

بررسی اثر باکتری کشی سرم گاو میش

سعید هاشمی^{۱*} ، مسعود قربانپور نجف آبادی^۲

(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۰)

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری کشی سرم فعال گاو میش بر روی باکتری استافیلوکوکوس ارتوس در فاصله زمانی آبان ماه ۱۳۸۰ تا اردیبهشت ۱۳۸۱، تعداد ۷۸ نمونه خون گاو میش تحت کشتار از کشتارگاه صنعتی دام شهر اهواز جمع آوری گردید. از باکتری استافیلوکوکوس ارتوس، رقت های مختلف بر اساس روش مک فارلند تهیه شد و با حجم های مساوی از سرم حرارت دیده ی غیر فعال و سرم تازه ی گاو میشهای تحت مطالعه به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مجاور گردید و سپس تعداد باکتری های موجود به روش شمارش کلنی در پلیت شمارش گردید. نتایج نشان داد که با آزمون مربع کای و دقت $P < 0.05$ اختلاف آماری معنی داری بین اثر باکتری کشی سرم فعال و حرارت دیده وجود دارد ولی اختلاف آماری معنی داری بین گروه های گاو میش بر حسب سن و جنس دیده نشد.

واژگان کلیدی: گاو میش، سرم فعال ، سرم غیر فعال ، استافیلوکوکوس ارتوس

۱- مربی، گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد ، بروجرد، ایران

۲ - دانشیار ، بخش میکروبیولوژی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: saeedhashemi2000@yahoo.com

مقدمه

فعالیت باکتری کشی غیر اختصاصی سرم ۱۸۳۴ توسط پفیفر شناخته شد (۲). امروزه میدانییم این عمدتا توسط سیستم کمپلمان صورت می گیرد (۵). علاوه بر آن سرم خون واجد ترکیباتی نظیر لیزوزیم و لاکتوفرین و املاح و پروتئین های دیگری است که اثرات باکتری کشی دارند . لیزوزیم در تمام ترشحات و بافتهای بدن بجز مایع مغزی نخاعی وجود دارد. این آنزیم ، اسیل آمینو پلی ساکاریدهای موجود در کپسول برخی از باکتریهای گرم مثبت را تجزیه کرده و با مشارکت کمپلمان برخی از باکتریهای گرم منفی را از بین می برد (۳). لاکتوفرین هم در تمام ترشحات سطوح مخاطی دیده می شود و اثرات ضد ویروس و باکتری دارد. مهمترین نقش لاکتوفرین مهار آهن است و بسیاری از باکتریهای پاتوژن برای رشد و تکثیر نیازمند آهن می باشند (۱۳). گاومیش اهلی داری ویژگیهای خوبی برای پرورش است از جمله با مصرف علوفه با کیفیت پایین، رشد خوبی دارد لذا در صنعت تولید گوشت قرمز توجه به این دام حائز اهمیت است. از آنجا که در مورد سیستم ایمنی گاومیش مطالعات چندانی صورت نگرفته در مطالعه حاضر تاثیر سرم خون این دام بر رشد و تکثیر باکتری استافیلوکوکوس ارئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

در فاصله آبان ماه ۱۳۸۰ تا اردیبهشت ۱۳۸۱ مجموعا ۷۸ نمونه خون گاومیش از کشتار گاه صنعتی اهواز با روش سیستماتیک جمع آوری شد. هر بار که به کشتار گاه مراجعه می شد حدود ۲۰ نمونه خون از طریق ورید جاگولار و قبل از کشتار دام گرفته شده و بلافاصله به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل می گردید . باکتری استاف

ارئوس را در محیط آگار مغذی کشت خالص داده و با سرم فیزیولوژیک استریل یک سوسپانسیون غلیظی از آن تهیه نمودیم که تا پایان آزمایشاتاز آن استفاده می کردیم.

مراحل آزمایش

قبل از نمونه گیری تعداد ۸۰ میکروتیوب و ۲۵ لوله آزمایش برای تهیه نمونه خون و تهیه رفتهای مختلف از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در اتوکلاو قرار گرفته و استریل می شد.

یک روز قبل از نمونه گیری رفتهای $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس تهیه می کردیم به این صورت که ابتدا از سوسپانسیون غلیظ باکتری که از قبل تهیه شده بود رقتی برابر رقت ۱ مک فارلند تهیه می شد سپس در ۴ لوله آزمایش استریل به ترتیب در لوله اول $\frac{4}{9}$ میلی لیتر و در بقیه لوله ها $\frac{4}{5}$ میلی متر سرم فیزیولوژی ریخته می شد آنگاه با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر و سرسمپلر استریل در مجاورت شعله ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با رقت ۱ مک فارلند به لوله اول اضافه شده و با همزن کاملاً مخلوط می شد. سپس توسط پی پت مدرج استریل $\frac{0}{5}$ میلی متر از لوله اول برداشته به لوله دوم افزوده می شد و این روند تا لوله آخر ادامه می یافت بدین ترتیب رفتهای $\frac{1}{50}$ ، $\frac{1}{500}$ ، $\frac{1}{5000}$ ، $\frac{1}{50000}$ تهیه می شد. چون در رفتهای $\frac{1}{50}$ و $\frac{1}{500}$ تعداد باکتریها زیاد و امکان شمارش آنها مشکل بود برای آزمایشات رفتهای $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ استفاده شد.

هر بار ۲۰ نمونه خون از کشتارگاه تهیه و در آزمایشگاه سرم آنها با سانتریفوژ دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه جدا می شد و نمونه ها بر حسب سن و جنس در چهار گروه قرار می گرفت . ۳ میلی لیتر از هر سرم را با قرار دادن در دمای ۵۶ درجه به مدت نیم ساعت غیر فعال می کردیم. قبل از انجام

مرحله کشت در پلیت آگار مغذی :

هر پلیت به دو قسمت $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ تقسیم می شد و بنابراین برای گروه سرم فعال ۲۰ پلیت و برای گروه سرم غیر فعال نیز ۲۰ پلیت استفاده می شد. میکروتیوبها از انکوباتور خارج می شد و از آنها در مجاورت شعله کشت داده می شد به طوری که مطابق شماره فرضاً "میکروتیوب A₁ با رقت $\frac{1}{5000}$ و B₁ با رقت $\frac{1}{50000}$ که مربوط به سرم شماره ۱ فعال بود در یک پلیت که به دو قسمت تقسیم می شد کشت می گردید . در پلیت دیگری هم از میکروتیوبهای C₁ و D₁ که مربوط به سرم شماره ۱ غیر فعال بود کشت می گردید و میکروتیوبها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شد و سپس کلنی های موجود در سطح پلیتها با دستگاه کلنی شمار ، شمارش می گردید و نتایج در جدولی که از قبل تهیه شده بود ثبت می گردید و در نهایت نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار می گرفتند و میانگین کاهش رشد باکتریها در سرم فعال و غیر فعال در هر گروه سنی مورد آزمایش محاسبه می شد .

آزمایش ، برای هر نمونه سرم تست آگلوتیناسیون در روی لام انجام می شد. بدین صورت که یک قطره از سرم و یک قطره از سوسپانسیون استاف ارنوس در روی یک لام با هم مخلوط می شد و چنانچه آگلوتینه می شد نمونه سرم حذف می شد و سپس ۸۰ میکروتیوب در ۴ ردیف ۲۰ تایی ، A ، B ، C و D قرار داده می شد و از ۱ تا ۲۰ شماره گذاری می گردید . سپس مطابق شماره لوله آزمایش در هر ردیف در دو میکروتیوب سرم فعال و در دو میکروتیوب سرم غیر فعال ریخته می شد به نحوی که فرضاً "از سرم شماره ۱ ، ۱۰۰ میکرولیتر سرم فعال در میکروتیوب A₁ و ۱۰۰ میکرولیتر سرم فعال در میکروتیوب B₁ ، ۱۰۰ میکرولیتر سرم غیر فعال در میکروتیوب C₁ و ۱۰۰ میکرولیتر سرم غیر فعال در میکروتیوب D₁ قرار داده می شد سپس به ردیف های A ، C ، به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاف ارنوس با رقت $\frac{1}{5000}$ و به ردیفهای D،B نیز ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون $\frac{1}{50000}$ اضافه می گردید بعد درب میکروتیوبها بسته شده و کاملاً" به هم زده می شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می گرفتند.

جدول ۱: گروه های گاومیش تحت مطالعه بر حسب سن و جنس

شماره گروه	سن	جنس	گونه دام	تعداد
۱	>۲/۵	ماده	گاومیش	۲۴
۲	>۲/۵	نر	گاومیش	۱۷
۳	<۲/۵	ماده	گاومیش	۲۰
۴	<۲/۵	نر	گاومیش	۱۷

نتایج

مختلف مربوط به گروههای مختلف در جدول شماره ۲ آورده شده است . همانطوری که در این جدول دیده می شود ، به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین کاهش تعداد باکتری مربوط به گروههای شماره ۴ و ۳ با میانگین ۳۷/۴۱ و ۲۲/۴

در تمامی آزمایشات تعداد باکتری های (کلنی ها) استافیلوکوکوس ارنوس در پلیت های مربوط به سرم فعال کمتر از سرم غیر فعال بود . میانگین کاهش تعداد باکتری ها (کلنی ها) در نمونه های

می باشد یعنی از نظر فعالیت باکتری کشی ، گوساله گاومیش نر فعالیت ترین سرم را دارد و سرم گوساله گاومیش ماده کمترین اثر را دارد که با سطح اطمینان ۹۵٪ هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروههای مختلف مربوط به گاومیش دیده نشد ($P < /0.5$).

جدول ۲: میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم فعال گروههای گاو میش تحت مطالعه

شماره گروه	تعداد نمونه ها	میانگین کاهش تعداد باکتری	انحراف معیار
۱	۲۴	۲۵/۳۷	۲۳
۲	۱۷	۲۳/۵۸	۲۱/۲۷
۳	۲۰	۲۲/۴	۱۹/۴۷
۴	۱۷	۳۷/۴۱	۱۶/۵۹

میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم های فعال گاومیش های هم جنس در جدول شماره ۳ مورد مقایسه قرار گرفته اند که فعال ترین سرم مربوط به جنس نر گاومیش با میانگین کاهش تعداد باکتری ۳۰/۵۰ می باشد و کمترین فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به سرم جنس های ماده گاومیش با میانگین کاهش تعداد باکتری ۲۴/۲ می باشد ولی با سطح اطمینان ۹۵٪ هیچ گونه اختلاف معنی داری بین این گروهها بر حسب جنس دیده نشد ($P < /0.5$).

جدول ۳: مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم فعال گاومیش بر حسب جنس

شماره گروه	تعداد نمونه ها	میانگین کاهش تعداد باکتری	انحراف معیار
۳و۱	۴۴	۲۴/۲	۲۱/۲۸
۴و۲	۳۴	۳۰/۵۰	۲۰/۰۵

میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم فعال گاومیش های هم سن در جدول شماره ۴ مورد مقایسه قرار گرفته اند که مطابق این جدول فعال ترین سرم مربوط به گاومیش های جوان (سن کمتر از ۲/۵ سال) با میانگین کاهش تعداد باکتری ۲۹/۲۹ می باشد و کمترین فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به سرم گاومیشهای مسن (سن بالای ۲/۵ سال) با میانگین کاهش تعداد باکتری ۲۴/۶۳ می باشد که البته تحلیل آماری معنی دار بودن آن را به اثبات نرسانده است ($P < /0.5$).

جدول ۴: مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم فعال گاومیش با حسب سن

شماره گروه	تعداد نمونه	میانگین کاهش تعداد باکتری	انحراف معیار
۲و۱	۴۱	۲۴/۶۳	۲۲/۰۴
۴و۳	۳۷	۲۹/۲۹	۱۹/۴۹

سرم فعال و غیر فعال گاو میش بر حسب سن و جنس وجود دارد یا خیر؟ که البته بر اساس نتایج اختلاف آماری معنی داری بین گاومیش های نر و

بحث

این مطالعه به این منظور انجام گرفت که مشخص شود آیا تفاوتی بین فعالیت باکتری کشی

آنتی بیوتیک های موثر بر استافیلوکوکوس ارئوس مصرف کرده باشند که عملاً امکان تشخیص و حذف آنها از جمعیت تحت مطالعه وجود نداشت.

نیکول و همکاران (۱۹۷۴) در طی مطالعه ای به این نتیجه رسیده اند که گوساله های هم سن نژاد آبردین آنگوس در مقایسه با نژاد بلک پید مقاومت بیشتری نسبت به باکتری ها دارند که این تفاوت ممکن است ناشی از اثرات متفاوت باکتری کشی سرم این دونژاد باشد (۱۱).

کوربیل و همکاران (۱۹۸۸) و ایزن شنک و همکاران (۱۹۹۵) به بررسی فعالیت اثر باکتری کشی سرم گاوهای غیر ایمن بر روی بروسلاآبورتوس پرداخته اند و نتیجه گرفته اند که سرم های گاوهای غیر ایمن می تواند این باکتری را بکشد (۸و۷). ذکر این نکته ضروری است که در مورد باکتریهای گرم منفی مثل بروسلاآبورتوس از بین رفتن باکتری در اثر سرم فعال ممکن است ناشی از فعال شدن مسیر فرعی دستگاه مکمل باشد که در هر حال جزء ایمنی غیر اختصاصی است. در این مطالعه فعالیت باکتری کش سرم با استفاده از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس مورد ارزیابی قرار گرفت که چون مثبت است در صورتی که در اثر سرم از بین برود مربوط به فعال شدن دستگاه مکمل نیست و سایر اجزاء باکتری کش سرم در این امر دخیل خواهند بود. بهیمانی و همکاران (۱۹۹۹) به ارزیابی اثر لاکتوفرین گاوی بر روی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس پرداخته اند و نتایج مطالعه آنها نشان می دهد که اگر چه این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی اثر باکتری کش ضعیفی دارد ولی در بدن اثر قوی دارد زیرا در مقایسه با گروههای شاهد، تجویز خوراکی و وریدی آن، عفونتهای کلیوی تجربی ناشی از این باکتری را ۶۰-۳۰ درصد و تعداد کلنی های بدست آمده از کشت کلیه ها را ۱۲-۵ برابر کاهش داده است (۴).

ماده ، گاو میش های بالغ و نابالغ و نیز گاو میش های هم سن و هم جنس مشاهده نگردید . اما با سطح اطمینان ۹۵٪ و دقت ۰/۰۵ اختلاف آماری معنی بین فعالیت باکتری کشی سرم فعال و غیر فعال (حرارت دیده) مشاهده شد که بررسیهای متعددی این خاصیت را به اثبات رسانده اند و برخی از ترکیباتی که باعث این خاصیت می گردند نیز شناسایی شده اند. از آنجایی که تمامی سرمهای مورد استفاده قرار گرفته در این مطالعه قبل از آزمایش از نظر وجود پادتن ضد استافیلوکوکوس ارئوس بررسی شده بودند و سرم های واجد پادتن حذف گردیدند ، فعالیت باکتری کشی مشاهده شده را به وجود پادتن (ایمنی اختصاصی) یا دستگاه مکمل نمی توان نسبت داد. هان وتوله (۱۹۸۱) به مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم و نوتروفیل های انسان و گاو پرداخته اند و به این نتیجه رسیده اند که سرم و نوتروفیل های گاو بهتر از سرم و نوتروفیل های انسان استرپتوکوکوس آگالاکتیه را می کشند (۹).

کارول (۱۹۷۹) به اندازه گیری میزان لیزوزیم ۲۰۶ نمونه سرم گاو پرداخته است و مشاهده کرده است که در ۹۶ نمونه سرم ، میزان لیزوزیم به حدی کم است که قابل تعیین نیست . در ۷۹ نمونه سرم میزان لیزوزیم کمتر از ۲ میکروگرم در میلی لیتر بوده و در ۲۵ نمونه سرم نیز میزان لیزوزیم بین ۲-۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و در ۶ نمونه سرم نیز میزان لیزوزیم بیش از ۲۵ میکروگرم بوده است (۶). لذا با توجه به این مهم که بخش عمده ای از فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به لیزوزیم است می توان وجود تنوع زیاد در فعالیت باکتری کشی سرم که در این مطالعه دیده شده را به آن نسبت داد . البته از این نکته نیز نباید غافل بود که احتمال دارد سرم هایی که فعالیت باکتری کشی زیادتری داشته اند ، مربوط به دام های کشتار شده ای باشد که قبل از کشتار ،

الظاهر مقایسه بین فعالیت باکتری کشی سرم در جنس های متفاوت (نر و ماده) ، سنین مختلف و گونه های مختلف صورت نگرفته است و لذا نمی توان نتایج بدست آمده از این تحقیق را به خوبی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. به هر حال در این مطالعه تفاوت معنی داری بین گاو و گاومیش ، گاوها و گاومیش های هم جنس و هم سن دیده نشد که این بدان معنی است که ارتباطی بین سن و جنس و فعالیت باکتری کشی سرم فعال وجود ندارد که البته لازم است در تحقیقات مشابهی در بوته آزمایش قرار گیرد.

بواسحاقی و همکاران (۱۳۷۹) نیز در مطالعه ای به بررسی نوتروفیل های گاو و گاومیش از نظر تکنیک احیاء نیتروبلوتترازولیوم پرداخته اند و بدین نتیجه رسیده اند که از این نظر تفاوتی بین این دو دام و نیز دام های هم جنس و هم سن وجود ندارد (۱).

گرچه در مطالعه حاضر کاهش تعداد کلنی ها در حضور سرم فعال معنی دار بود ولی این کاهش حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد (کمتر از ۰/۵ برابر) بود که در مقایسه با تحقیق مذکور که ۱۲ تا ۵ برابر کاهش تعداد کلنی مشاهده شده ، ناچیز است . اما بدین نکته نیز باید توجه داشت که این محققین نیز ذکر نموده اند که در شرایط آزمایشگاهی اثر باکتری کشی لاکتوفرین گاوی ناچیز بوده است. به هر حال جهت بررسی بهتر فعالیت باکتری کشی سرم گاومیش می توان اثر آن را در جلوگیری از عفونتهای تجربی در موش مورد توجه قرار داد .

در مطالعه ایکدا و سوجی یاما (۱۹۹۸) و همچنین سوارت و کوپرز (۱۹۹۸) ، اثر ضد ویروسی لاکتوفرین بر روی ویروس هیپاتیت C انسان و ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان نیز به اثبات رسیده است (۱۰ و ۱۲)

اگر چه بر روی فعالیت باکتری کشی سرم فعال مطالعات متعددی صورت گرفته است ولی علی

منابع

- ۱- بواسحاقی ، ح و قربانپور ، م ، ۱۳۷۹ . مقایسه فعالیت نوتروفیل های گاو و گاومیش . پایان نامه شماره ۳۷۷ جهت اخذ دکترای عمومی دامپزشکی ، دانشگاه شهید چمران . صفحات ۶-۱ .
- ۲- تاج بخش ، ح . ۱۳۷۰ . ایمنی شناسی بنیادی . چاپ پنجم ، انتشارات دانشگاه تهران . صفحات ۳۷-۳۶ و ۲۱۵-۲۱۳ .
- ۳- شیمی ، ا . ۱۳۸۰ . اصول ایمنی دامپزشکی تألیف ایان تیزارد . چاپ اول ، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور صفحات ۴۴-۳۴ .
- 4- Bhimani, R.S ., Vendrov ,Y., Furmanski ,P.J., 1999. Influence of Lactoferrin Feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice . Journal of Applied Microbiology .86(1): 135-144
- 5- Carroll, E .J ., Jasper, D.E., 1977. Bactericidal activity of standard Bovine serum against coliform bacteria isolated from udders and the environment of dairy cows . American Journal of Veterinary Research.38(12):2019-2022
- 6- carroll, E.J., 1979. The role of lysozyme in killing and lysis of coliform bacteria in the bovine animal Serum and milk concentrations of lysozyme. Microbiology .87(1): 235-244
- 7- Corbeil, L.B., Blau, K., Inzana ,T.J.,Nielsen, K.H.,Jacob, ,R.H., et al.,1988. Killing of Brucella abortus by bovine serum. Infection and Immunity .56(12):3251-3261

- 8- Eisenschenk, F.C., Houle ,J.J., Hoftman ,E.M .,1995.Serum Sensitivity of field isolates and laboratory strains of Brucella abortus . American Journal of veterinary Research. 56(12) : 1592-1598.
- 9- Hahn, G., Tolle, A.,1981.Comparison of human and bovine group B- streptococci (str . agalactiae) by bactericidal assay .Zentralblatt-Fur- Baktriologie- Mikrobiologie – und- Hygiene. 249(1):15-23
- 10- Ikeda, M., Sugiyama, K.,1998. Lactoferrin markedly inhibits C Virus infection in cultured human hepatocytes .Biochemical and Biophysical Research communications .245(2):549-553.
- 11- Nikol, V.V., Litvin, V.P., polyakov, A.A.,1974.Natural resistance of Cattle to disease and ways of evaluating it prevention and treatment of Diseases of young farm animals.85-89
- 12-Swart,P.J.,Kuipers,E.M.,smit,C.,Harmsen,M.C.,Meijer,D.K., 1998. Antiviral activity of Lactoferrin. Advances in Experimental medicine Biology .44(3): 205-213.
- 13-Yamauchi, K., Wkabayashi, H.,Hashimoto, S.,Teraguchi, S.,Hayasawa,H., Tomita,M.,1998.Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers. Advances in Exprimental medicine Biology .44(3): 261-264.

