JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۱
صفحات ۱۷۹-۱۷۳

شناسایی آلودگی مخمری لاینرهای دستگاه شیردوشی برخی از گاوداری های صنعتی استان تهران

فرزانه تاجدینی*[۱]، حامد مکاری[۲]، مهدی فیضی[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، کرج، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، انجمن علمی دانشجویان ، کرج، ایران

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

چکیده

این مطالعه به منظور آگاهی از حضور مخمر در لاینرهای دستگاه شیردوشی گاوداری های صنعتی استان تهران انجام شده است. از سطح داخلی لاینرهای دستگاه شیر دوشی ۱۵ گاوداری نمونه گیری به عمل آمد و به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل گردید. نمونه ها در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوباسیون گردید. پس از پنج تا هفت روز بررسی محیط ها صورت گرفت و محیط هایی که در آن مخمر رشد کرده بودند، در یخچال نگهداری شد و سپس به منظور شناسایی و تعیین دقیق گونه های مخمر های جدا شده از کیت تجاری به نام Rapid yeast plus system استفاده شد که گونه های جدا شده عبارت اند از:

Candida. albicans, Candida. krusei, Candida.rugosa, Cryptococcus. neoformanse, Cryptococcus. humiculus, Cryptococcus. albicus, Rodotrola·rubra, Geotrichum. candidum, Trichosporon. beigelly, Sporodiobolus. salmonicolor.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان می دهد بین تعداد شستشوی دستگاه شیردوشی در روز با جدا شدن مخمر های خطرناک ارتباط آماری معناداری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: دستگاه شیردوشی ، لاینر شیردوشی، آلودگی مخمری

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(3)173-179, 2012

Detection of yeast contamination in milk claw linear of industrial dairy farms in Tehran

Tajdini, F.[*1] , Mokari, H.[2], Feizi, M.[2]

1- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

**** Corresponding author:*** tajdinifarzaneh@yahoo.com

Abstract

For the purpose of identifying the most probable type of yeast which manifests the milk claws, 15 industrials farms, which held Holstein cattle for milk production, were selected randomly. Samples were taken from the internal surface of the liners by sterile swabs and then the samples were taken to the mycology laboratory. The samples were cultured in sabourauds dextrose agar and kept in room temperature. The final and definite recognition was done by the yeasts recognition kit (Rapid yeast plus system). The type of yeasts which detected were include: C.albicansl C.krusei C.rugosal Cryptococcus.neoformanse, Cryptococcus.humiculus, Cryptococcus.albicus, Rodotrola.rubra, Geotrichum.candidum, Trichosporon.beigelly, Sporodiobolus.salmonicolor.

In this study relationship between number of milk claws washing per day and type of disinfected solution with detection of saprophyte yeasts were also considered.

Key words: milk claws, yeast detection, linear

مقدمه

قارچ‌های مخمری تا زمانی که سوبسترای کافی در اختیارشان باشد قادرند به راحتی در هر محیطی رشد و تکثیر داشته باشند(۹). مطالعاتی که تا کنون پیرامون جداسازی قارچ‌ها صورت پذیرفته است در بیشتر نقاط دنیا راجع به جداسازی از نمونه‌های بالینی بوده و کمتر توجه به حضور مخمر و قارچ در اکوسیستم زندگی دامها شده به طور مثال تحقیقاتی که در شمال اروپا و امریکا به عمل آمده ثابت کرده است گونه‌های روتین مخمری که در شیرهای آلوده جدا شده Candida.Krusei و Candida.Rugosa بوده است و یا مطالعات مشابهی در کشورهای اسکاندیناوی نشان می‌دهد علاوه بر دو گونه فوق گونه Candida. Kefir نیزجدا شده است (۵و۶).

به نظر میرسد اگر در لاینر شیردوشی مخمرهای مولد بیماری‌های پستان باشد به دلیل بروز ورم پستان در سطح گله خسارت اقتصادی جبران ناپذیری به وجود می‌آید. اگرچه ورم پستان با عوامل مخمری دو تا سه درصد کل موارد مسبب ورم پستان را شامل می‌شود اما به دو دلیل عوامل مخمری در بروز ورم از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. اول اینکه بخشی از ورم پستان‌های مخمری در دوره خشکی بروز می‌کنند و چون در این دوره گاو کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد بیماری به صورت مزمن در آمده و اقدامات درمانی به مراتب مشکل تر می‌شود و دوم اینکه درمان طولانی مدت با آنتی بیوتیک‌ها فرصت رشد بیشتر مخمرها را فراهم می نماید (۸).

از دیگر خطرات بهداشتی، حضور مخمرهای ساپروفیت در لاینرهای شیردوشی و انتقال این ارگانیسم به شیر تولیدی از مرکز دامداری است که می‌تواند در صورت مصرف شیر خام یا فراوری محصولات لبنی از شیر غیر پاستوریزه سلامت عمومی جامعه را به خطر می‌اندازد (۲). بنابراین در این مطالعه ما سعی کردیم ضمن جدا سازی مخمر از لاینرهای شیردوشی به تفکیک گونه‌های جدا شده بپردازیم تا بیماری زا و غیر بیماری زا بودن آنها نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

پانزده گاوداری صنعتی بزرگ در اطراف شهر تهران به طور تصادفی برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. پیش از آغاز نمونه‌گیری از یک پرسشنامه جهت دستیابی به اطلاعاتی نظیر نام گاوداری، رکورد شیردوشی گله، تعداد گاو دوشا، تعداد گاو شیروار مبتلا به ورم پستان بالینی، تعداد گاو شیروار مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، تعداد شستشوی لاینرها در روز، فاصله زمانی از آخرین نوبت ضد عفونی لاینرها، استفاده گردید. از هر گاوداری ۱۴ نمونه با رعایت اصول آسپتیک تهیه شد، بدین نحو که پس از شیر دوشی، به محض جدا شدن لاینر از پستان، به کمک سواب استریل از سطح هر چهار لاینر نمونه‌ها اخذ و به داخل لوله استریل برگشت داده شد و سپس نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل گردید و درون محیط کشت سابورو دکستروز آگارتلقیح شد(۱۰). کلیه مراحل تلقیح در زیر هود انجام شد و سپس محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۷ روز انکوباسیون گردید تا در صورت حضور مخمر در نمونه‌های اخذ شده با رشد پرگنه‌های مخمری و تشکیل کلنی‌های قابل رویت روی محیط کشت فرضیه وجود مخمر در لاینرهای دستگاه شیردوشی به اثبات برسد. ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، محیط های کشت به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت تا هم حضور مخمرها ارزیابی گردد و هم اینکه در صورت رشد قارچ رشته‌ای نمونه‌ها خالص سازی شود و پس از کامل شدن و جدا کردن و خالص سازی مخمرها جهت شناسایی جنس و گونه اقدام شود. جهت شناسایی جنس و گونه از کیت های تشخیص سریع Rapid yeast plus system ساخت شرکت Remel امریکا استفاده شد. اساس کار این کیت بر آزمون‌های بیوشیمیایی است که توان مخمرها در مصرف موادآلی مختلف مورد بررسی قرار

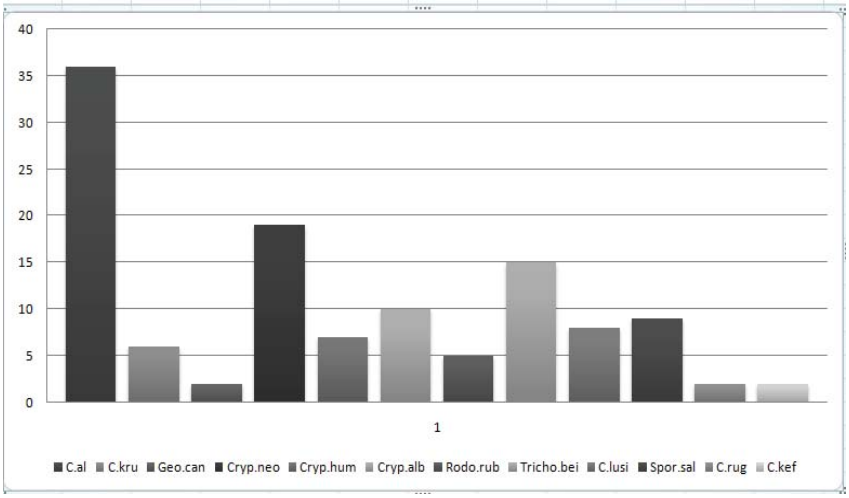
می‌گیرد و پس از کسب اطلاعات بیوشیمیایی و انتقال آن به نرم افزار ویژه کیت به نام Eric، تعیین گونه‌های مورد بررسی انجام می گردد.

ابتدا به کمک آنس استریل پرگنه‌های مخمری رشد کرده بر روی محیط کشت را برداشته و با مایع تلقیح موجود در بسته بندی کیت درون لوله‌ای مخلوط کرده و تکان داده می‌شود تا به صورت سوسپانسیون درآید، سپس درب نایلونی روی پانل را از سمت راست باز کرده و سوسپانسیون را به اولین چاهک تلقیح داخل پانل ریخته و پانل را در سطحی با شیب ۴۵ درجه قرار داده و آنگاه به آرامی پانل را به چپ و راست می‌چرخانیم تا کلیه چاهک‌های تلقیح دارای سطح یک نواختی از سوسپانسیون باشند و در مرحله بعد به آرامی پانل را به سمت حفرات واکنش بر می‌گردانیم تا مخلوط وارد حفره‌های واکنش شود. پانل‌ها را در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت انکوباسیون می‌کنیم و در مرحله بعد معرف‌های A و B که به شکل قطره چکان در بسته بندی کیت موجود است به بعضی حفرات اضافه می‌گردد که با تغییر رنگ حاصل از افزودن معرف‌ها درون حفرات نتایج قابل قرائت می‌شود. بدین صورت که بعد از انکوباسیون درب نایلونی پانل را باز کرده و یک قطره معرف A به حفرات ۷ تا ۱۴ اضافه می‌کنیم و یک قطره معرف B به حفرات ۱۶ تا ۱۸ اضافه می‌شود تا در صورت مثبت بودن و انجام واکنش در هر حفره تغییر رنگ لازم رخ دهد. (مدت زمان بین افزودن معرف تا قرائت نتایج نباید بیش از یک دقیقه باشد). هر پانل دارای ۱۸ حفره واکنش است که از حفره یک تا ۶ بعد از انکوباسیون چنانچه نتیجه مثبت باشد به رنگ زرد در خواهند امد، حفرات ۷ تا ۱۴ بعد از افزودن معرف A در صورت مثبت بودن به رنگ زرد در می‌آیند و رنگ قرمز و قرمز تیره حفره ۱۵ مثبت تلقی می‌شود و حفرات ۱۶ تا ۱۸ با افزودن معرف B در صورت مثبت بودن به رنگ قرمز و بنفش و صورتی تبدیل شده است. سپس از سمت چپ پانل امتیاز هر سه حفره مثبت با هم جمع می‌شود تا عددی شش رقمی حاصل شود آنگاه این عدد را به نرم افزار Eric داده تا با تجزیه و تحلیل داده‌ها گونه‌ی مخمری مورد مطالعه تعیین شود.

نتایج

پس از کشت نمونه‌های مشکوک پرگنه‌های مخمری روی محیط کشت رشد کرد که نشان از حضور مخمر در لاینر دستگاه شیردوشی بود. از ۱۵ گاوداری ۲۱۰ نمونه به طور کل جمع آوری شد که ۱۲۱ (۵۷%) نمونه‌ها آلوده به مخمر بود. گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه شامل *C.krusei, C.albicans Cryptococcus.,Cryptococcus.neoformanse,C.rugosa, Rodotrola·rub,Cryptococcus.albicus,humiculus Trichosporon.beigelly,Geotrichum.candidum,ra Sporodiobolus.salmonicolor* که فراوانی آنها در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

همچنین اطلاعاتی نظیر تعداد مخمر جدا شده و تعداد دفعات شستشوی دستگاه با ماده ضد عفونی کننده در روز به تفکیک هر گاوداری، در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- فراوانی مخمرهای جدا شده از لاینرهای شیردوشی ۱۵ گاوداری صنعتی

جدول ۱- تعداد مخمر جدا شده و تعداد دفعات شستشوی دستگاه با ماده ضد عفونی کننده در روز به تفکیک هر گاوداری

شماره گاوداری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
تعداد مخمر جدا شده	۱۱	۱۴	۹	۱۰	۱۱	۱۴	۱۱	۱۰	۱۲	۰	۸	۷	۰	۰	۰
تعداد شستشوی دستگاه با ماده ضد عفونی کننده در روز	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۳	۲	۲	۳	۳	۳

بحث و نتیجه‌گیری

عدم توجه کافی به بیماری‌های با منشا قارچی در پروسه تشخیص و درمان راه را برای رشد و پیشرفت عوارض قارچی هموار می‌کند و به دلیل اینکه تشخیص و درمان به طور صحیح انجام نمی‌پذیرد خساراتی از قبیل هزینه درمان نا مناسب، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و ایجاد فرصت رشد و نمو قارچ‌ها رخ می‌دهد (۴).

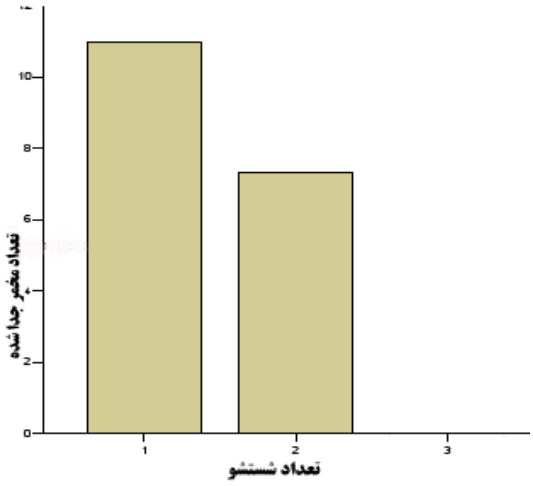
بر اساس تحقیقاتی که به عمل آمده یکی از بافت‌های زنده که به عفونت‌های مخمری بسیار حساس است پستان نشخوارکنندگان است. اغلب مطالعات انجام شده عامل انتقال مخمر به پستان گاو را تزریقات آلوده داخل پستانی و یا دستکاری های پستان، تحت شرایط غیر بهداشتی می‌دانند (۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که لاینرهای دستگاه شیردوشی نیز می‌توانند به مخمر آلوده باشند. در خصوص عواملی که در انتقال آلودگی موثرخواهد بود، اطلاعاتی در دسترس نیست ولی گونه‌های ساپروفیت جدا شده در این مطالعه با گونه‌های مخمری که از پوست پستان در مطالعات داخل وخارج از کشور جدا شده قرابت زیادی دارد(۱و۳). همین طور در مطالعاتی که پیرامون جداسازی عوامل قارچی از شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان در دامداری‌های صنعتی ایران انجام پذیرفته گونه‌های مخمری مشابهی شناسایی شده است (۱۱). بر خلاف انتظار چنانچه مخمر از دستگاه شیردوش به گاوها منتقل گردد اپیدمیولوژی تک گیر خود را از دست داده و ورم پستان مخمری تمام گله را فرا می‌گیرد چون تمام گاوهای شیروار در طول شبانه روز ۲ تا ۴ بار با دستگاه آلوده در تماس هستند و حتی اگر یک گاو به ورم مخمری مبتلا شود دستگاه می‌تواند عامل بیماری زا

را به کل گله انتقال دهد (۸).

گونه‌های جدا شـــده در این بررســـی میتوانند عامل مسبب ورم پســـتان باشـــند مثـــل .Criptococcus, c.albicans neoformans ,Trichosporium.beigelly و همـــان طور که در نمودار شماره ۱ مشـــاهده می‌شود C.albicans بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است که ۲۹ درصد است و Cryptococcus·neoformanse بـــا فراوانی ۱۵درصد و Trichosporon·beigelly با فراوانی ۱۲ درصد در درجه دوم و ســـوم قرار دارند و بنابر این دقت نظر در بهداشت دستگاه شیر دوشی بسیار مهم می باشد.

بررسی‌های داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نشان می‌دهد بین جدا شدن مخمر و تعداد شستشو در روز ارتباط آماری معنا داری وجود دارد (P=0.045) بطوریکه نحوه شستشو و تعداد آن در این مطالعه موردارزیابی قرار گرفت که بر این اساس مراکزی که در روز سه بار یا بیشتر شستشوی دستگاه را انجام می‌دادند هم میزان آلودگی بسیار پایین تری داشتند و هم جداسازی گونه‌های ساپروفیت نسبت به مراکزی که در آنها تعداد شستشو در روز از ۳ بار کمتر بود میزان کمتری داشت. ارتباط تعداد شستشوی دستگاه و میزان آلودگی در ۱۵ گاوداری در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲- ارتباط تعداد شستشو و تعداد مخمر جداشده از لاینر های دستگاه شیر دوشی

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه میتوان به این نتیجه‌گیری نهایی رسید که امکان ایجاد ورم پستان مخمری به دلیل انتقال مخمرهای بیماریزا از طریق لاینر های شیردوشی وجود دارد و دقت نظر به وضعیت بهداشتی دستگاه شیردوشی و همین طور شستشوی مکرر در روز تا حد زیادی به کاهش سطح آلودگی مخمری دستگاه وکاهش بروز عوارض پستانی منجر می‌شود.

References

1- Aeinei,M. ,Tajdini,F. (2010),Study Of Cutaneous Yeast Contamination of cattle Teat In Industrial Dairy Farms in Tehran Province ,Thesis no. 1107, Islamic azad university , karaj branch, pp:52-58 (Text in Persian)

2- Andissie, E.J., McGinnis, R.M., Pfaller, M.A. (2003) Clinical mycology. Monson publisher, 1st edition, pp: 56-72

3- Farnsworth, R.j., Sorensen, D.K. (1972) Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minessota , Can.j.Med.17:23-27

4- Griffin, D.H(1994) Fungal physiology ,John wiley & sons, 2nd edition, New York publisher, pp:25-46

5- Health, I.B. (1978) Nuclear division in fungi, academic press, New York publisher, pp:10-16

6- Jennings, D.H., Lysek, G. (1996) Fungal biology, Bios scientific publishers, Oxford, pp:90-113

7- Radostits, O.M. (2007) Veterinary medicine, Elsevier publisher, pp.1613-1618

8- Razaghi-abiane, M., Shams Ghahfarokhi, M. (1985) General veterinary mycology, Jahade keshavarzi publisher, pp: 36-60 (text in Persian)

9- Salemi, A. (1988) Mycology and fungal disease in veterinary, Sepehr publisher, pp:15-20 (text in Persian)

10- Vishteh, A. , Tajdini, F. (2010) Detection of fungus isolated from milk of healthy And mastitis cows in dairy farms of Tehran ,Thesis no. 1046, Islamic azad university , karaj branch, pp:87-97