریک سیستم ایمنی این پروتئین، از سرور Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen>)

استفاده شد که پیش‌بینی خود را بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی پلی‌پپتید انجام می‌دهد. صحت پیش‌بینی این سرور در حدود ۸۹-۷۰٪ عنوان شده است.

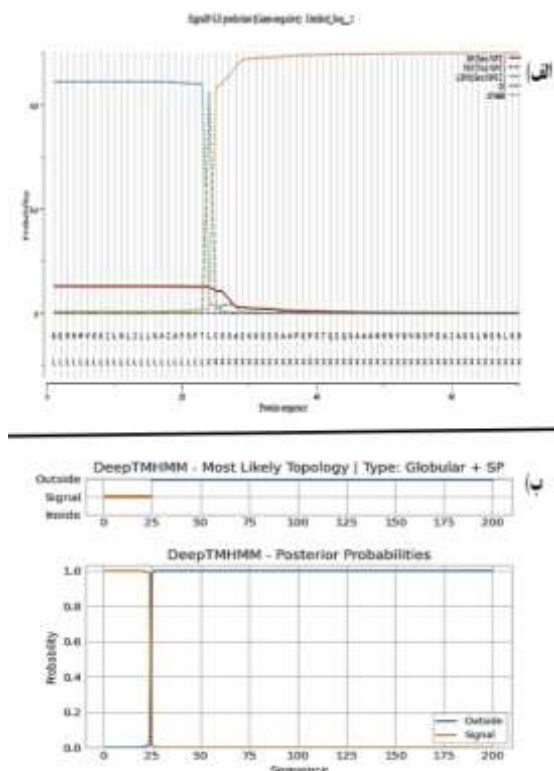
تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکی و شیمیایی و پیش‌بینی حلالیت

با استفاده از سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>)، خواص فیزیکی و شیمیایی از جمله pH ایزوالکتریک، وزن مولکولی، نیمه عمر آنتی‌ژن و همچنین حلالیت پروتئین اصلی و نوترکیب هر کدام بصورت جداگانه با استفاده از سرور SolPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) مورد بررسی و پیش‌بینی قرار گرفت.

ترجمه معکوس، تعیین جایگاه‌های برشی و بهینه‌سازی کدون

بر اساس مطالعات فیلوژنی پس از همترازی توالی‌های مورد مطالعه، توالی نهایی با حداکثر انطباق با سروواریهای بومی لپتوسپیرا و پس از حذف توالی سیگنال، بصورت توالی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار EditSeq ترجمه معکوس شد. این توالی به لحاظ جایگاه‌های برشی آنزیم‌های اندونوکلاز در راستای انتخاب آنزیم‌های مناسب جهت وارد کردن قطعه نهایی در ناقل (Vector)، جهت جلوگیری از برش‌های ناخواسته بدلیل وجود سایت برشی مشابه، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت برای بهینه‌سازی کدونهای ژنی





شکل ۱. پیش‌بینی موقعیت و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 و توالی سیگنال آن در ساختار غشاء

الف. پیش‌بینی توالی سیگنال توسط سرور SignalP-5.0

ب. پیش‌بینی موقعیت و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 و جایگاه سیگنال پپتید با استفاده از سرور DeepTMHMM

پیش‌بینی ساختار دو بعدی

بر اساس نتایج پیش‌بینی سرور GOR4 از توالی آمینواسیدی پروتئین Loa22؛ ۶۷ آمینواسید (۳۳/۵٪) در تشکیل مارپیچ آلفا، ۲۹ آمینو اسید (۱۴/۵٪) در ساختار رشته توسعه یافته (Extended Strand) و ۱۰۴ آمینواسید (۵۲٪) در پیچش‌های تصادفی (Random Coil) شرکت دارند (شکل ۲).

برای بیان در میزبان E.coli از ابزار آنالین GeneSmart™ (<https://www.genscript.com/gensmart-free-gene-codon-optimization.html>) استفاده شد.

نتایج

آنالیز توالی پروتئین Loa22

بر اساس نتایج همترازی توالی‌های آمینواسیدی سرووارهای بومی و غیربومی مورد مطالعه، تنها جایگزینی در ۵ آمینواسید در توالی‌های مختلف پروتئین Loa22 مشاهده شد. این تغییرات شامل؛ سه آمینواسید آلانین^{۳۷}، آلانین^{۸۷} و والین^{۱۸۵} در میان سرووارهای گریپوتیفوزا بود که بترتیب با آمینواسیدهای ترئونین^{۳۷}، پرولین^{۸۷} و آلانین^{۱۸۵} در دیگر سرووارها جایگزین شده بودند. از میان دو مورد دیگر یک مورد در سرووار کانیکولا مشاهده شد که آمینواسید هیستیدین در موقعیت ۵۸ با آمینواسید اسپارتیک اسید در سایر سرووارها متفاوت بود و مورد دیگر آمینواسید گلوتامین در موقعیت ۱۲۹ در سرووار آتومنالیس با گلوتامیک اسید در دیگر سرووارها متفاوت بود.

تعیین قالب صحیح خوانش پروتئین Loa22

برای بررسی چارچوب صحیح باز خوانش (ORF) از سرور Expasy استفاده شد. از میان انواع قالب ORF شناسایی شده، قالب ۱۹۵ آمینواسیدی (5'-3' Frame 1)، قالب کامل و در برگیرنده تمام طول پروتئین Loa22 بود.

بررسی سیگنال پپتید در ساختار پروتئین Loa22

با استفاده از سرور آنالین SMART و ابزار SignalP، حضور سیگنال پپتید در انتهای آمینی توالی مورد نظر نشان داده شد. جایگاه برشی توالی سیگنال بین آمینواسیدهای Cys²⁴ و Ser²⁵ پیش‌بینی شد (شکل الف).

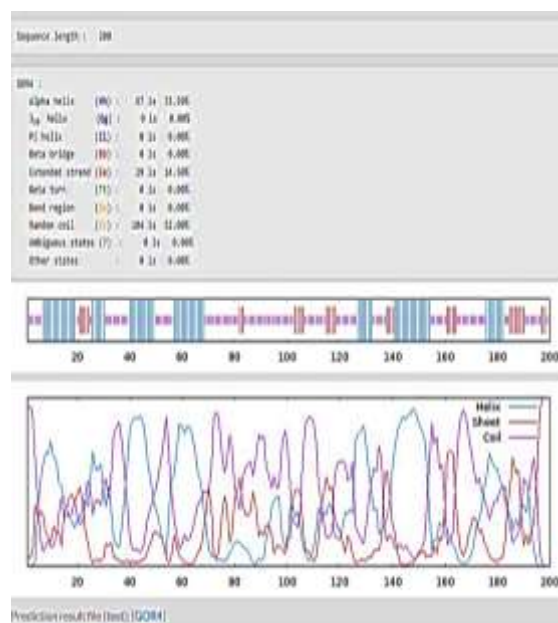


سرور IEDB با IC50 کمتر از ۲۰۰ شمار متعددی از اپی‌توپ‌های سلولهای T مربوط به MHC-I پیش‌بینی شد.

در میان سوپرتایپ‌های سرور NetCTL، سوپرتایپ‌های A1، B7 و B8 و سپس B62 و B58 بیشترین قابلیت انطباق با پپتیدهای پیش‌بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 را داشتند. در این میان و بر اساس مقادیر امتیاز مجموع پپتیدهای پیش‌بینی شده، هجده پپتید با حد آستانه بیش از یک شناسایی شد که توالی پپتیدی DAKNRRVTF (آمینواسیدهای ۱۸۸-۱۸۰) با عدد ۱/۸۰ ایمونوژن‌ترین پپتید پیش‌بینی شده بود. همچنین توالی پپتیدی FRFATSAPQ با عدد ۱/۵۳ (آمینواسیدهای ۱۹۷-۱۸۹)، توالی FRYPDGLTR با عدد ۱/۴۲ (آمینواسیدهای ۷۹-۷۱)، توالی LTRPGFSY با عدد ۱/۴۰ (آمینواسیدهای ۸۵-۷۷) و توالی YSELRANAV با عدد ۱/۲ (آمینواسیدهای ۱۴۹-۱۴۱) محتمل‌ترین اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده بودند.

از سوی دیگر، نتایج سرور IEDB از اپی‌توپ‌های سلولهای T برای آلل‌های مربوط به MHC-I بر اساس فراوانی آلل‌های منطبق بر توالی پپتیدی پیش‌بینی شده؛ اپی‌توپ‌های FTLCSAEK با انطباق با ۸ سوپرتایپ و FATSAPQQL، FSFTLCSA و FRFATSAPQ هر کدام با ۷ سوپرتایپ و YSELRANAV و FRYPDGLTR نیز هر کدام با ۶ سوپرتایپ بیشترین تعداد انطباق را داشتند.

بررسی اپی‌توپ‌های سلولهای T برای لوکوس HLA-DRB متصل شونده به مولکول‌های MHC-II در ساختار پروتئین Loa22 ۳۰ پپتید با مقادیر IC50 کمتر از ۲۰۰ با استفاده از سرور IEDB شناسایی شد که در این میان هسته اپی‌توپیک VKKILNLIL در شش موقعیت متفاوت در بازه توالی پپتیدی ۱۵-۱ بیشتر احتمال اتصال به آلل‌های MHC-II (HLA-DRB1,4,5,8) را داشت. همچنین هسته YSELRANAV با شش موقعیت متفاوت در



شکل ۲. پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین Loa22 با استفاده از سرور GOR4

پیش‌بینی ساختار سه بعدی

بهترین مدل پیش‌بینی شده از ساختار سه بعدی پروتئین هدف با استفاده از سرور alphafold پس از محاسبات و آنالیز داده‌های سرور Dali، بیشترین تشابه را با ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین‌های خانواده OMP نشان داد که پروتئین Loa22 نیز عضوی از این خانواده پروتئینی می‌باشد (شکل ۳).

تعیین محل و نحوه قرارگیری پروتئین Loa22 در ساختار غشاء

نتایج محاسبات سرور DeepTMHMM، از موقعیت و نحوه قرارگیری این پروتئین در غشاء لپتوسپیرا، پروتئین Loa22 بصورت کامل خارج غشایی و فاقد مارپیچ گذرنده از عرض غشاء پیش‌بینی شد. همچنین این سرور، یک سیگنال پپتید در انتهای آمینی (آمینواسیدهای ۱-۲۴) پیش‌بینی کرد (شکل ۱ب).

بررسی اپی‌توپ‌های سلولهای T در ساختار پروتئین Loa22

براساس نتایج سرور NetCTL با حد آستانه ۰/۵ و بر اساس امتیاز مجموع (Combination Score) و نتایج

بر اساس پیش‌بینی سرور Vaxigen این پروتئین خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی را داشته و آنتی‌ژن‌سنجی این پروتئین را ۰/۸۰۲۶ پیش‌بینی کرد که به میزان دو برابر بیشتر از حد آستانه تعیین شده (۰/۴) برای مدل‌های باکتریایی بود.

از آنجائی که سازه ایمنی‌زا اگر آلرژیک باشد، ممکن است باعث ایجاد واکنش‌های ایمنی متقاطع خاص آلرژن مانند تحریک و التهابات پوستی و مخاطی در بدن میزبان شود. بنابراین پروتئین Loa22 قبل و بعد از بهینه‌سازی با استفاده از هر دو سرور AllerTOP و AllergenFP مورد بررسی و نتیجه هر دو ارزیابی، این پروتئین را فاقد ویژگی‌های آلرژیک پیش‌بینی کردند. همچنین بر اساس پیش‌بینی سرور Toxinpred به لحاظ سمیت و توکسیسیته، بی‌خطر گزارش شد (جدول ۳).

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آنتی ژن و حالیت

خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین Loa22 در سرور ProtParam قبل و بعد از بهینه‌سازی بررسی شد. وزن مولکولی قطعه مورد نظر قبل از بهینه‌سازی حدود ۲۲ kDa، نقطه ایزوالکتریک حدود ۸/۹ و نیمه عمر تخمین زده شده در سیستم پروکاریوتی تنها حدود ۳ دقیقه بود که در دسته پروتئین‌های ناپایدار قرار می‌گیرد. اما پس از بهینه‌سازی و حذف توالی سیگنال وزن مولکولی به حدود ۱۹/۲ kDa (۱۷۳ آمینواسید) و نقطه ایزوالکتریک ۶ و نیمه عمر تخمین زده شده در سیستم پروکاریوتی به حدود ۱۰ ساعت تغییر کرد که در این حالت پروتئین پایدار بشمار می‌آید (جدول ۳). ترجمه معکوس، تعیین جایگاه‌های برشی و بهینه‌سازی کدون بر اساس مطالعات فیوژنی پیشین و همترازی توالی‌های مورد مطالعه، توالی نهایی با حداکثر انطباق با سروواری بومی لپتوسپیرا و پس از حذف توالی

بازه آمینواسیدهای ۱۵۰-۱۳۶، هسته LILGAIAF نیز در شش موقعیت مختلف در بازه پپتیدی ۲۱-۷ و هسته FRFATSAPQ در سه موقعیت مختلف در بازه آمینواسیدهای ۲۰۰-۱۸۴ با بیشترین احتمال امکان قرارگیری در شیار آلل‌های مختلف MHC-II را داشتند (جدول ۱).

در مجموع توالی‌های پپتیدی پیش‌بینی شده، ۱۷ توالی مشترک با امکان تطابق و قرارگیری در شیار HLA‌های هر دو کلاس MHC یافت شد که با یک بررسی سختگیرانه‌تر، بر اساس امتیاز مجموع و فراوانی آلل‌های انطباق یافته، توالی‌های پپتیدی FRFATSAPQ، YSELRANAV، FTLCSAEK، FRYPDGLTR و RRVTFRFAT با بیشترین احتمال حضور داشتند. محتمل‌ترین سوپرتایپ برای هر یک از این پپتیدهای پیش‌بینی شده در جدول به همراه امتیازات مربوط به آن آورده شده است.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلولهای B در ساختار پروتئین Loa22 نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلولهای B در ساختار پروتئین Loa22 با استفاده از سرور BepiPred-3.0 در مجموع ۵ توالی پپتیدی (به استثناء اپی‌توپ پیش‌بینی شده در ناحیه سیگنال پپتید) را بعنوان توالی اپی‌توپیک نشان داد (جدول ۲).

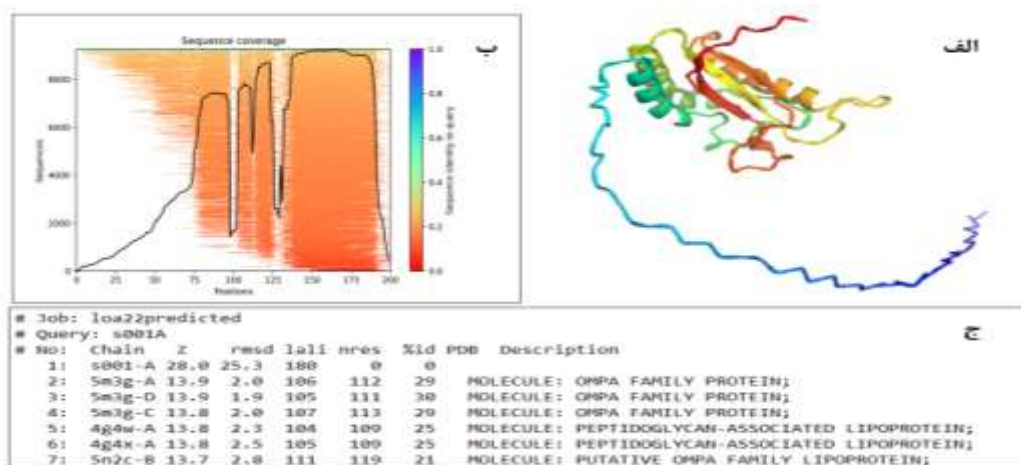
همچنین بر اساس پیش‌بینی، آمینواسیدها با بیشترین احتمال درگیری در میانکنش اپی‌توپ‌های خطی با سلولهای B به رنگ زرد و در رده بعدی به رنگ نارنجی و به همین ترتیب آمینواسیدهای کمتر موثر با رنگ بنفش در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. در گراف بدست آمده از سرور DiscoTope - 3.0 بر اساس ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده با استفاده از سرور alphafold برای پروتئین Loa22 مناطق سبز رنگ اپی‌توپ‌های فضایی پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. (شکل ۵ و جدول ۲).

تعیین آنتی‌ژن‌سنجی، توکسیسیته و آلرژن بودن پروتئین

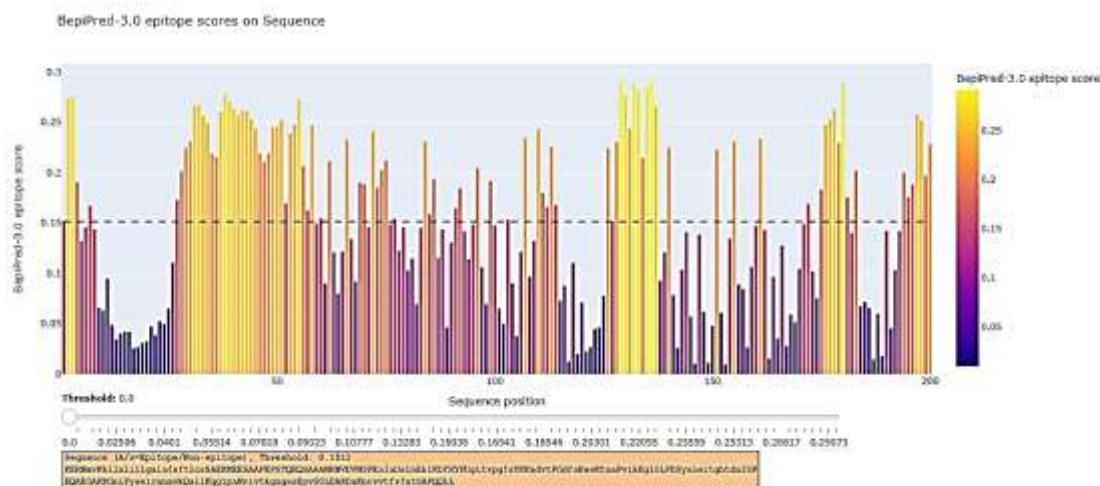


ناخواسته، انتخاب شد (شکل ۶). در نهایت پس از بهینه سازی کدونهای ژنی برای بیان در میزبان E.coli، توالی نهایی با طول ۵۳۹ جفت باز پس از اطمینان از نتایج مطلوب آزمایشگاهی در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی OR134515 ثبت گردید.

سیگنال، بصورت توالی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار EditSeq ترجمه معکوس شد. جهت وارد کردن قطعه ژن در وکتور مورد نظر، دو جایگاه برشی NcoI (CCATGG) و XhoI (CTCGAG) به دلیل عدم وجود سایت برشی مشابه در درون ژن loa22 جهت جلوگیری از تداخل در بیان پروتئین نو ترکیب در اثر برش



شکل ۳. الف؛ بهترین مدل سه بعدی پیش بینی شده پروتئین Loa22. ب؛ تصویر حاصل از ارزیابی شاخص های Coverage و PAE، pLDDT و ساختار سوم پروتئین Loa22 با استفاده از سرور AlphaFold. ج؛ مشابه ترین ساختارها به ساختار پیش بینی شده پروتئین Loa22 با استفاده از سرور Daliserver.



شکل ۴. پیش بینی آمینواسیدهای موثر در نواحی اپی توپ های خطی غیر ممتد سلولهای B در ساختار پروتئین Loa22 با استفاده از سرور BepiPred-3.0. محور x و y بر ترتیب موقعیت توالی پروتئین و امتیازات اپی توپ ها را نشان می دهد. آمینواسیدهایی که امتیاز بالاتری دارند بعنوان بخشی از اپی توپ سلول B با رنگ زرد مشخص شده اند.

جدول ۱. بررسی و مقایسه پپتیدهای برتر MHC-I، پیش‌بینی شده با سرور IEDB و NetCTL و اشتراک با MHC-II

ردیف	پپتید	شروع	پایان	MHC-I IEDB	IC50	MHC-I NetCTL	امتیاز	MHC-II	IC50
1	FRFATSAPQ	189	197	HLA-C*03:03	9.4	HLA-B27	1.54	HLA-DRB5*01:01	18.00
2	ATSAPQQLL	192	200	HLA-C*03:03	5.6	HLA-A1	0.65	--	--
3	FATSAPQQL	191	199	HLA-C*12:03	1.3	HLA-B39	0.69	HLA-DRB1*07:01	18.00
4	FRYPDGLTR	71	79	HLA-C*03:03	10.2	HLA-B27	1.42	HLA-DRB5*01:01	27.00
5	LTRPGFSYK	77	85	HLA-A*30:01	4.8	HLA-A3	1.46	--	--
6	LILLGAIAF	12	20	HLA-C*03:03	30.7	HLA-B62	1.23	HLA-DRB1*01:01	9.00
7	GAIAFSFTL	16	24	HLA-C*03:03	4.7	HLA-A2	0.93	--	--
8	FSFTLCSSA	20	28	HLA-C*12:03	7.5	HLA-A2	0.54	HLA-DRB5*01:01	65.00
9	FTLCSSAEK	22	30	HLA-C*03:03	4.8	HLA-A3	1.21	HLA-DRB5*01:01	59.00
10	IADSLNEKL	60	68	HLA-C*12:03	7.1	HLA-A1	0.62	--	--
11	HTDAIGPEQ	122	130	HLA-C*12:03	7.8	HLA-A1	1.00	--	--
12	YSELRANAV	141	149	HLA-C*15:02	9.0	HLA-B8	1.20	HLA-DRB1*01:01	6.00
13	LGLPDSYAL	109	117	HLA-C*03:03	5.8	HLA-B39	0.59	--	--
14	DAKNRRVTF	181	189	HLA-C*12:03	5.6	HLA-B8	1.80	--	--
15	NRRVTFRFA	184	192	HLA-C*12:03	19.3	--	--	--	--
16	RRVTFRFAT	185	193	HLA-C*12:03	32.3	HLA-B27	1.46	HLA-DRB1*07:01	152.0
17	NRNVDVNSP	49	57	HLA-C*07:03	3.7	--	--	--	--
18	NVDVNSPEA	51	59	HLA-C*12:03	4.8	--	--	--	--
19	FSYKKADVT	82	90	HLA-C*03:03	6.4	--	--	--	--
20	SAEKKEESA	27	35	HLA-C*12:03	6.6	--	--	--	--

جدول ۲. اپی‌توپ‌های خطی و فضایی پیش‌بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 با استفاده از سرور BepiPred

نوع اپی‌توپ	شروع	پایان	پپتید	امتیاز	طول پپتید
خطی	۲۷	۶۱	SAEKKEESAAPEPSTQEQSAAANRNVDVNSPEAIA	۰٫۲۷۵	۳۵
	۶۸	۷۷	LKDFRYPDGL	۰٫۲۷۷	۱۰
	۱۲۶	۱۳۹	IGPEQAEGAKKGNI	۰٫۲۹۱	۱۴
	۱۷۴	۱۸۲	VSGLDAKDA	۰٫۲۸۸	۹
	۱۹۴	۱۹۸	SAPQQ	۰٫۲۵۷	۴
فضایی	۲۵	۵۷	CSSAEKKEESAAPEPSTQEQSAAANRNVDVNSP	۰٫۸۷۵	۳۶
	۷۵	۸۷	DGLTRPGFSYKKA	۰٫۵۲۷	۱۳
	۱۰۹	۱۱۴	GKLPDS	۰٫۶۴۴	۶
	۱۲۵	۱۳۸	DAIGPEQAEGAKKG	۰٫۷۰۵	۱۴
	۱۷۷	۱۸۱	LDAKD	۰٫۵۳۸	۵
	۱۹۴	۲۰۰	SAPQQLE	۰٫۷۰۳	۷



بحث

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام با پیامدهای سلامت جهانی است که توسط سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا ایجاد می شود و تهدیدی قابل توجه برای سلامت عمومی در سراسر جهان است (Hidalgo et al., 2020). تمرکز بر توسعه روش های تشخیصی سریع برای تسهیل تشخیص زود هنگام بیماری و توسعه واکسنی جهانی مسائل کلیدی اصلی برای فائق شدن بر بسیاری از جنبه های زیان آور بیماری لپتوسپیروز هستند. پروتئین های غشای خارجی (OMPs) لپتوسپیرا، اعضای خانواده ی بزرگی از پروتئین ها هستند که ارتباط مستقیمی با بیماریزایی دارند، بطوریکه می توانند نقش مهمی را در اتصال، عفونت اولیه و در نتیجه ایجاد بیماری ایفا کنند (Haake and Zückert, 2015).

یکی از لیوپروتئین های غشاء خارجی در لپتوسپیراهای بیماریزا Loa22 است که اولین بار توسط محققان ژاپنی شناسایی شد (Koizumi and Watanabe, 2003) و در ادامه نقش آن در بیماریزایی لپتوسپیرا با استفاده از سویه موتانت loa22 که از طریق موتاژن تصادفی ترانسپوزون Himar 1 ایجاد شد، نشان داده شد (Ristow et al., 2007).

این تحقیق با هدف مطالعه ویژگی های ساختاری و عملکردی پروتئین Loa22، ارزیابی پتانسیل آن به عنوان یک واکسن کاندید بر علیه لپتوسپیروز با استفاده از ابزارها و پایگاه های اطلاعاتی بیوانفورماتیک و مطالعات ایمونوانفورماتیک و در نهایت، بهینه سازی توالی آن جهت بیان مطلوب در میزبان E.coli انجام شد.

ابزارهای تجزیه و تحلیل توالی مانند BLAST را می توان برای شناسایی پروتئین های همولوگ با ساختارها یا عملکردهای شناخته شده مورد استفاده قرار داد و بینش هایی را در مورد مناطق حفاظت شده ارائه کرد که ممکن

است به عنوان اپی توپ های بالقوه عمل کنند. برای تحقق اهداف مطالعه، ۳۶ توالی آمینواسیدی مربوط به پروتئین Loa22 از سرووارهای بیماریزای بومی و غیر بومی لپتوسپیرا مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آنالیز همترازی چندگانه (Multiple alignment)، تشابه توالی در سطح آمینواسیدی، بین ۹۸-۱۰۰ درصد در میان تمامی سرووارها گزارش شد که نشان می دهد، مطابق با مطالعات پیشین، توالی Loa22 بسیار حفاظت شده است (Yan et al., 2010, Mohammadi et al., 2022). تفاوت در میان سرووارهای کرشتری با دیگر سرووارهای بیماریزای مورد مطالعه تنها مربوط به تغییر در سه آمینواسید در طول توالی Loa22 بود. دو آمینواسید غیرقطبی آلانین (Ala⁸⁷) و والین (Val¹⁶⁵) در سرووارهای گریپوتیفوزا بترتیب جایگزین دو آمینواسید غیرقطبی پرولین (Pro⁸⁷) و آلانین (Ala¹⁶⁵) و آمینواسید غیرقطبی آلانین (Ala³⁷) در سرووارهای گریپوتیفوزا جایگزین آمینواسید قطبی ترئونین (Thr³⁷) در میان دیگر سرووارهای شده که در مجموع تغییر قابل ملاحظه ای در شکل فضایی و اپی توپ های پیش بینی شده در ساختار پروتئین Loa22 ایجاد نکرده است.

بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک، نتایج پیش بینی ساختمان و ساختار پروتئین Loa22، با نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی، اتمی و کانفوکال از موقعیت و نحوه قرارگیری این پروتئین در غشاء لپتوسپیرا منطبق بود (Hsu et al., 2021) و این پروتئین دارای یک توالی سیگنال می باشد (Balamurugan et al., 2021). در این مطالعه، با استفاده از سرور آنلاین SignalP موقعیت قرارگیری پروتئین Loa22 بصورت خارج غشایی پیش بینی شد و همچنین بر اساس پیش بینی این سرور و نیز سرور TMHMM، یک توالی سیگنال در انتهای آمینی با جایگاه برش بین آمینواسیدهای Cys²⁴ و Ser²⁵ حضور



دارد. بر اساس مطالعات پیشین، پروتئین Loa22، یک لیپید اصلاح شده متصل به آمینواسید Cys²¹ و یک جایگاه برش در بین آمینواسیدهای ۲۱ و ۲۰ برای حذف سیگنال پپتید و ایجاد لیپوپروتئین بالغ دارد که با همترازی توالی این پروتئین در این مطالعات، آمینواسیدهای جایگاه برش، یکسان و بر هم منطبق بودند (Kaur et al., 2014, Hsu et al., 2021).

همچنین بر اساس پیش‌بینی، حذف توالی سیگنال از توالی پروتئین Loa22، منجر به یک پروتئین بالغ با حلالیت بیشتر می‌شود که همسو با مطالعات تجربی، از این نظر حمایت می‌کند که پروتئین بالغ، بدون پپتید سیگنال، در بخش محلول باقی می‌ماند (Zhang et al., 2010, Gharakhani et al., 2022). بهترین حالت بیان پروتئین در میزبان E.coli بصورت محلول می‌باشد که در ادامه نیاز به مراحل محلول سازی نباشد. بیان پروتئین‌ها به صورت محلول در اشرشیاکلی نقطه عطفی در تولید پروتئین است (Clark and Pazdernik, 2016).

ارزیابی سایر ویژگی‌های پروتئین Loa22، بر اساس تجزیه و تحلیل فیزیکوشیمیایی، مدل‌سازی همسانی و یافته‌های حاصل از مطالعات فیلوژنتیک، نشان داد که توالی بهینه شده این پروتئین، بقاء و پایداری بیشتری نسبت به توالی اصلی آن داشت، بطوریکه پس از بهینه سازی توالی، پایداری و نیمه عمر آن در میزبان پستاندار و E.coli افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد.

ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین Loa22، بر اساس نتایج بدست آمده با استفاده از سرور Dali، بیشترین تشابه با ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین‌های خانواده OMP در باکتری‌های دیگر مانند E.coli بوده که این پروتئین نیز عضوی از این خانواده می‌باشد. البته درصد تشابه پروتئینی بدلیل تفاوت آمینواسیدها، حدود ۳۰٪ است ولی عدد RMSD حدود

عدد ۲ (گستره ۲-۰ ایده آل است) بود که عدد قابل قبولی می‌باشد و عدد Z در بهترین حالت حدود ۱۴ بود که به دلیل وجود دنباله‌ای در انتهای آمینی این پروتئین است که ساختار آن قابل پیش‌بینی نبوده و تقریباً با هیچ ساختاری منطبق نمی‌شود. این موضوع نیز به این دلیل که در کریستالوگرافی اشعه X، یک چنین دنباله‌های طولی، بدلیل نوسان بالا، اصولاً در تعیین ساختار نمی‌گنجد.

بر اساس مطالعات ایمونوفورماتیک، پروتئین Loa22 آنتی‌ژنیسیته بالایی داشته و در عین حال غیر توکسیک و فاقد ویژگی‌های آلرژیک بود که مجموع این ویژگی‌ها، آن را بعنوان کاندید مناسبی برای طراحی واکسن مطرح می‌کند. هدف نهایی واکسیناسیون در برابر بیماری‌های عفونی ایجاد یک پاسخ حافظه ایمونولوژیک موثر طولانی مدت متشکل از حافظه اختصاصی آنتی ژن T (ایمنی سلولی) و سلول‌های B (ایمنی هومورال) است (Grassmann et al., 2017). عفونت با لپتوسپیرو عمدتاً منجر به تولید آنتی‌بادیهای اختصاصی توسط سلول B می‌شود (Adler and Faine, 1977). از آنجا که سلولهای T در هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولی نقش دارند؛ لذا حضور اپی‌توپهای سلول B و اپی‌توپهای سلول T کمکی در میان توالی یک پروتئین می‌تواند موجب تحریک هر دو ایمنی سلولی و در نهایت افزایش ایمنی شود. بنابراین در این مطالعه پیشگویی اپی‌توپهای سلولهای B و T به صورت تواماً انجام شد.

الگوریتم‌های مختلفی مانند روش‌های مبتنی بر BepiPred، ABCpred و SVM می‌توانند اپی‌توپ‌های سلول B را بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی یا الگوهای توالی پیش‌بینی کنند. الگوریتم‌های پیش‌بینی اپی‌توپ سلول T مانند NetMHCpan یا NetCTLpan



می‌توانند پپتیدهای بالقوه اتصال MHC کلاس I یا II را شناسایی کنند که پاسخ‌های ایمنی سلولی را فعال می‌کنند.

پیش تر Xu'ai Lin و همکارانش تاثیر واکسن مولتی اپی‌توپ r4R، متشکل از اپی‌توپ‌های سلول B و T پیش‌بینی شده در توالی پروتئین‌های غشاء بیرونی لپتوسپیرا شامل؛ LipL21 و LipL32، OmpL1 در القا، پاسخ ایمنی بر علیه لپتوسپیرا مورد بررسی و نتایج امیدوار کننده‌ای بدست آورده بودند (Lin et al., 2016). در ایران نظیفی و همکاران اپی‌توپ‌های ایمونوژن پروتئین‌های LipL32 و OmpL1 از سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا با قابلیت تحریک هر دو سلول T (MHCI و MHCII) و سلول B را جهت طراحی واکسنی نو ترکیب بر اساس اپی‌توپ‌های کایمیریک با استفاده از ابزار ایمونوآنفورماتیک مورد بررسی قرار دادند (Nazifi et al., 2018).

در مطالعه حاضر با استفاده از سروورهای IEDB و NetCTL و با در نظر گرفتن تمامی احتمالات، بر اساس رتبه صدک و حد آستانه آنها، توالی‌های FRFATSAPQ، YSELRANAV و FTLCSAEK، FRYPDGLTR پیش‌بینی شده با احتمال بالای انطباق با HLA‌های هر دو کلاس MHC بودند. علاوه بر این، توالی DAKNRRVTF و FTLCSAEK برای انطباق با HLA‌های مربوط به MHC-I و توالی VKKILNLIL و LILLGAIAF نیز محتمل‌ترین پپتیدها برای قرارگیری در شیار MHC-II بودند. ویکتور و همکارانش چهار اپی‌توپ سلول‌های B در توالی پروتئین Loa22 پیش‌بینی کردند که با اپی‌توپهای DAIGPEQAEAGAKKG، MVKKILNLIL، VSGLDAKDA و FTLCSAEKE، پیش‌بینی شده در این مطالعه همپوشانی کامل داشتند (Victor et al., 2015).

در مجموع نتایج بدست آمده از بررسی توالی پروتئین L022، چندین اپی‌توپ شاخص با ضریب اطمینان بالا در هر دو گروه سلول‌های B و T پیش‌بینی شد که در برخی نواحی این اپی‌توپ‌ها همپوشانی داشتند. این نکته از این جهت حائز اهمیت است که در مطالعات دانگ و لین نشان داده شد که ظرفیت بالای القای پاسخ Th-1 در موش‌های BALB/C و تولید IgG2a می‌تواند بدلیل حضور ترکیبی از اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در دومین‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های LipL41 و OmpL1 باشد (Dong et al., 2008, Lin et al., 2013).

نتیجه‌گیری نهایی

در سال‌های اخیر، بیوانفورماتیک و ایمونوآنفورماتیک به عنوان ابزار قدرتمندی برای طراحی واکسن ظاهر شده‌اند. این رویکردهای محاسباتی انتخاب و بررسی ساختار پروتئین‌های ایمونوژن و نیز غربالگری سریع اپی‌توپ‌های بالقوه موثر را با در نظر گرفتن ایمنی زایی، پروفایل ایمنی و حفاظت‌شدگی آنها در میان سویه‌ها یا گونه‌های مختلف امکان‌پذیر می‌کند. ادغام این فن‌آوری‌ها با اعتبارسنجی تجربی، نویدبخش توسعه واکسن‌های نو ترکیب مبتنی بر پروتئین‌های غشایی و یا واکسنی مرکب از اپی‌توپ‌های ایمونوژن این پروتئین‌ها، مؤثر علیه لپتوسپیروز و در عین حال کاهش زمان و هزینه تحقیقات آزمایشگاهی است.

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین‌های سطحی لپتوسپیرا مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با کد ۹۶۰۴۵-۱۰۵-۱۸-۱۸-۰۱ و کد اخلاق IR.IAU.RASHT.REC.1402.042 مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان می‌باشد.

تعارض منافع



7. Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Rizzi, C., Schuch, R. A., Jorge, S., Oliveira, T. L., et al. (2017). Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. *Int J Mol Sci*, 18, 158. <https://doi.org/10.3390/ijms18010158>
8. Dhayabaran, V., Chidambaram, D. & Krishnaswamy, P. R. (2020). Identification of compounds for improved growth of *Leptospira* in culture and isolation. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 96, 114923. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114923>
9. Dong, H., Hu, Y., Xue, F., Sun, D., Ojcius, D. M., Mao, Y., et al. (2008). Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiol*, 8, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-223>
10. Fraser, T. & Brown, P. D. (2017). Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. *Front Microbiol*, 8, 783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00783>
11. Gharakhani, M., Ghasemi, M. F., Khaki, P., Esmaelizad, M. & Tebianian, M. (2022). Improvement the Expression and Purification of Loa22: A Lipoprotein with OmpA domain from Pathogenic *Leptospira* Serovars. <https://doi.org/10.18502/ijm.v15i5.13873>
12. Grassmann, A. A., Souza, J. D. & McBride, A. J. A. (2017). A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction? *Front Immunol*, 8, 256.

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

1. Adler, B. (2015). Vaccines against leptospirosis. *Leptospira and leptospirosis*, 251-272. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_10
2. Adler, B. & Faine, S. (1977). Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun*, 17, 67-72. <https://doi.org/10.1128/iai.17.1.67-72.1977>
3. Balamurugan, V., Thirumalesh, S., Alamuri, A., SowjanyaKumari, S., Vinod Kumar, K., Linshamol, L., et al. (2021). Evaluation of the diagnostic potential of recombinant leptospiral OMP A-like protein (Loa22) and transmembrane (OmpL37) protein in latex agglutination test for serodiagnosis of leptospirosis in animals. *Lett Appl Microbiol*, 72, 730-740. <https://doi.org/10.1111/lam.13461>
4. Cerqueira, G. M., Souza, N. M., Araújo, E. R., Barros, A. T., Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., et al. (2011). Development of transcriptional fusions to assess *Leptospira interrogans* promoter activity. *PLoS One*, 6, e17409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017409>
5. Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. (2016). *Recombinant Proteins. Biotechnology. Second Edition* ed. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00001-6>
6. Clifford, J. N., Høie, M. H., Deleuran, S., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. (2022). BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. *Protein Science*, 31, e4497. <https://doi.org/10.1002/pro.4497>



19. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
20. Kaur, D., Verma, R., Kumar, B., Deka, D. & Agrawal, R. K. (2014). Cloning, Phylogenetic Analysis and Expression of Recombinant LipL41, Loa22 and LipL21 Proteins from *Leptospira interrogans*. *Int J Environ Agric Biotechnol*, 7, 409-420. <http://dx.doi.org/10.5958/2230-732X.2014.01345.X>
21. Koizumi, N. & Watanabe, H. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett*, 226, 215-219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00619-0)
22. Lin, M.H., Chang, Y.C., Hsiao, C.D., Huang, S.-H., Wang, M.-S., Ko, Y.-C., et al. (2013). LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *PLoS One*, 8, e83246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083246>
23. Lin, X. a., Xiao, G., Luo, D., Kong, L., Chen, X., Sun, D., et al. (2016). Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol*, 16, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0852-y>
24. Mohammadi, Y. M., Khaki, P., Bidhendi, S. M. & Nofeli, M. (2022). Evaluation of the Presence of Gene Encoding Loa22 in Pathogenic *Leptospira* Serovars. *Iran J Med Microbiol*, 16(5), 392-398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256>
13. Haake, D. A. & Matsunaga, J. (2010). *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Molecular microbiology*, 77, 805-814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x>
14. Haake, D. A. & Zückert, W. R. (2015). The leptospiral outer membrane. *Leptospira and Leptospirosis*, 187-221. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_8
15. Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., et al. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*, 2022.04.08.487609. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
16. Hidalgo, J., Rodriguez-Vega, G. M. & Arriaga, P. (2020). *Leptospirosis. Evidence-Based Critical Care: A Case Study Approach*. Cham: Springer International Publishing. 10.1007/978-3-030-26710-0_66
17. Hsu, S.H., Chang, M.Y., Lin, S.M., Ko, Y.-C., Chou, L.-F., Tian, Y.-C., et al. (2021). Peptidoglycan mediates *Leptospira* outer membrane protein Loa22 to toll-like receptor 2 for inflammatory interaction: a novel innate immune recognition. *Scientific reports*, 11, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79662-8>
18. Hsu, S.H. & Yang, C.W. (2022). Insight into the structure, functions, and dynamics of the leptospira outer membrane proteins with the pathogenicity. *Membranes*, 12, 300. <https://doi.org/10.3390/membranes12030300>



- Ave, P., et al. (2007). The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3, e97. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030097>
29. Victor, A. A. R., Abraham, S., Tennyson, J. & Pradhan, N. (2015). In silico prediction and threading based epitope mapping of OmpA-like outer membrane Leptospiral Lipoprotein Loa22. *Int J Sci Eng Res*, 6, 477-485.
30. Yan, W., Faisal, S. M., McDonough, S. P., Chang, C.-F., Pan, M.-J., Akey, B., et al. (2010). Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine*, 28, 2277-2283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.071>
31. Zhang, Y., Bao, L., Zhu, H., Huang, B. & Zhang, H. (2010). OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42, 70-79. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp109>
- <http://dx.doi.org/10.30699/ijmm.16.5.392>
25. Monaris, D., Sbrogio-Almeida, M., Dib, C., Canhamero, T., Souza, G., Vasconcellos, S., et al. (2015). Protective immunity and reduced renal colonization induced by vaccines containing recombinant *Leptospira interrogans* outer membrane proteins and flagellin adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*, 22, 965-973. <https://doi.org/10.1128/CVI.00285-15>
26. Nazifi, N., Mousavi, S. M., Moradi, S., Jaydari, A., Jahandar, M. H. & Forouharmehr, A. (2018). In Silico B Cell and T Cell epitopes evaluation of lipL32 and OmpL1 proteins for designing a recombinant multi-epitope vaccine against leptospirosis. *International Journal of Infection*, 5. <https://doi.org/10.5812/iji.63255>
27. Raja, V. & Natarajaseenivasan, K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Crit Rev Microbiol*, 41, 1-17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.787387>
28. Ristow, P., Bourhy, P., McBride, F. W. d. C., Figueira, C. P., Huerre, M.,



In Silico Designing and Optimization of Loa22 Protein in Pathogenic Leptospira Serovars for Use in Recombinant Vaccine

Mehdi Gharakhani¹, Mohammad Faezi Ghasemi², Pejvak khaki^{3*}, Majid Esmaelizad⁴, Majid Tebianian⁵

1. PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
2. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Associate Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
5. Associate Professor, Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Leptospirosis, caused by pathogenic *Leptospira* species, is a globally prevalent zoonotic disease with significant public health implications. Developing an effective vaccine against leptospirosis remains a challenge due to the complex nature of the pathogen and its outer membrane proteins (OMPs). The outer membrane protein Loa22 has been proposed as a potential vaccine due to its immunogenic properties. The study aims to explore the application of bioinformatics and immunoinformatics in studying the Loa22 protein, elucidating its structural and functional characteristics, and assessing its potential as a vaccine candidate for leptospirosis. Based on the findings of multiple sequence alignment, Loa22 protein showed more than 99% convergence in different strains of pathogenic leptospira. The evaluation of different features of this protein showed it to be an immunogenic, non-toxic, and non-allergenic antigen that can induce immune responses against *Leptospira* infection. Also, based on the predictions, it was shown that Loa22 protein is a stable structure, soluble, and has antigenic areas of T and B cell epitopes, which are conserved in all pathogenic serovars and can be used in the design of the recombinant vaccine or the use of its immunogenic epitopes in the combination with the immunogen epitopes of other conserved proteins of *Leptospira* outer membrane should be used in the design of multi-epitope vaccine.

Keywords: Leptospirosis, Leptospira, Protein Loa22, Bioinformatics, Immunoinformatics

*Corresponding author: Pejvak khaki

Address: Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
E. mail: khakipejvak53@gmail.com



اثر نانوذرات اکسید نیکل بر روی میکروارگانیسم های آلوده کننده موجودات آبی

عسل نعیم آبادی^۱، مینا رمضانی^{۲*}، رامین محمدی آلوچه^۳

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶

چکیده

ظهور فزاینده مقاومت آنتی بیوتیکی در میان گونه های رایج میکروارگانیسم ها، جامعه علمی را به جستجوی عوامل ضد میکروبی جدید ترغیب کرده است. در این بین از نانوذرات فلزی به عنوان عوامل ضد میکروبی بر علیه گونه های باکتریایی متعددی استفاده شده است. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات اکسید نیکل به روش هیدروترمال و بررسی خواص ضد میکروبی آنها می باشد. نانوذرات اکسید نیکل به روش هیدروترمال سنتز شد و سپس آنالیزهای XRD، EDX، SEM، FTIR، UV-vis جهت بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این نانومواد انجام شد. فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی آن بر علیه باکتری گرم مثبت / استرپتوکوکوس اینیایی و باکتری گرم منفی / آئروموناس هیدروفیلا و قارچ فوزاریوم سولانی به کمک آزمون های MIC و MBC و چاهک گذاری بررسی گردید. سنتز بهینه نانوذرات اکسید نیکل در طول موج ۱۹۰ نانومتر، با اتصالات و پیوندهای مناسب بین عناصر اکسیژن و نیکل، ساختار بلوری مشخص در اندازه بین ۶۶ تا حدود ۱۰۰ نانومتر و تقریباً کروی شکل با خلوص قابل قبول، انجام پذیرفت. با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی دو گونه استاندارد / استرپتوکوکوس اینیایی و آئروموناس هیدروفیلا، MIC نانوذره برای گونه / استرپتوکوکوس اینیایی ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر و برای سوش گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا، غلظت ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر مشخص گردید. مقادیر مربوط به MBC نانوذرات اکسید نیکل مشابه MIC آنها ارزیابی گردید. از طرفی ارزیابی های مرتبط با فرآیند ضد قارچی نانوذرات اکسید نیکل حاکی از اثرات ضعیف این ترکیب علیه قارچ فوزاریوم سولانی بود. از این مطالعه نتیجه شد با توجه به اینکه باکتری های / استرپتوکوکوس اینیایی و آئروموناس هیدروفیلا و قارچ فوزاریوم سولانی بعضاً در محیط های آبی و موجودات زنده ساکن این محیط ها ایجاد آلودگی و بیماری می نمایند، نتایج این پژوهش می تواند جالب توجه باشد اما می بایست مطالعات بیشتر، گسترده تر و تخصصی تر همراه با ارزیابی در شرایط طبیعی بدن (in vivo) در این خصوص صورت گیرد.

کلمات کلیدی: نانوذرات، اکسید نیکل، سنتز هیدروترمال، استرپتوکوکوس اینیایی، آئروموناس هیدروفیلا، فوزاریوم

سولانی

* نویسنده مسئول: مینا رمضانی

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

پست الکترونیک: mina.ramezani@gmail.com

مقدمه

استفاده از عوامل شیمیایی برای درمان و ضد عفونی، یکی از روش‌های اصلی پیشگیری و کنترل عوامل عفونی در چند دهه گذشته بوده است (Rice, 2009). یکی از مشکلات جدی که بر همه ارگانسیم‌ها تاثیر می‌گذارد، توسعه سریع مقاومت آنتی بیوتیکی است که به‌ویژه در گونه‌های آبرزی به چشم می‌خورد. در طول سال‌ها، گزارش‌های علمی درباره خطرات سلامتی مرتبط با استفاده بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها در ماهی‌ها و دیگر موجودات آبرزی قطعی بوده‌اند (Sood et al., 2015). استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها، تأثیرات منفی بر سیستم‌های زیستی و محیط زیست می‌گذارد و اغلب منجر به ایجاد و گسترش الگوی با مقاومت دارویی بالا در بین پاتوژن‌ها می‌شود (Swain et al., 2014).

در میان نانوذرات اکسید فلزات واسطه (TMO)، به طور معمول، اکسید نیکل یکی از مهم‌ترین مواد اکسید فلز واسطه با ساختار شبکه مکعبی است که کاربردهای زیادی دارد. استفاده از نانوذرات به عنوان عوامل ضد میکروبی نه تنها نوید بخش غلبه بر مقاومت‌های میکروبی است بلکه از اثرات ناخواسته بر روی اکوسیستم‌ها نیز جلوگیری می‌کند و یا آنها را به حداقل می‌رساند (Song et al., 2019). Deshpande et al., 2016; Ali et al. and Gao, 2008;). محققان فعالیت ضد میکروبی نانوذرات روی آلومینات و نانو کامپوزیت روی کرومیت-روی آلومینات را علیه سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کولای ارزیابی کردند و فعالیت ضد باکتری بسیار خوبی را مشاهده نمودند که می‌تواند به عنوان یک ترکیبات ضدباکتریایی جدید در مطالعات بسته بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Taheri et al., 2020). نانوذرات به دلیل نسبت زیاد سطح به حجم، فعالیت سطحی بالایی از خود نشان می‌دهند (Nisar et al., 2019).

(2019; Zarenezhad et al., 2022). میل ترکیبی بالای

نیکل به اجزای حاوی سولفور و فسفر مانند DNA و پروتئین‌ها، تکثیر DNA را مختل کرده و باعث تغییر شکل پروتئین می‌شود (Radzig et al., 2013; Galdiero et al., 2015). بطور کلی فعالیت‌های ضد باکتریایی نانوذرات نیکل مربوط به محتوای یون نیکل است که به سلول باکتری نفوذ کرده و به سطح غشای سلولی باکتری و محیط درون سلولی می‌رسد (Galdiero et al., 2015). این هجوم کاتیون‌های نیکل اندامک-هایی مانند ریبوزوم‌ها را از بین می‌برد و بر متابولیسم باکتری‌ها تأثیر می‌گذارد (Radzig et al., 2013; Xing et al., 2015). مطالعه متون نشان می‌دهد که به دلیل جاذبه الکترواستاتیک بین سلولی با بار منفی و یون‌های نیکل با بار مثبت، نفوذ یون‌ها به داخل سلول اتفاق می‌افتد (Gomaji Chaudhary et al., 2015; Xing et al., 2016; Imran Din and Rani, 2015). فرآیندهای مربوط به تولید اکسیدهای فلزی تحت شرایط هیدروترمال یکی از مهم‌ترین جنبه‌های رویکرد هیدروترمال در تولید مواد است. مزیت این روش، تهیه نانوذرات با توزیع یکنواخت و توانایی کنترل اندازه ذرات می‌باشد. از دیگر مزایای این روش می‌توان به خلوص و همگنی بالای محصول، تقارن بلورها، توزیع بلورها، توزیع اندازه همگن، تک مرحله‌ای بودن فرآیند، امکان تولید نانوذرات با اندازه‌های مختلف و کم بودن مصرف انرژی اشاره نمود (Magaye and Zhao, 2012). *Streptococcus iniae* گونه‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و کروی شکل است و از مهم‌ترین پاتوژن‌های ماهی‌ها محسوب می‌شود. عفونت در ماهی‌ها به شکل زخم‌های پوستی، متنگوانسفالیت و سپتی سمی است. این عفونت در انسان‌ها نیز به صورت التهاب پوستی، سپسیس دیده می‌شود (Agnew and Barnes, 2007).



آمده به مدت ۵ ساعت در آون خشک گردید و در نهایت در دمای ۴۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت کلسینه شده تا نانوذره اکسید نیکل مورد نظر حاصل گردد (Tran, Park and Son, 2024).

ارزیابی نانوذرات اکسید نیکل تولید شده

به منظور ارزیابی نانوذرات اکسید نیکل تولید شده از طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV)، تفرق یا پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپی الکترونی روبشی (FE-SEM)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) یا (EDAX) و آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) استفاده گردید.

در مرحله اول و پس از گذشت مدت ۲۴ ساعت از زمان واکنش و مشاهده تغییرات، به منظور تایید و بررسی صحت و وضعیت نانوذره اکسید نیکل سنتز شده، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Biomate5, Thermo (USA) در طول موج بین ۱۹۰ تا ۹۰۰ نانومتر انجام پذیرفت (Rahaiee et al., 2020). جهت انجام آنالیز XRD در این پژوهش، مقدار ۰/۲ گرم نانوذرات اکسید نیکل با استفاده از دستگاه (PW1730, Philips (Netherlands) در آن لود شده و سپس ولتاژ ۴۰ KV و جریان ۴۰ mA دستگاه توسط لامپ cuka در دما ۱۰۰ تا ۱۰۰ درجه برای شناسایی ماهیت نانوذرات برقرار گردید (Javan et al., 2020). در نمودار طیفی XRD پیک های تیز نشان دهنده اندازه بلورک در مقیاس نانو هستند.

$$D = 0.9 \lambda / \beta \cos \theta$$

در این رابطه، λ طول موج پرتو X، β پهنای پیک در نیمه ارتفاع بیشینه (FWHM) بر حسب رادیان و θ زاویه پراش براگ است.

به منظور بررسی ریخت شناسی و اندازه نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال در این پژوهش از

Aeromonas hydrophila نیز یک باکتری متحرک گرم منفی و میله ای شکل است و بیشتر در آب های شور یافت می شود. طیف گسترده ای از عفونت ها شامل مننژیت و اندوکاردیت را در انسان ایجاد می کند و همچنین نقش مهمی در بیماری زایی برای ماهی ها، قورباغه ها و دیگر حیوانات آبی دارد (Kashhedikar and Chhabra, 2010). *Fusarium solani* مسئول اپیزوتیک های فاجعه آمیز در سخت پوستان آب شیرین و آب شور است و عمدتاً بر روی آبشش ها و کوتیکول تاثیر می گذارد. این قارچ از ضایعات با آبشش های سیاه نوعی میگوی پرورشی نیز جدا شده است (Mostafa Mahmoud, 2019). لذا این مطالعه با هدف سنتز نانوذرات اکسید نیکل به روش هیدروترمال و بررسی خواص ضد میکروبی و ضد قارچی آنها بر علیه باکتری های / استرپتوکوکوس / اینیایی و آئروموناس هیدروفیلا و قارچ فوزاریوم سولانی برای پیشگیری از ورود آنها به محیط زیست و مقابله با عفونت های ناشی از کلونیزاسیون آنها در برخی از جانوران نظیر ماهی ها و همینطور توقف تولید انواع توکسین در آنها، برای اولین بار به مرحله اجرا در آمد.

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات اکسید نیکل به روش هیدروترمال

در این پژوهش از نیترات نیکل شش آب، پلی اتیلن گلیکول و اوره به منظور تهیه نانوذرات اکسید نیکل استفاده گردید. مقدار ۷ گرم نیترات نیکل را به ۲۰ میلی-لیتر آب مقطر افزوده و سپس به وسیله همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت هم زده شد. در مرحله بعد ۱/۵ گرم سورفاکتانت و اوره به محلول اضافه گردید. پس از آن محلول را به راکتور انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. رسوب بدست



دستگاه FESEM مدل MIRA II ساخت کشور جمهوری چک استفاده گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا در ولتاژ زیر ۳۰ KV و تحت فشار خلاء (10^{-5} Torr) مورد تصویربرداری FE-SEM قرار گرفتند. طی آنالیز EDS در مطالعه حاضر، مقدار ۰/۰۲ گرم از نانوذرات اکسید نیکل را در دستگاه FESEM مدل MIRA II ساخت کشور جمهوری چک لود نموده و خروجی های مرتبط با آن ثبت گردید (Javadi, Mohammadzadeh and Aghaeinejad-Meybodi, 2023). در روش طیف سنجی FT-IR، پرتو مادون قرمز (IR) از نمونه عبور می کند. بخشی از اشعه مادون قرمز توسط نمونه جذب و بخشی دیگر از داخل آن عبور می کند. در نتیجه طیف ها بر اساس جذب و عبور IR، خواص مولکول های نمونه را نشان می دهند. در این تحقیق از حالت جامد نمونه برای انجام آزمایش استفاده شده است، بدین ترتیب که مقدار ۱ میلی گرم از نمونه جامد را که کامل پودر شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ با پتاسیم برمید کاملاً خشک، مخلوط کرده و سپس مقداری از آن ها را در قالب فلزی مخصوص ریخته و با دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار قرار می دهیم تا یک قرص شفاف به دست آید. سپس از دستگاه (AVATAR, Thermo (USA جهت خوانش نمونه ها در ناحیه طیف IR میانه ($4000-400$ cm⁻¹) استفاده گردید (Venkatachalapathy et al., 2022).

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید نیکل

از سوش های استاندارد باکتری های /استرپتوکوکوس /ینیایی (PTCC 1887)، آئروموناس هیدروفیلا (PTCC 1890) و قارچ فوزاریوم سولانی (IBRC-M 30506)

تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، به منظور ارزیابی های ضد میکروبی نانوذرات اکسید نیکل استفاده گردید. در ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری و قارچ مورد آزمایش، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند (1×10^8 cfu/ml) تهیه گردید.

بررسی حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک

پس از کشت و آماده سازی نمونه های باکتری، حساسیت آنها نسبت به چند آنتی بیوتیک با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد آزمون قرار گرفت. بدین منظور برای باکتری /استرپتوکوکوس /ینیایی آنتی-بیوتیک های پنی سیلین (P)، ریفامپین (RA)، مروپنم (Men) و تتراسایکلین (Te) و برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا آنتی بیوتیک های جنتامایسین (GM) و سفنازیدیم (CAZ) در نظر گرفته شد. در این مرحله پس از تهیه غلظت نیم مک فارلند از سویه های باکتریایی، کشت آن ها در محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت. دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی پلیت ها قرار داده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در نهایت با اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد تشکیل شده، نتایج پس از مقایسه با جداول استاندارد CLSI 31st Edition 2021، گزارش گردید (Puneeth et al., 2022).

بررسی اثر ضد میکروبی به روش چاهک (Agar well diffusion)

از هر یک از سوش های باکتریایی /استرپتوکوکوس و آئروموناس، پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند با استفاده از محلول نمکی فیزیولوژیک، به کمک سواب پنبه ای استریل، کشت به



به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شدند و پس از طی این مدت، چاهک ها از نظر وجود کدورت باکتریال تفسیر گردید. جهت اندازه گیری حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) نیز از چاهک هایی که در مرحله تعیین MIC، رشد باکتری در آنها مشاهده نشده بود بر روی محیط کشت آگار تلقیح گردید و در صورت عدم رشد کلنی باکتریایی در پلیت، کمترین غلظت مربوط به چاهک ها، به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی سنجش و به ثبت رسید (Ilbeigi, Kariminik and Moshafi, 2019).

نتایج

در طی سنتز نانوذرات اکسید نیکل به روش هیدروترمال، پس از خشک کردن آن، پودری سیاه رنگ حاصل شد که به عنوان نانوذرات اکسید نیکل جهت انجام مراحل بعدی در ظرف شیشه ای در بسته نگهداری گردید.

در ارزیابی نانوذرات اکسید نیکل به روش XRD همانطور که در نمودار شکل ۱ مشاهده می شود، برطبق استاندارد JCPDS No: 65-2901، در نواحی 75° - 79° - 63° - 43° - 37° 2θ طیف جذبی نانوذرات اکسید نیکل، پیک های واضحی وجود دارد که از دلایل تأیید و صحت سنتز موفق این نانوذرات می باشد. آنالیز ساختاری نشان می دهد که نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال در این مطالعه دارای ساختار بلوری با شاخص های میلر (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) در شبکه مکعبی (FCC) است. همچنین وجود قله های تیز در الگوها نشان دهنده میزان بالایی از خصلت بلورینگی برای این نانوذرات می باشد (Ramírez-Meneses et al., 2014).

صورت یکنواخت در محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت. سپس چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط های کشت حفر شده و مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت های ۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۸، ۶، ۴ میلی گرم در میلی لیتر نانوذرات اکسید نیکل به داخل چاهک ها انتقال داده شد.

برای قارچ فوزاریوم نیز روش مشابه و در محیط سابرو دکستروز آگار انجام پذیرفت با این تفاوت که غلظت های به کار رفته از نانوذرات معادل ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود.

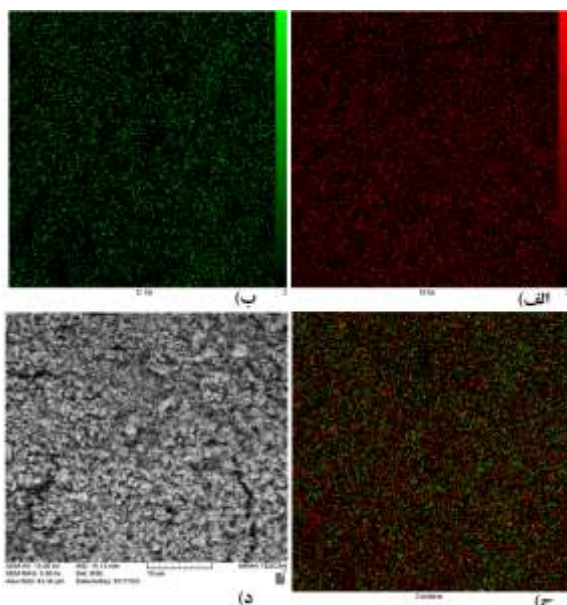
پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شدند و پس از طی این مدت قطر هاله های عدم رشد، اندازه گیری و ثبت گردید (Athanasiadis et al., 2009).

بررسی اثر ضد باکتریایی به روش میکرودايلوشن (MIC و MBC)

در این روش حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری های مورد بررسی توسط نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده اندازه گیری و تعیین گردید. روش کار بدین صورت بود که همانند متد چاهک، از هر کدام از سوش های پاتوژن تهیه شده، سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک فارلند، تهیه گردید. سپس رقت های سریالی از نانوذره تهیه شد. این رقت ها در ۱۰ خانه از چاهک الایزا که هر کدام حاوی محیط کشت براث بودند اضافه شده و به ترتیب ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶ و ۰ در نظر گرفته شدند. لذا غلظت های (بر حسب $\mu\text{g/ml}$) معادل ۴۰۹۶، ۲۰۴۸، ۱۰۲۴، ۵۱۲ و ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۰ برای نانوذرات اکسید نیکل حاصل گردید. سپس به هر کدام از چاهک ها و نیز چاهک شاهد (غلظت صفر) از سوسپانسیون باکتری های مربوطه افزوده شد. کنترل منفی حاوی محیط کشت می باشد. میکروپلیت ها

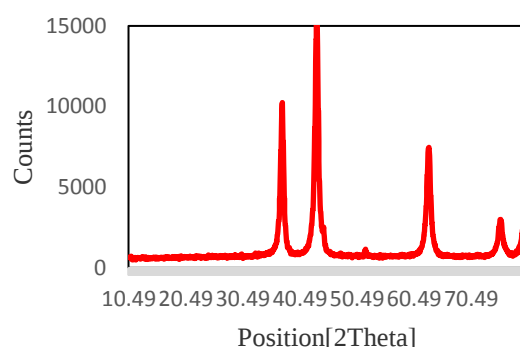


EDS (Mapping)، توزیع ذرات اکسیژن و نیکل به صورت مجزا و در ترکیب باهم را نشان داد.

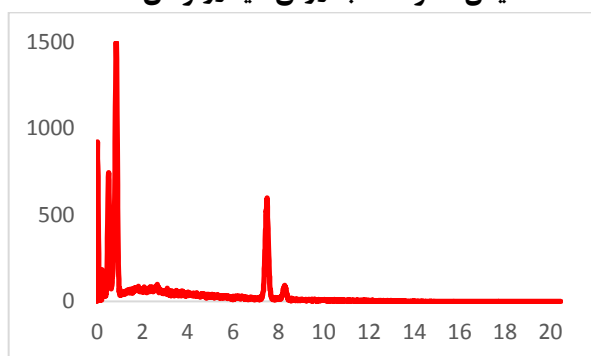


شکل ۳: تصاویر مربوط به Mapping آنالیز EDS نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال. (الف) نیکل (ب) اکسیژن (ج) در ترکیب باهم (اکسید نیکل) (د) تصویر SEM در مقیاس ۱۰ میکرومتر (بزرگنمایی ۵/۰۰ kx)

شناسایی گروه‌های عملکردی موجود در نانوذرات اکسید نیکل و گروه‌های احیا کننده یونی موجود در آن در محدوده $400-4000\text{ cm}^{-1}$ نشان داد، وجود پیک در طول موج های 478 cm^{-1} ، 628 cm^{-1} و 717 cm^{-1} به اتصالات نیکل با اکسیژن (Ni-O) مرتبط است. همچنین پیک قوی 833 cm^{-1} مربوط به حضور مولکول‌های آب است که به خوبی حذف نشده‌اند. پیک‌های پهن و قوی در 1234 cm^{-1} تا 1465 cm^{-1} با ارتعاشات گروه‌های کربنات موجود در نانوذره در ارتباط می‌باشد. علاوه بر آن پیک-هایی در محدوده 3363 cm^{-1} تا 3594 cm^{-1} مشاهده می‌شود که دلیل آن ارتعاشات کششی O-H داخل مولکولی بین مولکول آب جذب شده و عنصر اکسیژن در اکسید نیکل می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۱. طیف مربوط به آنالیز XRD نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال

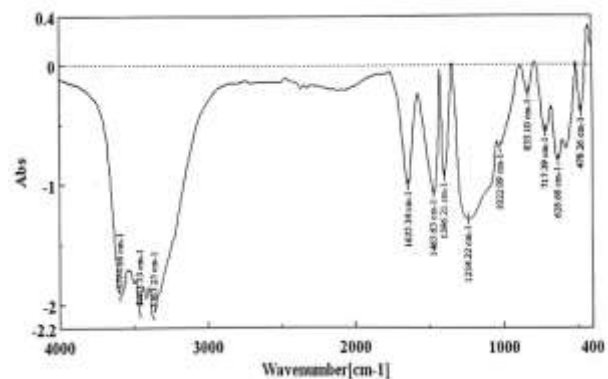


شکل ۲: طیف مربوط به آنالیز EDS نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال

همچنین شناسایی فازهای موجود در نانوذرات اکسید نیکل و آنالیز عناصر موجود در نمونه سنتز شده با استفاده از EDS، نشان داد پیک‌های قوی موجود در نواحی با پتانسیل ورودی حدود ۱، ۷/۵ و ۸/۵ کیلو الکترون ولت (KeV) نشان دهنده بیشترین میزان عنصر نیکل بود. سیگنال قوی دیگر موجود مربوط به اکسیژن در ترکیب نانوذره اکسید نیکل بود که در نقطه 0.5 KeV حاصل شد. پیک‌های ضعیف دیگر قابل مشاهده در نمودار EDS مربوط به ترکیبات آلی و معدنی و ناخالصی‌های موجود در محلول نانوذرات اکسید نیکل بود (Makhlof et al., 2022) مشخص شد که ۷۲/۴۵ درصد نیکل و ۲۷/۵۵ درصد اکسیژن در نمونه وجود دارد (شکل ۲). همچنین آنالیز نقشه برداری

اثر نانوذرات اکسید نیکل بر روی میکروارگانیزم های آلوده کننده موجودات... (نعیم آبادی و همکاران)..... ۱۳۷.

طیف سنجی نور مرئی - فرابنفش آنالیز در محدوده‌ی ۱۹۰ تا ۹۰۰ نانومتر انجام گرفت که نانوذرات اکسید نیکل بیشترین جذب را در طول موج ۱۹۰ نانومتر و کمترین جذب را در طول موج ۲۳۷ نانومتر نشان دادند که این نشان دهنده وجود نانوذرات سنتز شده درون محلول می باشد. افزایش جذب به تدریج در سراسر طیف مرئی ادامه می‌یابد اما در پایان ناحیه UV رو به کاهش می‌رود (شکل ۴).

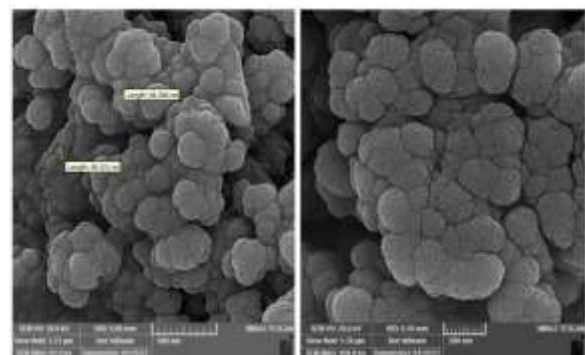


شکل ۴. طیف مربوط به آنالیز FT-IR نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال

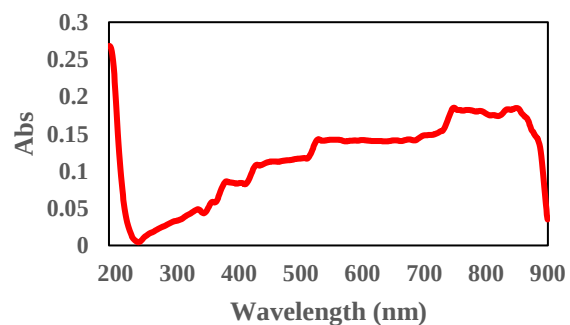
ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید نیکل

در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها مشخص گردید که از میان آنتی بیوتیک های مورد بررسی بر روی جدایه /ستریتوکوکوس/ینیایی، بیشترین حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ریفامپین با قطر ۲۵ میلی متر بود. آنتی بیوتیک های مروپنم و تتراسایکلین به ترتیب با قطر هاله ۲۲ و ۱۶ میلی متر بازدارندگی ارائه دادند که قطر ثبت شده برای تتراسایکلین کمتر از حد ایجاد حساسیت گزارش شده توسط CLSI بوده و باکتری /ستریتوکوکوس/ینیایی نسبت به آن مقاوم در نظر گرفته شد. همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی برای این باکتری در مقابل پنی سیلین و با عدم بروز قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید.

برای آئروموناتس هیدروفیلا نیز هر دو آنتی بیوتیک جنتامایسین (GM) و سفتازیدیم (CAZ) قطر هاله مناسبی داشتند و بر روی این باکتری بازدارنده بوده و ایجاد حساسیت کامل نمودند (جدول ۱).



شکل ۵. تصاویر مربوط به بررسی مورفولوژیک نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده طی آنالیز FESEM



شکل ۶. طیف مربوط به آنالیز UV-vis نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده به روش هیدروترمال

بررسی میکروسکوپ الکترونی FESEM نشان داد اندازه تقریبی نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده در محدوده بین ۶۶/۹۹۶ تا ۹۹/۵۳۱ نانومتر بوده است. علاوه بر آن معلوم گردید که نانوذرات بیشتر به شکل کروی می باشد (شکل ۵).

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده (بر حسب میلی متر)

نوع آنتی بیوتیک						سوش باکتری
سفتازیدیم	جنتامایسین	تتراسایکلین	مروپنم	ریفامپین	پنی سیلین	
-	-	۱۶	۲۲	۲۵	۰	استرپتوکوکوس اینیایی
۳۰	۲۵	-	-	-	-	آئروموناس هیدروفیلا

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد باکتریایی ایجاد شده توسط نانوذرات اکسید نیکل در روش چاهک (میلی متر)

غلظت های مختلف نانوذره ($\frac{mg}{ml}$)									سوش باکتری
۱۰۰	۸۰	۶۰	۴۰	۲۰	۱۰	۸	۶	۴	
۱۴	۱۴	۱۳	۱۱	۱۱	۰	۰	۰	۰	استرپتوکوکوس اینیایی
۱۲	۱۲	۱۲	۱۱	۱۱	۰	۰	۰	۰	آئروموناس هیدروفیلا

جدول ۳: قطر هاله عدم رشد قارچی ایجاد شده توسط نانوذرات اکسید نیکل در روش چاهک (میلی متر)

غلظت های مختلف نانوذره ($\frac{mg}{ml}$)				قارچ
۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	
۰	۰	۰	۰	فوزاریوم سولانی

۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و کمتر از آن نیز هیچ تأثیری در این روش بر روی باکتری مذکور نداشت (جدول ۲ و ۳).

برای آئروموناس هیدروفیلا نیز هر ۵ غلظت نانوذرات اکسید نیکل بازدارنده بود اما این بازدارندگی کمی ضعیف تر ارزیابی گردید. به طوری که غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن همگی قطر هاله ای به اندازه ۱۲ میلی متر و دو غلظت ۴۰ و ۲۰ نیز هر دو قطر ۱۱ میلی متری بر رشد باکتری آئروموناس داشتند. همچنین غلظت های کمتر از آن بر روی این باکتری بی تأثیر بود.

ارزیابی تأثیرات ضدقارچی نانوذرات اکسید نیکل نیز حاکی از آن بود که قارچ فوزاریوم سولانی نسبت به هیچ یک از غلظت های ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم به کار رفته نانوذره حساس نبود و قطر هاله عدم رشد ناچیزی مشاهده گردید. لذا می توان گفت که نانوذرات اکسید نیکل،

جدول ۴: نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتریایی برای نانوذرات اکسید نیکل (بر حسب $\mu g/ml$)

MBC	MIC	سوش باکتری
۱۰۲۴	۱۰۲۴	استرپتوکوکوس اینیایی
۴۰۹۶	۴۰۹۶	آئروموناس هیدروفیلا

به منظور تعیین اثر ضد باکتری نانوذرات اکسید نیکل بر علیه سوش های استاندارد باکتری مورد مطالعه، مشخص گردید، باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به آئروموناس حساسیت بیشتری در حضور نانوذره داشته و در غلظت های ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با ۱۴ میلی متر قطر، از رشد در محیط کشت باز می ماند. در غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر، این مقدار بازدارندگی ۱۳ میلی متر بوده و دو غلظت ۴۰ و ۲۰ نیز با قطر هاله ۱۱ میلی متری، رشد استرپتوکوکوس را مهار کردند. غلظت



طی این روش مورد بررسی و علیه این سوش استاندارد، اثر ضد قارچی بسیار ناچیزی داشته است. در بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری، مطابق نتایج حاصله، اثر چندانی طی این روش و در غلظت های تهیه شده از نانوذرات بر روی بازدارندگی رشد باکتری ها مشاهده نگردید و اکثر باکتری ها توانایی رشد در حضور غلظت های مختلف نانوذره اکسید نیکل در محیط کشت را داشتند. با این حال بیشترین تأثیر بازدارندگی نانوذره در غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر و بر روی گونه گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی بود که این مقدار به عنوان MIC علیه باکتری مذکور به ثبت رسید. برای سوش گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا نیز غلظت ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر در محیط مایع بازدارنده بود. مقادیر مربوط به حداقل غلظت کشنده نیز برای هر دو باکتری مشابه حداقل غلظت بازدارنده آنها بود و لذا MBC نانوذرات اکسید نیکل نسبت به سوش های استرپتوکوک و آئروموناس، مشابه MIC آنها و به ترتیب برابر ۱۰۲۴ و ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی گردید.

بحث

در این مطالعه نانوذرات اکسید نیکل با استفاده از روش هیدروترمال سنتز گردید. تکنیک هیدروترمال به دلیل ماهیت آسان و همه جانبه آن و نیز سنتز کنترل شده نانوذرات با خلوص و پراکندگی مناسب، یکی از بهترین روش ها برای سنتز نانوذرات می باشد. این در حالی است که برخی روش های شیمیایی یا فیزیکی سنتز، ممکن است اثرات نامطلوبی بر سلامت و محیط زیست بر جای گذارده و حین سنتز، مصرف انرژی بالایی داشته باشند (Al-Shawi et al., 2021; Rheima et al., 2021).

نتایج مطالعه ما بر تولید نانوذرات اکسید نیکل تولید شده به روش هیدروترمال نشان داد که بیشترین میزان جذب را طی تکنیک UV-vis در طول موج ۱۹۰ نانومتر نشان می دهند که این امر به نوعی مؤید وجود نانوذرات و تأیید فرآیند سنتز، در محلول به کار رفته می باشد. جهت تشخیص اتصالات به وجود آمده بین نیکل و اکسیژن در نانوذرات اکسید نیکل و نوع دیگری از ارزیابی های تحلیلی فرآیند سنتز، تکنیک FT-IR مورد استفاده قرار گرفت که طی آن وقوع این اتصالات به همراه پیوند ها و مولکول های دیگر موجود در محلول حاوی نانوذره محرز گردید. همچنین آنالیز XRD، ساختار بلوری و کریستالیزاسیون نانوذرات اکسید نیکل در خلوصی بسیار مناسب، را تأیید نمود. بررسی ویژگی های ضد میکروبی نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده نشان داد تأثیر بازدارندگی نانوذره در غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر و بر روی گونه گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی بود که این مقدار به عنوان MIC علیه باکتری مذکور به ثبت رسید. برای سوش گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا نیز غلظت ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر در محیط مایع بازدارنده بود. به عبارت دیگر گونه گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی با وجود مقاومت بیشتر نسبت به آنتی بیوتیک ها، در هر دو روش ضد میکروبی به کار رفته، یعنی تعیین قطر هاله بازدارنده و نیز حداقل غلظت های بازدارنده و گشوده، حساسیت بیشتری را نسبت به نانوذرات در مقایسه با گونه گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا داشت.

در پژوهش انجام شده توسط Khashan و همکاران، محلول کلوئیدی نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده از طریق نوعی تکنیک فرسایشی بر روی نیکل غوطه ور در آب، مورد مطالعه قرار گرفت. یافته های این مطالعه نشان



نانوذرات خالص نشان می‌دهند (Alam et al., 2023).

در مطالعه Ilbeigi و همکاران، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید نیکل در برابر برخی از سویه های باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات اکسید نیکل با استفاده از روش مایکروویو سنتز شدند. مشخص گردید در بین سویه های باکتریایی، بیشترین حساسیت در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با MIC و MBC به ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۷۸ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. این باکتری به سفازولین، اریترومايسين، ریفامپيسين، آمپی سیلین، پنی سیلین و استرپتومايسين مقاومت بالایی داشت (Ilbeigi, Kariminikand Moshafi, 2019).

Ghetas و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش شیمیایی و بیولوژیکی در برابر *Streptococcus agalactiae* و *Aeromonas hydrophila* جدا شده از ماهی تیلاپیا پرداختند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تولید بیولوژیکی سبز نانوذرات نقره ایمن تر و موثرتر از روش شیمیایی در برابر باکتری های جداسازی شده از آبزیان می باشد (Ghetas et al., 2022). همچنین Shaalan و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان نمودند که نانوذرات نقره رشد *A. salmonicida* و *A. invadans* که جزء پاتوژن های آبزیان می باشند را در غلظت ۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر مهار کردند. نانوذرات اکسید روی رشد *A. salmonicida*، *Y. ruckeri* و *A. invadans* را به ترتیب در غلظت های ۱۵/۷۵، ۵/۳۱ و ۳/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر مهار کردند (Shaalan et al., 2017).

می‌دهد که نانوذرات اکسید نیکل می‌توانند نفوذپذیری دیواره سلولی در باکتری ها را تقویت کرده و تجمع آنتی بیوتیک آموکسی سیلین را در آن ها به طور قابل توجهی افزایش دهند، که خود حاکی از تأثیرات سینرژیستی (هم افزایی) نانوذرات اکسید نیکل به همراه آموکسی سیلین بر مهار رشد سویه های باکتریایی بوده است (Khashan et al., 2016). در پژوهش ما اثرات سینرژیستی نانوذرات اکسید نیکل با مواد یا متابولیت های دیگر نظیر آنتی بیوتیک ها بررسی نگردید اما حساسیت گونه های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها سنجش شد. همچنین با مطابقت نتایج دو مطالعه، می‌توان به این نکته پی برد که گونه های گرم مثبت حساسیت بیشتری در حضور نانوذرات اکسید نیکل ارائه می دهند که این امر با ساختار دیواره سلولی آن ها و تک لایه بودن آن مرتبط می باشد. بطور کلی تصور می شود که نانوذرات اکسید نیکل به دلیل نیروهای الکترواستاتیکی باعث چسبندگی و زیست فعالی می شود. از آنجایی که دیواره های سلولی باکتری ها مولکول هایی با بار منفی هستند، هدف بالقوه یون های Ni^{2+} قرار می گیرند که از نانوذرات اکسید نیکل آزاد می شوند (Isticato and Ricca, 2016).

در مطالعه Alam و همکاران، نانوذرات اکسید نیکل پوشش داده شده با مولیبدن (Mo) با استفاده از یک روش سونوشیمیایی ساده سنتز شدند. این نانوذرات از نظر فعالیت ضد باکتریایی در برابر سویه های باکتریایی گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) و گرم منفی (*پسودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی*) نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که طبق نتایج مشخص گردید نانوذرات اکسید نیکل دوپ شده با مولیبدن فعالیت ضد باکتریایی بهتری در مقایسه با



نویسندگان هیچ گونه تعارض ندارند.

منابع

1. Agnew, W. and Barnes, A.C. (2007) 'Streptococcus iniae: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination', *Veterinary microbiology*, 122(1-2), pp. 1-15.
2. Al-Shawi, S.G. et al. (2021) 'Synthesis of NiO nanoparticles and sulfur, and nitrogen co doped-graphene quantum dots/nio nanocomposites for antibacterial application', *Journal of Nanostructures*, 11(1), pp. 181-188.
3. Alam, M.W. et al. (2023) 'Effect of Mo doping in NiO nanoparticles for structural modification and its efficiency for antioxidant, antibacterial applications', *Scientific reports*, 13(1), p. 1328.
4. Ali, A.A. et al. (2019) 'Fabrication of solar cells using novel micro-and nano-complexes of triazole schiff base derivatives', *Journal of Southwest Jiaotong University*, 54(6).
5. Athanassiadis, B. et al. (2009) 'An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an agar well diffusion assay', *Australian dental journal*, 54(2), pp. 141-146.
6. Deshpande, M.P. et al. (2016) 'Structural, thermal and optical properties of nickel oxide (NiO) nanoparticles synthesized by chemical precipitation method', *Advanced Materials Research*, 1141, pp. 65-71.
7. Galdiero, S. et al. (2015) 'Antimicrobial peptides as an opportunity against bacterial diseases', *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), pp. 1665-1677.
8. Ghetas, H.A. et al. (2022) 'Antimicrobial activity of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles against some fish pathogens', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), pp. 1298-1305.

در این مطالعه بیشترین تأثیر بازدارندگی نانوذره در غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر در گونه گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی نانوذرات اکسید نیکل مطابق MIC برابر ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید نیکل را می توان به یون های نیکل آزاد شده از نانوذره نسبت داد. این یون های آزاد شده، نفوذپذیری غشاء را بیشتر کرده و استرس اکسیداتیو را افزایش می دهند که به نوبه خود باعث فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی می شود (Kim et al., 2007; Shaalan et al., 2017).

نتیجه گیری

طی این پژوهش سنتز نانوذرات اکسید نیکل از طریق تکنیک هیدروترمال که ماهیت ساده ای داشته و روشی قابل کنترل به خصوص برای ذرات دارای خواص کریستالی بالا و همگن دارد، صورت گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، سنتز بهینه نانوذرات اکسید نیکل در طول موج ۱۹۰ نانومتر، با اتصالات و پیوندهای مناسب بین عناصر اکسیژن و نیکل، ساختار بلوری مشخص در اندازه بین ۶۶ تا حدود ۱۰۰ نانومتر و تقریباً کروی شکل با خلوص قابل قبول، انجام پذیرفت. همچنین مشخص شد که ۷۲/۴۵ درصد نیکل و ۲۷/۵۵ درصد اکسیژن در نمونه وجود دارد. نتایج مطالعه حاضر نقش بالقوه نانوذرات اکسید نیکل تولید شده به روش هیدروترمال را به عنوان عوامل ضد باکتریایی، نشان داد. بنابراین شاید بتوان از آنها به عنوان عوامل ضد عفونی کننده آب ها جهت کنترل سوش های باکتری آلوده کننده آبزیان و همچنین در صنایع مختلف زیست محیطی استفاده نمود.

تعارض منافع



18. Magaye, R. and Zhao, J. (2012) 'Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles' genotoxicity and carcinogenicity', *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(3), pp. 644–650.
19. Makhlof, M.E.M. et al. (2022) 'Suppression effect of *Ulva lactuca* selenium nanoparticles (USeNps) on HepG2 carcinoma cells resulting from degradation of epidermal growth factor receptor (EGFR) with an evaluation of its antiviral and antioxidant activities', *Applied Sciences*, 12(22), p. 11546.
20. Mostafa Mahmoud, M. (2019) 'Fusarium solani infection of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)', *Assiut Veterinary Medical Journal*, 65(161), pp. 50–59.
21. Nisar, P. et al. (2019) 'Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action', *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24, pp. 929–941.
22. Puneeth, T.G. et al. (2022) 'Large scale mortality in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): natural co-infection with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae*', *Iranian Journal of Veterinary Research*, 23(3), p. 219.
23. Radzig, M.A. et al. (2013) 'Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, pp. 300–306.
24. Rahaiee, S. et al. (2020) 'Green synthesis, characterization, and biological activities of saffron leaf extract-mediated zinc oxide nanoparticles: a sustainable approach to reuse an agricultural waste', *Applied Organometallic Chemistry*, 34(8), p. e5705.
25. Ramírez-Meneses, E. et al. (2014) 'Synthesis and electrochemical
9. Gomaji Chaudhary, R. et al. (2015) 'Synthesis of nickel nanoparticles: Microscopic investigation, an efficient catalyst and effective antibacterial activity', *Advanced Materials Letters*, 6(11), pp. 990–998.
10. Ilbeigi, G., Kariminik, A. and Moshafi, M.H. (2019) 'The antibacterial activities of NiO nanoparticles against some gram-positive and gram-negative bacterial strains', *International Journal of Basic Science in Medicine*, 4(2), pp. 69–74.
11. Imran Din, M. and Rani, A. (2016) 'Recent advances in the synthesis and stabilization of nickel and nickel oxide nanoparticles: a green adeptness', *International journal of analytical chemistry*, 2016.
12. Isticato, R. and Ricca, E. (2016) 'Spore surface display', *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, pp. 349–366.
13. Javadi, M., Mohammadzadeh, H. and Aghaeinejad-Meybodi, A. (2023) 'Structural characterization, lattice features, and optical, and magnetic properties of Ni-Cr oxide nanocomposite'.
14. Javan, H. et al. (2020) 'Nickel nanoparticles decorated on carbon quantum dots as a novel non-platinum catalyst for methanol oxidation; a green, low-cost, electrochemically-synthesized electrocatalyst', *Chemical Engineering Science*, 217, p. 115534.
15. Kaskhedikar, M. and Chhabra, D. (2010) 'Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish', *Food Microbiol*, 28, pp. 157–168.
16. Khashan, K.S. et al. (2016) 'Synthesis, characterization and antibacterial activity of colloidal NiO nanoparticles.', *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29(2).
17. Kim, J.S. et al. (2007) 'Antimicrobial effects of silver nanoparticles', *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 3(1), pp. 95–101.



- against microbes associated with diseases in aquaculture', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, pp. 2491–2502.
32. Taheri, A., Ziaadini, M. and Gahramzei, M. (2020) 'Antibacterial activity of zinc aluminate nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria of *E. coli* and *P. aeruginosa*', *Food Hygiene*, 10(2 (38)), pp. 95–108.
 33. Tran, T.T.B., Park, E.-J. and Son, J.-T. (2024) 'Optimization of hydrothermal synthesis of nickel oxide with flower-like structure', *Korean Journal of Chemical Engineering*, pp. 1–6.
 34. Venkatachalapathy, M. *et al.* (2022) 'Synthesis, morphological, structural, functional, optical and computational properties of nickel oxide nanoparticles using hydrothermal method', *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 17(4).
 35. Xing, K. *et al.* (2015) 'Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review', *Agronomy for Sustainable Development*, 35, pp. 569–588.
 36. Zarenezhad, E. *et al.* (2022) 'Nickel nanoparticles: applications and antimicrobial role against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections', *Antibiotics*, 11(9), p. 1208.
 - characterization of Ni nanoparticles by hydrazine reduction using hydroxyethyl cellulose as capping agent', *Electrochimica Acta*, 127, pp. 228–238.
 26. Rheima, A.M. *et al.* (2021) 'Evaluation of anti-biofilm formation effect of nickel oxide nanoparticles (NiO-NPs) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(4), pp. 221–230.
 27. Rice, L.B. (2009) 'The clinical consequences of antimicrobial resistance', *Current opinion in microbiology*, 12(5), pp. 476–481.
 28. Shaalan, M.I. *et al.* (2017) 'In vitro assessment of the antimicrobial activity of silver and zinc oxide nanoparticles against fish pathogens', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59, pp. 1–11.
 29. Song, X. and Gao, L. (2008) 'Facile synthesis and hierarchical assembly of hollow nickel oxide architectures bearing enhanced photocatalytic properties', *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(39), pp. 15299–15305.
 30. Sood, S. *et al.* (2015) 'Highly effective Fe-doped TiO₂ nanoparticles photocatalysts for visible-light driven photocatalytic degradation of toxic organic compounds', *Journal of colloid and interface science*, 450, pp. 213–223.
 31. Swain, P. *et al.* (2014) 'Antimicrobial activity of metal based nanoparticles

The impact of nickel oxide nanoparticles on microorganisms contaminating aquatic organisms

B Asal Naeimabadi¹, Mina Ramezani^{2*}, Ramin Mohammadi-Aloucheh³

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

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

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

Abstract

The increasing emergence of antibiotic resistance among common microorganism species has prompted the scientific community to search for new antimicrobial agents. Among these, metallic nanoparticles have been utilized as antimicrobial agents against various bacterial species. The aim of this study was to synthesize nickel oxide nanoparticles by the hydrothermal method and investigate their antimicrobial properties. Nickel oxide nanoparticles were synthesized by the hydrothermal method, and XRD, EDX, SEM, FTIR, and UV-vis analyses were performed to evaluate the physical and chemical properties of these nanomaterials. The antimicrobial and antifungal activities against the gram-positive bacterium *Streptococcus iniae*, the gram-negative bacterium *Aeromonas hydrophila*, and the fungus *Fusarium solani* were assessed using MIC and MBC assays and well diffusion method. Optimum synthesis of nickel oxide nanoparticles was achieved at a wavelength of 190 nanometers, with appropriate connections and bonds between oxygen and nickel elements, a crystalline structure with a size ranging from 66 to approximately 100 nanometers, and a nearly spherical shape with acceptable purity. Based on the antibiotic resistance of the standard strains *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila*, the MIC of nanoparticles against *Streptococcus iniae* was determined to be 1024 micrograms per milliliter, and for the gram-negative strain *Aeromonas hydrophila*, the concentration was 4096 micrograms per milliliter. The corresponding MBC values of nickel oxide nanoparticles were similar to their MIC values. Furthermore, evaluations of the antifungal activity of nickel oxide nanoparticles indicated limited effects against *Fusarium solani*. In conclusions, Considering that *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila* and *Fusarium solani* sometimes cause contamination and disease in aquatic environments and resident organisms, the results of this study could be of interest.

Keywords: Nanoparticles, Nickel Oxide, Hydrothermal Synthesis, *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium solani*.

Keywords: Diabetes mellitus, Insulin resistance, Intestinal microbiota, Inflammation, Fatty acid oxidation

* Corresponding author: Mina Ramezani,

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

E. mail: mina.ramezani@gmail.com

