

فعالیت ضدباکتریایی محصولات زنبور عسل

هادی کوهساری*

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۳۰

چکیده

زنبورهای عسل که به عنوان حشره طلایی نیز شناخته می‌شوند، متعلق به جنس *Apis* هستند و گونه اصلی مورد استفاده برای گرده‌افشانی محصولات *Apis mellifera* است. از نظر اقتصادی، زنبور عسل یکی از مهم‌ترین حشرات است. محصولات این حشره مفید، برای هزاران سال و در بسیاری از فرهنگ‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و خواص درمانی آن‌ها در بسیاری از متون مذهبی مانند قرآن کریم ثبت شده است. یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های بیولوژیک این محصولات، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها می‌باشد و با توجه به گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوارض ناخواسته ترکیبات دارویی شیمیایی، گرایش به ترکیبات با منشأ طبیعی به منظور مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیمارزا افزایش یافته است. عسل، زهر، بره‌موم، گرده گل و ژل رویال دارای ترکیبات زیست فعال بسیاری هستند که آن‌ها را در برابر انواع گونه‌های باکتریایی بیماری‌زا موثر می‌کند. مطالعات زیادی به طور جداگانه بر فعالیت ضدباکتریایی هر یک از این محصولات پرداخته‌اند. هدف از مطالعه حاضر اشاره به فعالیت ضدباکتریایی همه محصولات زنبور عسل شامل عسل، زهر زنبور عسل، بره‌موم، گرده گل و ژل رویال در یک مطالعه متمرکز با تاکید بر مکانیسم فعالیت ضدباکتریایی این محصولات می‌باشد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدباکتریایی، عسل، زهر، بره‌موم، ژل رویال، گرده گل

*نویسنده مسئول: هادی کوهساری

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

پست الکترونیک: hadikoohsari@yahoo.com

مقدمه

زنبورهای عسل که به عنوان حشره طلایی نیز شناخته می شوند، متعلق به جنس *Apis* هستند که کلمه لاتین زنبور است. این حشرات اجتماعی در جامعه‌ای منظم زندگی می کنند و به راسته *Hymenoptera* و خانواده *Apidae* تعلق دارند. زنبورهای عسل را می توان در سرتاسر جهان یافت و برای نقش حیاتی خود به عنوان گرده افشان در کشاورزی استفاده می شود، اما گونه اصلی مورد استفاده برای گرده افشانی محصولات *Apis mellifera* است. از زمان های قدیم، محصولات زنبور عسل برای اهداف دارویی استفاده می شده است. در بسیاری از کتب دینی نیز به آن ها اشاره شده است. مصری ها، رومی ها، چینی ها و ایرانی ها هزاران سال است که ارزش های غذایی و دارویی فرآورده های زنبور عسل را مستند کرده اند. *Apitherapy* شاخه ای از پزشکی غیر متعارف است که بر استفاده از محصولات زنبور عسل متشکل از عسل، گرده، بره موم، ژل رویال و زهر زنبور عسل تکیه دارد. عسل علاوه بر داشتن اهمیت تغذیه ای بالا و فواید سلامتی، دارای فعالیت های ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد عفونی کننده، ضد سرطانی، ضد دیابتی، ضد التهابی و محافظتی قلبی نیز می باشد (Nader et al., 2021; Boukraa et al., 2013).

در مورد زهر زنبور عسل، علیرغم اثرات نامطلوب احتمالی آن مانند واکنش های آلرژیک که ممکن است پس از نیش زنبور عسل رخ دهد، نمی توان اثرات درمانی مختلف آن را نادیده گرفت. زهر اثرات ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد باکتریایی دارد، همچنین برای درمان بسیاری از بیماری های عصبی استفاده می شود (Arteaga et al., 2019; Abd El-Wahed et al., 2019). در مورد بره موم، توانایی مبارزه با سرطان و

بسیاری از میکروارگانیسم ها را دارد (Kuropatnicki et al., 2013; Bogdanov et al., 2012). علاوه بر این، گرده دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد انعقاد و ضد التهابی است (Campos et al., 2010; Nader et al., 2021). همچنین، ژل رویال چندین فعالیت بیولوژیکی جالب از جمله آنتی اکسیدانی، ضد پیری، ضد تومور، ضد التهابی، ضد میکروبی و فعالیت های نوروتروفیک را نشان می دهد (Nader et al., 2021; Bogdanov et al., 2016). از این رو، هدف از انجام این بررسی مروری، برجسته کردن یکی از مهم ترین و رایج ترین فعالیت های بیولوژیکی مشترک همه محصولات کندوی زنبور عسل یعنی فعالیت ضد باکتریایی می باشد.

فعالیت ضد باکتریایی ژل رویال

ژل رویال (¹RJ)، یک ترشح اسیدی چسبنده و سفید مایل به زرد است که توسط زنبورهای کارگر تولید می شود و از غدد هیپوفارنکس و فک پایین ترشح می شود. لارو زنبورها در مراحل اولیه زندگی خود به ژل رویال به عنوان منبع اصلی غذا متکی هستند. فقط ملکه زنبور عسل با ژل رویال تغذیه می شود تا زمانی که بمیرد، به همین دلیل است که ژل رویال به طور گسترده به عنوان یک غذای فوق العاده شناخته می شود (Nader et al., 2021; Buttstedt et al., 2014; Bogdanov, 2011; Fratini et al., 2016).

آب، مولکول اصلی تشکیل دهنده RJ است (۵۰ تا ۶۰ درصد). علاوه بر آب، RJ حاوی اجزای دیگری مانند پروتئین ها (۱۸٪)، کربوهیدرات ها (۱۵٪)، لیپیدها (۳ تا ۶٪)، نمک های معدنی (۱،۵٪) و سایر ترکیبات جزئی مانند اسیدهای آمینه آزاد، ویتامین ها (به ویژه ویتامین B

¹ Royal Jelly



نتایج نشان داد که Jelleines-I و II دارای فعالیت طیف وسیعی بودند، در حالی که Jelleine-III کمتر فعال بود و Jelleine-IV هیچ فعالیت ضد میکروبی نداشت (Fontana et al., 2004; Bucekova and Majtan, 2016). از این رو، jelleine های I، II و III مسئول فعالیت ضدباکتریایی MRJP1 هستند. از سوی دیگر، MRJP2 (apalbumin2) یک فعالیت ضدباکتریایی در برابر پانی باسیلوس لاروا، باسیلوس سوبتیلیس و اشیشیا کلی نشان داد. این فعالیت ضدباکتریایی MRJP2 به سطوح بالای کربوهیدرات مانوز و ساختارهای کربوهیدرات آنتنی پیچیده آن نسبت داده می شود (Bíliková et al., 2009). علاوه بر این، یک مطالعه نشان داده است که سطوح MRJP3 (apalbumin 3) پس از عفونت باکتریایی افزایش یافته است. کار آینده باید فعالیت ضد میکروبی این پروتئین در برابر انواع پاتوژن ها را بررسی کند (Okamoto et al., 2003). ذکر این نکته ضروری است که آلرژن های غالب ژل رویال MRJ1 و MRJ2 هستند که می تواند محدودیتی در استفاده از ژل رویال به عنوان یک عامل درمانی ایجاد کند (Rosmilah et al., 2008).

رویالیزین (Royalisin)، پروتئین ضدباکتری دیگری که در RJ یافت می شود، از آلوده شدن RJ توسط باکتری های گرم مثبت جلوگیری می کند. نشان داده شده است که رویالیزین دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری های گرم مثبت (اما نه باکتری های گرم منفی) است (Fontana et al., 2004). با این حال، نشان داده شده است که رویالیزین در سیستم حفاظت زنبور عسل در برابر تهاجم باکتری ها به ویژه در برابر پانی باسیلوس لاروا، پاتوژن اصلی بیماری فولبرود آمریکایی، نقش دارد. رویالیزین همچنین روی سایر باکتری های گرم مثبت

و فنل هایی مانند فلاونوئیدها است (Nader et al., 2021; Bogdanov, 2011).

RJ فعالیت ضدباکتریایی مهمی از خود نشان می دهد. این پتانسیل ضدباکتریایی RJ به دلیل وجود برخی از اجزای اصلی فعال زیستی است. پروتئین ها نقش مهمی در فعالیت ضدباکتریایی RJ دارند. در واقع، پروتئین ها اجزای اصلی ماده خشک RJ (۵۰ درصد ماده خشک RJ) هستند (Nader et al., 2021; Buttstedt et al., 2014; Bogdanov, 2011). خانواده گلیکوپروتئین های MRJPs^۲ 82 تا ۹۰ درصد از ترکیبات پروتئینی RJ را تشکیل می دهند و دارای ۹ عضو شناسایی شده MRJP1-MRJP9 است. MRJP1، همچنین به عنوان رویالاکتین یا آپالبومین شناخته می شود، اولین پروتئین شناسایی شده و پروتئین اصلی در خانواده MRJPs است (Nader et al., 2021; Hanes and Simuth, 1992; Bogdanov, 2016; Fratini et al., 2011). کشف شده است که MRJP1 دارای یک فعالیت ضدباکتری غیر مستقیم است. علاوه بر این، Jelleine، پپتیدهای ضد میکروبی کوتاه (هشت تا نه اسید آمینه) وجود دارند که دارای چهار توالی پپتیدی مختلف هستند: jelleine-I (TPFKLSLHL-NH2)، jelleine-II (EPFKLSLHL-NH2)، jelleine-III (TPFKLSLH-NH2) و jelleine-IV (TPFKLSLH-NH2).

Jelleine I، II و III از محصول برش MRJP1 مشتق شده اند و مسئول فعالیت ضد باکتریایی MRJP1 هستند. یک مطالعه jelleine های I، II و III را در برابر باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و باسیلوس سوبتیلیس) و گرم منفی (اشیشیا کلی، انتروباکتر کلواکه، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا) آزمایش کرده است.

² Major royal jelly proteins



(میکروکوکوس پیوژنز، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) دارد (Fratini et al., 2016). میلیو و چینو در سال ۲۰۰۵، اسیدهای چرب دیگری را گزارش کردند که فعالیت ضد باکتریایی داشتند. پاتوژن‌های دهانی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس ویریدانس، و همچنین استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، به طور موثر توسط ۳-هیدروکسی دودکاندیونیک اسید، ۱۰-استوکسی-۲-دکنوئیک اسید و (S11) هیدروکسی دودکانوئیک اسید مهار شدند. با این حال، اکثر این اسیدهای چرب در برابر باکتری‌های گرم منفی بی اثر بودند. علاوه بر این، ۳-هیدروکسی دودکاندیونیک اسید، با MIC 47/0 میلی گرم بر میلی لیتر، به نظر می‌رسد که تأثیر جزئی بر کلبسیلا پنومونیه دارد (Melliou and Chinou, 2005). در نتیجه، برخی از MRJP ها، Jelleine ها، رویالین و ۱۰-HDA ممکن است به صورت سینرژیک عمل کنند و به RJ یک فعالیت ضدباکتریایی موثر بدهد (Fratini et al., 2016). RJ خام در بسیاری از مطالعات بر روی پاتوژن‌های انسانی آزمایش شده است. حاجی محمد و همکاران در سال ۲۰۲۲، فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های ژل رویال جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل از نواحی جغرافیایی مختلف در استان گلستان واقع در شمال ایران علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا شامل اشیریشیا کلی (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، استافیلوکوکوس اورئوس (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، باسیلوس سرئوس (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، سودوموناس آئروژینوزا (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، انتروکوکوس فکالینس و شیگلا دیسانتری را بررسی کردند. سطوح MIC نمونه‌های ژل رویال در محدوده ۰/۷۸ تا ۱۲/۵ درصد (حجمی/حجمی) و MBC آنها در محدوده ۳/۱۲ تا ۵۰

مانند استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، لوکونوستوک، باسیلوس سوبتیلیس، سارسینا لوتتا، میکروکوکوس لوتئوس و میله‌ای‌های گرم مثبت مانند کورینه‌باکتریوم، کلستریدیوم و لاکتوباسیلوس هلوئیکوس نیز اثر می‌گذارد. با این حال، هیچ مهارتی از باکتری‌های گرم منفی مانند اشیریشیا کلی و سراشیا مارسه سنس شناسایی نشد (Fujiwara et al., 1990; BÍliková et al., 2009; Bachanov et al., 2002). مکانیسم عمل اکثر پپتیدهای RJ ناشناخته باقی مانده است. برای اولین بار، تجزیه و تحلیل RAcc-Royalisin (پروتئین نو ترکیب RAcc-Royalisin بیان شده و خالص شده از اشیریشیا کلی) نشان داد که رویالیزین با اختلال در نفوذپذیری غشای سلولی و همچنین کاهش آبگریزی سلول‌های باکتریایی، رشد باکتری را مهار می‌کند (Shen et al., 2012). علاوه بر این، اسید چرب ترانس-۱۰-هیدروکسی-۲-دکنوئیک اسید (HDA-۱۰) فراوان‌ترین جزء در بخش لیپیدها (۸۰٪) است و فقط در RJ یافت می‌شود (Shen et al., 2012). برخلاف سایر اسیدها که دارای ۱۴ تا ۲۰ اتم کربن هستند، اسیدهای چرب RJ کوتاه‌تر هستند (۸ تا ۱۰ اتم کربن). علاوه بر این، اسیدهای چرب RJ یا دی کربوکسیلیک یا هیدروکسی اسید هستند. از سوی دیگر، سایر اسیدهای چرب معمولاً اسیدهای چرب تری گلیسیرید هستند (Shen et al., 2012). بنابراین، این اسید چرب خاص ممکن است برای متمایز کردن RJ از سایر محصولات زنبور عسل و تأیید صحت اولیه استفاده شود (Nader et al., 2021; Bogdanov et al., 2011; Šedivá et al., 2018). مطالعات اولیه روی فعالیت ضد میکروبی HDA-۱۰ نشان داد که HDA-۱۰ توانایی بالایی در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی (اشیریشیا کلی) و گرم مثبت



درصد (حجمی/حجمی) گزارش شد. نمونه های جمع آوری شده از مناطق کوهستانی بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را با MIC برای باکتری های گرم مثبت از ۰/۷۸ تا ۱/۵۶ درصد (حجمی/حجمی) و برای باکتری های گرم منفی از ۱/۵۶ تا ۳/۱۲ درصد (حجمی/حجمی) نشان دادند. محتوای فنلی کل و فعالیت مهار رادیکال DPPH در نمونه های ژل رویال منطقه کوهستانی به طور قابل توجهی بیشتر از نمونه های دو منطقه با سایر اقلیم ها بود. نتایج این مطالعه نشان داد که اقلیم منطقه جغرافیایی محل نمونه برداری بر فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی ژل رویال تأثیر داشته که ممکن است به دلیل تفاوت در پوشش گیاهی و منشاء گل زنبورها باشد (Haji Mohammad et al., 2022).

دو نمونه RJ، از آرژانتین، A و B در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی که باعث عفونت در زخم های پوستی می شوند، آزمایش شدند. هر دو نمونه توانایی مهار باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را داشتند به جز کلبسیلا پنومونیه که توسط هیچ یک از نمونه ها مهار نشد. نمونه A نیز بر استرپتوکوکوس اوبریس تأثیری نداشت. تفاوت در فعالیت های بین نمونه های RJ می تواند به تفاوت ها در مکان های جغرافیایی و تغییرات در اجزا به دلیل تغییرات ژنتیکی بین کلنی های زنبور عسل مرتبط باشد (Celeste García et al., 2021).

در مطالعه ای دیگر راتاناوالاچای و ونگ چای در سال ۲۰۰۲ در تایلند، RJ را در برابر باکتری های گرم مثبت (میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (شیگلا فلکسنری، سالمونلا تیفی، اشیریشیا کلی، پروتئوس و لگاریس و سودوموناس آئروژینوزا) آزمایش کردند. نتایج نشان داد که RJ دارای فعالیت ضد باکتریایی بوده و دارای دو نوع اثر متمایز یکی ضد باکتری و دیگری

باکتریواستاتیک در برابر باکتری های مورد مطالعه است. به همین ترتیب، آنها تأثیر زمان ذخیره سازی بر فعالیت ضد باکتری RJ را بررسی کردند. در ۲۴ ساعت پس از انجماد، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی RJ مشاهده شد. این فعالیت در طول زمان به تدریج کاهش یافت تا زمانی که به یک مقدار ثابت رسید (Ratanavalachai and Wongchai., 2002).

یک مطالعه اخیر فعالیت RJ را با کلرهمگزیدین (استاندارد طلایی) در برابر باکتری های پریدونپاتیک (هوازی و بی هوازی) در پلاک زیر لثه مقایسه کرده است. مشخص شد که کلرهمگزیدین اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به RJ دارد. این نتایج نشان داد که اگر RJ به عنوان جایگزینی برای کلرهمگزیدین استفاده شود باید در غلظت های بالا تجویز شود (Khosla et al., 2020).

فعالیت ضد باکتریایی بره موم

بره موم یکی از جالب ترین محصولات زنبور عسل است که به عنوان عنصر اصلی دفاعی و بلوک ساختمانی در کندوها مورد استفاده قرار می گیرد. بره موم توسط زنبورها برای پرکردن حفره دیواره های کندو استفاده می شود، همچنین از آن برای ترمیم شانه ها و تقویت حاشیه های نازک آن استفاده می شود. از سوی دیگر، بره موم می تواند مهاجمان مزاحم را که نمی توانند به بیرون منتقل شوند، مومیایی کند و در نتیجه از پوسیدگی آن ها جلوگیری می کند. از زمان های قدیم، خاصیت محافظت در برابر پوسیدگی، توسط انسان ها، به ویژه توسط مصری ها استفاده شده است. اینکه منشأ بره موم، که به عنوان چسب زنبور عسل هم شناخته می شود، از گیاهان است یا از خود زنبور عسل، تا مدت ها موضوع بحث بوده است. امروزه ترکیب تقریبی بره موم و عوامل مؤثر بر آن آشکارتر شده است.



جدول ۱. مطالعات مورد اشاره مبنی بر خواص ضد باکتریایی ژل رویال

نام محصول	هدف اصلی از مطالعه	باکتریهای مورد آزمون	نتیجه اصلی	نویسنده، سال، کشور	رفرنس
ژل رویال	استخراج پپتیدهای Jelleine I-IV از ژل رویال زنبور عسل و بررسی اثر ضدباکتریایی روی چند گونه باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس تورنجینسیس، باسیلوس پومیلوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آنروژینوزا و انتروباکتر کلوآکه، کلبسیل پنومونیه، پروتئوس میرابیلیس	در مجموع، Jelleine I، II و III بیشترین اثر را علیه باکتریهای مورد آزمون نشان داد.	فونتانا و همکاران، ۲۰۰۴، برزیل	Fontana et al., 2004
ژل رویال	بررسی اثر تغییرات پساترنس کریپشنی بر فعالیت ضدباکتریایی پروتئین Apalbumin2 (MRJP2) در ژل رویال	پانی باسیلوس لاروا، استافیلوکوکوس اورئوس، و باسیلوس سوبتیلیس اشریشیا کلی، سودوموناس آنروژینوزا	Apalbumin2 ژل رویال دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای گرم مثبت به ویژه پانی باسیلوس لاروا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس است؛ فعالیت آن با اصلاحات پساترنس کریپشنی افزایش می یابد.	بیلیکوا و همکاران، ۲۰۰۹، اسلواکی	Bíliková et al., 2009
عسل و ژل رویال	بررسی تأثیر پروتئین گلیکوپروتئینی MRJP1 ژل رویال در فعالیت ضدباکتریایی عسل طبیعی	استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس، سودوموناس آنروژینوزا	MRJP1 به تنهایی نقشی در خاصیت ضدباکتریایی عسل ندارد.	بوککوا و مایتان، ۲۰۱۶، اسلواکی	Bucekova and Majtan, 2016
ژل رویال	جداسازی، خالص سازی و شناسایی ساختار اولیه، رویالیزین با فعالیت ضدباکتریایی از ژل رویال	استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، لوکونوستوک، باسیلوس سوبتیلیس، سارسینا لوتئا، میکروکوکوس لوتئوس و میله ای های گرم مثبت مانند کورینه باکتریوم، کلستری دیوم و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس و باکتری های گرم منفی مانند اشریشیا کلی و سریشیا مارسه سنس	پروتئینی به وزن حدود 5.5 کیلو دالتون به نام رویالیزین با خواص قوی ضدباکتریایی به خصوص علیه گرم مثبت ها از ژل رویال خالص شد.	فوجیوارا و همکاران، ۱۹۹۰، ژاپن	Fujiwara et al., 1990
ژل رویال	بررسی مکانیسم عمل پروتئین ضدباکتری Royalisin از ژل رویال زنبور آسیایی	استافیلوکوکوس اورئوس، و باسیلوس سوبتیلیس باسیلوس پومیلوس، میکروکوکوس فلاووس، کلستری دیوم تنانی، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی مورریوم، پروتئوس ولگاریس	فعالیت قوی علیه گرم مثبت ها؛ مکانیسم از طریق آسیب به دیواره و غشاء سلولی	شن و همکاران، ۲۰۱۲، چین	Shen et al., 2012



فعالیت ضدباکتریایی محصولات زنبور عسل (کوهساری) ۷.

Sediva <i>et al.</i> , 2018	سدیوا و همکاران، ۲۰۱۸، اسلواکی	HDA-10 رشد پانی باسیلوس لاروا را مهار می کند؛ اثر آن در pH اسیدی بسیار بیشتر است.	سویه های مختلف پانی باسیلوس لاروا	بررسی اثر ضدباکتری و وابستگی به pH اسید چرب ۱۰-HDA از ژل رویال	ژل رویال
Melliou and Chinou, 2005	ملیو و چینو، ۲۰۰۵، یونان	اثر مهار قوی بر گرم مثبت ها. نقش دیگر اسیدهای چرب ژل رویال به غیر از HDA۱۰-، در فعالیت ضدباکتریایی	استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس ویریدانس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، کلبسیلا پنومونیه	بررسی ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی ژل رویال یونانی	ژل رویال
Haji Mohammad <i>et al.</i> , 2022	حاجی محمد و همکاران در سال ۲۰۲۲، ایران	اقلیم منطقه ای نقش مهمی در ترکیب شیمیایی و در نتیجه فعالیت بیولوژیکی ژل رویال دارد. ژل رویال جمع آوری شده از مناطق کوهستانی دارای اثر ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی قوی تر است.	اشربشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آنروژینوزا، اتروکوکوس فکالیس و شینگلا دیساتتری	فعالیت ضدباکتریایی نمونه های ژل رویال از نواحی جغرافیایی مختلف در شمال ایران	ژل رویال
Ratanavalachai and Wongchai., 2002	راتاناوالاچای و ونگچای، ۲۰۰۲، تایلند	تایید فعالیت ضدباکتریایی نمونه های ژل رویال	میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس، شینگلا فلکسنری، سالمونلا تیفی، اشربشیا کلی، پروتئوس ولگاریس و سودوموناس آنروژینوزا	ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نمونه های ژل رویال	ژل رویال

اکنون تایید شده است که بره موم یک محصول زنبور عسل است که از گیاهان ساخته شده است. زنبورها مواد گیاهی صمغی را از قسمت‌های مختلف گیاه، مانند مواد چربی دوست روی برگ‌ها و جوانه‌های آن‌ها، لاتکس و همچنین موسیلاژ جمع‌آوری می‌کنند.

همچنین زنبورها قادرند تکه‌های بافت‌های رویشی گیاه را به منظور استخراج محصولات لازم برای تولید بره موم برش دهند. علاوه بر این، بره موم یک مخلوط پیچیده با ترکیبی متغیر است که به منطقه جغرافیایی و گونه‌های گیاهی مورد استفاده در تولید آن بستگی دارد. بره موم رزینی است که می‌تواند در رنگ‌های مختلف وجود داشته باشد و بوی رزین معطر دلپذیری را ایجاد می‌کند. بره موم عمدتاً از رزین‌ها، فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، ترپنوئیدها، اسانس‌ها و سایر مواد آلی و معدنی تشکیل شده است (Bankova et al., 2000; Nader et al., 2021).

استخراج بره موم و انحلال آن به منظور آزادسازی فعال‌ترین مواد تشکیل‌دهنده آن مورد نیاز است. فرآیند استخراج همچنین برای استفاده بعدی از بره موم برای اهداف دارویی مورد نیاز است. همچنین انواع حلال‌های مورد استفاده در استخراج می‌توانند بر فعالیت بیولوژیکی بره موم تأثیر بگذارند. برای فعالیت ضدباکتریایی، فراوانی فلاونوئیدها و فنل‌ها نقش کلیدی دارد (Galeotti et al., 2010; Miguel et al., 2018). علاوه بر این، وجود بسیاری از مواد فعال زیستی و در غلظت‌های مختلف در جلوگیری از بروز مقاومت باکتریایی بسیار مهم است (Inui et al., 2014). در مورد مکانیسم اثر، بره موم می‌تواند به طور مستقیم بر روی میکروارگانیسم یا غیرمستقیم با تحریک سیستم ایمنی که منجر به فعال شدن مکانیسم دفاعی طبیعی بدن می‌شود، عمل کند. مطالعات

نشان داد که باکتری‌های گرم منفی نسبت به بره موم مقاومت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند. این را می‌توان با دو عامل اصلی توضیح داد، اولی ساختار خاص پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی و وجود غشای خارجی در دیواره سلولی و دومی ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک است که مواد فعال موجود در بره موم را از بین می‌برد (Bastos et al., 2008).

آرتپیلین C (۵۳ دیپرنیل-p-کوماریک اسید) یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنلی موجود در بره موم است. عصاره اتانولی بره موم در مقایسه با عصاره هگزانی به دلیل غلظت بالاتر آرتپیلین C در عصاره اتانولی، فعالیت ضد باکتریایی بیشتری در برابر MRSA نشان داد (Veiga et al., 2017). فعالیت ضدباکتریایی بره موم استخراج شده با اتانول و ترکیبات مشتق آن بر علیه پورفیروموناس ژنژیوالیس^۳، یک باکتری مسئول بیماری‌های پریودنتال بررسی شد. آرتپیلین C با ایجاد وزیکول‌گذاری یک اثر باکتریواستاتیک نشان داد (Yoshimasu et al., 2018). بره موم حاوی سایر مشتقات فنیل مانند ۲-دی متیل-۸-پرنیل کرومن و ۳-پرنیل سینامیک اسید آلایل استر است. بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی بره موم، نتایج غلظت بالایی از اسید p-کوماریک، آرتپیلین C، دروپانین و کامپفید همراه با فعالیت ضدباکتریایی علیه لیستریا مونوسیژنز، استروفوکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس را نشان داد (Seibert et al., 2019). همچنین بره موم حاوی پینوسمبرین و آپیزنین است. بره موم شیلیایی تحت یک مطالعه قرار گرفت و محققان دریافتند که فعالیت ضد باکتریایی پینوسمبرین و آپیزنین بیشتر از مخلوط پلی فنل‌ها یا حتی کلرگزیدین علیه استرپتوکوکوس موتانس است



(Veloz et al., 2019). کارهای متعددی وجود فعالیت ضدباکتریایی پینوسمبرین را علیه سویه‌های باکتریایی مختلف مانند *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سوبرینوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *سودوموناس آنروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* گزارش کردند (Kharsany et al., 2019; Okińczyc et al., 2020).

عصاره اتانولی بره موم نپالی هم از نظر فعالیت ضد میکروبی و هم از نظر ترکیب شیمیایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. اجزای اصلی آگلیکون‌های فلاونوئید (عمدتاً نتوفلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها) و پتروکارپان‌ها بودند. بره موم نپالی بالاترین فعالیت ضد باکتریایی خود را در برابر *هلیکوباکتر پیلوری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا فلکسنری* نشان داد. هنگامی که با آمیکاسین و تتراسایکلین ترکیب شد، همان بره موم قوی‌ترین اثر را در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت (Okińczyc et al., 2020). عصاره اتانولی بره موم لهستانی برای فعالیت ضدباکتریایی آن در برابر MRSA و MSSA مورد بررسی قرار گرفت. میانگین MIC، ۰/۵۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود و بر روی ۱۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بود. همچنین، همراه با ۸ داروی ضد *استافیلوکوک*، نسبت به عصاره اتانولی به تنهایی، اثر ضدباکتری قوی‌تری را در برابر سویه‌های آزمایش شده ارائه کرد (Wojtyczka et al., 2013). موقعیت جغرافیایی بر ترکیب بره موم و همچنین فعالیت ضد میکروبی آن تأثیر می‌گذارد. ۴۰ عصاره اتانولی بره موم جمع‌آوری شده در سراسر جهان از نظر فعالیت ضد باکتریایی آنها در برابر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فعالیت متوسطی برای نمونه‌های آسیایی و آفریقایی به ترتیب با سطوح MIC در محدوده ۰/۱۵۶ تا بیش از ۰/۵ میلی گرم بر

میلی لیتر و ۰/۰۷۸ تا بیش از ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داد. نتایج مشابهی برای نمونه‌های جمع‌آوری شده از آمریکای شمالی و جنوبی و اروپا نشان داده شد (Seidel et al., 2008). نمونه‌های EEP از سه منطقه مختلف ترکیه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر MIC متغیر بود و به میزان ۰/۱۸، ۰/۱۶۲ و ۰/۱۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر رسید و نمونه‌ها فعالیت ضدباکتریایی بالایی را نشان دادند (Kilic et al., 2005).

گرمی و همکاران (۱۳۹۷) فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی سه نوع بره موم با موقعیت جغرافیایی مختلف از استان گلستان واقع در شمال ایران را بررسی کردند. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک انجام شد و کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی با روش ماکرودایلوشن تعیین شد. محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی و توانایی مهار رادیکال آزاد نمونه‌های بره موم نیز تعیین گردید. باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری به غلظت‌های مختلف نمونه‌های بره موم نشان دادند به طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی بره موم شصت کلاً برای *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۴۸ و ۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر و برای *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۳/۱۲ و ۳/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد. بره موم منطقه جهان نما با میانگین ۱۴۲/۶۷ میلی گرم معادل اسید گالیک در هر گرم و ۳۵/۲۴ میلی گرم معادل کوئرستین در هر گرم نمونه به ترتیب بیشترین محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی را نشان دادند. نمونه شصت کلاً بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH را نشان داد. بین فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های بره موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آنها ارتباط مستقیم دیده شد (Garmani et al., 2018).



شکیا و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ایران، فعالیت ضدباکتریایی نمونه های بره موم و عسل از نواحی جغرافیایی با آب و هوای مختلف را علیه ایزوله های بومی و سویه های استاندارد /شریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی عسل جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل مناطق جنگلی بیش از مناطق دیگر بود به طوریکه MIC این نمونه های عسل در محدوده ۲۵-۱۲/۵ درصد حجمی/حجمی گزارش شد. نمونه های بره موم جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل در مناطق دشت با MBC در محدوده ۵۰-۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. باکتریهای گرم مثبت در مقایسه با باکتریهای گرم منفی و سویه های استاندارد در مقایسه با ایزوله های بومی حساسیت بیشتری نسبت به نمونه های بره موم و عسل نشان دادند و استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین باکتری های مورد آزمون گزارش شدند (Shakiba et al., 2018).

تعداد مطالعات مربوط به اثر ضدباکتریایی بره موم علیه باکتری های بی هوازی محدود است. با این حال، ارائه شده است که بره موم بر روی باکتری های بی هوازی گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی فعال است. بره موم فعالیت ضدباکتریایی را علیه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پرووتلا اورالیس، پورفیروموناس ژنژیوالیس، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، پیتواسترپتوکوکوس ان آئروبیوس، اکتینومایسس ناسلوندی و وایلونلا پارولا نشان داد (Koru et al., 2007). علاوه بر این، تحقیقات نشان از فعالیت مهم بره موم در برابر گونه های پورفیروموناس، فوزوباکتریوم،

پروپیونی باکتریوم، کلستریدیوم، پرووتلا، اکتینومایسس و باکتریوئیدس دارد (Shabbir et al., 2016). بره موم مکانیسم های ضد باکتریایی مختلفی مانند مهار تقسیم سلولی، فروپاشی غشاهای سیتوپلاسمی و دیواره های سلولی میکروبی، کاهش تحرک باکتری ها، غیرفعال سازی آنزیمی، باکتریولیز و مهار سنتز پروتئین را نشان می دهد (Fernandes Júnior et al., 2005; Nader et al., 2021). تمام ترکیبات مختلف که ترکیب بره موم را تشکیل می دهند، غنی از پلی فنول ها هستند که با پروتئین های میکروبی مختلف برای تشکیل پیوندهای یونی و هیدروژنی کار می کنند. این منجر به تغییر ساختار سه بعدی پروتئین ها و در نتیجه تغییر عملکرد آنها می شود. این اثرات محققان را تشویق کرده است تا بره موم را با آنتی بیوتیک ها ترکیب کنند تا بر مشکل مقاومت باکتریایی به داروها غلبه کنند (Orsi et al., 2012; Nader et al., 2021). هم افزایی بین عصاره اتانولی بره موم و آنتی بیوتیک های وانکومایسین و اگزاسیلین که سنتز دیواره سلولی باکتری را مهار می کنند، در برابر استرپتوکوکوس پیوژنز، VRE و MRSA مشاهده شده است (AL-Ani et al., 2018). همچنین، هم افزایی بین عصاره اتانولی بره موم و داروهایی که ریبوزوم های میکروبی (نئومایسین) را هدف قرار می دهند وجود داشت، اما با داروهایی که در پیوستن اسید فولیک یا DNA (سپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) و همچنین داروهایی که مسیرهای متابولیک را مهار می کنند (کوتریموکسازول) دخالت می کنند، وجود نداشت (Orsi et al., 2012).



جدول ۲. مطالعات مورد اشاره مبنی بر خواص ضدباکتریایی برهموم

نام محصول	هدف اصلی از مطالعه	باکتریهای مورد آزمون	نتیجه اصلی	نویسنده، سال، کشور	رفرنس
برهموم	بررسی فعالیت ضدباکتریایی برهموم جمع‌آوری شده از ایالت‌های مختلف برزیل علیه پانی‌باسیلوس لاروا / و مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم	پانی‌باسیلوس لاروا	تایید فعالیت ضدباکتریایی برهموم، برهموم برزیلی مؤثرتر از نمونه‌های ایالات متحده آمریکا بودند.	باستوس و همکاران، ۲۰۰۸، برزیل و آمریکا	Bastos et al., 2008
برهموم	بررسی فعالیت ضد میکروبی و فعالیت آنتی اکسیدانی برهموم سبز، عصاره‌های باکاریس دراکونکومیفولیا و آرتپیلین C	استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین (MSSA)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)	برهموم سبز اتانولی در مقایسه با سایر عصاره‌ها، فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بهتری نشان می‌دهد. این فعالیت‌ها ممکن است به وجود آرتپیلین C در هم‌افزایی با سایر ترکیبات عصاره‌ها مربوط باشد.	ویگا و همکاران، ۲۰۱۷، برزیل	Veiga et al., 2017
برهموم	فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی برهموم و ترکیبات مشتق شده از عصاره اتانولی در برابر پورفیروموناس ژنژیوالیس، یک پاتوژن کلیدی برای بیماری‌های پرودنتال	پورفیروموناس ژنژیوالیس	پورفیروموناس ژنژیوالیس حساسیت بالاتری نسبت به گونه‌های کامنسال دهانی مانند استرپتوکوک نشان داد.	یوشیماسو، ۲۰۱۸، ژاپن	Yoshimasu et al., 2018
برهموم	تهیه یک نانوامولسیون برای حمل عصاره‌های برهموم برزیلی به عنوان نگهدارنده طبیعی غذا و بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات شیمیایی عصاره‌ها	استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، اشریشیا کلی، سودوموناس آنروژینوزا	عصاره‌ها به خصوص عصاره اتانولی با غلظت بالایی از اسید p-کوماریک، آرتپیلین-C، دروپانین و کامپفید، فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نشان دادند. نانوامولسیون می‌تواند به عنوان نگهدارنده غذا استفاده شود و از تخریب جلوگیری کرده و طعم نامطلوب برهموم را بپوشاند.	سیبرت و همکاران، ۲۰۱۹، برزیل	Seibert et al., 2019
برهموم	تعیین غلظت فلاونوئیدهای اصلی موجود در برهموم شیلیایی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلم ترکیبات منفرد و مخلوط این ترکیبات در برابر کشت‌های استرپتوکوکوس مونانس	استرپتوکوکوس مونانس	پینوسمبرین، آپیزتین، کورستین و اسید کافئیک فنتیل استر فراوان‌ترین ترکیبات موجود در برهموم شیلی هستند. این پلی‌فنول‌ها در غلظت‌های پایین پتانسیل ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی قوی دارند.	ولوز، ۲۰۱۹، شیلی	Veloz et al., 2019
برهموم	درک فعالیت ضد میکروبی ترکیبات پینوسمبرین، گالاتین و کریسین موجود در برهموم، چه به صورت مستقل و چه به صورت ترکیبی.	استرپتوکوکوس مونانس، استرپتوکوکوس سوبرینوس، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سودوموناس آنروژینوزا و کلیسیلا پنومونه	ترکیبات موجود در برهموم آفریقای جنوبی به‌طور هم‌افزایی برای دستیابی به اثر ضد میکروبی بهینه عمل می‌کنند، در حالی که به‌طور هم‌زمان سمیت سلولی را به حداقل می‌رسانند.	خارسانی و همکاران، ۲۰۱۹، آفریقای جنوبی	Kharsany et al., 2019

Okńczyc <i>et al.</i> 2020	اوکینزیک، ۲۰۲۰، نپال	بره موم نپالی یک عامل ضدباکتری کارآمد است، به خصوص در برابر <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>هلیکوباکتر پیلوری</i> .	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> ، <i>انتروکوکوس فکالیس</i> ، <i>باسیلوس سوبتیلیس</i> ، <i>اشریشیا کلی</i> ، <i>سراسیا مارسه سنس</i> ، <i>شیگلا فلکسنری</i> ، <i>هلیکوباکتر پیلوری</i> ، <i>سودوموناس آئروژینوزا</i> و <i>کلبسیلا پنومونیه</i>	ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی، در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها و ترکیب شیمیایی عصاره‌های اتانولی بره موم نپالی	بره موم
Wojtyczka <i>et al.</i> , 2013	وچیتسکا و همکاران، ۲۰۱۳، لهستان	سویه‌های بالینی MSSA و MRSA با الگوهای مقاومت دارویی متفاوت، به EEPP حساس بودند.	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> حساس به متی‌سیلین (MSSA)، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)	ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی بره موم لهستانی هم به صورت تنها و هم در ترکیب با داروهای ضد استافیلوکوکی در برابر ایزوله‌های بالینی <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> حساس به متی‌سیلین و <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به متی‌سیلین در شرایط آزمایشگاهی	بره موم
Seidel <i>et al.</i> , 2008	سیدل و همکاران، ۲۰۰۸، انگلستان	عصاره‌های بره موم عمدتاً در برابر باکتری‌های گرم مثبت فعال بودند. فعالیت ضدباکتریایی بالایی برای نمونه‌هایی از مکان‌هایی که با آب و هوای جنگل‌های بارانی گرمسیری مرطوب مشخص می‌شوند، مشاهده شد.	باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی	غربالگری آزمایشگاهی عصاره‌های اتانولی بره موم جمع‌آوری شده از طیف وسیعی از کشورها در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل و مقایسه فعالیت آنها در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از روش میکروداپلوشن پراث	بره موم
Kilic <i>et al.</i> , 2005	کیلیک و همکاران، ۲۰۰۵، ترکیه	عصاره اتانولی، بره موم نمونه‌برداری شده از ترکیه دارای فعالیت ضد میکروبی قوی است و یک درمان جایگزین در برابر عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم مانند MRSA و VREF ارائه می‌دهد.	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به متی‌سیلین، <i>انتروکوکوس فاسیوم</i> مقاوم به وانکومایسین	کارایی ضد باکتریایی سه عصاره اتانولی بره موم نمونه‌برداری شده از سه منطقه جغرافیایی در ترکیه	بره موم
Garmani <i>et al.</i> , 2018	گرمنی و همکاران، ۲۰۱۸، ایران	باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری به غلظت‌های مختلف نمونه‌های بره موم نشان دادند. بین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های بره موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آنها ارتباط مستقیم دیده شد.	<i>باسیلوس سرئوس</i> ، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> ، <i>شیگلا دیسانتری</i> ، <i>اشریشیا کلی</i>	ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی سه نوع بره موم با موقعیت جغرافیایی مختلف از استان گلستان واقع در شمال ایران	بره موم
Shakiba <i>et al.</i> , 2018	شکیبا و همکاران، ۲۰۱۸، ایران	فعالیت ضدباکتریایی عسل مناطق جنگلی و نمونه‌های بره موم مناطق دشت بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری را نشان دادند.	ایزوله‌های بومی و سویه‌های استاندارد <i>اشریشیا کلی</i> ، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> ، <i>سودوموناس آئروژینوزا</i> و <i>باسیلوس سرئوس</i>	بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های بره موم و عسل از نواحی جغرافیایی با آب و هوای مختلف	بره موم و عسل



فعالیت ضدباکتریایی محصولات زنبور عسل (کوهساری) ۱۳.

بره موم	بررسی فعالیت ضد میکروبی پنج نمونه بره موم، جمع آوری شده از چهار منطقه مختلف در ترکیه و برزیل، در برابر نه سویه بی‌هوازی	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پروتلا اورالیس، پروتلا ملانینوزنیکا، پورفیروموناس ژنریوالیس، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، پیتواستریتوکوکوس ان آئروبیوس، پیتواستریتوکوکوس میکروس، اکتینومایسس ناسلوندی و وایلونلا پارولا	همه سویه‌ها حساس بودند و مقادیر MIC برای فعالیت بره موم از ۴ تا ۵۱۲ میلی گرم در میلی لیتر متغیر بود. بره موم کازان-آنکارا موثرترین مقادیر MIC را برای میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه نشان داد.	کورو و همکاران، ۲۰۰۷، ترکیه و برزیل Koru et al., 2007
بره موم	ارزیابی اثرات ضد میکروبی بره موم پاکستانی بر روی ۳۵ جدایه بالینی از پاتوژن‌های پریدنتال بی‌هوازی رنگدانه‌دار	پورفیروموناس ساکارولیتیکا، پورفیروموناس ژنریوالیس، پروتلا اینترمدیا، پروتلا ملانینوزنیکا، باکتریوئیدس فراژیلیس	بره موم پاکستان فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر پاتوژن‌های پریدنتال بی‌هوازی رنگدانه‌دار دارد.	شیر و همکاران، ۲۰۱۶، پاکستان Shabbir et al., 2016
بره موم	بررسی هم‌افزایی بین عصاره اتانولی بره موم و داروهای ضد میکروبی	استافیلوکوکوس اورئوس	هم‌افزایی بین عصاره اتانولی بره موم و کلرامفنیکل، جنتامایسین، تتیلامایسین، تتراسایکلین و وانکومایسین (به‌ویژه آن دسته از داروهایی که در سنتز پروتئین باکتریایی اختلال ایجاد می‌کنند) مشاهده شد.	فرناندز ژونیور و همکاران، ۲۰۰۵، برزیل Fernandes Júnior et al., 2005
بره موم	بررسی هم‌افزایی احتمالی بین بره موم و آنتی بیوتیک‌های مؤثر بر ریبوزوم (کلرامفنیکل، تتراسایکلین و نئومایسین) علیه سالمونلا تیفی در شرایط آزمایشگاهی	سالمونلا تیفی	بره موم بلغاری یک اثر ضد باکتریایی مهم و همچنین یک اثر سینرژیک با آنتی بیوتیک‌های مؤثر بر ریبوزوم نشان داد.	اورسی و همکاران، ۲۰۱۲، برزیل و بلغارستان Orsi et al., 2012
بره موم	بررسی ترکیب شیمیایی، فعالیت‌های بیولوژیکی و خواص هم‌افزایی با آنتی بیوتیک‌های نمونه‌های بره موم جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف	استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ائروتوکوکوس فکالیس، استریتوکوکوس پیوژنز، استریتوکوکوس پنومونیه، استریتوکوکوس اورالیس، استریتوکوکوس آکالاکتیه، استریتوکوکوس ترموفیلوس، باسیلوس سوبتیلیس، ائروتوکوکوس کازلیفلاروس، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا کلر اسوئیس، شیگلا فلکسنری، هموفیلوس آنفولانزا، آسینتوباکتر بومانی، ائروتوباکتر کلواکه، یرسینیا ائروتوکولیتیکا، بورخلدیریا سپاسیا	عصاره بره موم به‌طور هم‌افزایی با آنتی بیوتیک‌ها، به‌ویژه آنتی بیوتیک‌هایی که بر سنتز دیواره سلولی (وانکومایسین و آگزاسیلین) تأثیر می‌گذارند، اثربخشی در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو را افزایش داد.	آل آنی و همکاران، ۲۰۱۸، آلمان، ایرلند و جمهوری چک AL-Ani et al., 2018

عصاره اتانولی بره موم هنگامی که با آنتی‌بیوتیک‌هایی که با ییوستنز پروتئین باکتریایی تداخل می‌کنند مانند تتراسایکلین، لینزولید، کلرامفنیکل، جنتامایسین، توبرامایسین و نتیل مایسین ترکیب شود، در برابر MRSA و MSSA موثرتر است (Wojtyczka et al., 2013).

بره موم به دلیل دارا بودن فعالیت‌های زیستی مختلف در پزشکی کاربرد فراوانی دارد. اثر عصاره موضعی بره موم بر روی آکنه و لگاریس صورت آزمایش شد که در آن افراد با محلول موضعی عصاره اتانولی بره موم درمان شدند. این محلول فعالیت باکتریولوژیکی قابل توجهی را بر روی پروپیونی باکتریوم آکنه و استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس نشان داد و همچنین در برابر آکنه صورت مؤثر بود (Ali et al., 2015). کارایی بره موم در مهار پوسیدگی دندان کودکان با مهار پوسیدگی در ۹۹/۸۰ درصد موارد گزارش شد (Darwita et al., 2018). مطالعه دیگری، محققان بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن را با محلول هیدروالکلی عصاره بره موم درمان کردند. این درمان موثرتر از درمان معمولی بود زیرا به طور قابل توجهی زنده ماندن پورفیروموناس ژنژیوالیس را کاهش داد (Gebara et al., 2003).

فعالیت ضدباکتریایی گرده زنبور عسل

گرده گل‌های مختلف توسط زنبورهای صحرایی جمع آوری شده و توسط آنزیم‌های زنبور عسل که از غدد بزاقی و شهد ترشح می‌شود آگلوتینه می‌شود. سپس گرده را در کوریکیولاهای واقع در ساق پاهای عقبی زنبورها قرار می‌دهند تا بارهای گرده را که معمولاً به عنوان گرده زنبور عسل شناخته می‌شود، به شکل گرانول تشکیل دهند. گرده ماده خامی است که زنبورها برای تولید نان زنبور عسل، پایه غذای کندو، استفاده می‌کنند. گرده‌های ذخیره شده در سلول‌های لانه زنبوری با لایه نازکی از عسل و موم پوشانده می‌شود. این منجر به

تشکیل نان زنبور عسل می‌شود که تحت تخمیر بی‌هوازی قرار می‌گیرد و توسط اسید لاکتیک تشکیل شده حفظ می‌شود. در مقایسه با عسل، مقدار کمی گرده زنبور عسل در کندوها ذخیره می‌شود و در زمان غیاب خوراک مورد استفاده قرار می‌گیرد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که زنبورها گرده را از گونه‌های گیاهی بسیار کمی جمع‌آوری می‌کنند. گرده زنبور عسل حاوی حدود ۲۵۰ ماده از جمله اسیدهای آمینه، لیپیدها، ویتامین‌ها، درشت مغذی‌ها و ریز مغذی‌ها، فلاونوئیدها و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی آلی است که آن را به یک غذای ایده آل تبدیل می‌کند. ترکیب آن بسته به منشأ جغرافیایی زیستی، زیستگاه اکولوژیکی، فصل، شرایط آب و هوایی در طول جمع‌آوری، و همچنین به نژاد زنبور عسل و حتی مدیریت زنبورداری متفاوت است. ترکیبات فنلی مسئول فعالیت زیستی گرده زنبور عسل هستند. قرن‌هاست که از گرده زنبور عسل به دلیل خواص دارویی و تغذیه‌ای آن استفاده می‌شود. به همین ترتیب، بسیاری از فیلسوفان باستان برای گرده گل به عنوان بخشی از رژیم غذایی سالم خود ارزش زیادی قائل بودند (Kaškonienė et al., 2020; Taha et al., 2019; Campos et al., 2010).

گرده زنبور عسل اغلب با استفاده از تله گرده در ورودی یا در کندو جمع‌آوری می‌شود. گاهی مستقیماً از پاهای عقب زنبور عسل جمع‌آوری می‌شود (Nader et al., 2021; Abouda et al., 2011). آب، اتانول و متانول رایج‌ترین حلال‌های مورد استفاده برای استخراج گرده زنبور عسل هستند. مطالعات نشان داد که بیشترین محتوای ترکیبات فعال زیستی در عصاره‌های اتانولی یا آبی در مقایسه با گرده طبیعی زنبور عسل وجود دارد (Kroyer et al., 2001).



فعالیت ضدباکتریایی محصولات زنبور عسل (کوهساری) ۱۵.

جدول ۳. مطالعات مورد اشاره مبنی بر خواص ضدباکتریایی گرده گل

نام محصول	هدف اصلی از مطالعه	باکتریهای مورد آزمون	نتیجه اصلی	نویسنده، سال، کشور	شماره رفرنس
گرده گل	بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های نان زنبور عسل و گرده گل مراکشی	اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آنروژینوزا	حساسیت بیشتر باکتریهای گرم مثبت در مقایسه با باکتریهای گرم منفی	ابودا و همکاران، ۲۰۱۱، مراکش	Abouda et al., 2011
گرده گل	تعیین منشأ گیاهی و ارزیابی محتوای فنی، خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گرده‌های گل پنج پارک ملی پرتغال	باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی و اشریشیا کلی	حساسیت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی و اشریشیا کلی به گرده گل زنبور پرتغال	مورایس و همکاران، ۲۰۱۱، پرتغال	Morais et al., 2011
گرده گل	بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی نمونه‌های گرده جمع‌آوری‌شده زنبور عسل علیه کلستریدیوم ها	کلستریدیوم بوتیریکوم، کلستریدیوم هیستولیتیکوم، کلستریدیوم اینتستینال، کلستریدیوم پرفرنزئس و کلستریدیوم راموسوم	بهترین فعالیت ضد میکروبی گرده جمع‌آوری‌شده زنبور عسل علیه کلستریدیوم بوتیریکوم و پرفرنزئس یافت شد.	کاسانیوا و همکاران، ۲۰۱۴، اسلواکی	Kacaniova et al., 2014
گرده گل	تعیین پتانسیل ضدباکتریایی سه نمونه عسل و گرده زنبور عسل جمع‌آوری‌شده از کندوهای زنبور عسل از سه منطقه اقلیمی استان گلستان واقع در شمال ایران علیه جدایه‌های بالینی/انتروکوکوس، استافیلوکوکوس و سودوموناس	جدایه‌های بالینی/انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس/ایدرومایدیس و سودوموناس آنروژینوزا	نمونه‌های عسل و گرده زنبور عسل منطقه جنگل‌های رامیان بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. جدایه‌های استافیلوکوکوس/ایدرومایدیس بیشترین حساسیت و ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس بیشترین مقاومت را در روش چاهک نشان دادند. جدایه‌های سودوموناس آنروژینوزا و انتروکوکوس فکالیس بالاترین سطح مقاومت را در روش رقت براث داشتند	یزدانی و همکاران، ۲۰۲۴، ایران	Yazdani et al., 2024
گرده گل	تعیین خواص آنتی اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های گرده زنبور عسل تک‌گل	لیستریا منوسایتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آنروژینوزا، اشریشیا کلی	باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به گرده زنبور عسل حساس‌تر بودند.	فاترکوا-آرامکوا و همکاران، ۲۰۱۳، اسلواکی	Fatrcová-Šramková et al., 2013
گرده گل	ارزیابی مقایسه‌ای محصولات زنبور عسل از نظر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی	لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی O157: H7 و سالمونلا انترتیدیس	عصاره گرده‌ها، رشد لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس را با مقادیر مختلف مهار کردند.	کارادال و همکاران، ۲۰۱۸، ترکیه	Karadal et al., 2018
گرده گل	تعیین فواید بالقوه گرده زنبور عسل اسلونیایی	اشریشیا کلی، کمپیلوباکتر ژژونی، لیستریا مونوسایتوزنز	فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه علیه/اشریشیا کلی و کمپیلوباکتر ژژونی و فعالیت ناچیز علیه لیستریا مونوسایتوزنز	سیمونوویچ و همکاران، ۲۰۱۹، اسلونی	Simunovic et al., 2018



گرده گل	تعیین منشأ گیاهی، ترکیب شیمیایی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی گرده زنبور عسل	<i>اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروینوزا، استرپتوکوکوس پیوژنز، انتروکوکوس فکالیس</i>	عصاره‌های گرده زنبور عسل، خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی، به ویژه در برابر میکروارگانیسم بیماری‌زای <i>استرپتوکوکوس پیوژنز</i> ، نشان دادند. کوئرستین و میریستین در تمام نمونه‌ها در غلظت‌های زیاد یافت شدند.	بریدی و همکاران، ۲۰۱۹، شیلی Bridi et al., 2019
گرده گل، برهموم و موم	آزمایش فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های برهموم، گرده گل و موم زنبور عسل	<i>لیستریا مونوسیتوژنز، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا، اشریشیا کلی</i>	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> حساس‌ترین باکتری به عصاره اتانولی گرده گل بود.	کاسانیوا و همکاران، ۲۰۱۲، اسلواکی Kacaniova et al., 2012
گرده گل، برهموم	بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره برهموم، عصاره گرده گل و روغن برگ بو (<i>Laurus nobilis</i>)	<i>باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کلی، یرسینیا انتروکولیتیکا، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسیتوژنز</i>	گرده گل بر خلاف برهموم و روغن‌های گیاه، هیچ اثر ضد میکروبی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های آزمایش شده نداشت. فعالیت ضد میکروبی وابسته به غلظت است.	ارکمن و همکاران، ۲۰۰۸، ترکیه Erkmen et al., 2008
گرده گل	بررسی ارتباط بین منشأ گیاهی چند گرده گل زنبور عسل از شیلی با محتوای فنلی، پروتئین و کاروتنوئید و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی	<i>سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، اشریشیا کلی</i>	فعالیت ضدباکتریایی در برابر تمام باکتری‌های مورد آزمایش مشاهده شد. برخی همبستگی‌ها بین منشأ گیاهی و خواص شیمیایی، آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی گرده گل مشاهده شد.	ولاکوئز و همکاران، ۲۰۱۷، شیلی Velásquez et al., 2017
گرده گل	ارزیابی سه نوع گرده گل زنبور عسل مصری از منابع گیاهی مختلف به عنوان عوامل ضدباکتری طبیعی، آنتی اکسیدان‌ها و افزودنی‌های غذایی	<i>استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا انتریتیدیس، سودوموناس آئروژینوزا</i>	عصاره متانولی گرده گل زنبور عسل ذرت، شبدر و نخل خرما به ترتیب بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>اشریشیا کلی</i> حساس‌ترین باکتری‌ها بودند.	خیدر و همکاران، ۲۰۱۳، مصر Khider et al., 2013

فعالیت ضدباکتریایی گرده زنبور عسل مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با حساسیت بالاتر در باکتری‌های گرم مثبت تأثیر مثبت دارد. یک مطالعه بر روی فعالیت ضد باکتریایی گرده زنبور عسل مراکشی یک اثر بازدارندگی را بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، گونه‌های *استرپتوکوکوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* با حساسیت بالاتر در باکتری‌های گرم مثبت نشان داد (Abouda et al., 2011). به طور مشابه، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی* و *اشریشیا کلی* به گرده زنبور پرتغال حساس بودند (Morais et al., 2011).

فعالیت ضد میکروبی گرده زنبور عسل نیز بر روی ارگانسم‌های رده کلستریدا، مثل کلستریدیوم بوتیریکوم، کلستریدیوم هیستولیتیکوم، کلستریدیوم اینتستینال، کلستریدیوم پرفرنجنس و کلستریدیوم راموسوم ارزیابی شد. نتایج که یک فعالیت ضد باکتریایی در برابر همه سویه‌های کلستریدایی که در بالا ذکر شد، را نشان داد، بهترین فعالیت ضدباکتریایی علیه کلستریدیوم بوتیریکوم و کلستریدیوم پرفرنجنس یافت شد (Kacaniova et al., 2014).

یزدانی و همکاران در سال ۲۰۲۴، پتانسیل ضدباکتریایی سه نمونه عسل و گرده زنبور عسل جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل از سه منطقه اقلیمی استان گلستان واقع در شمال ایران علیه جدایه‌های بالینی *انتروکوکوس*، *استافیلوکوکوس* و *سودوموناس* را بررسی کردند. نمونه‌های عسل و گرده زنبور عسل منطقه جنگل‌های رامیان بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. به‌طوری که میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک برای عسل ۲۲/۹ میلی‌متر و برای گرده زنبور ۱۳/۹ میلی‌متر ارزیابی شد. MIC برای این نمونه عسل ۱۰۷/۲

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره گرده زنبور عسل ۴۰۴/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرماییدیس* بیشترین حساسیت و ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* بیشترین مقاومت را در روش چاهک نشان دادند. جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* بالاترین سطح مقاومت را در روش رقت براث (ماکرودایلوشن) داشتند (Yazdani et al., 2024).

عصاره‌های اتانولی و متانولی گرده زنبور عسل اسلواکی برای خاصیت ضد باکتریایی آنها در برابر لیستریا مونوسایتوزنز، *سودوموناس* *آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیا کلی* مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین باکتری به عصاره گرده اتانولی زنبور عسل بود در حالی که *سالمونلا انتریکا* حساس‌ترین باکتری به عصاره متانولی بود (Fatrcová-Šramková et al., 2013). *اشریشیا کلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریا مونوسایتوزنز با عصاره اتانولی گرده مورد آزمایش قرار گرفتند. مشخص شد که رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و لیستریا مونوسایتوزنز مهار شده است در حالی که این مورد برای *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* که هر دو نسبت به عصاره اتانولی گرده مقاومت نشان دادند، صدق نمی‌کند (Karadal et al., 2018). در برخی از مطالعات، ماهیت حلال مورد استفاده ممکن است بر فعالیت ضد باکتریایی گرده زنبور عسل تأثیر بگذارد، زیرا همان نمونه می‌تواند در برابر باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت باشد. عصاره اتانولی گرده زنبور عسل اسلوانی فعالیت ضدباکتریایی بالاتری در برابر باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی* و *کمپیلوباکتر ژرونی*) نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (*لیستریا*



مونوسایتوزن) نشان داد (Šimunovic et al., 2019). همین نتیجه برای گرده زنبور عسل جمع آوری شده از ناحیه‌ای از شیلی مشاهده شد که فعالیت ضدباکتریایی را فقط بر علیه *استرپتوکوکوس پیوژنز* نشان داد و هیچ فعالیتی در برابر *شریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروینوزا* نشان نداد (Bridi et al., 2019). علاوه بر این، *شریشیا کلی* حساس‌ترین سویه به عصاره اتانولی (۷۰ درصد) گرده زنبور عسل بود اما نسبت به عصاره اتانولی (۹۶ درصد) مقاوم بود که این واقعیت را تأیید می‌کند که سویه‌های باکتریایی با توجه به ویژگی حلال و غلظت آن رفتار می‌کنند (Kacaniova et al., 2012).

مکانیسم ضدباکتری گرده زنبور عسل تاکنون نامشخص است. مطالعات پیشنهاد می‌کند که فعالیت ضدباکتریایی گرده زنبور عسل با گلوکز اکسیداز مرتبط است. آنزیمی که توسط زنبورهای عسل تولید می‌شود و در طی فرآیند تشکیل گرانول به گرده اضافه می‌شود (Campos et al., 2008). علاوه بر این، این فعالیت ممکن است با محتوای فنلی کل و ترکیب فنل مرتبط باشد. اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدهای موجود در گرده می‌توانند با تخریب غشای سیتوپلاسمی که منجر به از دست دادن یون‌های پتاسیم و شروع اتولیز سلولی می‌شود، علیه سلول‌های باکتریایی عمل کنند (Erkmen et al., 2008). محققان دیگر استدلال می‌کنند که ترکیب گرده با فعالیت ضد باکتریایی آن مرتبط است. این به احتمال زیاد به دلیل این واقعیت است که بسیاری از عصاره‌های گرده زنبور عسل با کمترین غلظت‌های فنل کل در برابر میکروارگانیسم‌ها مؤثرتر بودند (Velásquez et al., 2017). علاوه بر وجود بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مانند اسیدهای چرب و احتمالاً متابولیت‌های میکروبی که به دلیل فعالیت ضد باکتریایی خود در گرده زنبور عسل شناخته

شده‌اند. با کمال تعجب، گرده زنبور عسل در برابر بسیاری از گونه‌های باکتریایی بیماری‌زا اثر بازدارندگی دارد، اما در برابر کشت‌های آغازگر اسید لاکتیک عمل نمی‌کند. از این رو، گرده زنبور عسل می‌تواند به عنوان یک نامزد بالقوه مناسب تر از آنتی‌بیوتیک‌هایی باشد که هم پاتوژن‌ها و هم پروبیوتیک‌ها را از بین می‌برند (Khider et al., 2013).

فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل

زهر زنبور عسل (BV یا Bee venom) یک ماده سمی است که توسط غدد سمی زنبورهای کارگر ماده به عنوان مکانیزم حفاظتی ترشح می‌شود. اگرچه برای شکارچیان سمی است، اما BV از مصر باستان (۴۰۰۰ قبل از میلاد) برای بسیاری از اهداف دارویی استفاده شده است. زهر زنبور عسل، به طور مستقیم یا غیرمستقیم برای درمان برخی بیماری‌ها، مانند آرتریت روماتیسمی، به بدن وارد می‌شود (Wehbe et al., 2019). فعالیت ضد میکروبی و استفاده پزشکی از زهر زنبور عسل به دلیل وجود مولکول‌های فعال زیستی در پپتیدهای خاص است که اجزای اصلی هستند و ۴۸-۵۰ درصد وزن خشک زهر زنبور عسل را تشکیل می‌دهند. زهر *Apis mellifera* مایعی بی‌بو و شفاف است که از ۸۸ درصد آب و تنها ۰/۱ گرم زهر خشک تشکیل شده است. زهر خشک، خود بسیار غنی از پپتیدها به ویژه ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانولاسیون ماست سل (MCD یا Mast cell degranulating)، آنزیم‌هایی مانند فسفولیپاز A₂ (PLA₂) و هیالورونیداز است (Wehbe et al., 2019; Wang et al., 2020). در میان این پپتیدها، ملیتین اصلی‌ترین ترکیب فعال بیولوژیکی در زهر زنبور عسل است. حدود ۵۰ درصد از زهر زنبور عسل خشک را نشان می‌دهد. یکی دیگر از اجزای اصلی فسفولیپاز A₂ است که سمی‌ترین پپتید زهر زنبور عسل است (Wehbe



توانند به صورت سینرژیک عمل کرده و به غشای سلولی آسیب برسانند (Abd El-Wahed et al., 2019). ملیتین دارای گزینش پذیری پایینی برای غشای سلولی است و از طریق فرآیند تشکیل منافذ به شدت روی لیپیدهای آن اثر می گذارد. این فرآیند باعث آزاد شدن محتویات سیتوپلاسمی سلول می شود و منجر به لیز سلولی می شود. این روش عمل به احتمال زیاد مسئول خواص ضد باکتریایی زهر زنبور عسل است (Wehbe et al., 2019; Nader et al., 2021; Asthana et al., 2004).

چندین مطالعه توانایی زهر زنبور عسل را برای از بین بردن باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت نشان داده اند (Yacoub et al., 2020). فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل از نژاد خالص *Apis mellifera* و همچنین هیبرید در برابر پنج سویه باکتری مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که زهر زنبور عسل یک فعالیت ضدباکتریایی در برابر هر پنج سویه باکتریایی نشان داد. مطالعات دیگر ثابت کردند که زهر زنبور عسل می تواند به عنوان یک عامل ضد میکروبی مکمل در برابر باکتری های بیماری زا مورد استفاده قرار گیرد (Hegazi et al., 2015). پاتوژن های منتقله از غذا خطر ایجاد مقاومت ضد میکروبی و تولید بیوفیلم هایی مانند *سالمونلا* را ایجاد می کنند. در مطالعه ای، ۱۶ سویه *سالمونلا* جدا شده از طیور بر علیه آپیتوکسین (زهر زنبور عسل) آزمایش شدند. در ۱۴ سویه از ۱۶ سویه آزمایش شده، آپیتوکسین تشکیل بیوفیلم را کاهش داد و بیوفیلم از پیش ساخته شده را تا ۴۷ درصد از بین برد. همچنین، آپیتوکسین تحرک باکتری را افزایش داد و MIC بین ۱۰۲۴-۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود (Arteaga et al., 2015).

سایر مطالعات بر روی اثر ضد باکتریایی زهر زنبور عسل در برابر انواع دیگری از باکتری ها مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیا کلی* متمرکز بودند. نتایج نشان داد که زهر زنبور عسل در کشتن هر دو سویه باکتری فعال است. در ۱۰ برابر MIC، رشد مجدد *شریشیا کلی* در ۱۸ ساعت مشاهده نشد در حالی که برای *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۵ برابر MIC مشاهده نشد (Han et al., 2009). در خصوص سویه های گرم مثبت، دامنه MIC از ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تا ۸ میکروگرم در میلی لیتر برای حساس ترین گونه یعنی *باسیلوس سوبتیلیس* بود. همچنین، سویه های گرم منفی نسبت به زهر زنبور عسل مقاوم تر بودند (MIC ۶۰ تا بیش از ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر). این را می توان با ماهیت غشای سلولی باکتری توضیح داد (AL-Ani et al., 2015; Nader et al., 2021). غشای خارجی باکتری های گرم منفی شامل لیپوپلی ساکاریدها (LPS) است که مانع از نفوذ ملیتین موجود در زهر زنبور عسل می شود. بنابراین، ملیتین مسئول فعالیت ضد باکتریایی است. در حالی که در باکتری های گرم مثبت، LPS وجود ندارد، که نشان می دهد ملیتین می تواند راحت تر به غشای سلولی نفوذ کند و منافذ ایجاد کند و نفوذ پذیری سلول را از طریق غشای سیتوپلاسمی افزایش دهد (Wu et al., 2016). فسفولیپاز A₂ که به وفور در زهر زنبور عسل خام نیز وجود دارد می تواند غشای سلولی باکتری های گرم منفی را با هیدرولیز آنزیمی فسفولیپیدها به طور غیرمستقیم مختل کند. مطالعات دیگر، فعالیت ضد باکتریایی زهر زنبور عسل خام و دو بیوپتید اصلی آن ملیتین و فسفولیپاز A₂ را علیه پاتوژن های دهان مسئول پوسیدگی دندان یعنی باکتریهای *لاکتوباسیلوس کازئی*، *استرپتوکوکوس سالیواریس*، *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس میتیس*، *استرپتوکوکوس سوبرینوس*،



استرپتوکوکوس سانگوئینیس و انتروکوکوس فکاليس گزارش کردند. ملیتین دو برابر زهر زنبور عسل خام در برابر باکتری های آزمایش شده فعال بود (۴ تا ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر). در خصوص فسفولیپاز A₂، آن تنها در برابر لاکتوباسیلوس کازئی در غلظت بیش از ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر فعال بود (Leandro et al., 2015). به طور مشابه، ملیتین فعالیت ضد میکروبی را در برابر سویه های استافیلوکوک و همچنین سویه های MRSA نشان داد در حالی که فسفولیپاز A₂ هیچ تاثیری بر روی همان سویه ها نشان نداد (Choi et al., 2015). همچنین، نشان داده شده است که اسیدهای آمینه خاص و موقعیت آن ها نقش مهمی در فعالیت ضد باکتریایی اعمال شده توسط ملیتین دارند. به عنوان مثال، عدم وجود باقیمانده (Residue) پرولین در موقعیت ۱۴ به طور قابل توجهی فعالیت ضد میکروبی ملیتین را کاهش می دهد (Jamasbi et al., 2014). مکانیسم ضد باکتریایی پپتیدهای جدید مشتق شده از ملیتین MDP₁ و MDP₂ در برابر سویه های مقاوم به چند دارو مانند /شریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) مورد ارزیابی قرار گرفت. دو پپتید مشتق شده فعالیت ضدباکتریایی قوی در برابر سویه های مرجع سه سویه مقاوم به چند دارو در مقایسه با ملیتین بومی از طریق تغییر و آسیب غشاء نشان دادند (Akbari et al., 2018).

از سوی دیگر، درمان های ضد میکروبی به دلیل افزایش تعداد باکتری های مقاوم به چند دارو (MDR یا Multidrug resistant) و همچنین بیوفیلم های باکتریایی که درمان آن ها بسیار سخت است، روز به روز کارآمدی شان کمتر می شود. بین ۳۱۷ نمونه مثبت برای رشد باکتری، ۱۲۴ ایزوله MDR از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت بود. زهر زنبور عسل درصد مهار رشد کامل

(۱۰۰٪) را در برابر تمام جدایه های MDR آزمایش شده با طیف وسیعی از MICs و MLCs نشان داد که بین ۵۰-۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۰۰-۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر، به ترتیب علیه همه MDR های گرم منفی و یک گرم مثبت بود (Fadl, 2018).

بطور کلی زهر زنبور عسل و دو ترکیب اصلی آن ملیتین و فسفولیپاز A₂ فعالیت ضد باکتریایی بسیار امیدوارکننده ای را در برابر چندین سویه باکتریایی بیماری زا حتی در برابر باکتری های مقاوم به چند دارو نشان می دهند. با این حال، همیشه باید در نظر داشت که این بیوپپتیدها سمی هستند و در صورت تجویز اشتباه ممکن است به عنوان عوامل سمی عمل کنند. ملیتین سمی ترین جزء در زهر زنبور عسل است. در حالی که مسئول اکثر دردهای ناشی از نیش زنبور است، تنها یک واکنش آلرژیک جزئی ایجاد می کند. برخلاف فسفولیپاز A₂ که آلرژی زاترین و ایمنی زاترین پروتئین در زهر زنبور عسل است (Pucca et al., 2019). مسمومیت با زهر زنبور عسل می تواند منجر به تظاهرات بالینی زیادی مانند واکنش های التهابی موضعی، واکنش های آلرژیک، شوک های آنافیلاکتیک و واکنش های سمی سیستمیک شود (Almeida et al., 2011). درمان های ایده آل در برابر اثر سمی زهر زنبور، کورتیکواستروئیدها، آنتی هیستامین ها و آدرنالین عضلانی بسته به شدت سموم زنبور عسل هستند (Fitzgerald and Flood, 2006).

بسیاری از مطالعات بالینی روی زهر زنبور عسل نتایج امیدوارکننده ای را نشان داده اند. آکنه، یکی از شایع ترین مشکلات در میان نوجوانان، معمولاً با آنتی بیوتیک ها برای از بین بردن باکتری های ایجاد کننده درمان می شود، اما در برخی موارد مقاومت باکتریایی ممکن است رخ دهد (Kim et al., 2019).



جدول ۴. مطالعات مورد اشاره مبنی بر خواص ضد باکتریایی زهر زنبور عسل

نام محصول	هدف اصلی از مطالعه	باکتریهای مورد آزمون	نتیجه اصلی	نویسنده، سال، کشور	رفرنس
زهر زنبور عسل	بررسی فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> ، <i>اشریشیا کلی</i> ، <i>استرپتوکوکوس پیوژنز</i> ، <i>کلبسیلا پنومونیه</i> ، <i>سودوموناس آئروژینوزا</i>	تایید فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل	هگازی و همکاران، ۲۰۱۵، مصر	Hegazi et al., 2015
زهر زنبور عسل	ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی زهر زنبور عسل علیه سویه های سالمونلا	سویه های سالمونلا انتریکا	تایید فعالیت ضد سالمونلایی و ضد بیوفیلمی زهر زنبور عسل	آرته آگا و همکاران، ۲۰۱۵، اسپانیا	Arteaga et al., 2015
زهر زنبور عسل	ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل کامل و ملیتین خالص شده	<i>اشریشیا کلی</i> ، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	تایید فعالیت ضدباکتریایی زهر زنبور عسل کامل و ملیتین خالص شده	هان و همکاران، ۲۰۰۹، کره جنوبی	Han et al., 2009
زهر زنبور عسل	بررسی فعالیت ضد میکروبی زهر زنبور عسل و جزء اصلی آن، ملیتین، به تنهایی یا در ترکیبات دو دارویی و سه دارویی با آنتی بیوتیک ها یا متابولیت های ثانویه گیاهی ضد میکروبی	سویه های <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به متی سیلین، <i>اشریشیا کلی</i> ، <i>اشریشیا کالی</i> ، <i>مایکوباکتریوم های سریع الرشد</i>	زهر زنبور و ملیتین به طور هم افزایی اثر باکتری کشی چندین عامل ضد میکروبی را هنگام استفاده ترکیبی، به ویژه هنگامی که داروها بر چندین هدف مولکولی متفاوت تأثیر می گذارند، افزایش می دهند.	آل آنی و همکاران، ۲۰۱۵، آلمان	AL-Ani et al., 2015
زهر زنبور عسل	مقایسه فعالیت ضد میکروبی و سمیت سلولی ملیتین طبیعی و دو چشم یافته آن	<i>لیستریا مونوسیتوژنز</i>	ملیتین طبیعی فعالیت ضد میکروبی بالاتری را در برابر لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد.	وو و همکاران، ۲۰۱۶، آمریکا	Wu et al., 2016
زهر زنبور عسل	ارزیابی پتانسیل ضد باکتریایی آپیتوکسین تولید شده توسط زنبور عسل در برابر عوامل ایجاد کننده پوسیدگی دندان	<i>استرپتوکوکوس سالیاریوس</i> ، <i>استرپتوکوکوس موناس</i> ، <i>استرپتوکوکوس سورینوس</i> ، <i>استرپتوکوکوس میتیس</i> ، <i>استرپتوکوکوس سانگوتیس</i> ، <i>لاکتوباسیلوس کازئی</i> ، <i>اشریشیا کالی</i>	نشان دادند. ملیتین فعال ترین جزء در آپیتوکسین بود. آپیتوکسین و جزء آن ملیتین کاربرد بالقوه ای در برابر پاتوژن های دهانی دارند.	لئوناردو و همکاران، ۲۰۱۵، برزیل	Leandro et al., 2015
زهر زنبور عسل	ارزیابی زهر زنبور عسل و ماده فعال اصلی آن، ملیتین، را از نظر فعالیت های ضد باکتریایی و محافظت درون تنی در برابر عفونت های MRSA	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به متی سیلین، <i>استرپتوکوکوس پنومونیه</i> ، <i>استرپتوکوکوس آگالاکتیه</i> ، <i>استرپتوکوکوس گوردونی</i> ، <i>اسافیلوکوکوس اپیدرمایدیس</i> ، <i>استرپتوکوکوس بویس</i>	زهر زنبور عسل، که ذاتاً سمی است، هنگام استفاده به عنوان یک درمان ضد MRSA اثرات منفی دارد. با این حال، ملیتین، جزء اصلی زهر زنبور عسل، اثرات ضد باکتریایی با حداقل سمیت در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی نشان می دهد.	چویی و همکاران، ۲۰۱۵، کره جنوبی	Choi et al., 2015
زهر زنبور عسل	بررسی مکانیسم ضدباکتریایی پپتیدهای جدید مشتق شده از ملیتین (یعنی MDP1 و MDP2) در برابر <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به چند دارو، <i>اشریشیا کلی</i> و <i>سودوموناس آئروژینوزا</i>	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> مقاوم به چند دارو، <i>اشریشیا کلی</i> و <i>سودوموناس آئروژینوزا</i>	MDP1 و MDP2 یکپارچگی غشاهای باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را تغییر داده و از طریق آسیب های غشایی، باکتری ها را از بین می برند.	اکبری و همکاران، ۲۰۱۸، ایران	Akbari et al., 2018
زهر زنبور عسل	اثر ضدباکتریایی و ضد بیوفیلمی زهر زنبور عسل برای مهار باکتری های پاتوژن مقاوم به چند دارو	<i>اشریشیا کلی</i> ، <i>کلبسیلا پنومونیه</i> ، <i>اشریشیا کالی</i> ، <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> ، <i>استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین</i> ، <i>استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین</i> ، <i>استافیلوکوکوس همولیتیکوس</i> و <i>اشریشیا کالی</i>	تایید تأثیر زهر زنبور عسل علیه باکتری های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک	فدل، ۲۰۱۸، مصر	Fadl, 2018



Molan et al., 1992; Bagheri et al., 2017; Hizomi Shirejini et al., 2018; Bagheri et al., 2016

اثر ضدباکتریایی عسل به واسطه دو مکانیسم انجام می شود: یک مسیر وابسته به پراکسید و یک مسیر مستقل از پراکسید. در مسیر پراکسید هیدروژن، H_2O_2 توسط گلوکز اکسیداز، یک آنزیم متابولیزه کننده کربوهیدرات که توسط زنبورها به شهد اضافه می شود، تشکیل می شود. همانطور که مطالعات قبلی نشان داد، اکسیداسیون آنزیمی گلوکز مسئول فعالیت ضد میکروبی عسل است. هنگامی که نمونه های عسل با کاتالاز، آنزیمی که پراکسید هیدروژن را تجزیه می کند، تیمار شدند، رشد باکتریایی کاهش یافت. در نهایت، هنگامی که H_2O_2 توسط کاتالاز حذف شد، از تخریب DNA (ناشی از اثر باکتریوستاتیک عسل) جلوگیری شد (Sowa et al., 2017; Bang et al., 2003;) (Brudzynski et al., 2012).

در مورد مسیر مستقل از پراکسید، خواص فیزیکوشیمیایی متشکل از ویسکوزیته بالا و محتوای قند بالا دو عاملی هستند که به عسل اثر ضدباکتریایی آن را می دهند. این احتمالاً به این دلیل است که محتوای قند زیاد در عسل باعث بهبود جذب مجدد الکترولیت و آب در روده می شود. علاوه بر این، سطح pH پایین رشد میکروبی را متوقف می کند (Kwakman et al., 2010). متیل گلیوکسال (MGO) یکی دیگر از ترکیبات فعال زیستی است که در عملکرد ضدباکتریایی غیر پراکسیدی نقش دارد. با تبدیل غیر آنزیمی دی هیدروکسی استون (که در شهد گل‌های *Leptospermum scoparium* یافت می شود) تولید می شود. عسل مانوکا، عسلی که به دلیل داشتن MGO دارای فعالیت ضد باکتریایی غیر پراکسیدی است، از درخت مانوکا خانواده Myrtaceae، *L. scoparium*

در یک مطالعه بالینی که توسط هان و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، محصولات مراقبت از پوست با یا بدون زهر زنبور عسل بر روی ۱۲ فرد مبتلا به آکنه آزمایش شدند. نتایج کاهش ۵۷/۷ درصدی در ATP اندازه گیری شده برای ارزیابی کاهش میکروب های پوست را نشان داد. بنابراین، محصولات آرایشی و مراقبت از پوست حاوی زهر زنبور عسل می توانند به عنوان یک عامل درمانی امیدوارکننده ضد آکنه استفاده شوند (Han et al., 2013).

فعالیت ضدباکتریایی عسل زنبور عسل

شناخته شده ترین و با ارزش ترین محصولات طبیعی که توسط زنبورهای عسل تولید می شود، عسل می باشد. از زمان های بسیار قدیم، عسل برای مصارف دارویی و تغذیه ای مورد استفاده بشر بوده است. عسل یک محلول قند فوق اشباع طبیعی است که از یک کمپلکس پیچیده ای از کربوهیدرات ها (۷۷-۸۶٪) تشکیل شده است که فروکتوز و گلوکز فراوان ترین آن ها هستند. دارای مقدار کمی آب (حدود ۲۰٪) است که به عسل چندین ویژگی مانند ویسکوزیته بالا و فشار اسمزی بالا می دهد. همچنین حاوی اجزای متعدد جزئی اما ضروری از جمله پروتئین ها، آنزیم ها (اینورتاز، کاتالاز و غیره)، اسیدهای آلی (اسید گلوکونیک، اسید استیک)، اسیدهای آمینه، لیپیدها، ویتامین ها، مواد معدنی و بسیاری دیگر است. علاوه بر این، عسل از *Apis mellifera* با سطح pH پایین بین ۳/۵۳ تا ۴/۰۳ مشخص می شود (Alvarez-Suarez et al., 2014; Moniruzzaman et al., 2013). با این وجود، ترکیب عسل بسته به عوامل متعددی مانند منشأ گل، شرایط محیطی، و همچنین فرآیند پردازشی که طی می کند (پاستوریزه کردن و ذخیره سازی) به طور گسترده ای متفاوت است (Kumar et al., 2010;)



تولید می‌شود. این عسل به دلیل خواص بیولوژیکی که دارد به ویژه خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آن مورد توجه بسیاری از دانشمندان سراسر جهان قرار گرفته است. علاوه بر این، عسل مانوکا در درمان عفونت‌هایی مانند زخم‌های جراحی، آبسه‌ها، زخم‌های ضربه‌ای، سوختگی‌ها و زخم‌های با منشاء مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و قدرت خود را در مهار عوامل بیماری‌زای انسانی و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌ها نشان داده است (Adams et al., 2009; Jenkins and Cooper, 2012). علاوه بر ترکیبات فعال زیستی مسئول فعالیت غیر پراکسیدی، یک پپتید ضد میکروبی موجود در عسل به نام Defensin-1 زنبور عسل در برابر چندین باکتری گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *لارو پانی‌باسیلوس* که عامل اصلی بیماری ویرانگر لارو زنبور عسل آمریکایی هستند، عمل می‌کند (Kwakman et al., 2010).

عسل طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک را نشان می‌دهد که هم باکتری‌های گرم منفی و هم باکتری‌های گرم مثبت را در بر می‌گیرد. موکایا و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۱۶ نوع مختلف عسل را از مناطق مختلف کنیا جمع‌آوری کردند. آنها دریافتند که تمام ۱۶ نمونه از رشد *اشریشیا کلی* جلوگیری کردند و مقدار قابل توجهی از فعالیت ضد میکروبی غیر پراکسیدی داشتند (Mokaya et al., 2020). مطالعه دیگری دو عسل طبیعی را در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، *انتروکوک*‌های حساس به وانکومایسین (VSE) و *انتروکوک*‌های مقاوم به وانکومایسین (VRE) مورد بررسی قرار داد و سپس فعالیت ضدباکتریایی آنها را با عسل مصنوعی مقایسه کرد. تمام سویه‌های MRSA به عسل مصنوعی مقاوم اما به هر دو نوع عسل (طبیعی)

حساس بودند. همانطور که برای VRE و VSE، هر دو حساس به عسل مصنوعی و طبیعی، با حداقل غلظت بازدارنده (MIC) کمتر برای عسل طبیعی، بودند (Cooper et al., 2002). این یافته‌ها با مطالعه پروژنسکی و لانیگان در سال ۲۰۱۲ در کانادا، همخوانی دارد. که در آن MRSA و VRE به عسل‌های انتخاب شده حساس بودند و نشان دادند که اثر باکتریواستاتیک وابسته به دوز H_2O_2 است (Brudzynski and Lannigan, 2012). علاوه بر این، نشان داده شده است که عسل به عنوان یک مهارکننده قوی هلیکوباکتر پیلوری، عامل ایجاد کننده زخم معده، عمل می‌کند (Header et al., 2016).

از آنجایی که عسل مانوکا دارای فعالیت ضدباکتریایی استثنایی است، براون و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در انگلستان، آن را در برابر *استافیلوکوکوس پرودو/ینترمدیوس* که باعث عفونت‌های جدی در حیوانات اهلی می‌شود و می‌تواند به صاحب آنها منتقل شود، امتحان کردند. آن‌ها نشان دادند که عسل مانوکا نه تنها در برابر ایزوله‌های جدید *استافیلوکوکوس پرودو/ینترمدیوس* مقاوم به چند دارو موثر است، بلکه علاوه بر این با آنتی بیوتیک‌های مهم بالینی اثر سینرژیستی برقرار می‌کند و بیماریزایی را کاهش می‌دهد (Brown et al., 2020).

علاوه بر این، مطالعه دیگری نشان داد که غلظت ۱۰ درصد عسل می‌تواند از تشکیل یک بیوفیلم از باکتری‌های دهان مانند *سترپتوکوک موتانس* جلوگیری کند، و این نشان می‌دهد که عسل می‌تواند برای به حداقل رساندن پاتوژن‌های دهانی در پلاک دندان کمک کند (Badet and Quero, 2011). عسل همچنین در برابر بیوفیلم‌های تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین (MSSA)، MRSA و *سودوموناس*



آئروژینوزا با میزان باکتری کشی به ترتیب ۶۳ تا ۸۲ درصد، ۷۳ تا ۶۳ درصد و ۹۱ تا ۹۱ درصد موثر بود که بالاتر از اثر آنتی بیوتیک های منفرد پرمصرف بود (Alandejani et al., 2009).

در مطالعه دیگری، عسل فعالیت ضد باکتریایی را در برابر بورخلدیریا سپاسیا^۴، که مسئول عفونت های ریوی به ویژه در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس و بیماری گرانولوماتوز مزمن است، نشان داد. ۲۰ سویه از بورخلدیریا سپاسیا جدا شده از خلط بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس از نظر حساسیت به هشت آنتی بیوتیک و دو نوع عسل (با و بدون فعالیت پراکسید) غربالگری شدند. همه سویه ها به آنتی بیوتیک های آزمایش شده مقاوم بودند، اما در غلظت های کمتر از ۶ درصد (v/v) نسبت به عسل حساس بودند (Cooper et al., 2000). علاوه بر این، ۱۳ نمونه عسل از منابع گیاهی مختلف بر علیه سودوموناس آئروژینوزا و اشیریشیا کلی در غلظت های مختلف (۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱ درصد وزنی/حجمی) مورد آزمایش قرار گرفتند. تمام نمونه های عسل برای غلظت های بالاتر از ۲/۵ درصد، اثر بازدارندگی بر رشد سودوموناس آئروژینوزا و اشیریشیا کلی نشان دادند. تنها چهار نمونه در غلظت ۲/۵ درصد هنوز موثر بودند. هیچ فعالیتی در غلظت های زیر ۲/۵ درصد مشاهده نشد (Wilkinson and Cavanagh, 2005).

شایان ذکر است که فعالیت ضد باکتریایی عسل بسته به منبع گیاهی بسیار متفاوت است (Kumar et al., 2010; Wilkinson and Cavanagh, 2005). مطالعه هیزمی شیره جینی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ایران، دلالت بر این داشت که فعالیت ضد باکتریایی نمونه های عسل با توجه به منشأ گل عسل متغیر است. آن ها فعالیت

ضد باکتریایی و آنالیز فیزیکوشیمیایی چهار نوع عسل شامل آویشن، زول، پونه و شوید را مورد بررسی قرار دادند. مطالعه آن ها بیشترین فعالیت ضد باکتریایی برای عسل گیاه زول یا بوقناق با نام علمی Eryngium به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۵/۵، ۱۴، ۱۱ و ۱۱ میلی متر علیه شیگلا دیسانتری / استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشیریشیا کلی در غلظت ۵۰ درصد حجمی/حجمی را نشان داد و سطوح کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) برای عسل های مورد آزمون در محدوده ۵۰-۶/۲۵ درصد حجمی/حجمی گزارش شد (Hizomi Shirejini et al., 2018).

در مطالعه ای مشابه، باقری و همکاران در سال ۲۰۱۶، فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی چهار نمونه عسل با منشأ گیاهی مختلف جمع آوری شده از کندوهای زنبور عسل واقع در استان گلستان واقع در شمال ایران را بررسی کردند. عسل افرا (Maple) با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰/۳۳، ۲۲، ۱۴/۳۳ و ۱۳/۳۳ میلیمتر به ترتیب علیه شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشیریشیا کلی بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان داد و سطوح MIC و MBC برای عسل های افرا، نمدار (Linden) و گون (astragalus) در محدوده ۲۵-۶/۲۵ درصد حجمی/حجمی گزارش شد. عسل نمدار بیشترین محتوای فنلی و فلاونوئیدی و مهار رادیکال های آزاد DPPH (خاصیت آنتی اکسیدانی) را در بین نمونه های عسل نشان داد. آنها نتیجه گرفتند که فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی نمونه های عسل با توجه به منشأ گل و گیاه عسل متغیر است (Bagheri et al., 2016).

⁴ Burkholderia cepacia



فعالیت ضدباکتریایی محصولات زنبور عسل (کوهساری) ۲۵.

جدول ۵. مطالعات مورد اشاره مبنی بر خواص ضدباکتریایی عسل

نام محصول	هدف اصلی از مطالعه	باکتریهای مورد آزمون	نتیجه اصلی	نویسنده، سال، کشور	رفرنس
عسل	تعیین باکتری کش عسل درجه پزشکی	باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، اشریشیا کلی تولیدکننده بتا لاکتاماز با طیف گسترده، سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین و انتروکوکوس فاسیوم مقاوم به وانکومایسین	تمام باکتریها در غلظت هایی از عسل درجه پزشکی، کمتر از غلظت محلول قندی معادل عسل کشته شدند.	واکمن و همکاران، ۲۰۱۰، هلند	Kwakman et al., 2010
عسل	تخمین ترکیبات فعال زیستی، مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط آزمایشگاهی و فعالیت‌های ضد باکتریایی ۱۶ نوع عسل به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف در کنیا	اشریشیا کلی	ضمن تایید فعالیت ضدباکتریایی نمونه های عسل، منشأ جغرافیایی عسل بر محتوای فعال زیستی آن تأثیر داشت.	موکایا و همکاران، ۲۰۲۰، کنیا	Mokaya et al., 2020
عسل	تعیین حساسیت کوکسی‌های گرم مثبت دارای اهمیت بالینی در زخم‌ها به عسل	هجده سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و هفت سویه انتروکوک حساس به ونکومایسین از زخم‌های عفونی و ۲۰ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین از سطوح محیطی بیمارستان	مهار باکتری‌ها توسط عسل منحصراً به دلیل اسمولاریته نیست. برای کوکسی‌های گرم مثبت آزمایش شده، سویه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک حساسیت مشابهی به عسل نشان دادند.	کوپر و همکاران، ۲۰۰۲، ولز	Cooper et al., 2002
عسل	مکانیسم اثر باکتریواستاتیک عسل علیه ایزوله‌های بالینی مقاوم به چند دارو شامل رادیکال‌های هیدروکسیل تولید شده از پراکسید هیدروژن عسل	باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی، انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین	اثر باکتریواستاتیک وابسته به دوز H_2O_2 است.	بروژنسکی و لانینگان، ۲۰۱۲، کانادا	Brudzynski and Lannigan, 2012
عسل	فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیماریزایی عسل مانوکا در برابر سویه‌های استافیلوکوکوس سودو/ایترمدیوس با تنوع ژنتیکی	استافیلوکوکوس سودو/ایترمدیوس	تایید پتانسیل ضدباکتریایی عسل مانوکا	براون و همکاران، ۲۰۲۰، انگلستان	Brown et al., 2020
عسل	بررسی تأثیر دو نوع عسل مانوکا با قدرت‌های مختلف فعالیت ضدباکتریایی بر روی باکتری‌های بالقوه بیماری‌زای دهان	استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس	عسل‌های مانوکا ممکن است بتوانند عوامل بیماری‌زای دهانی را در پلاک دندان کاهش دهند و قادر به کنترل رسوب بیوفیلم دندانی هستند.	بادت و کوئرو، ۲۰۱۱، نیوزلند	Badet and Quero, 2011

عسل	تعیین اثر آزمایشگاهی عسل در برابر بیوفیلیم‌های تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس	عسل در از بین بردن بیوفیلیم‌های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس موثر است.	آلاندجانی و همکاران، ۲۰۰۹، کانادا	Alandejani et al., 2009
عسل	تعیین حساسیت ایزوله های بورخلدريا سپاسيا به عسل	بيست سويه از بورخلدريا سپاسيا	ایزوله های بورخلدريا سپاسيا با الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، به غلظت‌های عسل کمتر از ۱/۶ حساسیت نشان دادند.	کوپر و همکاران، ۲۰۰۰، ولز	Cooper et al., 2000
عسل	تعیین فعالیت ضدباکتریایی ۱۳ عسل، در برابر اشريشيا کلي و سودوموناس آئروژینوزا	اشريشيا کلي و سودوموناس آئروژینوزا	تایید فعالیت ضدباکتریایی ۱۳ نمونه عسل مورد بررسی علیه اشريشيا کلي و سودوموناس آئروژینوزا	ویلکینسون و کاواناگ، ۲۰۰۵، استرالیا	Wilkinson and Cavanagh, 2005
عسل	آنالیز فعالیت ضد باکتریایی و فیزیوشیمیایی چهار نوع عسل با منشاء گیاهی مختلف	شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشريشيا کلي	تایید اثرات ضدباکتریایی عسل‌های مورد آزمون و اینکه فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های عسل با توجه به منشاء گل عسل متغیر است.	هیزمی شیرجینی و همکاران، ۲۰۱۸، ایران	Hizomi Shirejini et al., 2018
عسل	فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی چهار نمونه عسل با منشاء گیاهی مختلف	شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشريشيا کلي	ضمن تایید فعالیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی نمونه‌های عسل، این فعالیت‌های بیولوژیک با توجه به منشاء گل و گیاه عسل متغیر است	باقری و همکاران، ۲۰۱۶، ایران	Bagheri et al., 2016
عسل	مقایسه فعالیت ضدباکتریایی عسل چندگل با چند نوع عسل تک گل	شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشريشيا کلي	فعالیت ضدباکتریایی عسل با توجه به منشاء گل متغیر است و عسل چندگل فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با عسل‌های تک گل داشت.	باقری و همکاران، ۲۰۱۷، ایران	Bagheri et al., 2017
عسل	اعمال یک پروتکل فلوسیتومتری برای بررسی و توصیف مکانیسم‌های عمل ضد باکتریایی نمونه‌های عسل	استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشيا کلي	نمونه‌های مختلف عسل اثرات کاملاً مشابهی بر باکتری‌ها ایجاد کردند. استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشيا کلي به دلیل عدم تعادل پتانسیل غشایی و آسیب غشایی تحت تاثیر نمونه های عسل قرار گرفتند. البته استافیلوکوکوس اورئوس دچار اختلال متابولیکی هم شد.	کومباروس فورتس و همکاران، ۲۰۲۰، اسپانیا	Combarros-Fuertes et al., 2020b

باقری و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه ای در ایران نشان دادند که عسل چندگل (Multifloral) فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با عسل های تک گل (Monofloral) داشت، بطوریکه در غلظت ۵۰ درصد میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲، ۲۱، ۱۶ و ۱۳/۶۶ میلیمتر به ترتیب علیه شینگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشیریشیا کلی و سطوح MIC و MBC برای نمونه های عسل در محدوده ۲۵-۶/۲۵ درصد حجمی /حجمی را گزارش کردند (Bagheri et al., 2017). تقلب، عملیات حرارتی و نگهداری طولانی مدت همگی می توانند بر عملکرد ضد باکتریایی عسل تأثیر بگذارند (Bucekova et al., 2020).

Combarros-Fuertes و همکاران (۲۰۲۰) مکانیسم سرکوب کننده عسل بر رشد باکتری ها را بررسی کرده اند. آنها دریافتند که وقتی اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در معرض نمونه های مختلف عسل قرار گرفتند، تغییرات فیزیولوژیکی در یکپارچگی و قطبیت غشاء رخ می دهد. عسل همچنین باعث اختلال متابولیک عمده در استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پیامد فیزیولوژیکی اولیه شد (Combarros-Fuertes et al., 2020b).

در مورد آزمایشات بالینی روی عسل، Blaser و همکاران بهبودی کامل در هفت بیمار متوالی با زخم های آلوده یا کلونیزه شده با MRSA را گزارش کردند. از طرف دیگر، آنتی سبتیک ها و آنتی بیوتیک ها قبلاً نتوانسته بودند علائم مرتبط با عفونت را ریشه کن کنند (Blaser et al., 2007). علاوه بر این، مطالعه دیگری نشان داده است که مصرف عسل حداقل یک بار در هفته به طور قابل توجهی شانس ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری را در گروهی متشکل از ۱۵۰ بیمار سوء هاضمه

کاهش می دهد (Boyanova et al., 2015). همچنین، در یک کارآزمایی بالینی شامل ۹۰ بیمار مبتلا به زخم های عفونی، عسل بدون تابش گاما با کاهش تدریجی بار باکتری در یک دوره ۴ هفته ای همراه بود (Yousaf et al., 2019).

مطالعات از روش های مختلفی برای اندازه گیری فعالیت ضدباکتریایی عسل استفاده کردند. رایج ترین روش ها، روش انتشار آگار و روش رقت سازی سریال در پلیت های میکروتیتر بود. روش اول، در حالی که در کارایی بدون زحمت و سریع است، محدودیت های زیادی دارد: (۱) مشکل در قرار دادن حجم خاصی از نمونه محصول در چاهک های آگار به دلیل ویسکوزیته بالای عسل، (۲) مشکلات انتشار با اجزای فعال مانند به عنوان دیفنسین-۱ و گلوکز اکسیداز، که دارای وزن مولکولی زیادی در سراسر ماتریکس آگار هستند، (۳) تکرارپذیری کم، (۴) مشکل در مقایسه نتایج با نتایج سایر نویسندگان، (۵) عدم توانایی در تمایز بین فعالیت باکتریواستاتیک و باکتری کش. برای روش دوم، سنجش رقت سریال، فعالیت باکتریواستاتیک (MIC) و باکتری کشی (MBC) نمونه های عسل بررسی شده را می توان با استفاده از این رویکرد بر خلاف روش اول به صورت کمی تعیین کرد. تنها چالشی که این روش ارائه می کند، تهیه محلول خروجی عسل است (Szweda, 2017).

با توجه به این یافته ها، به نظر می رسد که عسل فعالیت ضد باکتریایی گسترده ای در برابر انواع میکروارگانیسم ها دارد. در ادبیات پیشنهاد شده است که این ویژگی ها ایجاد مقاومت در برابر عسل را بعید می سازد و بر این باور است که عسل ممکن است یک کاربرد بالینی مهم در درمان باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک داشته باشد. همچنین استفاده از عسل به عنوان یک عامل ضدباکتری، برخلاف آنتی بیوتیک ها،



گوارشی مختلف مانند گاستروانتریت انجام می‌شود. علاوه بر این فعالیت ضد باکتریایی و ضد التهابی برخی محصولات مانند زهر زنبور عسل در درمان آکنه و نقش بره موم زنبور عسل در درمان بیماریهای دهان و دندان برخی بیماری های پوست و زخم و هم تایید شده است. در نهایت، اگرچه فرآورده های زنبور عسل به عنوان کاندیدهای ضدباکتریایی امیدوارکننده و قوی در نظر گرفته می‌شوند، کار آینده باید بر روی اثرات نامطلوب احتمالی آنها زمانی که مستقیماً روی بدن انسان اعمال می شود یا تجویز می‌شود، تأکید کند.

منابع

1. Abd El-Wahed, A.A.; Khalifa, S.A.M.; Sheikh, B.Y.; Farag, M.A.; Saeed, A.; Larik, F.A. Chapter 13 Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. In Studies in Natural Products Chemistry; Rahman, A.U., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019.
2. Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faïd, M., and Ahami, M. T., 2011. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Research Journal of Microbiology*. **6**(4): 376. doi: 10.3923/jm.2011.376.384.
3. Adams, C. J., Manley-Harris, M., and Molan, P.C., 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*. **344**(8): 1050-1053. doi: 10.1016/j.carres.2009.03.020.
4. Akbari, R., Hakemi Vala, M., Hashemi, A., Aghazadeh, H., Sabatier, J. M., and Pooshang Bagheri, K., 2018. Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. *Amino acids*. **50**: 1231-1243. doi: 10.1007/s00726-018-2596-5.

عوارض جانبی منفی برای بیماران ندارد و مقرون به صرفه است (Combarros-Fuertes *et al.*, 2020a). در نهایت، عسل ممکن است هنگام استفاده به عنوان یک درمان، محدودیت هایی مانند وجود برخی مواد سمی مانند علف کش ها یا آفت کش ها در آن، و همچنین آلودگی احتمالی آن توسط اندوسپورهای کلستریدیوم داشته باشد. بنابراین، رعایت معیارها و استانداردهای خاص هنگام استفاده از عسل به عنوان یک عامل درمانی بسیار مهم است (Hermanns *et al.*, 2019). همچنین ایجاد یک روش استریل کردن که برای اجزای آنتی باکتریال پروتئینی عسل (گلوکز اکسیداز، دیفنسین-۱) ایمن باشد، الزامی است. به نظر می‌رسد روش استریلیزاسیون پرتو گاما امیدوارکننده باشد (Molan and Allen, 1996). همچنین، توافق بر روی یک روش استاندارد برای تعیین فعالیت ضد میکروبی عسل مهم است که مقایسه فعالیت محصول ارزیابی شده در مطالعات مختلف را آسان می‌کند.

نتیجه گیری کلی

استفاده از محصولات کندوی عسل برای اهداف دارویی از دیرباز مورد بهره برداری بشر قرار گرفته است. با توجه به گسترش روزافزون مقاومت های آنتی بیوتیکی و عوارض ناخواسته ترکیبات دارویی شیمیایی، گرایش به ترکیبات با منشأ طبیعی افزایش یافته است. محصولات مختلف زنبور عسل می‌تواند نگرانی جامعه بهداشت جهانی را در این خصوص مرتفع سازد. در اینجا به خواص ضدباکتریایی عسل، زهر زنبور عسل، بره موم، گرده گل و ژل رویال پرداخته شد. هر یک از این محصولات با وجود ترکیبات زیست فعال، باعث مهار رشد سویه های باکتریایی بیماری زا می‌شوند. آزمایشات بالینی زیادی برای آزمایش ایمنی و اثربخشی محصولات کندو بر روی زخم های عفونی و بیماری های باکتریایی



pathogenesis. **137**: 103771. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103771.

12. Asthana, N., Yadav, S. P., and Ghosh, J. K. 2004. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(53): 55042-55050. doi: 10.1074/jbc.M408881200.

13. Bachanová, K., Klaudiny, J., Kopernický, J., and Šimúth, J. 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*. **33**(3): 259-269. doi:10.1051/apido:2002015.

14. Badet, C., and Quero, F. 2011. The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe*. **17**(1): 19-22. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.12.007.

15. Bagheri, A., Koohsari, H., and Seyed Alangi, S. Z. 2016. Antibacterial and antioxidant activity of four types of honey with different floral origion. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*. **6**(2): 670-677.

16. Bagheri, A.; Koohsari, H.; Seyyed Alangi, S.Z., 2017. Antibacterial activity of monofloral and multifloral honeys with different floral origin in the Golestan province. *Journal of Food Science and Technology*. **62**(14): 283-289.

17. Bang, L. M., Bunting, C., and Molan, P. 2003. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **9**(2): 267-273. doi: 10.1089/10755530360623383.

18. Bankova, V. S., de Castro, S. L., and Marcucci, M.C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **31**(1): 3-15. DOI: 10.1051/apido:2000102.

19. Bastos, E. M. A., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., and Spivak, M. 2008. In vitro study of the antimicrobial activity

5. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., and Chan, F., 2009. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. **141**(1): 114-118. doi: 10.1016/j.otohns.2009.01.005.

6. AL-Ani, I.; Zimmermann, S.; Reichling, J.; and Wink, M., 2015. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*. **22**(2): 245–255. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.019.

7. Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., and Wink, M., 2018. Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*. **5**(1): 2. doi: 10.3390/medicines5010002.

8. Ali, B. M. M., Ghoname, N. F., Hodeib, A. A., and Elbadawy, M. A., 2015. Significance of topical propolis in the treatment of facial acne vulgaris. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*. **35**(1): 29-36. doi: 10.4103/1110-6530.162468.

9. Almeida, R. A. M. D. B., Olivo, T. E. T., Mendes, R. P., Barraviera, S. R. C. S., Souza, L. D. R., Martins, J. G., ... and Barraviera, B., 2011. Africanized honeybee stings: how to treat them. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **44**: 755-761. doi: 10.1590/s0037-86822011000600020.

10. Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., and Giampieri, F., 2014. The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. *Foods*. **3**(3): 420-432. doi: 10.3390/foods3030420.

11. Arteaga, V., Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., and Franco, C. M. (2019). Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. *Microbial*



- load: phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. *Journal of natural products*. **82**(3): 559-565. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00945.
28. Brown, H. L., Metters, G., Hitchings, M. D., Wilkinson, T. S., Sousa, L., Cooper, J., ... and Jenkins, R. 2020. Antibacterial and antivirulence activity of Manuka Honey against genetically diverse *Staphylococcus pseudintermedius* strains. *Applied and environmental microbiology*. **86**(20): e01768-20. doi: 10.1128/AEM.01768-20.
29. Brudzynski, K., Abubaker, K., and Miotto, D. 2012. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food chemistry*. **133**(2): 329-336. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.035.
30. Brudzynski, K., and Lannigan, R. 2012. Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Frontiers in microbiology*. **3**: 36. doi: 10.3389/fmicb.2012.00036.
31. Bucekova, M., Bugarova, V., Godocikova, J., and Majtan, J. 2020. Demanding new honey qualitative standard based on antibacterial activity. *Foods*. **9**(9): 1263. doi: 10.3390/foods9091263.
32. Bucekova, M., and Majtan, J. 2016. The MRJP1 honey glycoprotein does not contribute to the overall antibacterial activity of natural honey. *European Food Research and Technology*. **242**: 625-629. DOI: 10.1007/s00217-016-2665-5.
33. Buttstedt, A., Moritz, R. F., and Erler, S. 2013. More than royal food-Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Frontiers in zoology*. **10**: 1-10. doi: 10.1186/1742-9994-10-72.
34. Buttstedt, A., Moritz, R. F., and Erler, S. 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **97**(3): 273-281. doi: 10.1016/j.jip.2007.10.007.
20. Bíliková, K., Mirgorodskaya, E., Bukovská, G., Gobom, J., Lehrach, H., and Šimúth, J. 2009. Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics*. **9**(8): 2131-2138. doi: 10.1002/pmic.200800705.
21. Bíliková, K., Wu, G., and Šimúth, J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*. **32**(3): 275-283. DOI: 10.1051/apido:2001129.
22. Blaser, G., Santos, K., Bode, U., Vetter, H., and Simon, A. 2007. Effect of medical honey on wounds colonised or infected with MRSA. *Journal of wound care*. **16**(8): 325-328. doi: 10.12968/jowc.2007.16.8.27851.
23. Boyanova, L., Ilieva, J., Gergova, G., Vladimirov, B., Nikolov, R., and Mitov, I. 2015. Honey and green/black tea consumption may reduce the risk of *Helicobacter pylori* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **82**(1): 85-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.001.
24. Bogdanov, S. 2011. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids*. **3**(8): 8-19.
25. Bogdanov, S., and Henry, K. 2012. *Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review*. *Bee Product Science*. 1-35.
26. Boukraâ, L., Abdellah, F., and Ait-Abderrahim, L. 2013. Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. URL: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol2.html> (دما обращения: 20.05. 2017).
27. Bridi, R., Atala, E., Pizarro, P. N., and Montenegro, G. 2019. Honeybee pollen



- significance isolated from wounds. *Journal of Applied microbiology*. **93**(5): 857-863. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01761.x.
42. Cooper, R. A., Wigley, P., and Burton, N. F. 2000. Susceptibility of multiresistant strains of *Burkholderia cepacia* to honey. *Letters in applied microbiology*. **31**(1): 20-24. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00756.x.
43. Darwita, R. R., Finisha, A., Nur Wahyuni, H., Ghina, S., Muhammad, R., Satyanegara, A., ... and Adiatman, M. 2018. The effectiveness of propolis fluoride application in inhibiting dental caries activity in school children age 6-9 years old. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. **9**(1). doi: 10.22159/ijap.2017.v9s2.01.
44. Erkmen, O., and Özcan, M. M. 2008. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of medicinal food*. **11**(3): 587-592. doi: 10.1089/jmf.2007.0038.
45. Fadl, A. E.W. 2018. Antibacterial and antibiofilm effects of bee venom from (*Apis mellifera*) on multidrug-resistant bacteria (MDRB). *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*. **58**(2): 60-80.
46. Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., and Stričík, M. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. **48**(2): 133-138. doi: 10.1080/03601234.2013.727664.
47. Fernandes Júnior, A., Balestrin, E. C., Betoni, J. E. C., Orsi, R. D. O., Cunha, M.D.L.R.D.S.D., and Montelli, A.C. 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **100**: 563-566. doi: 10.1590/s0074-02762005000500018.
48. Fitzgerald, K. T., and Flood, A.A. 2006. Hymenoptera stings. *Clinical techniques in small animal practice*. **21**(4): 194-204. doi: 10.1053/j.ctsap.2006.10.002.
- family. *Biological Reviews*. **89**(2): 255-269. doi: 10.1111/brv.12052.
35. Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., and Kurimoto, M. 2003. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life sciences*. **73**(16): 2029-2045. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00562-9.
36. Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., and Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*. **47**(2): 154-161. doi: 10.3896/IBRA.1.47.2.12.
37. Campos, M. G. R., Frigerio, C., Lopes, J., and Bogdanov, S. 2010. What is the future of Bee Pollen. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, **2**(4), 131-144. DOI: 10.3896/IBRA.4.02.4.01.
38. Choi, J. H., Jang, A. Y., Lin, S., Lim, S., Kim, D., Park, K., ... and Seo, H. S. 2015. Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular medicine reports*. **12**(5): 6483-6490. doi: 10.3892/mmr.2015.4275.
39. Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., Estevinho, M. M., Sousa-Pimenta, M., Tornadijo, M. E., and Estevinho, L. M. 2020a. Honey: another alternative in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Antibiotics*. **9**(11): 774. doi: 10.3390/antibiotics9110774.
40. Combarros-Fuertes, P., M. Estevinho, L., Teixeira-Santos, R., G. Rodrigues, A., Pina-Vaz, C., Fresno, J. M., and Tornadijo, M. E. 2020b. Antibacterial action mechanisms of honey: Physiological Effects of Avocado, Chestnut, and Polyfloral Honey upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*. **25**(5): 1252. doi: 10.3390/molecules25051252.
41. Cooper, R. A., Molan, P. C., and Harding, K. G. 2002. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical



56. Haji Mohammad, F., Koohsari, H., and Ghaboos, S. H. 2022. Antibacterial and antioxidant activity of royal jelly collected from geographical regions with different climates in the north of Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. **25**(3): 397-410. doi: 10.15547/bjvm.2020-0133.
57. Hanes, J., and Šimuth, J. 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*. **31**(1): 22-26. doi:10.1080/00218839.1992.11101256.
58. Han, S. M., Lee, K. G., and Pak, S.C. 2013. Effects of cosmetics containing purified honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on acne vulgaris. *Journal of integrative medicine*. **11**(5): 320-326. doi: 10.3736/jintegrmed2013043.
59. Han, S., Yeo, J., Baek, H., Lin, S. M., Meyer, S., and Molan, P. 2009. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Asian natural products research*. **11**(9): 796-804. doi: 10.1080/10286020903164277.
60. Header, E., Hashish, A. E. M., ElSawy, N., Al-Kushi, A., and El-Boshy, M. 2016. Gastroprotective effects of dietary honey against acetylsalicylate induced experimental gastric ulcer in albino rats. *Life Science Journal*. **13**(1): 42-47.
61. Hegazi, A. G., El-Feel, M. A., Abdel-Rahman, E., and Al-Fattah, A. 2015. Antibacterial activity of bee venom collected from *Apis mellifera* carniolan pure and hybrid races by two collection methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **4**(4): 141-9.
62. Hermanns, R., Mateescu, C., Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Wagener, F. A., and Cremers, N.A. 2020. Defining the standards for medical grade honey. *Journal of apicultural research*. **59**(2): 125-135. doi: 10.1080/00218839.2019.1693713.
49. Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., and Palma, M. S. 2004. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. **25**(6): 919-928. doi: 10.1016/j.peptides.2004.03.016.
50. Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., and Felicioli, A. 2016. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological research*. **192**: 130-141. doi: 10.1016/j.micres.2016.06.007.
51. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., and Kobayashi, K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*. **265**(19): 11333-11337. doi: 5;265(19):11333-7.
52. Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., and Volpi, N. 2018. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*. **7**(3): 41. doi: 10.3390/foods7030041.
53. García, M. C., Finola, M. S., and Marioli, J. M. 2010. Antibacterial activity of Royal Jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. **2**(3): 93-99. Doi:10.3896/IBRA.4.02.3.02.
54. Garmani, M.; Koohsari, H.; Seyyed Alangi, S.Z., 2018. The antibacterial and antioxidant activity of several types of beepropolis collected from different geographic regions of Golestan province. *Journal of Veterinary Microbiology*. **14**(2): 25-35.
55. Gebara, E. C. E., Pustiglioni, A. N., de Lima, L. A. P. A., and Mayer, M. P. A. 2003. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral health and preventive dentistry*. **1**(1). PMID: 15643746.



70. Karadal, F., Onmaz, N. E., Abay, S., Yildirim, Y., Al, S., Tatyuz, I., and Akcay, A. 2018. A study of antibacterial and antioxidant activities of bee products: Propolis, pollen and honey samples. *Ethiopian Journal of Health Development*. **32**(2).
71. Kaškonienė, V., Adaškevičiūtė, V., Kaškonas, P., Mickienė, R., and Maruška, A. 2020. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food bioscience*. **34** 100532. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100532.
72. Kharsany, K., Viljoen, A., Leonard, C., and Van Vuuren, S. 2019. The new buzz: Investigating the antimicrobial interactions between bioactive compounds found in South African propolis. *Journal of ethnopharmacology*. **238**: 111867. doi: 10.1016/j.jep.2019.111867.
73. Khider, M., Elbanna, K., Mahmoud, A., and Owayss, A.A. 2013. Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. *Food science and biotechnology*. **22**: 1-9. doi: 10.1007/s10068-013-0238-y.
74. Khosla, A., Gupta, S. J., Jain, A., Shetty, D. C., and Sharma, N. 2020. Evaluation and comparison of the antimicrobial activity of royal jelly–A holistic healer against periodontopathic bacteria: An: in vitro: study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. **24**(3): 221-226. doi: 10.4103/jisp.jisp_486_19.
75. Kilic, A., Baysallar, M., Besirbellioglu, B., Salih, B., Sorkun, K. A. D. R. İ. Y. E., and Tanyuksel, M. 2005. In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. 113-117.
76. Kim, H., Park, S. Y., and Lee, G. 2019. Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: A literature review. *Toxins*. **11**(7): 374. doi: 10.3390/toxins11070374.
77. Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C. H., Tunca, Y. M., Baysallar, M., Guclu, A. U.,
78. Hizomi Shirejini, S., Koohsari, H., and Seyed Alangi, S. Z. 2018. Antibacterial activity and physico-chemical analysis of several types of honey with different floral origins in the Golestan province. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. **14**(2): 273-282. DOI: 10.22067/ifstrj.v0i0.60915.
79. Inui, S., Hatano, A., Yoshino, M., Hosoya, T., Shimamura, Y., Masuda, S., ... and Kumazawa, S. 2014. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Natural product research*. **28**(16): 1293-1296. doi: 10.1080/14786419.2014.898146.
80. Issam, A. A., Zimmermann, S., Reichling, J., and Wink, M. 2015. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*. **22**(2): 245-255. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.019.
81. Jamasbi, E., Batinovic, S., Sharples, R. A., Sani, M. A., Robins-Browne, R. M., Wade, J. D., ... and Hossain, M.A. 2014. Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. *Amino acids*. **46**: 2759-2766. doi: 10.1007/s00726-014-1833-9.
82. Jenkins, R. and Cooper, R. 2012. Improving antibiotic activity against wound pathogens with manuka honey in vitro. *PLoS ONE*. 2012, **7**: e45600. doi: 10.1371/journal.pone.0045600.
83. Kacaniova, M.; Vuković, N.; Chlebo, R.; Haščík, P.; Rovná, K.; Cubon, J., ... and Pasternakiewicz, A. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences*. **64**: 927–934. doi: 10.2298/ABS1203927K.
84. Kačániová, M., Vatl'ák, A., Vuković, N., Petrová, J., Brindza, J., Nôžková, J., and Fatrcová-Šrámková, K. 2014. Antimicrobial activity of bee collected pollen against clostridia. *Animal Science and Biotechnologies*, **47**(2): 362-365.



- antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*. **49**(5): 1096-1101. doi: 10.1016/j.fct.2011.01.020.
85. Leandro, L. F., Mendes, C. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H., Cunha, W. R., Almeida, R. D., and Martins, C.H. 2015. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **87**(01): 147-155. doi: 10.1590/0001-3765201520130511.
86. Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., and Antunes, M.D. 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **48**(12): 3418-3423. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.014.
87. Molan, P. C., and Allen, K.L. 1996. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *Journal of pharmacy and pharmacology*. **48**(11): 1206-1209. doi: 10.1111/j.2042-7158.1996.tb03922.x.
88. Molan, P.C. 1992. The antibacterial activity of honey: 2 Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*. **73**(2): 59-76. doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099118.
89. Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., and Gan, S. H. 2013. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**: 1-12. doi: 10.1186/1472-6882-13-43.
90. Nader, R.A.; Mackieh, R.; Wehbe, R.; El Obeid, D.; Sabatier, J.M.; Fajloun, Z. 2021. Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review. *Antibiotics*, **10**: 717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717>.
91. Okińczyc, P., Paluch, E., Franiczek, R., Widelski, J., Wojtanowski, K. K., Mroczek, ... and Salih, B. 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*. **13**(3-4): 140-145. doi: 10.1016/j.anaerobe.2007.02.001.
78. Kroyer, G., and Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2**(3): 171-174. doi: 10.1016/S1466-8564(01)00039-X.
79. Kumar, P., Sindhu, R. K., Narayan, S., and Singh, I. 2010. Honey collected from different floras of Chandigarh Tricity: A comparative study involving physicochemical parameters and biochemical activities. *Journal of dietary supplements*. **7**(4): 303-313. doi: 10.3109/19390211.2010.508034.
80. Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., and Krol, W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**(1), 964149. doi: 10.1155/2013/964149.
81. Kwakman, P. H., Velde, A. A. T., de Boer, L., Speijer, D., Christina Vandenbroucke-Grauls, M. J., and Zaat, S.A. 2010. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*. **24**(7): 2576-2582. doi: 10.1096/fj.09-150789.
82. Melliou, E., and Chinou, I. 2005. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*. **53**(23): 8987-8992. doi: 10.1021/jf051550p.
83. Mokaya, H. O., Bargul, J. L., Irungu, J. W., and Lattorff, H. M.G. 2020. Bioactive constituents, in vitro radical scavenging and antibacterial activities of selected *Apis mellifera* honey from Kenya. *International journal of food science and technology*. **55**(3): 1246-1254. doi: 10.1111/ijfs.14403.
84. Morais, M., Moreira, L., Feás, X., and Estevinho, L.M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content,



98. Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D. G., and Fearnley, J. 2008. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy research*. **22**(9): 1256-1263. doi: 10.1002/ptr.2480.
99. Shabbir, A., Rashid, M., and Tipu, H.N. 2016. Propolis, a hope for the future in treating resistant periodontal pathogens. *Cureus*. **8**(7): e682. doi: 10.7759/cureus.682.
100. Shakiba, E., Koohsari, H., and Mahmoodjanloo, M.A. 2018. Antibacterial Activity of Honey Bee Products Collected from Three Different Climate in Golestan Province in Northern Iran. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*. **8**(2): 1062-1073.
101. Shen LiRong, S. L., Liu DanDan, L. D., Li MeiLu, L. M., Jin Feng, J. F., Din MeiHui, D. M., Parnell, L. D., and Lai, C.Q. 2012. Mechanism of action of recombinant Acc-royalisin from royal jelly of Asian honeybee against Gram-positive bacteria. *PLoS ONE*. **7**: e47194. doi: 10.1371/journal.pone.0047194.
102. Šimunovic, K.; Abramovi, H.; Lilek, N.; Angelova, M.; Podržaj, L.; Smole Možina, S.S. 2019. Microbiological quality, antioxidative and antimicrobial properties of Slovenian bee pollen. *Agrofor*, **4**(1). 4: 82–92. doi: 10.7251/AGRENG1901082S.
103. Sowa, P., Grabek-Lejko, D., Wesołowska, M., Swacha, S., and Dżugan, M. 2017. Hydrogen peroxide-dependent antibacterial action of *Melilotus albus* honey. *Letters in applied microbiology*. **65**(1): 82-89. doi: 10.1111/lam.12749.
104. Szweda, P. 2017. Antimicrobial Activity of Honey. Honey analysis. *Croatia, Intech, Open*. **17**: 216-228. doi: 10.5772/67117.
105. Taha, E. K. A., Al-Kahtani, S., and Taha, R. 2019. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological T., ... and Sroka, Z. (2020). Antimicrobial activity of *Apis mellifera* L. and *Trigona* sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **129**: 110435. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110435.*
92. Orsi, R. D. O., Fernandes, A., Bankova, V., and Sforcin, J. M. 2012. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural product research*. **26**(5): 430-437. doi: 10.1080/14786419.2010.498776.
93. Pucca, M. B., Cerni, F. A., Oliveira, I. S., Jenkins, T. P., Argemí, L., Sørensen, C. V., ... and Laustsen, A.H. 2019. Bee updated: current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. *Frontiers in immunology*. **10**: 2090. doi: 10.3389/fimmu.2019.02090.
94. Ratanavalachai, T., and Wongchai, V. 2002. Antibacterial activity of intact roval jelly, its lipid extract and its defatted extract. *Science and Technology Asia*. **7**: 5-12.
95. Rosmilah, M., Shahnaz, M., Patel, G., Lock, J., Rahman, D., Masita, A., and Noormalin, A. 2008. Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*. *Tropical Biomedicine*. **25**: 243–251. Doi: ;25(3):243-51.
96. Šedivá, M., Laho, M., Kohútová, L., Mojžišová, A., Majtán, J., and Klaudiny, J. 2018. 10-HDA, a major fatty acid of royal jelly, exhibits pH dependent growth-inhibitory activity against different strains of *Paenibacillus* larvae. *Molecules*. **23**(12): 3236. doi.org/10.3390/molecules23123236.
97. Seibert, J. B., Bautista-Silva, J. P., Amparo, T. R., Petit, A., Pervier, P., dos Santos Almeida, J. C., ... and Dos Santos, O.D.H. 2019. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food chemistry*. **287**: 61-67. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.078.



112. Wojtyczka, R. D., Dziedzic, A., Idzik, D., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., ... and Wąsik, T. J. 2013. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. *Molecules*. **18**(8): 9623-9640. doi: 10.3390/molecules18089623.
113. Wu, X., Singh, A. K., Wu, X., Lyu, Y., Bhunia, A. K., and Narsimhan, G. 2016. Characterization of antimicrobial activity against *Listeria* and cytotoxicity of native melittin and its mutant variants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **143**: 194-205. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.037.
114. Yacoub, T., Rima, M., Karam, M., Sabatier, J. M., and Fajloun, Z. 2020. Antimicrobials from venomous animals: An overview. *Molecules*. **25**(10): 2402. doi: 10.3390/molecules25102402.
115. Yazdani, Amin; Koohsari, Hadi; Sadegh Shesh Poli, Maryam. Antibacterial Activity of Honey and Bee Pollen Collected from Bee Hives from Three Climatic Regions of Golestan Province Against some Clinical Isolates with High Antibiotic Resistance. *Research and Innovation in Food Science and Technology*. **2024**. doi: 10.22101/jrifst.2024.415662.1514.
116. Yoshimasu, Y., Ikeda, T., Sakai, N., Yagi, A., Hirayama, S., Morinaga, Y., ... and Nakao, R. 2018. Rapid bactericidal action of propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of dental research*. **97**(8): 928-936. doi: 10.1177/0022034518758034.
117. Yousaf, I., Ishaq, I., Hussain, M. B., Inaam, S., Saleem, S., and Qamar, M. U. 2019. Antibacterial activity of Pakistani Beri honey compared with silver sulfadiazine on infected wounds: a clinical trial. *Journal of Wound Care*. **28**(5): 291-296. doi: 10.12968/jowc.2019.28.5.291.
118. Sciences. **26**(2): 232-237. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.06.003.
106. Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., ... and Marcucci, M. C. 2017. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*. **122**(4): 911-920. doi: 10.1111/jam.13400.
107. Velásquez, P., Rodriguez, K., Retamal, M., Giordano Villatoro, A., Valenzuela Roediger, L. M., and Montenegro Rizzardini, G. 2017. Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multi-floral bee pollen. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. **90**: 306-314.
108. Veloz, J. J., Alvear, M., and Salazar, L. A. 2019. Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean propolis. *BioMed research international*. **2019**(1): 7602343. doi: 10.1155/2019/7602343.
109. Wang, L., Zhao, X., Zhu, C., Zhao, Y., Liu, S., Xia, X., ... and Hu, J. 2020. The antimicrobial peptide MPX kills *Actinobacillus pleuropneumoniae* and reduces its pathogenicity in mice. *Veterinary microbiology*. **243**: 108634. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108634.
110. Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J. M., and Fajloun, Z. 2019. Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*. **24**(16): 2997. doi: 10.3390/molecules24162997.
111. Wilkinson, J. M., and Cavanagh, H. M. 2005. Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medicinal food*. **8**(1): 100-103. doi: 10.1089/jmf.2005.8.100.



Antibacterial activity of Beehive Products

Hadi Koohsari^{*1}

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

Received: 04 March 2025

Accepted: 22 October 2025

Abstract

Honeybees, also known as the "golden insect", belong to the genus *Apis* and the main species used for pollination of crops is *Apis mellifera*. Honeybees are one of the most amazing and economically useful insects. The products of this beneficial insect have been used for thousands of years in many cultures to treat various diseases, and their therapeutic properties have been recorded in many religious texts such as the Holy Quran. One of the most important biological activities of these products is their antibacterial activity. Each of the bee products, due to the presence of bioactive compounds, inhibits the growth of pathogenic bacterial strains. Due to the increasing spread of antibiotic resistance and unwanted side effects of chemical pharmaceutical compounds, the trend towards compounds of natural origin has increased to inhibit the growth of pathogenic microorganisms. Honey, venom, propolis, pollen, and royal jelly contain many bioactive compounds that make them effective against a variety of pathogenic bacterial species. Many studies have separately investigated the antibacterial activity of each of these products. The aim of the present study is to refer to the antibacterial activity of all honeybee products including honey, bee venom, propolis, pollen, and royal jelly in a focused study with emphasis on the mechanism of antibacterial activity of these products.

Keywords: Antibacterial activity, Bee products, Honey, Bee venom, Propolis, Royal jelly, Pollen

* Corresponding Author: Hadi Koohsari

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

Email: hadikoohsari@yahoo.com



مطالعه متا آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی جدا شده از موارد ورم پستان گاو

امیررضا شاورمنش^۱، مجید محمدصادق^{۲*}

۱-دانش آموخته دکترای عمومی، دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی،

گرمسار، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۱

چکیده

در این پژوهش به منظور مطالعه ی متاآنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری /شریشیا کلی جدا شده از گاو های مبتلا به ورم پستان، تعداد ۶۷۸ مقاله از طریق پایگاه های اطلاعاتی علمی نظیر: Web of Science, Scopus, Google scholar, PubMed به کمک کلید واژه های *E. Coli, bovine mastitis, antibiotic resistance* استخراج گردیدند. پس از آن تعداد ۱۱۱ مقاله بر اساس عنوان مقالات انتخاب شدند که در غربالگری اولیه به ۷۱ و در نهایت به تعداد ۲۷ مقاله کاهش پیدا کرد. پس از انتخاب مقالات نهایی پرسش نامه ای جهت استخراج اطلاعات از هر مقاله طراحی شد. سپس نتایج وارد اکسل گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات در این مطالعه در دو بخش آمار توصیفی و آمار استنباطی انجام گرفت. در بخش آمار توصیفی با توصیف تعداد مطالعات و بررسی میزان های شیوع به توصیف داده ها پرداختیم. در بخش آمار استنباطی از متاآنالیز با استفاده از نرم افزار R ver. 4.4.1 استفاده گردید. در این مطالعه مقالات مرتبط با شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی بر اساس دو کلاس بتا-لاکتام و آمینوگلیکوزید در نظر گرفته شد که از کلاس بتا-لاکتام مقاومت آنتی بیوتیکی آمپی سیلین و از کلاس آمینوگلیکوزید مقاومت آنتی بیوتیکی جنتامایسین بررسی گردید. نتیجه گیری نهایی نشان دهنده دامنه پراکنده ای در شیوع آمیخته /شریشیا کلی مقاوم به آمپی سیلین و جنتامایسین در مطالعات مختلف است و در واقع نشان دهنده تنوع قابل توجهی در برآوردهای میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین مطالعات است که احتمالاً به دلیل تفاوت در جمعیت های مورد مطالعه، روش شناسی پژوهش و یا مکانهای جغرافیایی مختلف است.

کلمات کلیدی: متاآنالیز، ورم پستان گاو، کلی فرمی، مقاومت آنتی بیوتیکی، آمپی سیلین، جنتامایسین

* نویسنده مسئول: مجید محمدصادق

آدرس: گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

پست الکترونیک: Majid.mohammadsadegh@iaau.ac.ir

مقدمه

ورم پستان به صورت کلی به عفونت بافت پارانشیم غدد پستانی در موارد مورد مطالعه گفته می شود که با تغییرات فیزیکی شیمیایی در شیر و همچنین تغییرات پاتولوژیک در بافت غدد همراه می باشد. ورم پستان در ایجاد زیان های اقتصادی مهمترین بیماری محسوب می شود. ورم پستان بالینی مواردی از ورم پستان است که یا شیر تغییراتی مانند چرک را نشان می دهد یا پستان تغییراتی مانند قرمزی، تورم و درد و یا خود گاو نشانه های بیماری سیستمیک مانند تب، کاهش اشتها و ... را نشان می دهد. تعداد سلول سوماتیک در ورم پستان غیر بالینی در شیر تک کارتی از عدد ۱۰۰۰۰۰ و یا در شیر چهار کارتی از ۲۰۰۰۰۰ بیشتر می شود ولی نشانه ای به جز کاهش شیر دیده نمی شود. در این نوع ورم پستان احتمال دارد کاهش تولید شیر در حدود ۱۰ تا ۲۶ درصد رخ دهد به صورت تقریبی ۷۵ درصد از ضرر اقتصادی ناشی از ابتلا به ورم پستان تحت بالینی می تواند مربوط به کاهش تولید شیر و مابقی به دلیل دور ریختن شیر گاو های در حال درمان شدن و هزینه های دامپزشک و دارو ها می باشد (Constable et al., 2017).

میزان خسارت از ورم پستان در کشور آمریکا حداقل یک میلیارد دلار و در بعضی گزارش ها تا دو میلیارد دلار در سال و در کشور انگلستان بین صد تا صد و بیست میلیون پوند در سال تخمین زده شده و به دو فرم ورم پستان بالینی و ورم پستان تحت بالینی، شایع ترین بیماری محصولات دامی است. تعداد زیادی مطالعه نشان داده اند که ورم پستان تحت بالینی از لحاظ اقتصادی اهمیت بیشتری از ورم پستان بالینی دارد (Godkin et al., 1990, Gokhale 2006).

شریشیا کلی یک باسیل گرم منفی است که به عنوان فلور طبیعی در دستگاه گوارش تقریباً تمامی پستانداران

و پرندگان وجود دارد. در حال حاضر/شریشیا کلی در میان عوامل مولد ورم پستان منجر به مرگ دام رتبه اول را به خود اختصاص داده است (Constable et al., 2017). مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری نه تنها در درمان موارد ناشی از آن مفید خواهد بود بلکه نشان دهنده تغییر سویه ها در اثر مقاومت و دیگر دلایل خواهد بود.

مطالعات اپیدمیولوژیک ورم پستان گاوی، وضعیت عفونت و الگوهای درمانی از اهمیت بالینی برخوردار است و مطالعات ارزشمندی را به تولیدکننده، دامدار و دامپزشک ارائه می دهد. به طور کلی در کشور ما، فرم تحت بالینی ورم پستان گاو کمتر مورد توجه قرار گرفته است و اکثر مطالعات روی موارد بالینی متمرکز شده است، در حالی که ممکن است ورم پستان تحت بالینی خسارت های هنگفتی را از نظر اقتصادی به بار آورد. با توجه به این که بررسی های محدودی در مورد شیوع این بیماری و عوامل بیماری زای دخیل در آن در کشور وجود دارد، تعیین شیوع، شناسایی عوامل ایجادکننده و تعیین حساسیت ضد میکروبی آنها در مناطق مختلف کشور امری ضروری به نظر می رسد. به منظور کنترل و پیشگیری ورم پستان در گاوهای شیری بررسی های دوره ای و منظم پستان گاوهای شیرده، انجام تست های غربالگری برای عیان نمودن شکل تحت بالینی، ایجاد سیستم پایش الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها در هر منطقه جغرافیایی ضروری است. به علاوه استفاده از آنتی بیوتیکها باید مطابق با دستورالعمل ها باشد و تست آنتی بیوگرام قبل از درمان انجام شود تا خطر بروز باکتری های مقاوم به حداقل برسد. همچنین روشهای صحیح دامپروری، تمیز کردن منظم گاوها، استفاده از شیوه های مناسب شیردوشی و دوشیدن گاوهای آلوده پس از گاوهای به ظاهر سالم به منظور کنترل و پیشگیری



از ورم پستان های مسری و محیطی ناشی از باکتری ها توصیه می شود (Pesarakloo et al., 2022). مقاومت باکتری های مولد ورم پستان به آنتی بیوتیک ها باعث عدم درمان گاوهای مبتلا و گسترش بیماری در گله شده و حتی بهداشت عمومی جامعه را نیز تهدید میکند. وجود اطلاعات در زمینه الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی برای اجرای برنامه های کنترل ورم پستان در هر منطقه جغرافیایی ضروری می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه های باکتریایی از نمونه های شیر مشکوک به ورم پستان به آنتی بیوتیک های مختلف دارای حساسیت های متفاوتی است که این موضوع با سایر تحقیقات انجام شده در ایران و خارج از کشور همخوانی دارد. در این مطالعه طیف وسیعی از باکتریها از شیر دام های مشکوک به ورم پستان جدا شد و این جدایه ها درجه های مختلفی از مقاومت به آنتی بیوتیک ها را نشان دادند (Hashemi 2016).

فرا تحلیل روشی آماری برای یکی کردن داده های بررسی های مختلف با فرضیه های مرتبط است که روشی ارزشمند برای افزایش توان تجزیه آماری و نیز بالا بردن تکرارپذیری نتایج نسبت به تجزیه و بررسی های انفرادی است (Sharifi et al., 2023).

روش کار

مقالات از طریق پایگاه های اطلاعاتی علمی نظیر: Web of Science, Google scholar, PubMed Scopus, از تاریخ ژانویه ۱۹۹۷ الی دسامبر ۲۰۲۲ استخراج شد. جهت جمع آوری مقالات از کلید واژه های Antibiotic و Bovine, Mastitis, E.Coli resistance استفاده شده است.

همزمان دوتن از اعضای تیم تحقیق به صورت مستقل به جمع آوری مقالات براساس عنوان و خلاصه مقالات

اقدام کردند. مقالات جمع آوری شده در بازه ی زمانی مشخص، تبادل شده و موارد عدم همخوانی با بحث و تبادل نظر بررسی شد. مقالات توسط دو عضو مذکور به صورت مستقل و جداگانه خلاصه گیری شد و براساس نظام تایید شده توسط نویسندگان مسئول دسته بندی و کدگذاری شد. روش انجام این مطالعه مطابق با روش گفته شده در PRISMA (preferred reporting items for Systemic review and Meta-analysis) می باشد. پس از حذف موارد تکراری نتایج اولیه جستجو وارد فاز غربالگری براساس عنوان چکیده شد. در قدم بعدی متن کامل مطالعات باقی مانده بررسی شد. علت خروج از مطالعه برای مطالعاتی که در این مرحله حذف شدند ثبت گردید. مقالات Case report, Systematic review و Meta-analysis مورد قبول نبودند. برای کنترل مقالاتی که روش محاسبه حجم نمونه در آن ها گزارش نشده بود حذف شدند.

نشر و آنالیز داده ها

پس از انتخاب مقالات نهایی پرسش نامه جهت استخراج اطلاعات از هر مقاله طراحی شد. سپس نتایج وارد نرم افزار اکسل نسخه پروفشنال آفیس ۲۰۱۶ گردید. تجزیه و تحلیل داده ها در این مطالعه در دو بخش آمار توصیفی و آمار استنباطی انجام گرفت. در بخش آمار توصیفی با توصیف تعداد مطالعات و بررسی میزان های شیوع به توصیف داده ها پرداختیم. در بخش آمار استنباطی از متاآنالیز با استفاده از نرم افزار R ver. 4.4.1 استفاده گردید. برای محاسبه واریانس هر مطالعه از توزیع دو جمله ای استفاده گردید. برای ترکیب میزان شیوع مطالعات مختلف، از میانگین وزنی استفاده شد. به هر مطالعه متناسب با عکس واریانس آن وزن داده شد. در متاآنالیز از تبدیل آرک سینوس دوگانه فریم-توکی برای تثبیت واریانس و محاسبه میزان شیوع با استفاده از



هر دو مدل اثرات مشترک و مدل اثرات تصادفی استفاده گردید. همچنین برآوردگر در سیمونیان-لرد برای برآورد واریانس بین مطالعات استفاده گردید. این تحلیل همچنین شامل ارزیابی ناهمگنی با استفاده از آماره I^2 بود. میزان ناهمگنی بر اساس شاخص I^2 بررسی (میزان شاخص کمتر از ۲۵٪ ناهمگنی کم، بین ۲۵٪ تا ۷۵٪ ناهمگنی متوسط و بالاتر از ۷۵٪ ناهمگنی زیاد) گردید. علاوه بر این مقادیر برآورد شده میزان شیوع با استفاده از نمودار جنگلی (نمودار ۳) نیز ارائه گردید. سطح معناداری برای کلیه آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

تعداد کلی مقالات به دست آمده از پایگاه های علمی ۶۷۸ مقاله بود که به صورت اختصاصی ۴۰۳ عدد از آن ها از Pubmed، ۱۱۳ عدد از Web of science و ۱۶۲ عدد از آن ها از پایگاه علمی Scopus به دست آمد.

تمامی مقالات در برنامه Covidence که برای انجام مطالعه از آن بهره گرفتیم بارگذاری شد. این برنامه مقالات را مورد بررسی قرار داد و ۲۷۵ عدد از مقالات تکراری را حذف کرد. در طی بررسی های بعدی ۷ مقاله به صورت دستی توسط محققین حذف گردیدند. بدین ترتیب مجموع مقالات تکراری حذف شده به ۴۰۳ عدد رسید.

سپس ۴۰۳ مقاله باقی مانده وارد غربالگری شدند. این مقالات در سه مرحله غربال شدند. در غربالگری اول با مطالعه عنوان و مقدمه هر مقاله، ۴۲۵ عدد از مقالات نامربوط حذف شدند. در این مرحله مقالات متاآنالیز و مقالات مروری، گزارش های موردی، مقالات در رابطه با گونه های دیگر جانوری و مقالات در رابطه با بیماری های دیگر حذف شدند. در مرحله بعد مقالات با دقت بالاتری مورد بررسی قرار گرفتند. به عبارت دیگر مقدمات و چکیده مقالات مطالعه شد و بررسی کلی

مقالات انجام گرفت، در مرحله سوم غربالگری تمامی متن هر مقاله مورد بررسی قرار گرفت. مقالاتی که به زبان های دیگر غیر از انگلیسی بودند، مقالاتی که تعداد نمونه خود را بررسی و مشخص نکرده بودند، مقالاتی که مقاومت آنتی بیوتیکی را بطور انحصاری بر روی *E.Coli* بررسی نکرده بودند و مقالاتی که صرفاً جمعیت مورد مطالعه آن ها گاو نبوده، حذف گردیدند. در نهایت ۲۷ مقاله به عنوان مقالات نهایی وارد مطالعه شدند. این یک مطالعه متاآنالیز بود که هدف از آن بررسی میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی جدا شده از موارد ورم پستان گاو بود. در این مطالعه مقالات مرتبط با شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی بر اساس دو کلاس بتا-لاکتام و آمینوگلیکوزید در نظر گرفته شد که از کلاس بتا-لاکتام مقاومت آنتی بیوتیکی آمپی سیلین و از کلاس آمینوگلیکوزید مقاومت آنتی بیوتیکی جنتامایسین بررسی گردید. برای انتخاب مطالعات مرتبط با میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین و جنتامایسین، از تعداد ۴۰۳ منبع که در ابتدا انتخاب شدند تنها ۲۷ منبع مرحله اول در مطالعه باقی ماندند. پس از فرآیند انتخاب در مرحله دوم در فرآیند انتخاب مطالعات، نمونه نهایی تعداد منابع برای مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین ۲۲ و جنتامایسین ۱۹ مطالعه بود.

نتایج

برای مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین از نتایج ۲۲ مطالعه استفاده گردید و اطلاعات مربوطه به ۲۲ مطالعه، برای برآوردی آمیخته از میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین استخراج گردید. به صورت کلی مجموع نسبت /شریشیا کلی جدا شده از نمونه های شیر تایید شد در این مطالعات برابر با ۱۹۴۲ مورد بود که از این تعداد، تعداد کل مقاومت



آنتی‌بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی‌سیلین در ۹۹۶ مورد مشاهده گردید.

نتایج متاآنالیز نشان داد که در مدل با اثرات مشترک شیوع آمیخته /شریشیا کلی مقاوم به آمپی‌سیلین برابر با ۰/۵۴۲۲ با بازه اطمینان ۹۵٪ (۰/۵۶۴۷ و ۰/۵۱۹۶) بود. این برآورد نشان دهنده شیوع متوسط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با فرض یک اندازه اثر مفروض در بین مطالعات بود. شیوع آمیخته /شریشیا کلی مقاوم به آمپی‌سیلین با استفاده از مدل اثرات تصادفی کمی کمتر و برابر با ۰/۵۱۳۲ با بازه اطمینان ۹۵٪ (۰/۷۱۹۷ و ۰/۳۰۴۵) بود.

ناهمگونی معناداری در بین مطالعات مشاهده شد. با توجه به آماره I^2 مقدار شاخص ناهمگونی در این مطالعه برابر با ۹۸/۸ درصد بود. آماره H برابر با ۹/۲۶ با فاصله اطمینان (۱۰/۰۴ و ۸/۵۳) است. تست ناهمگونی (Q-Test) نیز نتایج معناداری نشان داد، بطوریکه مقدار آماره Q برابر با ۱۷۹۸/۸ با درجه آزادی ۲۱ بود ($p < ۰/۰۰۱$).

تحلیل متاآنالیز مقاومت /شریشیا کلی جدا شده از موارد ورم پستان گاو به جنتامایسین را در ادامه مشاهده می‌نماید. هدف از این آنالیز برآورد میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شریشیا کلی به جنتامایسین در مطالعات مختلف و بررسی میزان ناهمگونی در بین مطالعات بود. نتایج این تحلیل شامل ۱۹ مطالعه با تعداد کل مشاهده شده /شریشیا کلی برابر با ۱۶۴۶ و ۴۱۰ مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به جنتامایسین بود.

بررسی متاآنالیز مقاومت به جنتامایسین در /شریشیا کلی تنوع قابل توجهی را در میزان مقاومت در بین مطالعات وارد شده نشان داد. مدل اثر مشترک برآورد شیوع آمیخته ۰/۱۶۷۶ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد (۰/۱۸۶۷ و ۰/۱۴۹۲) را به همراه داشت، در حالی که مدل اثرات تصادفی برآورد شیوع آمیخته کمتری نسبت به مدل اثرات مشترک داشت. مقدار این برآورد شیوع آمیخته

برابر با ۰/۱۲۲۱ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر با (۰/۲۹۲۳ و ۰/۰۱۶۴) ارائه کرد که نشان دهنده تفاوت در میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شریشیا کلی نسبت به جنتامایسین در بین مطالعات مختلف داشت. این سطح بالای ناهمگونی نشان می‌دهد که تغییرات در طراحی مطالعه، جمعیت‌ها یا روش‌شناسی ممکن است بر برآورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی تاثیر بگذارد. مدل اثرات مشترک با فرض یک اندازه اثر زمینه‌ای، برآوردی آمیخته از میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شریشیا کلی به جنتامایسین را ارائه می‌نماید در حالی که مدل اثرات تصادفی تغییرپذیری بین مطالعات را در نظر می‌گیرد. بررسی ناهمگونی مقاومت /شریشیا کلی جدا شده از موارد ورم پستان گاو به جنتامایسین نشان داد که میزان ۰/۲۰۵۵ برای شاخص برآورد واریانس بین مطالعات (τ^2) معنادار بود. مقدار I^2 نیز برابر با ۹۸/۶ با فاصله اطمینان (۹۸/۸ و ۹۸/۳) بود. آماره H نیز برابر با ۸/۳۵ با فاصله اطمینان ۹۵٪ برابر با (۹/۱۷ و ۷/۶) بود. همچنین آزمون ناهمگونی Q آماره آزمون برابر با ۱۲۵۴/۳ با ۱۸ درجه آزادی داشت که نتایج این آزمون معنادار بود ($p < ۰/۰۰۱$).

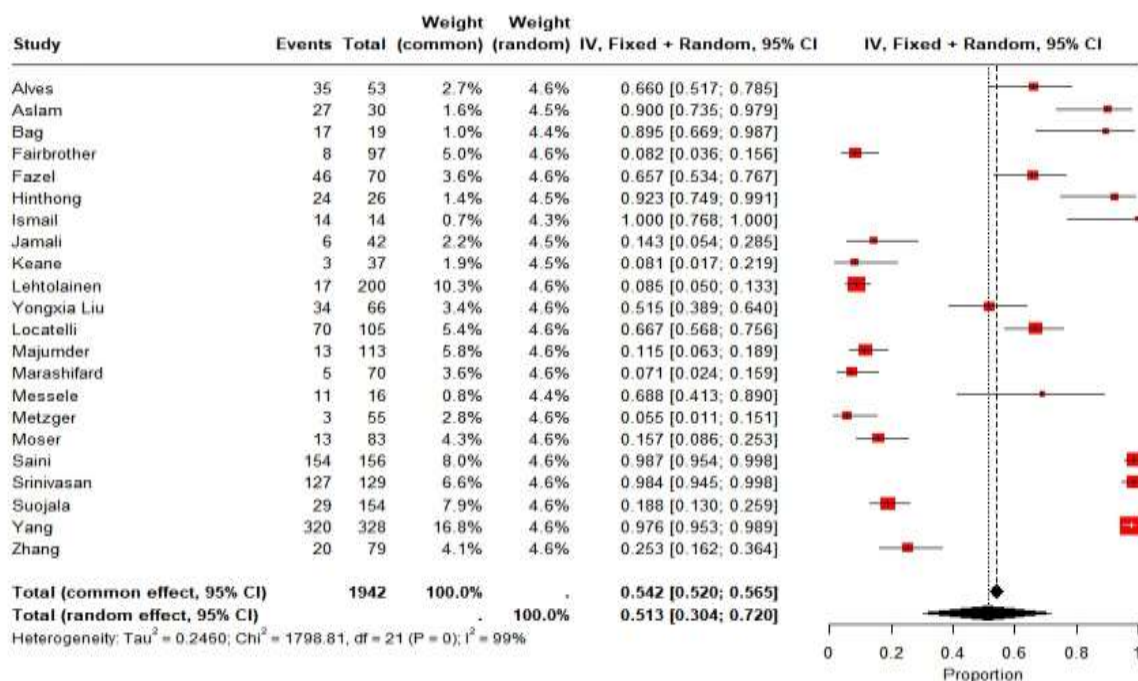
بحث

در این پژوهش ناهمگونی معناداری در بین مطالعات مشاهده شد. با توجه به آماره I^2 که این مقدار معنادار بود و می‌توان گفت که میزان ناهمگونی در این مطالعه در ردیف مطالعات با ناهمگونی شدید قرار می‌گیرد. این مقدار بالا در واقع نشان دهنده تنوع قابل توجهی در برآوردهای میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین مطالعات است که احتمالاً به دلیل تفاوت در جمعیت‌های مورد مطالعه، روش‌شناسی پژوهش و یا مکانهای جغرافیایی مختلف است. همچنین برآورد واریانس بین مطالعات (τ^2) نیز وجود واریانس قابل توجه بین مطالعات

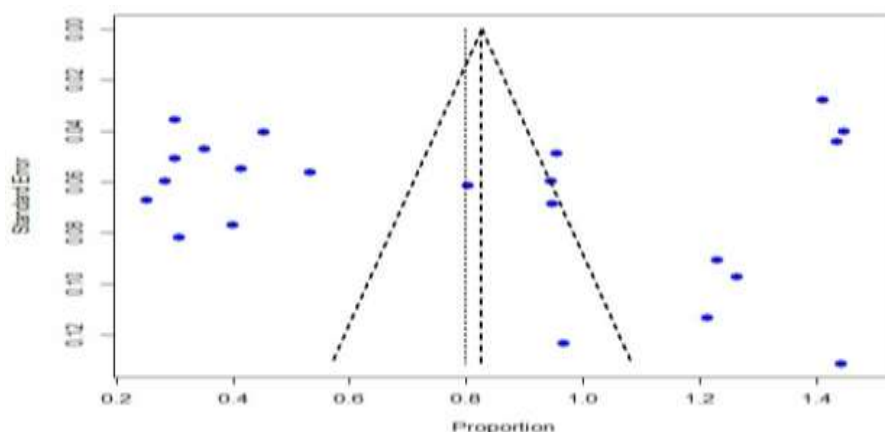


می دهد که تنوع مشاهده شده بسیار بیشتر از آن چیزی است که اگر همه مطالعات اندازه اثر یکسانی داشته باشند انتظار می رود. تست ناهمگونی (Q-Test) نیز نتایج معناداری نشان داد، این نتایج نشان دهنده معنادار بودن ناهمگنی در بین مطالعات است. با توجه به بالا بودن مقدار آماره Q و معناداری این آزمون می توان نتیجه گرفت که در برآورد میزان شیوع مقاومت تغییرپذیری قابل توجهی وجود دارد.

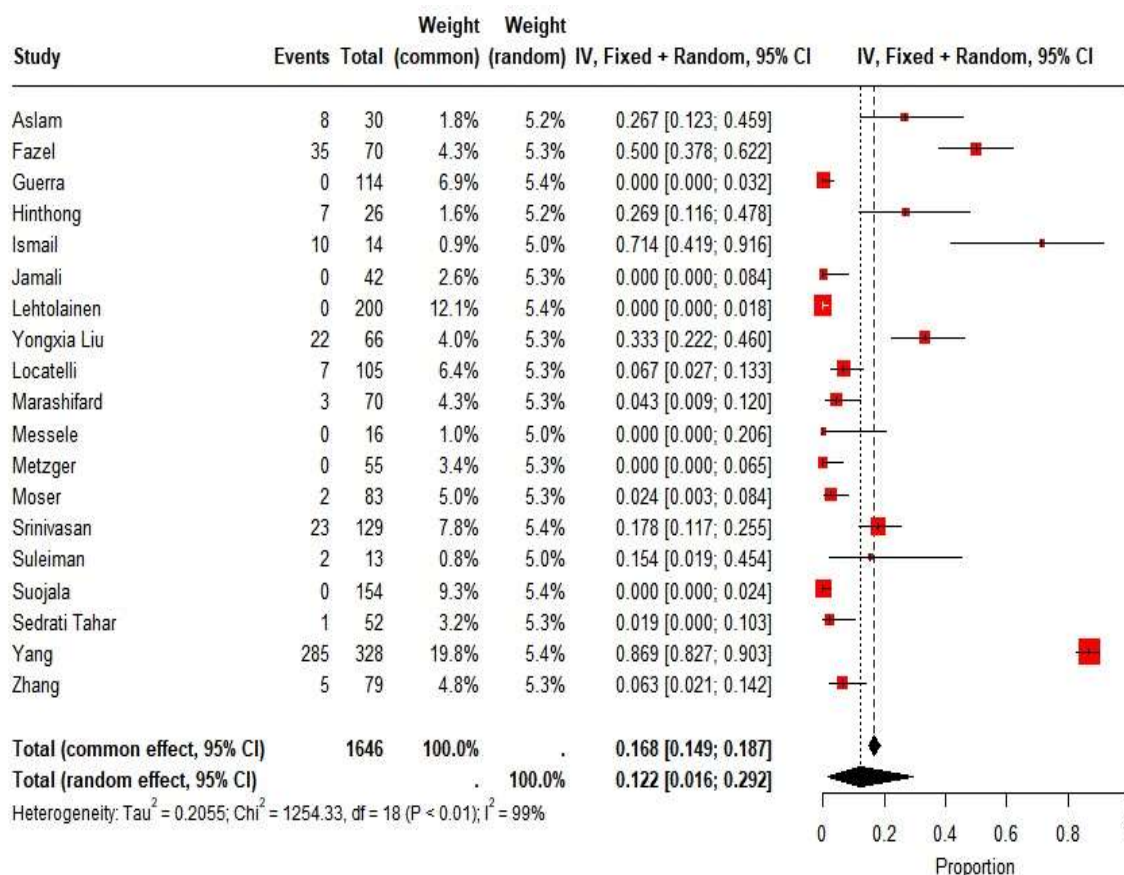
را تایید می کند. فاصله اطمینان نشان دهنده این است که این واریانس از نظر آماری معنادار می باشد که نشان دهنده تنوع قابل توجه در برآورد مقاومت آنتی بیوتیکی در تمامی مطالعات می باشد. انحراف استاندارد برآورد شده اندازه اثر (τ) بین مطالعات نشان دهنده میزان تنوع اندازه اثر می باشد که فاصله اطمینان نیز وجود ناهمگنی قابل توجهی را نیز نشان می دهد. آماره H که معیاری از میزان ناهمگنی نسبت به تنوع مورد انتظار تحت فرضیه صفر همگنی را ارائه می دهد. مقدار بالای این آماره نشان



نمودار ۱. نمودار جنگلی مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین



نمودار ۲: انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین



نمودار ۳. نمودار جنگلی مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به جنتامایسین

تخمین میزان شیوع کلی در مدل اثرات تصادفی کمک می کند.

مطالعات و تأثیر آنها بر نتایج کلی برآورد آمیخته میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین متفاوت بودند. وزن ها از ۰/۷٪ تا ۱۶/۸٪ در مدل اثرات تصادفی متغیر بود که منعکس کننده تفاوت در اندازه نمونه و دقت برآوردها است. مطالعات بزرگتر با برآوردهای دقیق تر تأثیر بیشتری بر نتایج برآورد داشتند. بررسی متاآنالیز مقاومت به جنتامایسین در /شریشیا کلی هم تنوع قابل توجهی را در میزان مقاومت در بین مطالعات وارد شده نشان داد. مدل اثر مشترک برآورد شیوع آمیخته ۰/۱۶۷۶ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد (۰/۱۸۶۷ و ۰/۱۴۹۲) را به همراه داشت، در حالی که مدل اثرات تصادفی برآورد شیوع آمیخته کمتری نسبت

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین به طور وسیعی در بین مطالعات تک به تک متفاوت بود. بعنوان مثال Yang (۱۶) (وزن ۱۶/۸٪) بالاترین میزان شیوع را با میزان ۹۷/۵۶ درصد گزارش کرد (فاصله اطمینان ۰/۹۸۹۴ و ۰/۹۵۲۵) و Metzger (۷) (وزن ۰/۸٪) کمترین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی را به میزان ۵/۴۵ درصد (فاصله اطمینان ۱۵/۱۲ و ۱/۱۴) گزارش کرد. سایر مطالعات نیز مانند Saini و همکاران ۲۰۱۱ میزان شیوع را ۹۸/۷۲ با فاصله اطمینان ۰/۹۹۸۴ و ۰/۹۵۴۵) و Srinivasan و دیگران ۲۰۰۷ با شیوع ۹۸/۴۵ درصد با فاصله اطمینان ۰/۹۹۸۱ و ۰/۹۴۵۱) نیز نرخ بالایی از مقاومت آنتی بیوتیکی /شریشیا کلی به آمپی سیلین را گزارش کردند که به طور قابل توجهی به



به مدل اثرات مشترک داشت. مقدار این برآورد شیوع آمیخته برابر با ۰/۱۲۲۱ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر با (۰/۲۹۲۳ و ۰/۰۱۶۴) ارائه کرد که نشان دهنده تفاوت در میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی / شریشیا کلی نسبت به جنتامایسین در بین مطالعات مختلف داشت. این سطح بالای ناهمگونی نشان می دهد که تغییرات در طراحی مطالعه، جمعیت ها یا روش شناسی ممکن است بر برآورد مقاومت آنتی بیوتیکی تاثیر بگذارد. مدل اثرات مشترک با فرض یک اندازه اثر زمینه ای، برآوردی آمیخته از میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی / شریشیا کلی به جنتامایسین را ارائه می نماید در حالی که مدل اثرات تصادفی تغییرپذیری بین مطالعات را در نظر می گیرد.

بررسی ناهمگونی مقاومت / شریشیا کلی جدا شده از موارد ورم پستان گاو به جنتامایسین نشان داد که میزان ۰/۲۰۵۵ برای شاخص برآورد واریانس بین مطالعات (τ^2) معنادار بود و نشان دهنده تغییرپذیری معنادار اندازه اثر در بین مطالعات بود. همچنین مقدار انحراف استاندارد برآورد شده اندازه اثر (τ) بین مطالعات نشان دهنده میزان قابل توجهی از ناهمگونی می باشد. مقدار I^2 نیز نشان دهنده سطح بالایی از ناهمگونی در بین مطالعات بود. آماره I^2 پیشنهاد می دهد که تقریباً تمامی تغییرپذیری در اندازه اثر به جای اینکه خطای نمونه گیری باشد در واقع به دلیل تفاوت بین مطالعات است.

آماره H نشان دهنده این موضوع است که به تغییرپذیری مشاهده شده به صورت قابل توجهی بیشتر از آن چیزی است که در صورت عدم وجود ناهمگونی انتظار می رود. همچنین آزمون ناهمگنی Q این آزمون معنادار بود که بدین معناست که ناهمگنی معناداری بین مطالعات وجود دارد. در واقع نتایج شاخص های ناهمگنی و آزمون ناهمگنی Q نشان داد که عواملی فراتر از عوامل تصادفی

به تفاوت های مشاهده شده کمک می کند. نتایج این مطالعه در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی / شریشیا کلی به جنتامایسین نشان داد که میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین مطالعات مختلف به صورت معناداری ناهمگن می باشند.

در مطالعه Molineri و دیگران ۲۰۲۱ دامنه پراکنده ای در شیوع آمیخته استافیلوکوک اورئوس مقاوم آنتی بیوتیک ها در مطالعه دیده شده بود که در پژوهش خود با بررسی دقیق و ارزیابی کامل تست های دیسک فیوژن سعی بر به حداقل رساندن آن کرده اند. در پژوهش Sharifi و دیگران ۲۰۲۳ نیز با محدود کردن موقعیت جغرافیایی مورد پژوهش و همچنین محدود کردن روش های به دست آوردن مقاومت آنتی بیوتیکی، سعی بر کاهش دادن پراکندگی مقاومت باکتریایی در پژوهش خود داشته اند.

نتیجه گیری نهایی

در نهایت می توان گفت که نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دهنده دامنه پراکنده ای در شیوع آمیخته / شریشیا کلی مقاوم به آمپی سیلین و جنتامایسین در مطالعات مختلف است و در واقع نشان دهنده تنوع قابل توجهی در برآوردهای میزان شیوع مقاومت آنتی-بیوتیکی در بین مطالعات است که احتمالاً به دلیل تفاوت در جمعیت های مورد مطالعه، روش شناسی پژوهش و یا مکانهای جغرافیایی مختلف است.

منابع

1. Constable, P., Hinchcliff, K., Done, S., & Gruenberg, W. (2017). Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. ##
2. Godkin, A., Leslie, K. & Martin W., (1990). Mastitis in bulk tank milk culture in Ontario. Highlights 13(2), pp. 13-16.



- <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105261>
9. Pesarakloo, M., Ahani Azari, A., & Danesh, A. (2022). Prevalence and Antibiotics Resistance Patterns of Common Bacterial Causes of Bovine Subclinical mastitis in Selected Dairy Farms of Gorgan, North-east of Iran. *Veterinary Research & Biological Products*, 35(1), 101-106. <https://doi.org/10.22092/vj.2021.352448.1793>
 10. Saini, V., Riekerink, R. G., McClure, J. T., & Barkema, H. W. (2011). Diagnostic accuracy assessment of Sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. *Journal of clinical microbiology*, 49(4), 1568–1577. <https://doi.org/10.1128/JCM.02209-10>
 11. Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F., (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 34(5): pp. 475-491.
 12. Sharifi, A., Sobhani, K., & Mahmoudi, P. (2023). A systematic review and meta-analysis revealed a high-level antibiotic resistance of bovine mastitis *Staphylococcus aureus* in Iran. *Research in veterinary science*, 161, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.05.016>
 13. Sharifi, S., Pakdel, A., & Ebrahimie, E. (2017). Meta-analysis of transcriptomic data of mammary gland infected by *Escherichia coli* Bacteria in dairy cows. *Iranian Journal of animal Science*, 48(3), 343-352. <https://doi.org/10.22059/ijas.2017.232123.653524>
 14. Singh P. J. & Sing, K. R., (1994). A study of economic losses due to
 3. Gokhale S (2006) Status of mastitis as an emerging disease in improved and periurban dairy farms in India. BAIF Development Research Foundation and Research Station, Uruli Kanchan, Pune, Maharashtra. *Annals of N. Y. Academy of Science* 1081: 74-83.
 4. Hashemi, M. (2016). Prevalence of antibiotic resistance among bacterial pathogens isolated from dairy cows with mastitis in Far province. *Veterinary Research & Biological Products*, 29(3), 85-93. <https://doi.org/10.22034/vj.2016.106302>
 5. Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*, 123(3), 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
 6. Kader, M. A., Samad, M. A. & Saha, S., (2003). Influence of host level factors on prevalence and economics of sub -clinical mastitis in dairy cows in Bangladesh. *Indian Journal of Dairy Science*. 56: pp. 235-240.
 7. Metzger, S. A., & Hogan, J. S. (2013). Short communication: antimicrobial susceptibility and frequency of resistance genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Journal of dairy science*, 96(5), 3044–3049. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6402>
 8. Molineri, A. I., Camussone, C., Zbrun, M. V., Suárez Archilla, G., Cristiani, M., Neder, V., Calvino, L., & Signorini, M. (2021). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Preventive veterinary medicine*, 188, 105261.



<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.040>

16. Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, L., Li, H., & Wang, X. (2018). Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in China. *Journal of dairy science*, 101(7), 6244–6252. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14156>.

mastitis in India. *Indian Journal of Dairy Science* 47: pp. 265-272.

15. Srinivasan, V., Gillespie, B. E., Lewis, M. J., Nguyen, L. T., Headrick, S. I., Schukken, Y. H., & Oliver, S. P. (2007). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary microbiology*, 124(3-4), 319–328.

A meta-analysis of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis cases

Amirreza Yavarmanesh¹, Mohammadsadegh Majid^{2*}

1. Department of veterinary clinical sciences, Ga.C., Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

2. Department of veterinary clinical sciences, Ga.C., Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

Received: 30 January 2025

Accepted: 28 June 2025

Abstract

The Middle-East, known-to-be the birthplace for animal domestication, is among the few In this study, to investigate and analyze the meta-analysis of antibiotic resistance in *E.coli* isolated from cows with mastitis, a total of 678 articles were extracted through scientific databases such as Google Scholar, PubMed, Web of Science, and Scopus using the keywords "antibiotic resistance," "bovine mastitis," and "*E. coli*." Subsequently, 111 articles were selected based on their titles, which were narrowed down to 71 in the initial screening and finally reduced to 27 articles. After selecting the final articles, a questionnaire was designed to extract information from each article. The results were then entered into Excel. The data analysis in this study was conducted in two sections: descriptive statistics and inferential statistics. In the descriptive statistics section, we described the number of studies and examined the prevalence rates to summarize the data. In the inferential statistics section, meta-analysis was performed using R software version 4.4.1. This study considered articles related to the prevalence of antibiotic resistance based on two classes: beta-lactams and aminoglycosides. Among the beta-lactam class, the antibiotic resistance to Ampicillin was examined, while for the aminoglycoside class, the resistance to Gentamicin was analyzed. The conclusion shows a scattered range in the prevalence of mixed ampicillin- and gentamicin-resistant *E. coli* in different studies and indeed shows significant variation in estimates of the prevalence of antibiotic resistance among studies, which is likely due to differences in the study populations, research methodology, or different geographical locations.

Keywords: meta-analysis, *E coli*, bovine mastitis, antibiotic resistance, Ampicillin, Gentamicin

*Corresponding author: Mohammadsadegh Majid

Address: Department of veterinary clinical sciences, Ga.C., Islamic Azad University, Garmsar, Iran

E. mail: Majid.Mohammadsadegh@iau.ac.ir



تأثیر نانوکیتوزان حامل عصاره ازمک بر سطح آنتی اکسیدان ها و پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد موش صحرایی آلوده به *استافیلوکوکوس* *اورئوس*

آناهیتا سینائی^۱، زهرا کشتمند^{۲*}، مرتضی مهاجری امیری^۱

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۵

چکیده

زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خاصیت ضد باکتریایی و غیر سمی بودن نانوکیتوزان و استفاده از ترکیبات گیاهی با خاصیت به عنوان مواد ضد باکتریایی امروزه مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی اثر نانوکیتوزان حامل عصاره ازمک بر تغییرات سطح آنتی اکسیدان ها و پراکسیداسیون لیپید بافت کبد آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در موش های صحرایی نر نژاد ویستار می باشد. در این مطالعه تجربی ۲۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار، در چهار گروه شامل گروه کنترل، آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* (10^8 CFU / ml)، دریافت کننده نانوکیتوزان (۱ ml) و مدل آلوده + دریافت کننده نانوکیتوزان حامل گیاه ازمک (200 mg/kg) تقسیم بندی شدند. القا آلودگی به روش تزریق درون صفاقی، تک دوز و دریافت نانوکیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک با روش گاوآژ به مدت ۳۰ روز انجام شد. بعد از دوره تیمار و تشریح حیوانات، بافت کبد جهت بررسی سطح فعالیت آنتی اکسیدان تام، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی آلدیید گروه های مختلف استخراج شد. آنالیز داده ها در گروه های مختلف با نرم افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یکطرفه انجام و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج حاصل، تغییر معنادار سطح آنتی اکسیدان تام، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی آلدیید گروه های آلوده را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0/05$). در حالیکه کاهش سطح مالون دی آلدیید، افزایش سطح آنتی اکسیدان تام، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز در گروه های تیمار در مقایسه با گروه آلوده به صورت معنادار نشان داده شد ($P < 0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده احتمالاً به دلیل ترکیبات و اثرات آنتی اکسیدانی، نانوکیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک اثر تعدیل-کنندگی بر سطح آنتی اکسیدان ها و پراکسیداسیون لیپید بافت کبد موش های صحرایی آلوده به باکتری را نشان داد. بنابراین احتمالاً بتواند به عنوان یک راهکار امیدوار کننده درمانی استفاده شود.

کلمات کلیدی: نانوکیتوزان، گیاه ازمک، آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون لیپید، کبد، *استافیلوکوکوس اورئوس*، موش صحرایی

* نویسنده مسئول: زهرا کشتمند

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

پست الکترونیک: zahra.keshtmand@iau.ac.ir

مقدمه

در میان انواع مختلف باکتری، استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های منتقله از بیمارستان است که در بیماری‌های بیمارستانی و اکتسابی جامعه نقش دارد. این پاتوژن گرم مثبت فرصت طلب بی‌هوازی است که قادر است تقریباً در هر بافت میزبان، پاتولوژی ایجاد کند (Wu et al., 2017). استافیلوکوکوس اورئوس به طور کلی به عنوان پاتوژن خارج سلولی غیر تهاجمی در نظر گرفته می‌شود که حداقل تا حدی به دو طریق به سلول‌های میزبان آسیب می‌رساند، یا از طریق چسبیدن به ماتریکس خارج سلولی سلول‌ها و یا با تهاجم و ماندگاری در سلول‌ها و قطع کردن مکانیسم‌های سیگنالینگ (Liang et al., 2024). ماهیت استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد که توانایی غلبه بر مکانیسم‌های دفاعی میزبان را دارد. بسیاری از مطالعات نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس تقریباً تمام پستانداران را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت پوستی، کلونیزاسیون بینی، سپسیس، نارسایی کلیه، آرتریت و اندوکاردیت نیز می‌باشد (Feng et al., 2015).

آسیب کبدی یکی از ویژگی‌های رایج سموم باکتریایی است که منجر به ایجاد شوک شدید و نارسایی چند عضوی می‌شود (Prasad et al., 2011). آلودگی به باکتری با برهم زدن تعادل سیستم دفاعی سبب تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال عملکردی شدید می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن به دلیل وجود الکترون‌های آزاد، مولکول‌هایی بسیار واکنش‌پذیر هستند (Feng et al., 2015)، که به وسیله میتوکندری و طی مسیر متابولیک فسفوریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شوند و می‌توانند از مولکول‌های زیستی یک الکترون برداشته و در عملکرد آن‌ها اختلال ایجاد کند و سبب یک واکنش زنجیره‌ای

از مولکول‌های ناپایدار شوند که با مولکول‌های دیگر واکنش نشان می‌دهند و باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد سمی جدید می‌گردند (Wu et al., 2017).

بین تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، یعنی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سطح آنتی اکسیدان‌های درون‌زا در طول شرایط فیزیولوژیکی، تعادل وجود دارد که برای محافظت از بافت در برابر آسیب اکسیداتیو عمل می‌کنند. اختلال در این تعادل، از طریق افزایش تولید ROS یا کاهش سطح آنتی اکسیدان‌ها، منجر به وضعیتی می‌شود که به آن "استرس اکسیداتیو" گفته می‌شود. بنابراین، ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی، وضعیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی و کاهش محتوای گلوتاتیون در بافت بیولوژیکی همواره به عنوان نشانگر آسیب بافتی و استرس اکسیداتیو استفاده شده است (Guo., 2023).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها رایج‌ترین راهکار برای درمان عفونت‌های باکتریایی است، اما ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (متی‌سیلین و وانکومایسین) حتی به یک تهدید بزرگ برای سلامت عمومی تبدیل می‌شود (Lin). (et al., 2021) مصرف روز افزون داروهای شیمیایی روز به روز مشکلاتی حادی از قبیل پدیده خود ایمنی و مقاومت دارویی را بر اثر مصرف مداوم بوجود آورده است. لذا استفاده از داروهای گیاهی که فاقد عوارض جانبی هستند یا عوارض جانبی کمی دارند، برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارد (Rana et al., 2022).

بسیاری از محققین اخیراً به دلیل اهمیت فارماکولوژیکی گسترده گیاهان دارویی، بر روش‌های درمانی مبتنی بر گیاهان برای درمان انواع مشکلات سلامت انسان تمرکز کرده‌اند (Noor et al., 2022). بر اساس اطلاعات علمی موجود، عصاره‌ها و روغن‌های گیاهی به عنوان



درمان های ضد میکروبی و ضد التهابی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند (Deciga-campos., 2022). از این رو، خواص ضد میکروبی مشتق شده از گیاهان بسته به گونه، توپوگرافی و آب و هوای کشور مبدا دارای طیف گسترده ای از فعالیت هستند و ممکن است حاوی دسته های مختلفی از مواد فعال مانند پلی فنول ها، کینون ها، فلاونوئیدها، تانن ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و غیره باشند (Shaaban et al., 2024).

از این رو مدیریت بیماری ها توسط گیاهان و مشتقات آنها روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می کند. پیشنهاد شده است که آنتی اکسیدان های طبیعی به دست آمده از گیاهان، استرس اکسیداتیو را کاهش می دهند و در نتیجه از اندام ها محافظت می کنند (Al-ghanayem et al., 2022).

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها، قرن ها سابقه دارد. امروزه با اینکه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند اما تخمین زده شده که دست کم یک سوم فرآورده های دارویی منشأ گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته اند (Dong et al., 2023; Zeedan et al., 2024). در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد مؤثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد. این کار به ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند اهمیت ویژه ای دارد.

گیاه ازمک با نام علمی *Lepidium draba L* یکی از گیاهان خانواده شب بو (*Cruciferae*) است. ساقه آن به ۲۰ تا ۶۰ سانتیمتر می رسد و در بالا بسیار منشعب می شود. برگ های پایین آن تخم مرغی و قاشقی شکل می باشند،

برگ های روی ساقه بیضی کشیده تا سرنیزه ای هستند؛ برگ های بهاره آن لطیف تر، طعم تره تیزک یا شاهی دارد و به عنوان سبزی صحرایی جمع آوری و در تغذیه انسان به کار می رود (Jambour et al., 2024). این گیاه در اکثر مزارع و کنار نهرها می روید. این گیاه ریشه های قوی و طویل داشته، سرعت نمو آن زیاد است و هر سال ساقه های قوی تولید می کند؛ تولید دانه نیز در این گیاه زیاد بوده گاهی به دو بار در سال می رسد (Jambour et al., 2024). برگ گیاه ازمک حاوی مقدار زیادی ویتامین C بوده و دارای خاصیت ضد باکتری است همچنین خاصیت ضد انگلی دارد (Jahantab et al., 2023).

برگ گیاه ازمک حاوی مقدار زیادی ویتامین C بوده و دارای خاصیت ضد باکتری است. عصاره حاصل از برگ های گیاه ازمک در درمان ناراحتی های سیستم تنفسی مانند سرفه های سخت و دردناک کاربرد دارد و خاصیت ضد انگلی نیز دارد (Poorbarat et al., 2022). بر اساس گزارش ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، تانن ها، ساپونین ها، لوکوآنتوسیانین ها، تری ترپنوئیدها و فلاونوئیدها مواد تشکیل دهنده ای هستند که در قسمت های هوایی *L. draba* یافت می شوند. سه گلیکوزید فلاونوئید شناخته شده، یعنی رامنوسیتین-۳-O-β-D-گلوکوزید، کمپلاناتوزید و جنکوانین-۴-O-β-D-گلوکوزید، از تمام قسمت های *L. draba* جدا شده اند. در مطالعه انجام شده توسط پوربرات و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثرات آنتی اکسیدانی گیاه ازمک در موش های آزمایشگاهی گزارش داده شد (Poorbarat et al., 2022).

از راهبردهای امیدوارکننده جهت غلبه بر مقاومت میکروبی و عوارض جانبی آنها در بافتها هدفمند کردن روش های درمانی و استفاده از نانوحامل هاست (Feng



(et al., 2022). در طی چندین دهه گذشته بسیاری از محققان توجه خود را به توسعه داروهای ایده‌ال که به طور اختصاصی ناحیه عمل را هدف قرار دهند، معطوف کرده‌اند، چرا که بیشتر داروهای زیستی و شیمیایی در فاز بالینی به دلیل نداشتن توانایی دستیابی به ناحیه عمل هدف، رد می‌شوند (Hajizadeh et al., 2024). تاکنون بسیاری از نانو مواد، ترکیبات آلی و معدنی به عنوان حامل ترکیبات زیست فعال برای پیشبرد روش‌های موثر در افزایش زیست فراهمی این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از نانوحامل‌های مورد استفاده در این حوزه شامل نانولیپوزوم، نانوامولسیون، نانونیوزوم، نانوفیتوزوم، نانوذرات لیپیدی جامد، نانوحامل‌های لیپیدی و نانو کیتوزان می‌باشند و در دو دهه گذشته تحقیقات روی نانوذرات کیتوزان گسترش یافته و برای کاربردهای دارویی مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Al-Fatlawi et al., 2024).

کیتوزان یک آمینو پلی ساکارید خطی ترکیبی و کاتیونی است که با ویژگی‌های سودمند زیستی از قبیل زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، پایداری بهتر، سمیت کم، روش‌های آماده‌سازی ساده و ملایم و ارایه راهکارهای متنوع برای انتقال دارو، اتصال اجزاء هدفدار به سطح نانوذرات بارگیری شده با دارو، چسبندگی مخاطی ذاتی و توانایی تعدیل یکپارچگی اتصالات سخت اپیتلیال به‌طور برگشت‌پذیر مورد توجه قرار گرفته است (Hassanen et al 2024 ; khodadadi etal 2025).

از این رو، با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده برای بسیاری از باکتری‌ها و از سویی اهمیت درمانی گیاهان و استفاده از نانو تکنولوژی جهت هدفمند کردن درمان‌ها، در این مطالعه برای اولین بار، اثر نانو کیتوزان حامل عصاره گیاه از مک بر سطح آنتی اکسیدانی و

پراکسیداسیون لیپیدی موش آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه و به حیوان‌خانه‌ی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه علوم و تحقیقات انتقال داده شدند، به منظور سازش با محیط آزمایشگاه به مدت یک هفته و پیش از شروع آزمایشات موش‌ها بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا در در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با درجه حرارت 22 ± 3 سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در حیوانخانه نگهداری شدند و آزمایش‌ها در بازه‌ی زمانی مشخصی (ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر) منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و اصول اخلاقی مورد تایید دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد (IR.IAU.CTB.REC.1403.339).

گروه‌بندی حیوانات

۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) به طور تصادفی در ۳ گروه هفت‌تایی گروه‌بندی شدند.

گروه کنترل: دریافت‌کننده آب و مواد غذایی به صورت روزانه

گروه دوم: موش‌های دریافت‌کننده *استافیلوکوکوس اورئوس* (10^8 CFU/ml) (Arkia et al., 2022).

گروه دریافت‌کننده نانو کیتوزان (۱ میلی لیتر) (Al-Fatlawi et al., 2024).

گروه سوم: موش‌های دریافت‌کننده *استافیلوکوکوس اورئوس* (10^8 CFU/ml) + نانو کیتوزان حامل عصاره از مک (200 mg/kg) (Wang et al., 2021).



متوالی، یک سی سی به هر موش خورانده شد (Tabaei et al., 2016).

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه ازمک

گیاه ازمک از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، گیاه ازمک را ابتدا در جریان هوا قرار داده، سپس در سایه کاملاً خشک و با آسیاب پودر گردید. از پودر تهیه شده برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر گیاه ازمک به ۵۰۰ میلی لیتر حلال اتانول اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت. پودر جامد بدست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده، نگهداری شد (Wang et al., 2021).

تهیه کیتوزان های حاوی عصاره گیاه ازمک

از روش ژل شدن یونی جهت تهیه نانوذرات کیتوزان استفاده خواهد شد. کیتوزان با میانگین وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون و ۸۵٪ داسیتالسیون با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر در اسید استیک ۳٪ (pH=۴) حل و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق بر روی همزن برقی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده خواهد شد تا محلول یکنواخت و شفاف ایجاد شود. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه سونیکه شده و pH نهایی آن با افزودن سود یک مولار بر روی ۶ تنظیم خواهد شد. سپس نمونه مورد نظر با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول شفاف رویی حاوی نانوکیتوزان جدا سازی خواهد شد. نمونه حاوی نانو کیتوزان با استفاده از دستگاه الیوفالیزر پودر و جهت ارزیابی های فیزیکوشیمیایی استفاده خواهد شد (Tabaei et al., 2016).

مشخصه یابی نانوکیتوزان حامل عصاره

القا آلودگی با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت 10^8 CFU/ml به صورت تک دوز و با تزریق درون صفاقی، نانوکیتوزان و نانوکیتوزان حامل عصاره ازمک از طریق گاوژ به موش های صحرایی داده شد. جهت یکسان بودن شرایط موش ها در طول دوره تیمار (۳۰ روز)، به گروه اول و دوم نیز روزانه، مقدار کمی از آب به صورت گاوژ داده شد.

تهیه گیاه ازمک

گیاه ازمک از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد.

تهیه و تایید سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 از آزمایشگاه استاندارد ایران تهیه و جهت شناسایی نمونه های باکتری از تست های استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز و کواگولاز لوله ای و رشد در مانیتول سالت آگار استفاده شد (Liang et al., 2024).

کشت باکتری

سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* تهیه شده بعد از انتقال به آزمایشگاه روی محیط کشت بلاد آگار (مرک، آلمان) پاساژ داده شد. سپس کلنی های حاصل از کشت از نظر میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. کلنی های کواگولاز مثبت، مانیتول مثبت جهت مطالعات بعدی در محیط BHI در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری در دور ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه رسوب گیری شد. در مرحله آخر رسوبات در نیم مک فارلند PBS حل شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر جذب نور اندازه گیری شد. با توجه به جذب $OD_{630} = 0.5$ نانومتر هر لوله حاوی 1×10^8 CFU/ml باکتری است. محلول باکتری در آمپول ۲ میلی لیتری ریخته شد و طی سه روز



تعیین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا

استفاده از ابزار DLS و اندازه گیری پتانسیل زتا به ما امکان می دهد قطر هیدرودینامیکی و بار سطحی نانوذرات تعیین شود. محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور DLS تعیین می شود که بدین منظور از دستگاه نانوسایزر Instruments Brookhaven Corp استفاده گردید. DLS تکنیکی است که از روش های سریع و غیر مخرب برای اندازه گیری غلظت ذرات در سوسپانسیون ها استفاده می کند. این روش با تجزیه و تحلیل تغییرات در پراکندگی نور ناشی از نانوذرات در طول زمان، اندازه ذرات را از چند نانومتر تا میکرومتر اندازه گیری می کند (Ciftci et al., 2024). میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانوکیتوزان حامل عصاره گیاه از مک نیز با استفاده از دستگاه زتاسایزر شرکت Instruments Brookhaven Corp در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. برای تعیین بار سطحی به ۱۵۰۰ میکرولیتر با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر نیاز است و تفرق دینامیک نور در طول موج ۶۳۳ نانومتر اندازه گیری می شود (Vaezifar and Molaei 2019).

سنجش مارکرهای استرس اکسیداتیو

پس از یک دوره تیمار ۳۰ روزه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی (IR.IAU.CTB.REC.1403.399) حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین-زایلانین ۱٪ آسان کشی شده و نمونه برداری از بافت کبد جهت سنجش سطح سوپراکسید دسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز، سطح مالون دی آلدئید و کاتالاز انجام شد. کیت های مربوطه جهت سنجش، از شرکت پارس آزمون (۴۸ تستی با برند Zellbii-GmbH) خریداری گردید.

سنجش سطح آنتی اکسیدان تام

ابتدا مقداری از بافت کبد را با یک میلی لیتر محلول بافر فسفات سدیم به همراه ۱۰۰ میلی گرم گلدوس به داخل میکروتیوپ ریخته و محلول حاصل به مدت ۸ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی را جدا کرده و جهت اندازه گیری جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر استفاده شد (Fatima et al., 2021).

سنجش فعالیت کاتالاز

حجم اندکی از نمونه در ۱ میلی لیتر مخلوط حاوی پراکسید هیدروژن ۶۵ میلی مولار در ۶۰ میلی مولار بافر فسفات با pH برابر با ۷/۴ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه در گرم خانه قرار داده شد. میزان فعالیت کاتالاز و جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد (Luhova et al., 2003).

اندازه گیری گلووتاتیون پراکسیداز

حجمی از بافت کبد با یک میلی لیتر بافر فسفات با $pH = (4/7)$ مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و از مایع رویی جهت جذب نمونه ها، در طول موج ۳۴۰ نانومتر استفاده شد (Pourbabaki et al., 2021).

سنجش فعالیت سوپراکسید دسموتاز

ابتدا حجمی از بافت کبد جدا شده با بافر فسفات سالین ۵۰ میلی مولار $pH = (4/7)$ هموزن شد. ۶۵ میکرولیتر بافر فسفات سالین $pH = (4/7)$ ، ۳۰ میکرولیتر MTT به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۷۵/۰ میکرومول با ۱۰ میکرولیتر هموزن بافتی مخلوط شده به ۷۵ میکرولیتر پیروگالل ۱۰۰، میکرولیتر دی متیل سولفو کسید اضافه گردید. جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوانده شد (Sincihu et al., 2023).



سنجش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد

۳۷۵ میلی گرم تیوباریتوریک اسید در ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک حل شده و به ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۱۵ درصدی تری کلرواستیک اسید اضافه شد، جهت حل شدن کامل رسوبات محلول تهیه شده از حمام آب ۵۰ درجه سانتی گراد استفاده گردید. سپس بافت مورد نظر توزین و بلافاصله با محلول کلرید پتاسیم ۱/۵٪ هموژن گردید تا یک مخلوط هموژن ۱۰٪ بدست آید. سپس ۱ میلی لیتر از مخلوط هموژن بافتی با ۲ میلی لیتر از محلول تهیه شده مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در آب در حال جوش حرارت داده شد (محلول به رنگ نارنجی صورتی). بعد از خنک شدن، به مدت ده دقیقه با دور ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت، اندازه گیری جذب نمونه ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Rami et al., 2018).

تحلیل داده ها

بررسی توزیع طبیعی داده ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام گرفت ($P > 0.05$). و نتایج حاصل از این پژوهش براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار و تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون آماری واریانس یک طرفه، تست توکی انجام و اختلاف معنادار بین گروه ها ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل DLS

قطر هیدرودینامیکی نانوکیتوزان سنتز شده با استفاده از آنالیز DLS تعیین شد. نمودار DLS در شکل ۱ نشان داده

شده است. تجزیه و تحلیل نتایج DLS نشان داد که اندازه نانوکیتوزان سنتز شده تقریباً ۱۷۰/۲ نانومتر است.

تحلیل پتانسیل زتا

بار سطحی نانوکیتوزان تشکیل شده با پتانسیل زتا نشان داده می شود. بار سطحی نانوکیتوزان نقش مهمی در حذف یا تجمع آنها و همچنین پایداری آنها دارد. اگر بار سطحی زیاد باشد (مثبت یا منفی)، نانوذرات یکدیگر را دفع خواهند کرد. مطابق شکل ۲، نانوکیتوزان سنتز شده از عصاره بار سطحی منفی داشتند (پتانسیل زتا ۳۵/۴ میلی ولت). مطالعات قبلی گزارش داده اند که نانوکیتوزان نقره پتانسیل زتا منفی را نشان می دهند. با تحلیل پتانسیل زتا می توان نتیجه گرفت که بار الکتریکی روی سطح نانوکیتوزان می تواند نیروی دافعه قوی بین آنها ایجاد کند که در نتیجه تجمع نانوذرات را کاهش می دهد.

نمودار گستره ی اندازه ی ذرات و ریخت شناسی نمونه های نانوکیتوزان و نانوکیتوزان حامل دانه گرده گل به ترتیب در شکل ۱ الف و ب نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می شود، میانگین اندازه ی نانوذرات کیتوزان بدون عصاره حدود ۱۷۰/۲ نانومتر و میانگین اندازه ی نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره حدود ۱۱۸/۱ نانومتر بود. اندازه ی نانوذرات کیتوزان سنتز شده در این پژوهش با دیگر مطالعات انجام گرفته در این رابطه مطابقت دارد. همچنین، از مقایسه ی اندازه ی نانوذرات کیتوزان قبل از بارگذاری دارو (۱۷۰/۲ نانومتر) و پس از بارگذاری دارو (۱۱۸/۱ نانومتر)، می توان نتیجه گرفت که میانگین اندازه ی ذرات پس از بارگذاری عصاره اندکی افزایش یافته است.

برای بررسی پایداری نانوذرات کیتوزان در کلونید، آزمون پتانسیل زتا انجام گرفت. نمودار توزیع بار سطحی نانوذرات کیتوزان در شکل ۲ نشان داده شده است. مقدار بار سطحی نانوذرات کیتوزان ۳۵/۳ میلی ولت به دست



بحث

از عوامل مهم مرگ و میر در محیط‌های بیمارستانی عفونت‌های باکتریایی هستند، درمان‌های رایج آنتی-بیوتیکی میکروب‌های مفید را از بین برده و منجر به ماندگاری سویه‌های مقاوم شوند. همچنین باکتری می‌تواند وارد گردش خون شود و موجب بروز سپتی سمی گردد که در این صورت درصد مرگ و میر بالاست (Taha et al., 2024).

در این پژوهش تاثیر نانوکیتوزان حامل عصاره ازمک بر تغییرات سطح آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد موش صحرایی آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شد.

در گروه‌های دریافت کننده باکتری، کاهش سطح فعالیت آنتی‌اکسیدان تام، سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و افزایش مالون دی آلدید در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد.

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۳ توسط Guo و همکاران گزارش داده شده که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سبب کاهش سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و نمودار ۲ افزایش سطح مالون دی آلدید در بافت کبدی گروه‌های دریافت کننده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و آلوده+ دریافت کننده نانوکیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری نشان داده شد ($P<0/01$).

همچنین در سال ۲۰۲۳، Merghni و همکاران بر هم خوردن تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و افزایش مالون دی آلدید را در موش‌های صحرایی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* را مشاهده شد (Merghni et al., 2023). که نتایج این مطالعه نیز همسو با مطالعات پیشین است.

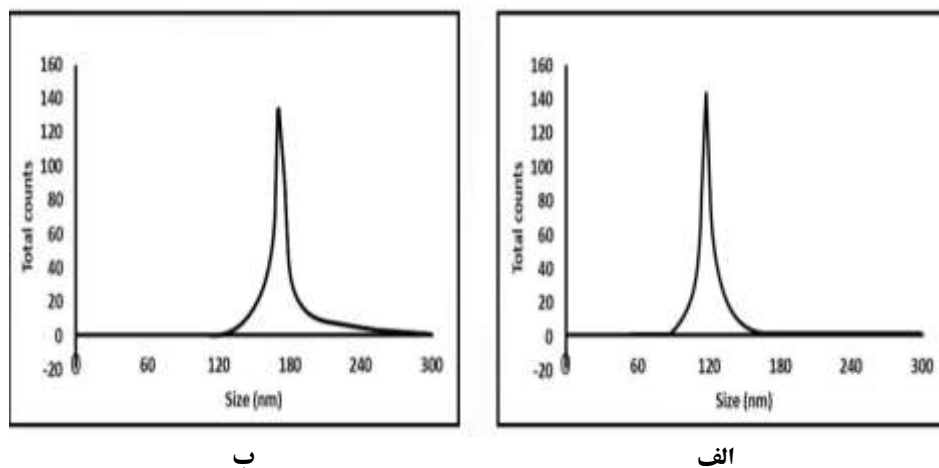
آمده است که پایداری به نسبت خوب ذرات کلونیدی را نشان می‌دهد. بار سطحی بالای نانوذرات با افزایش نیروی دافعه ی بین ذرات، از به هم چسبیدن آنها جلوگیری کرده و سبب افزایش پایداری و زمان نگهداری آنها می‌شود. پس از سنتز نانوذرات کیتوزان و بارگذاری عصاره، پتانسیل زتا روی نانوذرات کیتوزان حامل عصاره انجام شد که نتیجه ی آن در شکل ۲ب نشان داده شده است. بار سطحی نانوذرات کیتوزان حامل عصاره نیز ۳۱/۴ میلی‌ولت گزارش شده است که نشان از پایداری ذرات کلونیدی حامل عصاره دارد. همچنین، از مقایسه ی پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان حامل عصاره با نانوذرات کیتوزان بدون عصاره، می‌توان نتیجه گرفت که با اضافه شدن عصاره به نانوذرات، پتانسیل زتای آنها تغییر چندانی نداشته و نانوذرات همچنان پایدار باقی مانده است.

نمودار ۱ (الف تا د) تغییرات سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو سنجیده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. کاهش سطح آنتی‌اکسیدان تام، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و نمودار ۲ افزایش سطح مالون دی آلدید در بافت کبدی گروه‌های دریافت کننده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و آلوده+ دریافت کننده نانوکیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری نشان داده شد ($P<0/01$).

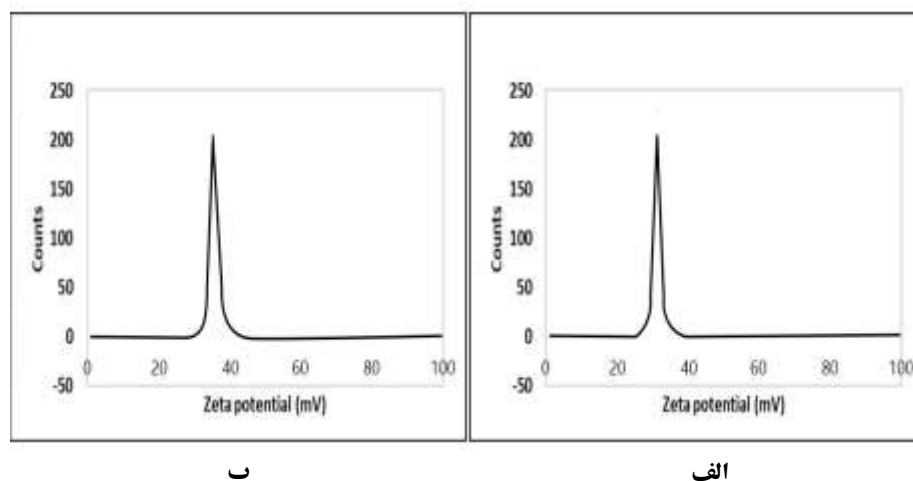
در حالیکه در گروه آلوده تیمار شده با نانوکیتوزان حامل دانه گرده، افزایش سطح آنتی‌اکسیدان تام، گلوتاتیون-پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و کاهش سطح مالون دی آلدید بافت کبدی در مقایسه با گروه آلوده معنادار مشاهده شد ($P<0/05$).



تاثیر نانوکیتوزان حامل عصاره از مک بر سطح آنتی اکسیدان ها..... (سینائی و همکاران) ۵۷.



شکل ۱. نمودار گسری اندازه ذرات و ریخت شناسی نمونه ها: الف) نانوذرات کیتوزان با متوسط اندازه ۱۸۱ نانومتر، ب) نانوکیتوزان حامل عصاره با متوسط اندازه ۱۷۰/۲ نانومتر



شکل ۲. نمودار پتانسیل زتای نمونه ها، الف: پتانسیل زتای نانوکیتوزان حامل عصاره (۳۱/۴ میلی ولت) ب) پتانسیل زتای نانوکیتوزان (۳۵/۳)،

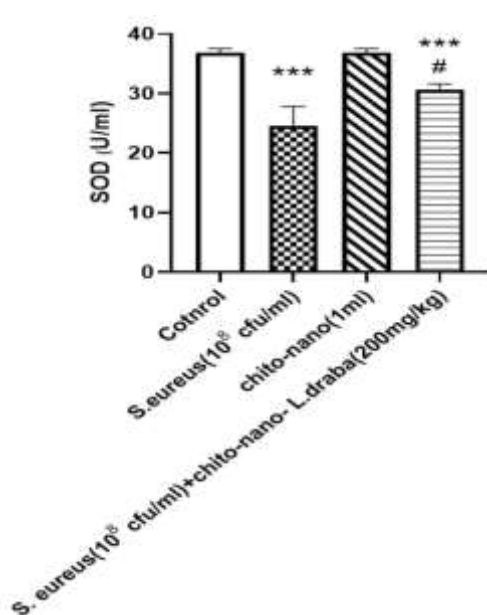
در نتیجه منجر به پراکسید هیدروژن می شود که در نهایت توسط GPx و کاتالاز خنثی می شود

(Abdelrazzak and Ramadan 2024).

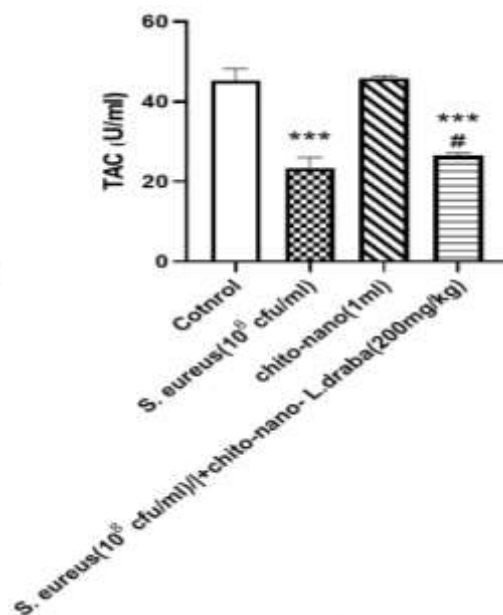
در مطالعه حاضر افزایش معنی داری در محصولات پراکسیداسیون لیپیدی با کاهش معنی داری در سطح فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند SOD، کاتالاز، GPx، GST، GR در گروه آلوده به باکتری مشاهده شد که با مطالعات پیشین نیز همسو می باشد.

پراکسیداسیون لیپیدی می تواند باعث تغییراتی در سیالیت و نفوذ پذیری غشا و افزایش سرعت تخریب پروتئین شود که در نهایت منجر به لیز سلولی می شود. به خوبی پذیرفته شده است که پاک کننده های رادیکال های آزاد مانند SOD، CAT و GSH و آنزیم های تنظیم کننده متابولیسم مانند GPx، GR و GST می توانند از سیستم سلولی در برابر اثرات مضر رادیکال های آزاد محافظت کنند (Eleyan et al., 2024).

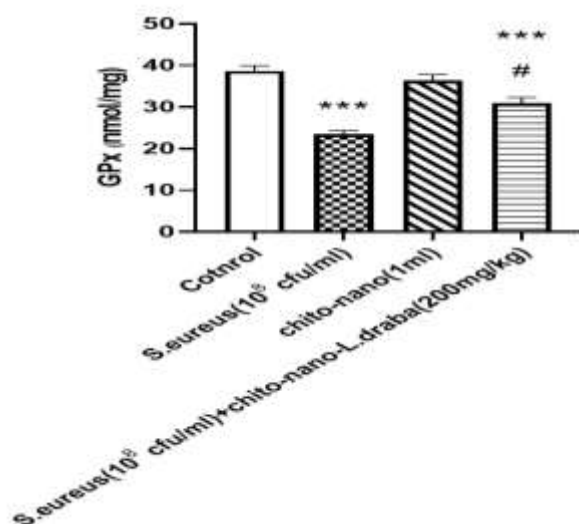
SOD به عنوان آنزیم آنتی اکسیدانی خط اول دفاعی نقش مهمی در تغییر موازات سوپراکسید ایفا می کند و



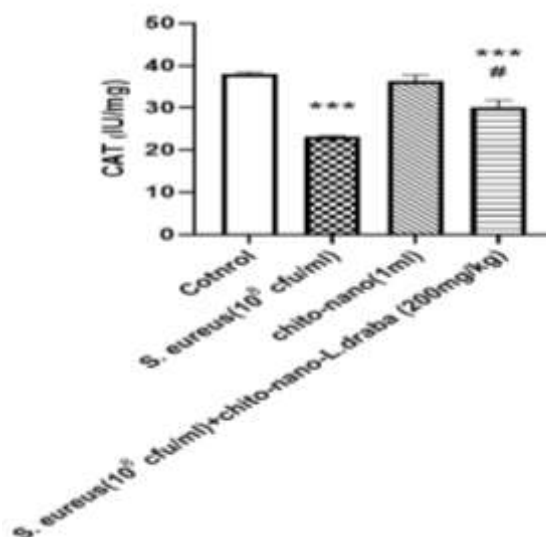
ب



الف



د



ج

نمودار ۱. مقایسه سطح آنتی اکسیدان‌های بافت کبدی، الف: سطح آنتی اکسیدان تام ب: سوپراکسید دیسموتاز ج: گلوکاتیون پراکسیداز د: کاتالاز در گروه‌های مختلف آزمایش (نتایج براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار؛ *** $P < 0.001$ مقایسه با گروه کنترل؛ # $P < 0.05$ مقایسه با گروه آلوده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس)

متابولیسم مانند GSH-Px، GR و GST می‌توانند از سیستم سلولی در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد محافظت کنند (Eleyan et al., 2024). SOD به عنوان آنزیم آنتی اکسیدانی خط اول دفاعی نقش مهمی در تغییر موازات سوپراکسید ایفا می‌کند و

پراکسیداسیون لیپیدی می‌تواند باعث تغییراتی در سیالیت و نفوذپذیری غشا و افزایش سرعت تخریب پروتئین شود که در نهایت منجر به لیز سلولی می‌شود. به خوبی پذیرفته شده است که پاک کننده‌های رادیکال‌های آزاد مانند SOD، CAT و GSH و آنزیم‌های تنظیم کننده

در نتیجه منجر به پراکسید هیدروژن می شود که در نهایت توسط GPx و کاتالاز خنثی می شود (Abdelrazzak and Ramadan 2024).

در مطالعه حاضر افزایش معنی داری در محصولات پراکسیداسیون لیپیدی با کاهش معنی داری در سطح فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند SOD، کاتالاز، GPx، GST، GR در گروه آلوده به باکتری مشاهده شد که با مطالعات پیشین نیز همسو می باشد. محتوای آنتی اکسیدان باعث کاهش گلوتاتیون در کبد موش های صحرایی مسموم با /استافیلوکوکوس اورئوس می شود. کاهش سطح فعالیت SOD، کاتالاز و GPx نشان دهنده تجمع یون های سوپراکسید و همچنین یون های پراکسید هیدروژن است که ممکن است منجر به افزایش مشاهده شده در محصولات پراکسیداسیون لیپیدی در کبد موش های مسموم با /استافیلوکوکوس اورئوس شود (Alfei et al., 2024).

علاوه بر این، تغییرات در متابولیسم گلوتاتیون در موش های تزریق شده با /استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. گلوتاتیون ردوکتاز یک دفاع شناخته شده در برابر استرس اکسیداتیو است که به نوبه خود به گلوتاتیون به عنوان کوفاکتور نیاز دارد. مشخص شده است که GSH نقش مهمی در دفاع سلول های کبدی در برابر ROS، رادیکال های آزاد و متابولیت های الکتروفیل ایفا می کند (Gao et al., 2021).

از این رو، کاهش شدید GSH سلول ها را در برابر اکسیداتیو آسیب پذیرتر می کند، آسیب توسط رادیکال ها و افزایش تیولاسیون پروتئین یا اکسیداسیون گروه های SH کاهش در محتوای گلوتاتیون، کاهش یافته ممکن است منعکس کننده سطوح کاهش یافته فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در کبد موش های آلوده به /استافیلوکوکوس اورئوس باشد.

مطابق با نتایج ما، قبلاً پیشنهاد شده بود که عفونت /استافیلوکوکوس اورئوس منجر به افزایش سطح واسطه های اکسیژن فعال با کاهش محتوای گلوتاتیون می شود (Xiang et al., 2018).

همچنین مشهود است که افزایش رادیکال های آزاد ساختار اندام های حیاتی را تغییر می دهد و همچنین مانند DNA به ماکرومولکول ها حمله می کند و در نتیجه تکه تکه شدن DNA را افزایش می دهد.

به طور مداوم، تغییرات بافتی همانطور که مشهود بود وجود داشت.

با بی نظمی سلول های کبدی همراه با هیپر تروفی سلول های کبدی مرکز لوبولار و همچنین افزایش قابل توجهی در نرخ قطعه قطعه شدن DNA در موش های آلوده به باکتری مشاهده شد که نشان دهنده آسیب DNA در کبد است.

در واقع عفونت های باکتریایی با تولید بیش از حد رادیکال های آزاد باعث برهم زدن تعادل سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی اکسیدانی و آنتی اکسیدانی شده که تولید این مولکول ها سبب تخریب مولکول های زیستی و در نهایت آسیب به بافت های مختلف می شود (Prasad et al., 2011; Wu et al., 2017).

در بخش دیگر این پژوهش، نشان داده شد، در گروه تیمار سطح آنتی اکسیدان ها در بافت کبد در مقایسه با گروه آلوده افزایش و میزان مالون دی آلدئید کاهش معناداری رانشان داد.

خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی ترکیبات فنلی در گونه های لپیدوم در چندین مطالعه گزارش شده است. تعداد معینی از مشتقات کوئرستین، کامفرول و ایزورامنتین، گلیکوزید کوئرستین (کوئرستین-۷،۳- دی-O- گلیکوزید و فلاونولیکان مشتق شده از گیاه نیز گزارش داده شده است که می توانند منجر به مهار تولید



نیتريت در سلول ها، فعاليت‌هاى ضد التهابى در ماکروفاژهاى و همچنين در سنجش‌هاى آنتى اکسيدانى کاهنده آهن عمل کنند.

در مطالعه انجام شده توسط فنگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثرات محافظتى عصاره ازمک بر روى کبد و کليه در برابر سميت اکسى متولون نشان داده شد که عصاره فعاليت گلوتاتیون ردوکتاز را افزايش داد (GSR)، SOD، CAT، پراکسیداز (POD) و گلوتاتیون-S-ترانسفراز (GST)، در حالى که کل را افزايش مى دهد. ظرفيت آنتى اکسيدانى و کاهش سطح ترکيبات واکنش دهنده با تيوباريتوريک اسيد (TBARS) بافتى در بافت کبد و کليه (Feng et al., 2022).

يکى از دلایل تاثير نانو کیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک خنثى کردن گونه هاى باز فعال اکسيژن و حذف رادیکال‌هاى آزاد بود که منجر به افزايش سوپر اکسيد ديسموتاز و کاهش مالون دی‌الدهید مى شود.

بسيارى از محققان دریافته‌اند که پلی‌فنل‌ها، آنتى اکسيدان-هاى با خواص ردوکس هستند که به آن‌ها اجازه مى دهد به عنوان عوامل کاهنده، اهدا کننده هیدروژن و خاموش کننده‌هاى اکسيژن منفرد عمل کنند. پلی‌فنل‌ها همچنين داراى خواص کيلاسيون فلزى هستند که مى‌توانند به فلزات متصل شوند (کلاتاسيون فلزات) و با رادیکال‌هاى آزاد و مواد سمى ژنتيکى يا سرطان‌زا واکنش نشان دهند (Xiao et al., 2024).

نتيجه‌گيرى

با توجه به بررسى‌هاى انجام شده و ارزيابى نتايج به دست آمده در اين مطالعه مى‌توان تصور نمود نانو کیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک احتمالاً به دليل دارا بودن ترکيبات متنوع با خاصيت آنتى اکسيدانى قوى، سطح آنتى اکسيدان‌هاى مالون دی‌الدهید در بافت کبد موش-هاى عفونى شده با باکترى *استافیلوکوکوس اورئوس*

برکبد موش‌هاى صحرایى نر را تعديل کرده و با کاهش پراکسیداسيون لیپيدى و افزايش فعاليت آنتى اکسيدانى در گير در مکانيسم اکسيدانى مى‌تواند در مدیریت و درمان آسیب‌هاى ناشى از عفونت باکترى *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شود.

اثرات محافظتى قابل توجهى در برابر آسیب کبدى ناشى از عفونت باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* از طريق افزايش گلوتاتیون، کاهش مالون دی‌آلدئید و گونه‌هاى اکسيژن فعال بدون هيچ نشانه‌اى از سميت آشکار ارائه مى‌کنند. در نتيجه احتمالاً، نانو کیتوزان حامل عصاره گیاه ازمک را مى‌توان به عنوان فيتو کيمیکال‌هاى اميدوارکننده برای محافظت از کبد در برابر سميت‌هاى مختلف از جمله عفونت‌هاى باکتریایی در نظر گرفت. مطالعات جامع ترى بايد برای بررسى پتانسيل محافظت از کبد ازمک انجام شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از همکارى مجتمع آزمایشگاهی زیست‌شناسى دانشگاه آزاد اسلامى واحد علوم و تحقيقات قدردانى مى‌کند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام مى‌دارند که هيچ گونه تعارض منافع ندارند.

ملاحظات اخلاقى

مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامى واحد علوم و تحقيقات انجام گرفته است و سعى شده که تمام موازين اخلاقى کار با حيوان مورد توجه باشد و الزامات معاهده هلسينكى رعایت گردد (IR.IAU.SRB.REC.1403.339).

منابع

1. Abdelrazzak, A.B., Ramadan, L.M. (2024). Markers of oxidative stress and inflammation increase in the lung and liver of partially irradiated



- 1277.doi : 10.1007/978-3-031-43105-0_136.
7. Ciftci, H., Er Caliskan, C., Yazici, B., Tekcan, A., Ozturk, K. (2024). Investigation of the Effect of Silver Nanoparticles Obtained from *Primula Vulgaris* Extracts by Applying the Green Synthesis Method on MCF-7 Cells'. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **43(7)**: 2556-2571. doi: 10.30492/ijcce.2024.2001893.602.
8. Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., González-Trujano, ME., Silveira, D. (2022). Pharmacological interaction between drugs and medicinal plants. *Frontiers in Pharmacology*, **13**:1081090. doi: 10.3389/fphar.2022.1081090.
9. Dong, J., Na, Y., Hou, A., Zhang, S., Yu, H., Zheng, S., Lan, W., Yang, L. (2023). A review of the botany, ethnopharmacology, phytochemistry, analysis method and quality control, processing methods, pharmacological effects, pharmacokinetics and toxicity of *codonopsis radix*. *Frontiers in Pharmacology*, **14**:1162036. doi: 10.3389/fphar.2023.1162036.
10. Eleyan, M., Zughbur, M.R., Hussien, M., Ayesh, B.M., Ibrahim, K.A.(2024). Carvacrol modulates antioxidant enzymes, DNA integrity, and apoptotic markers in zearalenone-exposed fetal rat liver. *Drug and Chemical Toxicology*, **13**:1-10. doi: 10.1080/01480545.2024.2425984.
11. Fatima, N., Sheikh, N., Satoskar, A.R., et al.(2021). Effect of Short-Term Tacrolimus Exposure on Rat Liver, An Insight into Serum Antioxidant Status, Liver Lipid Peroxidation, and Inflammation. *Mediators Inflamm*, **2021**:6613786. doi:10.1155/2021/6613786.
- rats. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, **11(1)**:412-23. doi.org/10.1080/2314808X.2024.2352676
2. Arkia, S., Arasteh, J., Hesampour, A., Israfili, A. Synergistic effect of vancomycin and interferon-gamma-loaded chitosan nanogels on TNF- α gene expression in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) -infected mice. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, **4:8(1)** : 42-57.
3. Al-Fatlawi, I.N., Pouresmaeil, V., Davoodi-Dehaghani, F., Pouresmaeil, A., Akhtari, A., Tabrizi, M.H.(2024). Effects of solid lipid nanocarrier containing methyl urolithin A by coating folate-bound chitosan and evaluation of its anti-cancer activity. *BMC biotechnology*, **24(1)**:18. doi.org/10.1186/s12896-024-00845-6.
4. Alfei, S., Schito, G.C., Schito, A.M., Zuccari, G.(2024). Reactive oxygen species (ROS)-mediated antibacterial oxidative therapies, available methods to generate ROS and a novel option proposal. *International Journal of Molecular Sciences*, **25(13)**:7182. doi: 10.3390/ijms25137182.
5. Al-Ghanayem, A.A., Alhussaini, M.S., Asad, M., Joseph, B.(2022). Effect of *Moringa oleifera* leaf extract on excision wound infections in rats. antioxidant, antimicrobial, and gene expression analysis. *Molecules*, **27(14)**:4481. doi: 10.3390/molecules27144481.
6. Benaicha, S., Bussmann, R.W., Elachouri, M.(2024). *Lepidium draba* L. *Lepidium sativum* L. Brassicaceae, *In Ethnobotany of Northern Africa and Levant*. Cham: Springer Nature Switzerland, 1267-



- Farroh, K.Y. (2025). Oral supplementation of curcumin-encapsulated chitosan nanoconjugates as an innovative strategy for mitigating nickel-mediated hepatorenal toxicity in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-6. doi: 10.1007/s00210-025-03799-4.
18. Jahantab, E., Hosseini, S.H., Sadeghi, Z. (2023). Ethnobotanical study of medicinal plants, Fasa County, Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 22(86):88-112. doi: 10.61186/jmp.22.86.88.
19. Jambour, f., Hamedeyazdan, s., Soraya, H. (2024). Cardiotoxicity of hydroalcoholic extract of *Lepidium draba* in isoproterenol-induced heart failure in rats. *Journal of Research in Pharmacy*, 28(2). doi: 10.29228/jrp.712.
20. Khodadadi, M., Jahromi, G.P., Meftahi, G.H., Khodadadi, H., Hadipour, M., Ezami, M. (2024 Oct 30). Crocin nano-chitosan-coated compound mitigates hippocampal blood-brain barrier disruption, anxiety, and cognitive deficits in chronic immobilization stress-induced rats. *Heliyon*, 10;10(20):e39203. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e39203.
21. Liang, H., Wang, Y., Liu, F., Duan, G., Long, J., Jin, Y., Chen, S., Yang, H. (2024). The Application of Rat Models in *Staphylococcus aureus* Infections. *Pathogens*, 21;13(6):434. doi: 10.3390/pathogens13060434.
22. Lin, L., Long, N., Qiu, M., Liu, Y., Sun, F., Dai, M. (2021). The inhibitory efficiencies of geraniol as an anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial, natural agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vivo. *Infection and drug*
12. Feng, J., Gao, H., Yang, L., Xie, Y., El-Kenawy, A.E., El-kott, A.F. (2022). Renoprotective and hepatoprotective activity of *Lepidium draba* L. extracts on oxymetholone-induced oxidative stress in rat. *Journal of Food Biochemistry*, 46(9):e14250. doi: 10.1111/jfbc.14250.
13. Feng, X., Maze, M., Koch, L.G., Britton, S.L., Hellman, J. (2015). Exaggerated acute lung injury and impaired antibacterial defenses during *Staphylococcus aureus* infection in rats with the metabolic syndrome. *PLoS One*, 10(5):e0126906. doi: 10.1371/journal.pone.0126906.
14. Gao, L., Tang, Z., Li, T., Wang, J. (2021). Combination of kaempferol and azithromycin attenuates *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis via anti-biofilm effects and by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 and SAPK. *Pathogens and Disease*, 79(8):ftab048.
15. Guo, X. (2023). Antibacterial and anti-inflammatory effects of genistein in *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(4):e23298. doi: 10.1093/femspd/ftab048.
16. Hajizadeh, M., Sarayan, M.S., Taleghani, A., Shafaei, E., Sahebkar, A., Eghbali, S., Nasirizadeh, S. (2024). Evaluation of antimicrobial and antioxidant effects of silver nanoparticles synthesized with leaves of *Lepidium draba* L. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 17(3):101004. doi: 10.1016/j.jrras.2024.101004.
17. Hassanen, E.I., Hassan, N.H., Mehanna, S., Hussien, A.M., Ibrahim, M.A., Mohammed, F.F.,



- K.S., Sarma, P.V. (2011). Protective effects of *Prosopis juliflora* against *Staphylococcus aureus* induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of pharmaceutical and biomedical research*, **22**:172-178.
29. Rami, M., Habibi, A., Khajehlandi, M. (2018). The effect of moderate intensity exercise on the activity of catalase enzyme and malondialdehyde in hippocampus area of diabetic male Wistar rats. *Feyz Medical Sciences Journal*, **22 (6)** :555-563.
30. Rana, A., Kumar, N.R., Kaur, J. (2022). Therapeutic effect of propolis on *Staphylococcus aureus* induced oxidative stress in spleen of Balb/c mice: A biochemical and histopathological study. *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)[Formerly Natural Product Radiance (NPR)]*, **13(3)**:346-55. doi: 10.56042/ijeb.v60i08.54823.
31. Shaaban, M.T., Abdel-Hamid, M.S., Orabi, S.H., Korany, R.M., Elbawab, R.H. (2024). Assessment of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles-based *Artemisia annua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected lung tissues in albino rats. *Journal of Analytical Science and Technology*, **15(1)**:25. doi.org/10.1186/s40543-024-00436-2.
32. Sincihu, Y., Lusno, M.F., Mulyasari, T.M., Elias, S.M., Sudiana, I.K., Kusumastuti, K., Sulistyorini, L., Keman, S. (2023). Wistar rats hippocampal neurons response to blood low-density polyethylene microplastics: a pathway analysis of SOD, CAT, MDA, 8-OHdG expression in hippocampal neurons and blood serum A β 42 levels. *Neuropsychiatric disease and resistance*, 2991-3000. doi: 10.2147/IDR.S318989.
23. Luhova, L., Lebeda, A., Hedererova, D., Pec, P. (2003). Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant Soil Environ*, **49(4)**: 151-157. doi: 10.17221/4106-PSE.
24. Merghni, A., Belmamoun, A.R., Urcan, A.C., Bobiş, O., Lassoued, M.A. (2023). 1, 8-Cineol (Eucalyptol) Disrupts Membrane Integrity and Induces Oxidative Stress in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antioxidants*, **6;12(7)**:1388. doi: 10.3390/antiox12071388.
25. Noor, F., Tahir ul Qamar, M., Ashfaq, U.A., Albutti, A., Alwashmi, A.S., Aljasir, M.A. (2022). Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment. *Pharmaceuticals*, **15(5)**:572. doi: 10.3390/ph15050572.
26. Poorbarat, S., Bibak, B., Mohammadi, A., Keshavarzi, Z., Alesheikh, P., Hoseinzadeh, A., et al. (2022). Evaluation of Anxiolytic Effects of Methanolic Extract of *Lepidium draba* L by Cross-Maze Method in Mice. *North Khorasan University of Medical Sciences*, **14 (2)** :21-27.
27. Pourbabaki, R., Khadem, M., Samiei, S., Amirkhanloo, F., Shahtaheri, S. (2021). Role of rosemary officinalis in the hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos sub-chronic exposure in rats. *Iran Occupational Health, Iran Occupational Health Journal*, **18(1)**:75-88. doi:10.52547/ioh.18.1.75
28. Prasad, O.H., Navya, A., Vasu, D., Chiranjeevi, T., Bhaskar, M., Babu,



- reproductive hormones and inflammatory signalling in oxymetholone-treated rat. *Andrologia*, **53(11)**:e14239. doi: 10.1111/and.14239.
37. Wu, D., Zhou ,S., Hu, S., Liu, B.(2017).Inflammatory responses and histopathological changes in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced bloodstream infections. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **30;11(4)**:294-305. doi: 10.3855/jidc.7800.
38. Xiang ,Y., Haixia ,W., Lijuan ,M., Yanduo ,T. (2018) .Isolation, purification and identification of antioxidants from *Lepidium latifolium* extracts. *Medicinal Chemistry Research*, **27**:37-45.
39. Xiao, P., Ma , H., Kuang, C., Wang ,W.(2024). Hydroalcoholic extract of *lepidium draba* l. ameliorates capecitabine -induced enterocolitis in rats. *Journal of animal & plant sciences*,**34(4)**: 999-1011 . doi:10.36899/japs.2024.4.0782.
40. Zeedan, GS., El-Aziz, A., Tamer, H., Sedky, D., Mohamed, A., Abdalhamed, A.M., Abdel-Aziem ,S., Khafagi, M., Nasr, S.M. (2024). In Vivo Investigation of the Anti-Staphylococcus aureus Impact of *Balanites aegyptiaca* and *Curcuma longa* Ethanol Extracts on Apoptotic Gene Expression and Their Implications on Hemogram and Serum Protein Profiles. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, **10(1)**: 169-176.doi:10.17582/journal.aavs/2022/10.1.160.169.
- treatment, **5**:19:73-83. doi: 10.2147/NDT.S396556.
33. Tabaei, S., Kouhi Noghondar, M., Mohammadzadeh, M.,Ataei ,L., Amel Jamehdar, S. (2016) .Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens. *Imam Reza hospital in Mashhad. Medical Journal of Mashhad university of Medical Sciences*, **59(2)**: 64-70. doi:10.22038/mjms.2016.7328.
34. Taha, S.M., Abd El-Aziz, N.K., Abdelkhalek, A., Pet ,I., Ahmadi, M., El-Nabtity ,S.M. (2024). Chitosan-Loaded *Lagenaria siceraria* and *Thymus vulgaris* Potentiate Antibacterial, Antioxidant, and Immunomodulatory Activities against Extensive Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: *In Vitro and In Vivo Approaches*. *Antioxidants*, **30;13(4)**:428. doi: 10.3390/antiox13040428.
35. Vaezifar, S., Molaei, M.(2019). Preparation and Characterization of Drug-Delivery System of Chitosan Nanoparticles Containing Doxorubicin for Use in the Treatment of Breast Cancer. *Journal of Isfahan Medical School*, **37(541)**: 1047-1053.doi: 10.22122/jims.v37i541.12118.
36. Wang ,Y., Bai ,L., Li, H., Yang, W., Li, M.(2021). Protective effects of *Lepidium draba* L. leaves extract on testis histopathology, oxidative stress indicators, serum



Effect of nanochitosan carrying *Lepidium draba* extract on antioxidant levels and lipid peroxidation in liver tissue of rat infected with *Staphylococcus aureus*

Anahita Sinaei¹, Zahra Keshtmand^{*2}, Morteza Mohajeri Amiri¹

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

2. Department of Biology, C.TC., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 09 March 2025

Accepted: 07 October 2025

Abstract

The biocompatibility, biodegradability, antibacterial and non-toxic properties of nanochitosan and the use of plant compounds with antibacterial properties have been considered today. The aim of this study was to investigate the effect of nanochitosan carrying *Lepidium draba* extract on changes in the level of antioxidants and lipid peroxidation of liver tissue infected with *Staphylococcus aureus* in male Wistar rats. In this experimental study, 28 male Wistar rats were divided into four groups including control group, infected with *Staphylococcus aureus* (10^8 CFU/ml), receiving nanochitosan (1ml), and infected model + receiving nanochitosan carrying *Lepidium draba* extract (200 mg/kg). Infection was induced by intraperitoneal injection, single dose, and receiving nanochitosan carrying the *Lepidium draba* extract by gavage for 30 days. After the treatment period and animal dissection, liver tissue was extracted to examine the activity levels of total antioxidant, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and malondialdehyde of different groups. Data analysis in different groups was performed with SPSS software and one-way variance statistical test, and $p < 0.05$ was considered significant. The results showed a significant change in the levels of total antioxidant, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and malondialdehyde in the infected groups compared to the control group ($P < 0.05$). While a decrease in the level of malondialdehyde, an increase in the level of total antioxidant, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the treatment groups compared to the infected group was shown to be significant ($P < 0.05$). Based on the results obtained, probably due to its antioxidant compounds and effects, nanochitosan carrying *Lepidium draba* extract showed a modulating effect on the level of antioxidants and lipid peroxidation in the liver tissue of bacteria-infected rats. Therefore, it can probably be used as a promising therapeutic strategy.

Keywords: Nanochitosan, *Lepidium draba*, Antioxidant, lipid peroxidation, Liver, *Staphylococcus aureus*, Rat

* Corresponding Author: Zahra Keshtmand

Address: Department of Biology, C.TC., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: zahra.keshtmand@iaua.ac.ir

بررسی مولکولی و همسان سازی ژن متیونیناز از باسیلوس های هالوفیل در سلول مستعد جهت استفاده در صنعت

فروغ سهی راد^۱، منصور بیات^{۲*}، محدثه لاری پور^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی صنعتی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فناوری های نوین،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد قارچ شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- دانشیار قارچ شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال،

تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۳۰

چکیده

متیونیناز آنزیمی است که در زمینه ی داروسازی به ویژه کانسرتراپی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. باسیلوس های هالوفیلیک گروهی از باکتری های گرم مثبتی هستند که در محیط نمکی زندگی می کنند. این ارگانسیم ها مخازن بالقوه آنزیم هایی هستند که به وفور در صنایع مختلف کاربرد دارند. از این رو هدف این مطالعه بررسی مولکولی و همسان سازی ژن متیونیناز از باسیلوس های هالوفیل در سلول مستعد جهت استفاده در صنعت می باشد. سویه های جنس باسیلوس از مجموع ۲۰ نمونه آب شور از بندرعباس-خلیج فارس جداسازی و تعیین هویت شدند و سپس با روش PCR، ژن متیونیناز از این باسیلوس ها جدا گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به وکتور انتقالی pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نو ترکیب به اشریشیا اورینگامی استاندارد ترانسفورم شد از ۱۲ سویه باسیلوس جدا شده تنها ۲ سویه واجد ژن متیونیناز بود. به منظور تعیین هویت مولکولی جنس باسیلوس حامل ژن متیونیناز از پرایمر خانه دار استفاده گردید. در نهایت با سکانس محصول PCR بیان ژن متیونیناز در باکتری اشریشیا کلی اورینگامی تایید شد. بیان آنزیم متیونیناز با استفاده از روش real-time PCR ارزیابی شد. در نتیجه این پژوهش موفق به پیدا کردن باسیلوس های هالوفیل بومی مولد آنزیم متیونیناز شده و ژن آن با موفقیت از باکتری باسیلوس سوبتلیس به باکتری اشریشیا اورینگامی به منظور بازدهی تولید بالا، وارد گردید که طبق نتایج، بهینه دمایی فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه بود.

کلمات کلیدی: متیونیناز، باسیلوس، همسان سازی، مولکولی، هالوفیل، PCR

*نویسنده مسئول: منصور بیات

آدرس: استاد قارچ شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

پست الکترونیک: m.bayat@srbiau.ac.ir

مقدمه

ال- متیونین-گاما-لیاز (EC 4.4.1.11) که به عنوان متیوناز، متیونیناز، L-متیونین- γ -دمتیولاز و L-متیونین متانتیول-لیاز شناخته می شود. متیونین گاما لیاز (MGL) دارای وزن مولکولی در حدود ۱۴۹ تا ۱۷۳ کیلو دالتون بوده و از چهار زیر واحد یکسان (تقریباً ۴۱ تا ۴۵ کیلو دالتون) تشکیل شده است. متیونیناز یک آنزیم وابسته به پیریدوکسال-۵-فسفات (PLP) است که یک مزیت منحصر به فرد در مهار سرطان دارد. متیونیناز توانایی هدف قرار دادن انتخابی و مهار رشد سلول های سرطانی، بدون آسیب رساندن به سلول های سالم را دارد. چرا که سلول های تومور فاقد یک آنزیم ضروری به نام متیونین سنتاز هستند که سلول های سالم از آن برای ساخت اسید آمینه حیاتی متیونین استفاده می کنند. مطالعات اخیر نشان می دهد که بسیاری از متابولیت ها می توانند خودشان به عنوان یک مولکول پیام رسان عمل کنند و برنامه رشد سلول را کنترل کنند. مطالعات بسیاری، بویژه توسط پژوهشگران سرطان شناسی به این مطلب اشاره داشته اند که «متیونین» ممکن است یک متابولیت پیام رسان باشد. تحقیقات نشان می دهد که بسیاری از سلول های سرطانی برای رشد، به متیونین وابسته هستند. متابولیسم غیرعادی سرطان یک پدیده تکرارشونده در طول پیشرفت سرطان است. بنابراین، جذب متیونین خارج سلولی تغییر یافته ممکن است باعث تومورزایی و پیشرفت شود (Abozeid, A.A, 2023).

متیونین (L-Methionine) با (cas number 3-68-63) یکی از هشت اسید آمینه ی ضروری برای بدن است. متیونین به عنوان یک اسید آمینه ضروری برای مهره داران، با کاربرد های بیوتکنولوژیکی، از جمله در صنایع غذایی، خوراک دام و داروسازی، بسیار مورد

توجه است (Neubauer, C. and Landecker, H., 2021).

در محیط سلولی، متیونین نه تنها برای شروع بیوسنتز پروتئین، بلکه برای تاخوردگی و پایداری پروتئین نیز حیاتی است. علاوه بر این، نقش مهمی به عنوان نقطه شروع فرآیندهای متابولیکی مختلف، از جمله - Sآدنوزیل متیونین (SAM)، یک دهنده برجسته گروه متیل در واکنش های متیلاسیون سلولی، ایفا می کند (Bernasocchi, T. and Mostoslavsky, R., 2024).

بسیاری از رده های سلولی بدخیم انسانی نیازمند متیونین بیشتری برای افزایش سنتز پروتئین و تنظیم بیان DNA هستند. در دسترس بودن بیشتر متیونین باعث فراهمی زیستی بیشتر S-آدنوزیل متیونین برای اهدای گروه های متیل به DNA می شود که این می تواند منجر به هیپرمتیلاسیون در DNA می شود (Vaccaro, J.A. and Naser, S.A., 2021).

از اولین تغییرات اپی ژنتیکی شناسایی شده در سرطان، تغییر در متیلاسیون DNA است. شواهد زیادی وجود دارد که محدودیت متیونین می تواند رشد سلول های سرطانی را مهار کند (Bandaru, N., et al 2025).

توانایی متیونیناز در کاهش سطح متیونین بدن، دلیل اصلی اثرات ضد سرطانی قوی آن است. متیونین نقش مهمی در رشد و تکثیر بسیاری از سلول های سرطانی، به ویژه آن هایی که در انواع خاصی از تومورها دیده می شوند، ایفا می کند. متیونیناز می تواند با کاهش در دسترس بودن این اسید آمینه حیاتی، ضمن حفظ سلول های طبیعی که کمتر به متیونین وابسته هستند، اثرات کشنده ای در سلول های سرطانی ایجاد کند. کاهش متیونین چندین اثر پایین دستی دارد. اول، باعث آپوپتوز می شود؛ کاهش سطح متیونین ممکن است باعث شود سلول های سرطانی مسیرهای آپوپتوز را آغاز کنند



هویت مولکولی جنس باسیلوس حامل ژن متیونیناز از پرایمرهای عمومی ۱۶srRNA به روش PCR استفاده گردید.

جداسازی باسیلوس های تولید کننده آنزیم متیونیناز به منظور شناسایی ژن کد کننده ی آنزیم متیونیناز (mdeA) از کیت دی ان ای اکسترکشن و آزمون PCR با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی سنتز شده توسط sinacolon انجام گرفت و محصول توسط ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان می دهد که تنها ۲ سویه حامل ژن mdeA می باشد.

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

سایز باند	توالی ژن	نام ژن
190	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'	M13-FP
1420	F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R 5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'	16s rRNA

کلون کردن ژن کد کننده ی آنزیم متیونیناز (mdeA) در اشریشیا کلی اورینگامی

باکتری E.Coli سویه اورینگامی از بانک میکروارگانسیم ها تهیه گردید. در این پژوهش به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شد. کیت TA کلونینگ از شرکت Sinaclon تهیه گردید. همانطور که در پروتکل کیت آمده بود از یک وکتور خطی بنام PTG19-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین قرار دارد استفاده شد. استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ۳' خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد، سپس آنزیم ligase T4 DNA با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می کند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر ماست تشکیل شده که توانایی تکثیر خود بخود را در میزبان مناسب مانند E.coli دارا می باشد.

و در نتیجه مرگ برنامه ریزی شده سلولی رخ دهد. دوم، با کاهش تأمین یک ماده مغذی حیاتی، رشد سلول های سرطانی را کند یا متوقف می کند که تکثیر سلولی را محدود می کند (Wahib., et al 2025). متیونیناز، متیونین را به α-کتوبوتیرات، متانتیول و آمونیاک کاتالیز می کند (George, S. and Narayanan, D.P., 2025) مطالعات نشان می دهد MGL از منابع مختلف از جمله: باکتری ها، قارچ ها و گیاهان جدا شده است. اما انسان ها فاقد این آنزیم هستند. در میان منابع MGL که قبلاً توضیح داده شد، باسیلوس های آزری و هالوفیل بهترین منبع باکتریایی برای تولید MGL گزارش شده است (Abozeid, A.A., 2023).

مواد و روش ها

نمونه برداری

این مطالعه از نوع توصیفی-تحلیلی می باشد و به صورت مطالعه علوم پایه انجام شده است. نمونه برداری از آب شور در بندرعباس-خلیج فارس انجام شد که در مجموع ۲۰ نمونه آب از سطح تا عمق ۱۰ سانتی متری نمونه برداری و بعد از بسته بندی در ظروف شیشه ای که از قبل استریل شده به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه ها با دور 8000 rpm سانتریفیوژ شد و از قسمت رسوب آن در محیط لوریا برتانی آگار به صورت چهار منطقه ای کشت انجام گردید. از قسمت کلنی های رشد یافته مشکوک به باسیلوس از نظر ماکروسکوپی، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفتند. از سویه استاندارد باسیلوس به عنوان کنترل مثبت در تمامی مراحل کار استفاده شد. برای غربالگری ۲۰ نمونه آب شور ارسالی به آزمایشگاه کلنی های مشکوک به باسیل های گرم مثبت جداسازی شده که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تحت عنوان باسیلوس تعیین هویت شدند. به منظور تایید



انتقال وکتور به میزبان اشرشیاکلی اورینگامی

باکتری E.coli سویه اورینگامی در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۷-۱۶ ساعت کشت داده شد و سپس در دستگاه سانتریفوژ لوله ای بمدت ۱۰ دقیقه در دور 10000g سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باکتری بدست آمد. ۱۰۰ میکرولیتر از بافر S به رسوب باکتری اضافه کرده سپس بمدت ۱ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار در دور ۱۲۰۰۰g قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از بافر S روی رسوب ریخته و بمدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفت. دوباره در دور 12000g بمدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شده، این بار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر S روی رسوب ریخته و پیپتاژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به محلول Ligation اضافه کرده و بمدت ۳۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. سپس ۹۰ ثانیه در ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و دوباره ۱۰ دقیقه دیگر بر روی یخ قرار داده شد. در نهایت محلول بدست آمده در حجم ۷۵ میکرولیتر در تیوب های ۱/۵ میلی لیتری درب پیچ دار مخصوص ذخیره گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد بصورت بلند مدت نگهداری شد. ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ساخته شده برداشته و در ویال ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و مواد transfer شده را که در یخ قرار دارند به آن اضافه شد. پس از پیپتاژ کردن بمدت ۶۰-۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. به محیط کشت آنتی بیوتیک آمپی سیلین اضافه شد تا باکتری بتواند در محیط رشد کند و وکتوری که دریافت کرده را نگه دارد. سپس محتویات بمدت ۱ دقیقه در دور ۶۵۰g سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری روی پلیت LB کشت داده شد و بمدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در نهایت انجام کلونینگ تایید گردید.

و در نهایت به منظور تایید کلونینگ مرحله زیر انجام شد:

۱. کلونال سلکشن (کلونی های سفید و آبی)

۲. پرایمر M13

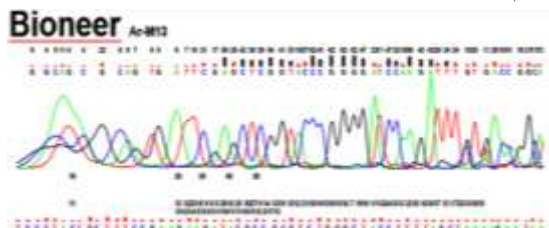
۳. سکانس و توالی یابی جانکشن ها

محصول PCR برای سکانس و بررسی بیان به شرکت Bioner ارسال گردید و BLAST شد.



تایید کلونینگ با روش کلونال سلکشن آبی و سفید

توالی های به دست آمده از نظر تشابه ژنتیکی با سایر توالی های ثبت شده در سایت NCBI هم ردیف شده و درخت فیلوژنی ترسیم گردید. به این صورت که ابتدا توالی DNA و mRNA ژن ۱۶srRNA در سایت NCBI شناسایی شد. سپس توالی چندین ژن ۱۶srRNA از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و با استفاده از نرم افزار clustalX توالی های این ژن با سایر باکتری ها هم تراز گردید. در ادامه تعداد جهش ها، تنوع نوکلئوتیدی، درصد تفرق ژنی و ... با استفاده از قسمت آنالیز ژنی در سایت NCBI انجام گردید. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار Mega5 استفاده شد.



محل ایجاد جانکشن و سکانس مربوط به آن توسط شرکت بیونر

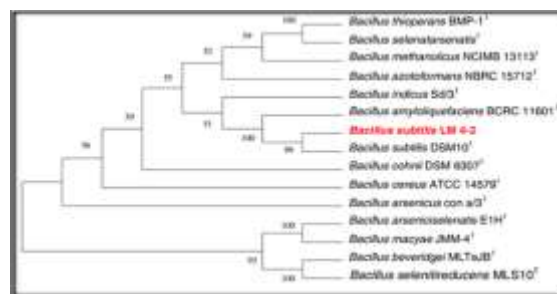
اطلاعات پرایمر متیونیناز سنتز شده توسط شرکت سیناکلون به سفارش پژوهشگر

Oligo name	Seq.(5-3)	MW	OD (1000μl)	nmol	Water/ tube (μl)	TM	GC%	Mer
Methioninase-F- 1042bp	ATGAGCATCACCCAGAAC	5461.6	2	12.08	120.84	53.69	50	18
Methioninase-R	TCATTTTCCAATCTTCCAT	5967.9	2	11.06	110.59	49.10	30	20

کلونینگ نشان داد که این ژن در اشریشیا کلی اورینگامی بطور موفقیت آمیزی کلون شده است. بررسی درخت فیلوژنی گونه های مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین گونه های باسیلوس با استفاده از ژن ۱۶srRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (Neighbor-Joining) نشان می دهد که نمونه ما با گونه های باسیلوس سوبتیلیس با بوت استرپ ۹۹٪ در یک کلاسد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن ها با هم بود.

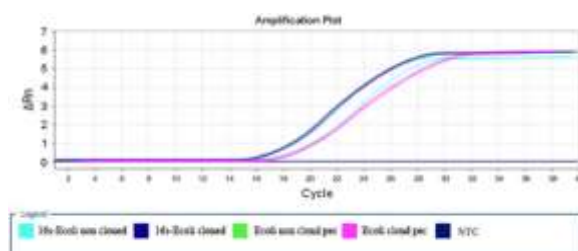
بحث

سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های طبیعی، برای رشد و تکثیر سریع به مقدار زیادی گلوکز نیاز دارند. اما درمان های بر پایه ی حذف، گلوکز به علت اینکه سلول های طبیعی نیز برای زنده ماندن و رشد به گلوکز نیاز دارند غیر ممکن است. یکی دیگر از ضروریات متابولیکی سلول های سرطانی، وابستگی آن ها به سطوح بالای اسیدهای آمینه خاص، از جمله متیونین برای رشد و تکثیر است. به همین جهت آنزیم متیونیناز به عنوان یک عامل محدودیت متیونین بسیار مورد توجه واقع شده است (Qoura, L.A. et al., 2024). Mohkam و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای اولین بار، تولید ال-متیونیناز از یک جنس جدید Alcaligenes را گزارش کرد که از نمونه های خاک جدا و شناسایی شد. در این مطالعه



درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16srRNA با

استفاده از نرم افزار Mega5



میزان بیان ژن متیونیناز توسط سویه ی نوترکیب به وسیله ی آزمون Real time PCR بررسی شد

نتایج

در نتیجه غربالگری ۲۰ نمونه آب ارسالی به آزمایشگاه در مجموع ۱۲ کلنی مشکوک به باسیل های گرم مثبت جداسازی شد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که تنها ۲ سویه حامل ژن mdeA می باشد. پس از کلون کردن سویه حامل ژن متیونیناز توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند و برای تایید حضور پرایمر M13 از کلنی های مشکوک DNA استخراج شد. توسط آزمون PCR و الکتروفورز محصول PCR، ورود ژن های پلازمید به باکتری اشریشیا کلی اورینگامی تایید شد. در نتیجه آزمون

نمونه‌ها از خاک باغ‌های مختلف شهر شیراز در استان فارس، ایران، جمع آوری شده بود. Ghalehno و همکاران در سال ۲۰۱۸ "به بررسی جداسازی و شناسایی سویه های تولیدکننده مواد فعال ضد میکروبی در طی غربالگری باکتری‌های گرم مثبت تشکیل دهنده‌ی آندوسپور هالوفیل جدا شده از دریاچه‌های شور ایران پرداختند. تعداد ۶۲ ایزوله از دریاچه‌های شور مختلف ایران جداسازی شدند." استخراج آنزیم متیونیناز از باکتری‌های تولید کننده این آنزیم، یکی از روش‌های دستیابی به این آنزیم است که در این مورد نیز تحقیقات متعددی انجام یافته است. در این مورد Azizi, E و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه ای "تحت عنوان جداسازی و شناسایی اکستروموفیل های مولد ضد سرطان آنزیم های ال-گلوتامیناز و ال-متیونیناز از چشمه آب گرم ییل گنبد که در قزوین، ایران انجام شده بود دریافتند که از مجموع ۲۰ نمونه آب گرم یله گنبد قزوین ۱۲ کلنی رشد کرد اما تنها ۱ ایزوله دارای متیونیناز فعال بود. در این مطالعه، باسیلوس لیکینی فورمیس به عنوان یک سویه غالب و یک سویه بومی برای تولید متیونیناز شناسایی شد." در مطالعه ی دیگری که در اندونزی توسط Prihanto, A.A در سال ۲۰۱۸ تحت عنوان باسیلوس سوبتیلیس UB7Tn، یک تولیدکننده بالقوه L-متیوناز جدا شده از گیاه حرا، Rhizophora mucronata انجام گرفت. "هدف از این مطالعه به دست آوردن باکتری اندوفیت مولد ال متیونیناز جدا شده از ریشه، ساقه و برگ درختان حرا بود که بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، بهترین تولید کننده باسیلوس سوبتیلیس بود." تولید آنزیم متیونیناز توسط سایر گونه های میکروبی مانند قارچ ها نیز انجام می گیرد. در مطالعه ای که در عربستان توسط Alzahrani و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام گرفت "از

۲۴ گونه قارچی که از ریزوسفر گیاهی جدا شده بود ۸ جدایه توانایی تولید آنزیم را داشتند که در مقایسه با باسیلوس های جدا شده در این مطالعه از توانایی بالایی در این زمینه برخورد بودند. آن ها همچنین توانی srRNA۱۶ جدایه های قارچی را آنالیز کردند و گزارش دادند که اکثر این قارچ ها از نوع آسپرژیلوس و پنی سیلیوم بوده اند."

نتیجه گیری

تولید دارو از طریق فناوری DNA نو ترکیب و اثرات درمانی آن از مباحث روز جوامع علوم پزشکی جهان است. ایران دارای تنوعی از محیط های شور با غلظت های مختلف است. این محیط ها شامل معادن نمکی، بیابان های شور، رودخانه های نمکی و به ویژه دریاچه های نمک است. دریاچه ارومیه بزرگ ترین و شورترین دریاچه دائمی ایران و یکی از دریاچه های فوق اشباع از نمک دنیا است که از این نظر با دریاچه نمک بزرگ آمریکا شباهت دارد. همچنین خلیج فارس به عنوان یکی از شور ترین آب های آزاد شناخته می شود. میکروارگانیسم های هالوفیل (نمک دوست) میکروارگانیسم هایی هستند که در محیط های شور و غنی از نمک زندگی می کنند. این موجودات به دلیل توانایی تحمل شرایط سخت و نقش در چرخه های زیستی، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. متیونیناز یکی از آنزیم های صنعتی با ارزش درمانی بالا است و به عنوان یک عامل ضد سرطانی قوی در برابر انواع مختلف رده های سلولی تومور به حساب می آید. بسیاری از رده های سلولی سرطانی انسان و تومورهای اولیه نیاز مطلق به L-متیونین، یک اسید آمینه ضروری برای بقا و تکثیر دارند. از سوی دیگر، سلول های طبیعی به دلیل متیونین سنتاز فعال، توانایی رشد بر روی هموسیستین، به جای متیونین را دارند. بسیاری از سلول های تومور فاقد متیونین سنتاز



- achievements, gaps, and future directions. *Microorganisms*, 9(10), p.2021.
5. Azizi, E., FARAHMAND, M. and Shahhosseini, M.H., 2018. Isolation and Identification of extremophiles producing anticancer L-glutaminase and L-Methioninase enzymes from Yale Gonbad hot spring in Qazvin, Iran.
 6. Bandaru, N., Noor, S.M., Kammili, M.L., Bonthu, M.G., Gayatri, A.P. and Kumar, P.K., 2025. Methionine restriction for cancer therapy: From preclinical studies to clinical trials. *Cancer Pathogenesis and Therapy*.
 7. Bernasocchi, T. and Mostoslavsky, R., 2024. Subcellular one carbon metabolism in cancer, aging and epigenetics. *Frontiers in epigenetics and epigenomics*, 2, p.1451971.
 8. Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. and Soerjomataram, I., 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), pp.3029-3030.
 9. George, S. and Narayanan, D.P., 2025. Biocatalytic Properties of Mangrove Microbiome. In *Mangrove Microbiome: Diversity and Bioprospecting* (pp. 297-308). Singapore: Springer Nature Singapore.
 10. Ghalehno, A.D., Ghavidel-Aliabadi, M., Shahmohamadi, Z., Mehrshad, M., Amoozegar, M.A. and Danesh, A., 2018. Isolation and Discovery of New Antimicrobial-agent Producer Strains Using Antibacterial Screening of Halophilic Gram-positive Endospore-forming Bacteria Isolated from Saline Lakes of Iran. *Arak. Med. Univ. J*, 20, pp.10-23.
 11. Javia, B.M., Gadhvi, M.S., Vyas, S.J., Ghelani, A., Wirajana, N. and Dudhagara, D.R., 2024. A review on L-methioninase in cancer therapy: Precision targeting, advancements and diverse applications for a promising future. *International Journal of*
- فعال هستند بنابراین به مکمل متیونین خارجی از طریق رژیم غذایی وابسته هستند. در نتیجه، متیونین هدف اصلی تومورهای خاص برای درمان است؛ بنابراین، بهره برداری درمانی از L-متیونیناز برای تخلیه متیونین پلاسما یک روش امیدوارکننده به نظر می رسد. علاوه بر این، توزیع محدود L-متیونیناز به عنوان آنزیم درون سلولی در بین همه پاتوژن های میکروبی، اما نه در انسان، این آنزیم را به یک هدف دارویی امیدوارکننده برای درمان های ضد باکتری، ضد قارچ و ضد تک یاخته تبدیل می کند. با توجه به اهمیت این مسئله و استفاده دارویی از آنزیم متیونیناز، در این مطالعه تلاش شد تا تولید این آنزیم از طریق روش کلونینگ توسط باکتری سریع رشد اشیشیا کلی اورینگامی انجام بگیرد تا قدمی در راستای تولید انبوه از این آنزیم با کمک باکتری ها صورت پذیرد. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که ژن آنزیم میونیناز در باسیلوس های هالوفیل موجود در آب های بندرعباس-خلیج فارس وجود دارد و با کلونینگ آن در اشیشیا کلی اورینگامی می توان به میزان گسترده تر و با صرفه اقتصادی بیشتر این آنزیم صنعتی را تولید نمود.
- منابع**
1. Abozeid, A.A., 2023. Short review on microbial L-methioninase and its applications. *Bulletin of Faculty of Science, Zagazig University*, 20 (4), pp.107-139.
 2. Aledo, J.C., 2019. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Science*, 28(10), pp.1785-1796.
 3. Alshehri, W.A., 2020. Bacterium Hafnia alvei secretes L-methioninase enzyme: Optimization of the enzyme secretion conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 27(5), pp.1222-1227.
 4. Alzahrani, K.J., 2021. Microbiome studies from Saudi Arabia over the last 10 years:



20. Neubauer, C. and Landecker, H., 2021. A planetary health perspective on synthetic methionine. *Lancet Planet Health* 5 (8): e560–e569 [online]
21. Prihanto, A.A., 2018, April. *Bacillus subtilis* UBTn7, a potential producer of L-Methioninase isolated from mangrove, *Rhizophora mucronata*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 137, No. 1, p. 012077). IOP Publishing.
22. Qoura, L.A., Balakin, K.V., Hoffman, R.M. and Pokrovsky, V.S., 2024. The potential of methioninase for cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1879**(4), p.189122.
23. Raboni, S., Faggiano, S., Bettati, S. and Mozzarelli, A., 2024. Methionine gamma lyase: Structure-activity relationships and therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1872**(3), p.140991.
24. Suganya, K., Govindan, K., Prabha, P. and Murugan, M., 2017. An extensive review on L-methioninase and its potential applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **12**, pp.104-115.
25. Vaccaro, J.A. and Naser, S.A., 2021, December. The role of methyl donors of the methionine cycle in gastrointestinal infection and inflammation. In *Healthcare* (Vol. 10, No. 1, p. 61). MDPI.
26. Wahib, Z.M., Muslim, S.N. and Shafi, F.A.A., 2025. Production, Purification, and Characterization of L-Methioninase Produced by *Escherichia coli* Isolates: Potential Application in Cancer Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, **10** (2), pp.285-292.
27. Wanders, D., Hobson, K. and Ji, X., 2020. Methionine restriction and cancer biology. *Nutrients*, **12**(3), p.684.
- Biological Macromolecules*, 265, p.130997.
12. Kaiser, P., 2020. Methionine dependence of cancer. *Biomolecules*, **10**(4), p.568.
13. Kavya, D. and Nadumane, V.K., 2020. Identification of highest L-Methioninase enzyme producers among soil microbial isolates, with potential antioxidant and anticancer properties.
14. Kharayat, B. and Singh, P., 2018. Statistical optimization of reaction condition of L-methioninase from *Bacillus subtilis*. *Research Reports*, **2**(2018), pp.1-9.
15. Lauinger, L. and Kaiser, P., 2021. Sensing and signaling of methionine metabolism. *Metabolites*, **11**(2), p.83.
16. Ma, C., Xu, A., Zuo, L., Li, Q., Fan, F., Hu, Y. and Sun, C., 2025. Methionine Dependency and Restriction in Cancer: Exploring the Pathogenic Function and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals*, **18**(5), p.640.
17. Mohkam, M., Taleban, Y., Golkar, N., Berenjian, A., Dehshahri, A., Mobasher, M.A. and Ghasemi, Y., 2020. Isolation and identification of novel L-methioninase producing bacteria and optimization of its production by experimental design method. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **26**, p.101566.
18. Navik, U., Sheth, V.G., Khurana, A., Jawalekar, S.S., Allawadhi, P., Gaddam, R.R., Bhatti, J.S. and Tikoo, K., 2021. Methionine as a double-edged sword in health and disease: Current perspective and future challenges. *Ageing research reviews*, **72**, p.101500.
19. Navik, U., Sheth, V.G., Khurana, A., Jawalekar, S.S., Allawadhi, P., Gaddam, R.R., Bhatti, J.S. and Tikoo, K., 2021. Methionine as a double-edged sword in health and disease: Current perspective and future challenges. *Ageing research reviews*, **72**, p.101500.



Molecular study and cloning of Methioninase gene from halophilic bacilli in cells susceptible to industrial application

Forough sahirad¹, Mansour bayat^{*2}, mohaddeseh larypoor³

1. Master's degree in Industrial Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and New Technologies, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Professor of Veterinary Mycology, Pathobiology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Associate Professor of Medical Mycology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 21 August 2025

Accepted: 14 October 2025

Abstract

Methioninase is an enzyme that has been widely studied in the field of pharmacy, especially cancer therapy. Halophilic bacillus are a group of gram-positive bacteria that live in saline environments. These organisms are potential reservoirs of enzymes that are widely used in industries. Therefore, the aim is molecular investigation and cloning of the methioninase gene from halophilic bacilli in the susceptible cell for use in industry. Bacillus strains were isolated and identified from a total of 20 saline water samples in Persian Gulf-Bandarabbas, and then the methioninase gene was isolated from the bacilli by PCR method. The amplified fragment was inserted into the pTG19 transfer vector by TA cloning method. In the next step, the recombinant vector was transformed into E.coli uragami. The expression level of pectinase enzyme was evaluated using real-time PCR method. Out of 12 Bacillus strains isolated, only 2 strains had methioninase gene. In order to determine the molecular identity of the Bacillus genus carrying the methioninase gene, housekeeping primers were used. Finally, the expression of methioninase gene in Escherichia coli Oragami bacteria was confirmed by PCR product sequence. As a result of this research, it was possible to find local halophilic bacilli producing methioninase enzyme and its gene was successfully transferred from Bacillus bacterium to E.coli bacterium for high production efficiency. According to the results, the optimal temperature of enzyme activity is at 37 degrees.

Keywords: Methioninase, Bacilli, cloning, Molecular, Halophile, PCR

*Corresponding author: Mansour bayat

Address: Professor of Veterinary Mycology, Pathobiology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E. mail: m.bayat@srbiau.ac.ir



مطالعه مولکولی سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوار کنندگان اهلی استان اصفهان، ایران

سید رضا حسینی^{*}،^۱ میلاد حمزه علی طهرانی^۲

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

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۱

چکیده

اکنون کوزیس یکی از بیماری های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات بوده که علائم آن با رشد طولانی مدت نوزاد های این سستود در بدن میزبان واسط عموماً "نشخوار کنندگان ظاهر می شود و انسان میزبان تصادفی و نهایی برای این انگل شناخته می شود. اگرچه این بیماری در برخی کشورها گزارش نشده ولی واجد پراکندگی جهانی می باشد و با توجه به اهمیت ژئوتیک این بیماری، شناخت سویه ها و تعیین میزان آلودگی به این انگل در میزبان های واسط ضروری می باشد به دلیل آنکه قطع چرخه تکاملی انگل در میزبان های واسط و میزبان نهایی واجد اهمیت بسیاری می باشد و همچنین این انگل دارای تعدادی گونه ها یا سویه های درون گونه ای بوده که این تنوع ژنتیکی می تواند در اپیدمیولوژی و کنترل بیماری و ساخت واکسن ها واجد اهمیت بالقوه ای بوده و لذا مطالعه توالی DNA میتوکندریایی و مطالعات فیلوژنتیکی مبتنی بر DNA این سستود واجد اهمیت بسیاری می باشد. ۲۴۴ نمونه از نشخوار کنندگان (گوسفند، گاو، شتر و بز) ذبح شده در کشتارگاه های صنعتی استان اصفهان (۶۱ نمونه کبد آلوده، شامل دو گروه ۳۱ جنس نر و ۳۰ جنس ماده در طی فاصله زمانی فروردین تا شهریور سال ۱۴۰۱ جمع آوری شد و پس از تهیه پروتواسکولکس های انگل از داخل کیست های هیداتید موجود، نسبت به استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA اقدام شد، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای (BD1 (Forward و S (Reverse که توانایی تکثیر ژنوم ریبوزومی ناحیه rDNA-ITS1 را دارد و منجر به تولید محصول PCR به طول ۱۰۰۰bp استفاده شد و با استفاده از آنزیم های اندونوکلاز HpaII, RsaI, AluI و TaqI تحت هضم آنزیمی (PCR-RFLP) قرار گرفت و در نهایت نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و با کمک آزمون مربع کای (X²) مورد تجزیه و تحلیل آماری و سطح معنی دار بودن تحقیق ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. نتایج نشان دهنده آلودگی قطعی به E. granulosus و سویه گوسفندی (G1) ناشی از چرخه گوسفندی - سگی در تمامی نمونه های حاصل شده از کبد نشخوار کنندگان بوده که در مقایسه و آنالیز آماری انجام شده تفاوت معنی داری بین نوع آلودگی به سویه های مختلف بین جنس نر و ماده وجود نداشته است. این مطالعه میتواند نتایج قبلی مبنی بر غالب بودن سویه گوسفندی در ایران را تایید نماید لذا توجه ویژه به این موضوع جهت کنترل و پیشگیری از انتقال این انگل در چرخه گوسفندی - سگی توصیه می شود.

کلمات کلیدی: اکینو کوزیس، گرانولوزوس، کیست هیداتید، تعیین سویه، اصفهان، ایران

^{*} نویسنده مسئول: سید رضا حسینی

آدرس: استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: dr.s.reza@gmail.com

مقدمه

اکنون کوکوزیس یکی از بیماری های انگلی مشترک بین انسان و حیوانات بوده که متعلق به خانواده Taeniidae و جنس Echinococcus می باشد. علائم این بیماری با رشد طولانی مدت نوزاد های این سستود در بدن میزبان واسط عموماً "نشخوارکنندگان ظاهر می شود و انسان میزبان تصادفی و نهایی برای این انگل شناخته شده است (Hua et al., 2022). این بیماری واجد پراکندگی جهانی بوده و تعداد بسیار کمی از کشورها را می توان به عنوان عاری از آلودگی به این انگل در نظر گرفت، کشورهایی که عمده تولیدات دامی آن ها مربوط به پرورش گوسفند می باشد، دارای بیشترین میزان آلودگی بوده و این موضوع خود نشان دهنده اهمیت سلامت عمومی و سویه گوسفندی (چرخه گوسفند - سگ) در انتقال به انسان ها است. کیست های تشکیل شده از مرحله نوزادی E.granulosus عمدتاً در کبد و ریه های انسان و سایر میزبان های واسط به صورت کیست های تک حفره و پر از مایع دیده می شود در صورتی که کیست های ناشی از مرحله نوزادی E.multilocularis دارای ساختار تومور مانند و پیشرونده بوده که از وزیکول های کوچک متعددی در استرومای بافت همبند جاسازی شده و توده های ناشی از آن معمولاً در لوب راست کبد دیده شده ولیکن در اثر متاستاز به ریه، طحال و مغز و حفرات صفاقی نیز گسترش می یابد (Hajimohammadi et al., 2022). با توجه به مطالعات ژنتیکی انجام شده، این انگل دارای تعدادی سویه های درون گونه ای بوده که این تنوع ژنتیکی می تواند در اپیدمیولوژی و کنترل بیماری و ساخت واکسن ها واجد اهمیت بالقوه ای باشد لذا مطالعه توالی DNA میتوکندریایی و مطالعات فیلوژنتیکی مبتنی بر DNA این سستود واجد اهمیت بسیاری می باشد. بر اساس تحقیقات

انجام شده سویه های Echinococcus شامل E.equinus، E.granulosus sensu stricto (G1-G3) (G4)، E.ortleppi (G5) و E.canadensis (G6-G10) است که ژنوتیپ G1 در واقع سویه گوسفندی، ژنوتیپ G4 سویه اسبی و سویه G5 سویه گاوی شناخته شده اند (Mirshekar et al., 2021). از همین رو این مطالعه با هدف تحقیق در مورد سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوارکنندگان اهلی کشتار شده در استان اصفهان، ایران انجام گرفت تا شناخت سویه های احتمالی ابتلا به این بیماری در این استان مشخص و موانع موجود در راه کنترل و پیشگیری از این بیماری و همچنین ساخت واکسن بر طرف گردد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

این مطالعه از فروردین تا شهریور ماه سال ۱۴۰۱ بر روی نشخوارکنندگان ذبح شده در کشتارگاه های صنعتی استان اصفهان انجام شد. کیست های هیداتید جدا شده از کبد نشخوارکنندگان شامل گاو، گوسفند، شتر و بز بوده اند که پس از بازبینی اولیه توسط کارشناسان بهداشتی کشتارگاه ها به عنوان کبد آلوده به کیست هیداتید شناخته شدند و سپس از هر نوع حیوان ۶۱ نمونه کبد آلوده، شامل دو گروه ۳۱ جنس نر و ۳۰ جنس ماده (در مجموع ۲۴۴ نمونه) جداسازی شده و با قید مشخصات و حفظ زنجیره سرمایی به آزمایشگاه مولکولی ارسال شده اند. در آزمایشگاه پس از ارزیابی نوع کیست ها (تک و یا چند حفره) و درج اطلاعات لازم، نسبت به تهیه نمونه اقدام شد، نمونه ها با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری استریل و با سوزن گیج ۱۴ در شرایط استریل از داخل کیست ها آسپیره شد سپس محتویات هر سرنگ به صورت جداگانه داخل لوله فالکن ۱۵ میلی لیتری استریل تخلیه و با دور ۳۵۰۰ دور



در دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی خارج شده و عمل شستشو با سرم فیزیولوژی سه نوبت تکرار شد و در نهایت با تهیه یک لام مرطوب از رسوبات باقی مانده و بررسی میکروسکوپی، حضور پروتواسکولکس های کرم Echinococcus اثبات شد، سپس رسوب های حاصله به صورت جداگانه در الکل ۹۶ درجه و در فریزر -۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات مولکولی نگهداری شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، نمونه های خون اخذ شده ابتدا از فریزر -۷۰- درجه سانتی گراد خارج شده و برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تمام DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای -۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای BD1 (Forward) با شماره دسترسی AY185188.1 و S ۴ (Reverse) با شماره دسترسی KJ363926.1 ثبت شده در بانک جهانی ژن که توانایی تکثیر ژنوم ریوزومی (۱۸ S rRNA Gene) را دارد و منجر به تولید محصول PCR به طول ۱۰۰۰ جفت باز می شود استفاده شد. (جدول شماره ۱).

حجم کلی محصول PCR برابر با ۲۰ μl بوده که شامل:

4 μL genomic DNA، One Time PCR Buffer، 1.5 U Taq polymerase (Ampliqon, Denmark) 100، 30 pmol of each primer (Metabion, Korea) μM of each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Ampliqon, Denmark)، 1 μL PCR Buffer (MgCl₂)، 1 μL Genomic DNA، 1 U Taq polymerase (Ampliqon, Denmark)، 2 μL of each primer (Metabion, Korea)، 1 μL dNTP and 13.5 μL Distilled Water

می باشد. جهت PCR نمونه ها از دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (SimpliAmp, USA) استفاده شد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. از نمونه های بدون DNA ژنومی به عنوان کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر ۱ X TBE آنالیز و یا استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد.

واکنش هضم آنزیمی (RFLP)

برای انجام واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم های اندونوکلاز TaqI و HpaII، RsaI، AluI به ترتیب توالی های AG/CT، GT/AC، C/CGG و T/CGA را شناسایی می کنند، استفاده شد. حجم کلی محلول آزمایش برابر با ۲۰ میکرولیتر بوده که شامل ۲ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و یک میکرولیتر (۱۰ واحد) از هر آنزیم و افزایش حجم با آب مقطر استریل تا ۲۰ میکرولیتر انجام و سپس محصول نهایی جهت هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت سازنده برای آنزیم های Hpa2، Alu1 و Rsa1 به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و برای آنزیم Taq1 ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در نهایت محصولات PCR پس از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE آنالیز و یا استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد.



جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

Reactions	Name of primer	Nucleotide sequence (5'–3')	PCR product
PCR for all samples	BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	1000 bp
	4S	TAGCGTTTCGAAGTGTCG	

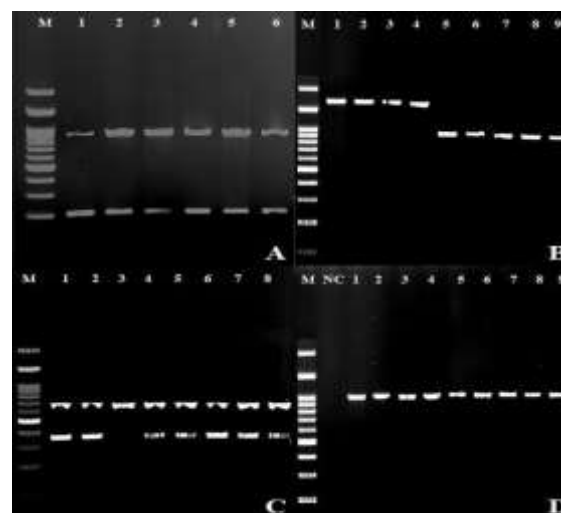
داده های آماری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و با کمک آزمون مربع کای (X^2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و سطح معنی دار بودن تحقیق ($P < 0.05$) بود که نشان از معنی دار بودن نتایج مطالعه حاضر داشت.

نتایج

نتایج مولکولی

اندازه قطعه تکثیر شده (18 S rRNA Gene) بعد از انجام واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده، ۱۰۰۰ جفت باز بوده و از یک نمونه تعیین توالی شده به عنوان کنترل مثبت آزمایش و همچنین از یک نمونه فاقد DNA ژنومی به عنوان کنترل منفی آزمایش استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از هضم با آنزیم اندونوکلاز (تصویر A. آنزیم Alu1، تصویر B. آنزیم Taq1، تصویر C. آنزیم Rsa1 و تصویر D. آنزیم Hpa2 طول مارکر استفاده شده برابر با 100bp می باشد).

نتایج آنالیز آماری

نتایج آزمایش نشان دهنده آلودگی قطعی به کیست هیداتید تک حفره ناشی از E.granulosus و سویه گوسفندی (G1) ناشی از چرخه گوسفندی - سگی در تمامی نمونه های حاصل شده از کبد نشخوارکنندگان بوده که در مقایسه و آنالیز آماری انجام شده تفاوت معنی داری بین نوع آلودگی به سویه های مختلف بین میزبان واسط جنس نر و ماده وجود نداشت.

بحث

با توجه به وجود ۱۰ ژنوتیپ مختلف از انگل E.granulosus با میزبان های واسط و نهایی مختلف و اثر گذاری این ژنوتیپ ها در چرخه زندگی انگل و انتقال آن به انسان، هدف این مطالعه بررسی سویه های کیست هیداتید جدا شده از نشخوارکنندگان اهلی استان اصفهان بود.

در مورد مطالعاتی که سایر کشورها انجام شده است، در تحقیق Gorkem Cengiz و همکاران در سال ۲۰۲۰، تحت عنوان مقایسه خصوصیات مولکولی و مورفولوژیکی و تجزیه هاپلوتیپی جدایه های گاو و گوسفند کیست های Echinococcus، با مطالعه ۱۱۹ نمونه کیست اخذ شده از ۴۸ گاو و ۷۱ گوسفند مورد مطالعه تهیه شده از شهر های مختلف کشور ترکیه و بررسی ژن های mt-cox1، mt-nad5 سویه غالب به ترتیب G1 و G3 اعلام شده است (Görkem & Bahadır, 2020). در مطالعه دیگری که در همان سال توسط Sarfraz Mehmood و همکاران، با هدف بررسی مولکولی هیداتیدوز گاو و گوسفند و اولین تشخیص

درصد آلودگی به سویه گاومیش - سگ (G3) و ۳۳/۰۶ درصد آلودگی به سویه گوسفند - سگ (G1) گزارش شده بود که در این تحقیق بر اهمیت انتقال این بیماری از گاومیش به انسان تاکید بسیاری شده است (Mehmood N. et al., 2020).

در مطالعه Akeel Beigh و همکاران در سال ۲۰۲۱، با موضوع مشخصات اپیدمیولوژیک و مولکولی *E. granulosus* جدا شده از نشخوارکنندگان کوچک دره کشمیر در کشور هند، با بررسی کیست های جدا شده از ۲۰۵۲ گوسفند و ۴۸ بز و مطالعه ناحیه ITS-1 سویه G1 به عنوان سویه غالب در آن منطقه گزارش شده است (Beigh et al., 2021) و همچنین در مطالعه دیگری که توسط Moudgil و همکاران در سال ۲۰۱۹، با عنوان هیداتیدوز در گوسفند و بز ذبح شده در هند: شیوع، خصوصیات ژنوتیپی و مطالعات پاتولوژیک انجام شده بود با بررسی کیست های حاصل شده از ۲۳۰ گوسفند و ۱۹۷ بز و ژن *cox-1* سویه G7 به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Moudgil et al., 2019).

در مطالعه Rui-Qi Hua و همکاران در سال ۲۰۲۲، با عنوان بررسی تنوع ژنتیکی *E. granulosus sensu lato* در چین (مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی سیستماتیک)، بر اساس مطالعات مروری انجام شده از سال های ۱۹۹۲ تا ۲۰۲۰ در آن کشور آلودگی به *E. granulosus* (G1, G3) با ۹۸/۳ درصد بالاترین میزان و آلودگی به *E. intermedius* (G6, G7) با ۱/۴ درصد، *E. ortleppi* (G5) با ۰/۱ درصد و همچنین *E. canadensis* (G8, G10) با ۰/۲ درصد کمترین میزان شیوع را داشته است (Hua et al., 2022).

در مورد مطالعاتی که در کشور ایران انجام شده است، در تحقیق حاجی محمدی و همکاران در سال ۲۰۲۲، تحت عنوان پیدایش و شناسایی ژنتیکی *E. granulosus*

گوسفند *E. canadensis* (G6/G7) در ترکیه، با مطالعه مولکولی ژن ناحیه *cox1* از ۸۵ نمونه (۱۹ گوسفند و ۶۶ گاو) سویه G6 و G7 برای اولین بار در ترکیه شناسایی شده است (Mehmood S. et al., 2020). همچنین در مطالعه Aylin Oral Babaoglu و همکاران در سال ۲۰۱۸، با موضوع تعیین ژنوتیپ جدایه های *E. granulosus* با تعیین توالی ژن *cox1* در منطقه آیدین کشور ترکیه انجام شده بود، با بررسی ۲۰ نمونه از مایع کیست های انسانی استخراج شده تحت عمل جراحی در مجموع ۷۵ درصد سویه سگی گوسفندی (G1) و ۲۵ درصد نمونه ها مربوط به سویه شتری و خوکی (G6, G7) گزارش شده است که در این مطالعه محققین علاوه بر غالب بودن سویه گوسفندی، آلودگی به سویه های شتری و خوکی را در انتقال *E. granulosus* به انسان گزارش نموده اند (Oral Babaoğlu et al., 2018) و در مطالعه Emrah Erdogan و همکاران در سال ۲۰۱۷، تحت عنوان بررسی مشخصات مولکولی جدایه های *E. granulosus* به دست آمده از میزبان های مختلف مناطق مختلف کشور ترکیه انجام شده بود، با بررسی ۲۵ نمونه اخذ شده از انسان، ۸ نمونه از گاو، ۶ نمونه از گوسفند و ۲ نمونه از بزها و بررسی ژن *cox1* نمونه های مورد مطالعه، سویه سگی - گوسفندی (G1) به عنوان سویه اصلی آلودگی به کیست هیداتید گزارش شده است (Erdogan et al., 2017).

در مطالعه دیگری که توسط Naunain Mehmood و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور پاکستان و با موضوع مطالعه جامع بر اساس اثر ژن *mtDNA* (*nad1*) بر ژنوتیپ های *E. granulosus* و بررسی نقش بالقوه چرخه سگ - گاومیش در آن کشور، با مطالعه چهار استان مختلف و اخذ ۳۵ نمونه از گوسفند، ۲۶ نمونه از بز، ۳۰ نمونه از گاو و ۳۰ نمونه از گاومیش در مجموع ۶۶/۹۴



sensu lato از حیوانات اهلی مرکز ایران، با بررسی ۹۷ حیوان آلوده از جمله گوسفند، بز، گاو و شتر کشتار شده در کشتارگاه های شهر یزد، ۱۳۵ مورد آلودگی به سویه های G1, G3 و ۱۹ مورد آلودگی به سویه G5 ثبت شده است که در این بین سویه G5 تنها در گاو، بز، و شتر گزارش شده است (Hajimohammadi et al., 2022). در مطالعه نعمت دوست و همکاران در سال ۲۰۲۱، تحت عنوان بررسی خصوصیات ژنتیکی *E. granulosus* sensu lato در جدایه های دام و انسانی شمال ایران، با بررسی ۵۷ نمونه جدا شده از ۴۵ گاو، ۹ گوسفند و ۳ بز از منطقه استان گیلان و ژن *cox1*, *nad1* در مجموع ۹۲/۷ درصد جدایه *E. granulosus* و ۷/۳ درصد جدایه *E. ortleppi* با سویه های (G1, G3) گزارش شد که در تحقیق ذکر شده در حقیقت اولین گزارش از وجود *E. ortleppi* در ایران بوده است (Nematdoost et al., 2021). همچنین در مطالعه رئیسی و همکاران که در همان سال با موضوع بررسی خصوصیات مولکولی و فیلوژنی *Taenia hydatigena* و *E. granulosus* از گوسفند و گاو ایرانی بر اساس ژن COX1 از نمونه های کسب شده از شهر چابهار انجام شده بود، با استفاده از تعیین توالی ژن ناحیه *cox-1* سویه G1 به عنوان سویه غالب اعلام شده است (Raissi et al., 2021).

در مطالعه شهنازی و همکاران در سال ۲۰۲۱، با موضوع خصوصیات مولکولی *E. granulosus sensu Stricto* جدا شده از دام های قزوین، ایران، با مطالعه ناحیه *cox-1* از ۱۲۰ نمونه (۳۰ بز، ۴۰ گاو و ۵۰ گوسفند) و همچنین توالی یابی ۳۰ نمونه، تمامی سویه ها مربوط به کمپلکس G1-G3 و غالب سویه شناسایی شده مربوط به سویه G1 بوده است (Shahnazi et al., 2021) و در مطالعه میر شکار و همکاران با عنوان بررسی مورفولوژیکی و مولکولی کیست های هیداتید

گوسفندان کشتاری شهرستان مشهد، با مطالعه مولکولی ناحیه ITS-1 و تعیین توالی، سویه G1 به عنوان سویه غالب در گوسفندان کشتار شده در شهر مشهد گزارش شده است (Mirshekar et al., 2021).

در مطالعه شهبازی و همکاران در سال ۲۰۲۰، با موضوع ژنوتیپ کیست های هیداتید تازه و پارافینیزه شده انسانی با استفاده از ژن های *nad1* و *cox1* در استان همدان، غرب ایران، با مطالعه ۷۲ نمونه در مجموع آلودگی به سویه G1 برابر با ۹۸/۶۱ درصد و سویه G3 39/1 درصد گزارش شده است (Shahbazi et al., 2020).

در مطالعه گرگانی فیروزجانی و همکاران در سال ۲۰۱۸، با موضوع شناسایی ژنوتیپ کیست های *Echinococcus* دام و انسان در استان مازندران، ایران؛ با مطالعه ژن ITS-1، *cox1* کیست های جدا شده از ۴۰ گوسفند، ۱۷ گاو و ۶ انسان با کمک تعیین توالی ژن های مذکور به ترتیب سویه G1 (۸۰/۷ درصد)، سویه G2 (۱۶/۱ درصد) و سویه G3 (۳/۲ درصد) تعیین شده است که در آن سویه سگی - گوسفندی (G1) به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Gorgani-Firouzjaee et al., 2019). همچنین در مطالعه خیراندیش و همکاران که در همان سال با عنوان خصوصیات ژنتیکی کیست های هیداتید جدا شده از اهلی حیوانات در استان لرستان، غرب ایران انجام شده بود با بررسی ۳۶ نمونه (۱۸ نمونه از گوسفند و ۱۸ نمونه از گاو) و بررسی ژن *cox1* در مجموع ۸۸/۹ درصد آلودگی به سویه G1 و ۱۱/۱ درصد آلودگی به سویه G3 گزارش شده است (Kheirandish et al., 2018).

در مطالعه اربابی و همکاران در سال ۲۰۱۷، با موضوع شناسایی مولکولی و ژنوتیپی *E. granulosus* جدایه های شتر و سگ در اصفهان (۱۳۹۴-۱۳۹۵)، با بررسی ۵۱ نمونه از کیست های هیداتید جمع آوری شده از شهر



سال ۲۰۱۸، با موضوع خصوصیات مولکولی *E. granulosus sensu lato* از دام ها در استان خراسان شمالی، ایران، با بررسی ۱۲۲ نمونه (۴۳ گوسفند و ۷۹ گاو) و ژن ناحیه *cox-1* گونه غالب *G1* گزارش گردیده است (Salehi et al., 2018).

در مطالعه فرهادی و همکاران در سال ۲۰۱۵، با موضوع بررسی خصوصیات ژنتیکی جدایه های دام و کیست هیداتید انسانی شمال غرب ایران با استفاده از توالی ژن *cox1* میتوکندریایی که در شهر زنجان انجام شده بود، از مجموع ۸۶ نمونه کیست هیداتید اخذ شده از ۴۹ گوسفند، ۲۸ گاو و ۹ انسان، سویه *G1* با ۹۵/۳۵ درصد بالاترین و سویه *G3* با ۴/۶۵ درصد کمترین شیوع را داشته است (Farhadi et al., 2015) و در مطالعه شمسی و همکاران در سال ۲۰۱۵، با هدف تعیین ژنوتیپ ایزوله های گوسفندی و انسانی کیست هیداتید در ایلام، با مطالعه ژن ناحیه *nad1* 20 نمونه از کیست های هیداتید گوسفندی و ۱۰ نمونه انسانی با روش PCR-RFLP ژنوتیپ کمپلکس (*G1-G3*) به عنوان سویه موجود شناسایی شده است (Shamsi et al., 2015).

در مطالعه واحدی و همکاران در سال ۲۰۱۴، تحت عنوان بررسی ویژگی های ژنوتیپی کیست های هیداتید جدا شده از انسان در استان آذربایجان شرقی در سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳، با مطالعه ۵۵ نمونه کیست جدا شده از انسان و مطالعه ناحیه *ITS-1* به روش PCR-RFLP سویه گوسفندی - سگی (*G1*) به عنوان سویه غالب در نواحی مذکور گزارش شده است (Vahedi et al., 2014).

در مطالعه دوستی و همکاران در سال ۲۰۱۳، تحت عنوان تعیین ژنوتیپ کیست هیداتید جدا شده از انسان و اهلی حیوانات در استان ایلام، غرب ایران با استفاده از PCR-RFLP، با بررسی ۳۰ نمونه حیوانی و ۴ نمونه اخذ شده از انسان، سویه *G1* به عنوان سویه غالب در استان ایلام با

های نجف آباد و زرین شهر و مطالعه بر روی ناحیه *cox1 nad1* سویه گوسفندی (*G1*) به عنوان سویه غالب شناسایی شده است (Arbabi et al., 2017) و در مطالعه دیگری که در همان سال توسط ابراهیمی پور و همکاران با موضوع مطالعه مولکولی بر روی *Echinococcus* شتر (*Camelus dromedarius*) و گزارش *E. ortleppi* در ایران انجام شده بود، با مطالعه ۲ نمونه کیست اخذ شده از ۵۶ شتر کشتار شده در منطقه مرکزی ایران و با بررسی ژن های ناحیه *cox-1* و *nad1* آلودگی به سویه *G6* برابر با ۳۵/۷ درصد و سویه های *G1*, *G3* برابر با ۲۸/۶ درصد گزارش شده است (Ebrahimipour et al., 2017).

در مطالعه کسائی و همکاران در سال ۲۰۱۶، با عنوان بررسی خصوصیات ریخت شناسی و مولکولی کیست هیداتید جدایه گاو در خرم آباد، با بررسی ژن ناحیه *cox-1* 1 نمونه های کیست اخذ شده از ۲۸ گاو، سویه گوسفندی - سگی (*G1*) به عنوان سویه غالب گزارش شده است (Kasaeiyan et al., 2016) و در مطالعه دیگری که توسط غلامی و همکاران در سال ۲۰۱۶ تحت عنوان بررسی *E. granulosus* در سگ و شغال های منطقه دریای خزر، شمال ایران، با مطالعه ۴۲ سگ ولگرد و ۱۶ شغال و بررسی ژن *cox1* در مجموع ۶۶/۷ درصد سویه *G1* و ۳۳/۳ درصد سویه *G3* گزارش شده است (Gholami et al., 2016).

در مطالعه کاملی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تحت عنوان شناسایی ژنتیکی جدایه های کیست هیداتید گاو از شمال شرق و جنوب غرب ایران، با بررسی ۱۲۰ نمونه (۷۰ نمونه از مشهد و ۵۰ نمونه از اهواز) و بررسی ناحیه *ITS-1* به روش PCR-RFLP سویه گوسفندی (*G1*) به عنوان سویه غالب آن مناطق گزارش شده است (Kamelli et al., 2016) و همچنین در مطالعه صالحی و همکاران در



استفاده از ژن ITS-1 گزارش شده است (Dousti et al., 2013) و همچنین در همان سال خادم وطن و همکاران مطالعه دیگری را تحت عنوان بررسی خصوصیات مولکولی دام و جدایه های انسانی *E. granulosus* جنوب غرب ایران انجام داده اند که با بررسی ۳۴۴ نمونه (۱۰۴ گاو، ۱۴۱ گوسفند، ۸۴ بز و ۵ انسان) اخذ شده از استان خوزستان و مطالعه ژن ناحیه ITS-1 به روش PCR-RFLP سویه G1 غالب بوده و سویه G6 (شتری) یافت نشده است (Khademvatan et al., 2013).

در مطالعه غلامی و همکاران در سال ۲۰۱۲، با هدف بررسی خصوصیات مولکولی *E. granulosus* از کیست های هیداتید جدا شده از انسان و حیوانات در استان گلستان، شمال ایران. با مطالعه ۶۰ نمونه تهیه شده از گوسفند، گوساله و شتر و ژن ناحیه ITS-1 سویه های G1 و G6 به عنوان سویه های موجود در نمونه ها گزارش شده است (Gholami et al., 2012) و در مطالعه دیگری که توسط صدوری و همکاران در سال ۲۰۱۲، با عنوان تعیین مشخصات کیست های هیداتید جدا شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه های صنعتی شهر یاسوج به روش PCR-RFLP انجام شده بود با مطالعه ۹۳ کیست (۳۱ نمونه گوسفندی، ۵۶ نمونه بز و ۶ نمونه گاو) از روی ناحیه ITS-1 تمامی نمونه های مورد آزمایش سویه گوسفندی *E. granulosus* (G1) را از خود نشان داده اند (Sadri et al., 2012).

در این مطالعه پس از الکتروفورز محصول واکنش PCR، طول قطعه تکثیر شده در تمام نمونه ها یکسان و برابر با ۱۰۰۰ جفت باز بود که نشان از مشابه بودن نتیجه واکنش PCR با سایر یافته های گزارش شده در مطالعات سایر محققین دارد. در بررسی ژنوتیپ های موجود در ۲۴۴ نمونه اخذ شده از نشخوارکنندگان مورد مطالعه، نتایج نشانگر حضور فعال ژنوتیپ سویه گوسفندی (G1) در

نشخوارکنندگان ذبح شده در استان اصفهان بوده که این نتایج نشان دهنده آلودگی قطعی تمامی نمونه های مورد آزمایش به سویه سگی - گوسفندی بوده و هیچ یک از نمونه های مورد بررسی (حتی نمونه های اخذ شده از شترها) به سویه سگی - شتری آلودگی نداشته اند که با مطالعه خادم وطن و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطابقت دارد. در نتیجه، فراوانی سویه های سگی - گوسفندی از بقیه بیشتر بوده و سویه اصلی آلوده کننده میزبان های نهایی و حتی واسط بوده است که با مطالعات سایر محققین در ایران و همچنین در مطالعات انجام شده در سایر کشورها مثل: ترکیه، پاکستان، هند و چین مطابقت داشته و فقط در یک مطالعه انجام شده در کشور پاکستان با توجه به شیوع بالا (۶۶/۹۴٪) آلودگی به سویه G3 در گاومیش ها مغایرت داشته است (Mehmood N. et al., 2020). در مورد مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر نتایج تحقیقات صورت گرفته در کشور ایران، نتایج به دست آمده مبنی بر غالب بودن سویه G1 در مناطق مختلف کشور ایران با سایر محققین مطابقت دارد و همچنین از نظر وجود سویه های دیگر این انگل در سایر مناطق ایران، سویه G3 بیشتر در مناطق شمالی و مرکزی ایران حضور فعال داشته است و همچنین بر اساس تاریخچه مطالعات گذشته سویه G2 در نمونه های حاصل از استان مازندران (Gorgani-Firouzjaee et al., 2019) و سویه G6 از نمونه های حاصل از بخش مرکزی ایران گزارش شده است (Kheirandish et al., 2018).

از نظر آماری هیچگونه شواهدی مبنی بر تاثیر جنسیت میزبان واسط بر تنوع سویه های بیماری زای این انگل وجود نداشته و لذا تمامی موارد درمان، تشخیص و پیشگیری باید بطور کامل و حتم در مورد این سویه مورد استفاده و مورد توجه قرار گیرند و آنچه که در این مطالعه اهمیت دارد این است که سویه اصلی یعنی سویه سگی -



3. Dousti, M., Abdi, J., Bakhtiyari, S., Mohebbali, M., Mirhendi, Sh., Rokni, M. (2013), Genotyping of Hydatid Cyst Isolated from Human and Domestic Animals in Ilam Province, Western Iran Using PCR-RFLP, Iran J Parasitol, 8:47-52.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655239/>
4. Ebrahimipour, M., Sadjjadi, SM., Yousofi Darani, H., Najjari, M. (2017), Molecular Studies on Cystic Echinococcosis of Camel (*Camelus dromedarius*) and Report of *Echinococcus ortleppi* in Iran, Iran J Parasitol, 12:323-31.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979341/>
5. Erdoğan, E., Özkan, B., Mutlu, F., Karaca, S., Şahin, İ. (2017), Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* isolates obtained from different hosts, Mikrobiyol Bul, 51:79-86. <https://doi.org/10.5578/mb.45452>
6. Farhadi, M., Fazaeli, A., Haniloo, A. (2015), Genetic characterization of livestock and human hydatid cyst isolates from northwest Iran, using the mitochondrial *cox1* gene sequence, Parasitol Res, 114:4363-70. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4673-y>
7. Gholami, S., Jahandar, H., Abastabar, M., Pagheh, A., Mobedi, I., Sharbatkhori, M. (2016), *Echinococcus granulosus* Sensu Stricto in Dogs and Jackals from Caspian Sea Region, Northern Iran, Iran J Parasitol, 11:186-94.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5236095/>
8. Gholami, Sh., Sosari, M., Fakhar, M., Sharif, M., Daryani, A., Hashemi, M., Vahadi, M. (2012), Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* from Hydatid Cysts Isolated from Human and Animals in Golestan Province, North of Iran, Iran J Parasitol, 7:8-16.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23323086/>
9. Gorgani-Firouzjaee, T., Kalantrai, N., Ghaffari, S., Alipour, J., Siadati, S.

گوسفندی میزبان های مختلف را مورد حمله قرار داده و در بدن آنها تکثیر یافته و چرخه زندگی خود را تکمیل می کند.

نتیجه گیری

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که آلودگی به هیداتیدوز ناشی از مرحله نوزادی *E. granulosus* در استان اصفهان شیوع بالایی داشته است و نتایج مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهد که سویه گوسفندی، گاوی، شتری و اخیراً سویه دیگری به نام سویه گاومیش با پراکندگی محدود از گاومیش و شتر در استان اردبیل در ایران وجود دارد ولیکن عمده سویه های یافت شده مربوط به سویه گوسفندی *E. granulosus* بوده است و بطور معمول باعث آلودگی انسان و سایر نشخوارکنندگان اهلی شده است و این مطالعه نتایج قبلی مبنی بر غالب بودن سویه گوسفندی در اکثر مناطق مختلف کشور ایران را تایید می نماید.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

منابع

1. Arbabi, M., Pestechian, N., Tavasol Khamseh, H., Hooshyar, H., Delavari, M. (2017), Molecular and genotyping identification of *Echinococcus granulosus* from camel and dog isolates in Isfahan, Iran (2015-2016), Feyz, 21:134-41.
<http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3347-en.html>
2. Beigh, A., Darzi, M., Bashir, S., Dar, P., Ganai, N., Malik, S., Bhat, B. (2021), Epidemiological and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolated from Small Ruminants in Kashmir Valley, India, Iran J Parasitol, 16:357-65. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v16i3.7088>



- granulosus from south-west Iran, J Helminthol, **87**:240-44. <https://doi.org/10.1017/s0022149x12000296>
16. Kheirandish, F., Badparva, E., Mahmmoudvand, H., Beiranvand, E., Babaei, S., Nasiri, B. (2018), Genetic Characterization of Hydatid Cysts Isolated from Domestic Animals in Lorestan Province, Western Iran, Iran J Parasitol, **13**:120-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019594/>
17. Mehlhorn H. (2012). Animal Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention. New York: Springer Spektrum: 323-33.
18. Mehmood, N., Muqaddas, H., Arshad, M., Ullah, MI., Khan, ZI. (2020), Comprehensive study based on mtDNA signature (nad1) providing insights on Echinococcus granulosus s.s. genotypes from Pakistan and potential role of buffalo-dog cycle, Infect Genet Evol, **81**:104271. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104271>
19. Mehmood, S., Simsek, S., Celik, F., Kesik, HK., Kilinc, SG., Ahmed, H. (2020), Molecular survey on cattle and sheep hydatidosis and first detection of Echinococcus canadensis (G6/G7) in sheep in Turkey, Parasitology, **147**:1055-62. <https://doi.org/10.1017/s0031182020000785>
20. Mirshekar, F., Hashemitabar, G., Razmi, G.A. (2021), morphological and molecular study of hydatid cyst in slaughtered sheep in Mashhad area, Veterinary Research & Biological Products, **34**:68-76. <https://doi.org/10.22092/vj.2020.341360.1678>
21. Moudgil, AD., Moudgil, P., Asrani, RK., Agnihotri, RK. (2019), Hydatidosis in slaughtered sheep and goats in India: prevalence, genotypic characterization and pathological studies, J Helminthol, **94**:27. <https://doi.org/10.1017/s0022149x18001219>
22. Nematdoost, K., Ashrafi, K., Majidi-Shad, B., Kia, E.B., Zeinali, A., (2019), Genotype characterization of livestock and human cystic echinococcosis in Mazandaran province, Iran, J Helminthol, **93**:255-59. <https://doi.org/10.1017/s0022149x1800010x>
10. Gökem, C., Bahadır, G. (2020), Comparison of Molecular and Morphological Characterization and Haplotype Analysis of Cattle and Sheep Isolates of Cystic Echinococcosis, Veterinary Parasitology, **282**:109132. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109132>
11. Hajimohammadi, B., Dalimi, A., Eslami, G., Ahmadian, S., Zandi, S., Baghbani, A., Hosseini, SS., Askari, V., Sheykhzadegan, M., Ardekani, MN., Boozhmehrani, MJ., Ranjbar, MJ., Ghoshouni, H., Vakili M. (2022), Occurrence and genetic characterization of Echinococcus granulosus sensu lato from domestic animals in Central Iran, BMC Vet Res, **18**:22. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03131-1>
12. Hua, RQ., Du, XD., He, X., Gu, XB., Xie, Y., He, R., Xu, J., Peng, XR., Yang, GY. (2022), Genetic diversity of Echinococcus granulosus sensu lato in China: Epidemiological studies and systematic review, Transbound Emerg Dis, **69**:1382-92. <https://doi.org/10.1111/tbed.14469>
13. Kamelli, M., Borji, H., Naghibi, A. (2016), Genetic identification of cattle hydatid cyst isolates from northeast and southwest of Iran, Ann Parasitol, **62**:301-05. <https://doi.org/10.17420/ap6204.65>
14. Kasaeiyan, F., Nayeibzadeh, H., Jalousian, F., Shokrani, H.R. (2016), Morphological and molecular characterization of cattle hydatid cysts in Khorramabad, Iran, Journal of Veterinary Research, **71**:381-87. <https://doi.org/10.22059/jvr.2016.59993>
15. Khademvatan, S., Yousefi, E., Rafiei, A., Rahdar, M., Saki, J. (2013), Molecular characterization of livestock and human isolates of Echinococcus



- Province, Iran, Iran J Parasitol, **13**:577-86.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348223/>
27. Shahbazi, AE., Saidijam, M., Maghsood, AH., Matini, M., Haghi, MM., Fallah, M. (2020), Genotyping of Fresh and Parafinized Human Hydatid Cysts Using nad1 and cox1 Genes in Hamadan Province, West of Iran, Iran J Parasitol, **15**:259-65.
<https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i2.3309>
28. Shahnazi, M., Habibvand, M., Johkool, M.G., Hajialilo, E., Sharifdini, M., Javadi, A., Saraei, M. (2021), Molecular Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Stricto Isolated from the Livestock of Qazvin, Iran, Infect Disord Drug Targets, **21**:270421187365.
<https://doi.org/10.2174/1871526520666201029130248>
29. Shamsi, M., Dalimi, A., Khosravi, A., Ghafarifar, F. (2015), Determination of Genotype Isolates of Human and Sheep Hydatid Cyst in Ilam, Journal of Ilam University of Medical Sciences, **23**:111-19.
<http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-2949-fa.html>
30. Vahedi, A., Mahdavi, M., Ghazanchaei, A., hokouhi, B. (2014), Genotypic characteristics of hydatid cysts isolated from humans in East Azerbaijan Province (2011-2013), J Anal Res Clin Med, **2**:152-57.
<https://doi.org/10.5681/jarcm.2014.025>
- Sharifdini, M. (2021), Genetic Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Lato in Livestock and Human Isolates from North of Iran Indicates the Presence of E. orteppi in Cattle, Acta Parasitol, **66**:446-54.
<https://doi.org/10.1007/s11686-020-00293-0>
23. Oral Babaoğlu, A., Soyder, A., Malatyali, E., Ertuğ, S., Ertabaklar, H. (2018), Genotyping of Echinococcus granulosus isolates by sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (cox1) gene in Aydin, Mikrobiyol Bul, **52**:198-205.
<https://doi.org/10.5578/mb.66711>
24. Raissi, V., Etemadi, S., Sohrabi, N., Raiesi, O., Shahraki, M., Salimi-Khorashad, A., Ibrahim, A. (2021), Molecular Characterization and Phylogeny of Taenia hydatigena and Echinococcus granulosus from Iranian Sheep and Cattle Based on COX1 Gene, Curr Microbiol, **78**:1202-07.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02377-0>
25. Sadri, A., Moshfe, A., Doosti, A., Ansari, H., Abidi, H., Ghorbani Dalini, S. (2012), Characterization of Isolated Hydatid Cyst from Slaughtered Livestock in Yasuj Industrial Slaughterhouse by PCR-RFLP, Armaghanej, **17**:243-52.
<http://armaghanej.yums.ac.ir/article-1-260-en.html>
26. Salehi, M., Yaghfoori, S., Bahari, P., Seyedabadi, M., Parande Shirvan, S. (2018), Molecular Characterization of Echinococcus granulosus Sensu Lato from Livestock in North Khorasan



Molecular study of hydatid cyst strains isolated from domestic ruminants in Isfahan province, Iran

Seyed Reza Hosseini^{*1} Milad Hamzehali Tehrani²

¹ Seyed Reza Hosseini, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

² Milad Hamzehali Tehrani, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 05 June 2023 Accepted: 23 August 2025

Abstract

Echinococcosis is one of the common parasitic diseases between humans and animals, whose symptoms appear with the long-term growth of the babies of this cestode in the body of the intermediate host, generally ruminants, and humans are known as the accidental and final host for this parasite. Although this disease in It is not reported in some countries, it has a global distribution, and considering the zoonotic importance of this disease, it is necessary to know the strains and determine the level of infection with this parasite in the intermediate hosts, because the interruption of the developmental cycle of the parasite in the intermediate hosts and the final host is very important and also this parasite has a number of species or strains within the species that this genetic diversity can be potentially important in epidemiology and disease control and making vaccines and therefore the study of mitochondrial DNA sequence and phylogenetic studies based on The DNA of this cestode is very important. 244 samples from ruminants (sheep, cows, camels, and goats) slaughtered in the industrial slaughterhouses of Isfahan province (61 infected liver samples, including two groups of 31 males and 30 females) were collected during the period from April to September of 2022 and After preparing protoscoleces from the existing hydatid cysts, DNA was extracted using a DNA extraction kit, PCR reaction using primers BD1 (Forward) and 4S (Reverse) which can amplify the ribosomal genome of the rDNA-ITS1 region. and led to the production of a PCR product with a length of 1000bp was used and subjected to enzymatic digestion (PCR-RFLP) using endonuclease enzymes AluI, RsaI, HpaII, and TaqI and finally the results were obtained using SPSS version 24 software and with Chi-square test (X²) was used for statistical analysis and the significance level of the research (P<0.05) was considered. The results show definite contamination with E. granulosus and sheep strain (G1) caused by the sheep-dog cycle in all the samples obtained from the liver of ruminants, and in the comparison and statistical analysis, there is a significant difference between the type of contamination with different strains between There was no male or female sex. This study can confirm the previous results about the predominance of the sheep strain in Iran, so it is recommended to pay special attention to this issue in order to control and prevent the transmission of this parasite in the sheep-dog cycle.

Keywords: *Echinococcus granulosus, hydatid cyst, strain determination, Isfahan, Iran*

** Corresponding Author: Seyed Reza Hosseini*

Address: Seyed Reza Hosseini, Ph.D of Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Email: dr.s.reza@gmail.com



بررسی سرو اپیدمیولوژی لپتوسپیروز در اسب‌های اطراف شهر رشت

ارغوان شفایی^۱، جلال شایق^{۱*}، غلامرضا عبدالله پور^۲

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، شبستر، ایران

۲- گروه بیماریهای داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱

چکیده

لپتوسپیروز یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های باکتریایی زئونوز است که هم انسان و هم حیوانات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با توجه به اهمیت این بیماری در اسب‌ها در مناطق شمالی کشور، از جمله شهر رشت، و این واقعیت که اسب‌ها میزبان برخی از سروتیپ‌های لپتوسپیرا هستند، این مطالعه با هدف انجام یک بررسی سرولوژیک-اپیدمیولوژیک از لپتوسپیروز در اسب‌های اطراف رشت با استفاده از تست میکروآگلوتیناسیون (MAT) انجام شد. نمونه‌ها از ۱۲۹ اسب جمع‌آوری شدند. پس از جداسازی سرم، نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقات لپتوسپیروز دانشگاه تهران ارسال شدند تا آزمایش‌های سرولوژیک و ارزیابی انجام شود. نتایج نشان داد که از ۱۲۹ نمونه، ۱۷ نمونه (۱۳/۷٪) واکنش مثبت به سروتیپ‌های لپتوسپیرا داشتند. شایع‌ترین سروتیپ، گریپوتیفوزا (۴/۶۵٪) بود، در حالی که کم‌شیوع‌ترین سروتیپ‌ها ایکتره‌مورائیه و کنیکولا بودند که هر دو با فراوانی ۲/۳۲٪ مشاهده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که لپتوسپیروز یک مشکل مهم در جمعیت اسب‌های رشت و مناطق اطراف آن است. اسب‌ها می‌توانند به عنوان میزبان برخی از سروتیپ‌های لپتوسپیرا عمل کنند. بنابراین، ضروری است که مسئولین سلامت حیوانات و کنترل بیماری‌ها اقدامات لازم را برای پیشگیری و کنترل لپتوسپیروز در جمعیت اسب‌های این شهر انجام دهند.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروز، اسب، تست میکروآگلوتیناسیون، رشت

* نویسنده مسئول: جلال شایق

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

پست الکترونیک: Jalalshayegh@iau.ir

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری عفونی و زئونوز با انتشار جهانی است که نشخوارکنندگان، تک سمی ها، شتر، جوندگان و حتی انسان به آن حساس هستند (Abdollahpour, 2016). عامل ایجاد بیماری باکتری گرم منفی لپتوسپیرا است که طبق آخرین طبقه بندی در سایت www.bacterio.net حاوی ۸۷ گونه بوده که دو گونه لیتوسپیرا انتروگانس (گونه بیماری زا) و لپتوسپیرا بیفلیکسا (گونه ساپروفیت) جز گونه های شاخص این جنس در پزشکی و دامپزشکی می باشد (Rycroft, 2024). اهمیت فراوان این بیماری از دو منظر اقتصادی و بهداشت عمومی مطرح است، زیرا این بیماری سبب مشکلات عمده ای در صنعت دامپروری شده است، از جمله این مشکلات می توان به مرده زایی، سقط، کاهش میزان تولید شیر، هموگلوبینوری و زردی اشاره کرد. شایان ذکر است که این بیماری در اسب در اکثر مواقع به شکل مزمن و خفیف به ویژه همراه با چشم درد دوره ای، کوری و سقط جنین می شود (Abdollahpour et al., 2009). در نتیجه هزینه های لازم جهت پیشگیری، کنترل و درمان لپتوسپیروز به اهمیت بررسی این بیماری می افزاید. بر اساس مطالعات انجام شده، این بیماری در کشور ما نیز رو به گسترش است که بهداشت عمومی و تولیدات دامی کشور را تهدید می کند.

در طبیعت هر حیوانی میزان نگهدارنده سروتیپ خاصی است. برای مثال گاو میزان نگهدارنده سروتیپ هارجو، سگ میزان نگهدارنده سروتیپ کنیکولا، گراز و خوک میزان نگهدارنده سروتیپ پومونا و موش میزان نگهدارنده سروتیپ ایکتره مو راژیه است. اسب نیز میزان نگهدارنده سروتیپ براتیسلاوا است. ممکن است این میزان ها در هر منطقه جغرافیایی بعد از مدتی از یک سویه خاص با یک گونه حیوانی هماهنگ شود و از

آن به عنوان مخزن نگهدارنده استفاده کنند. چنانچه همین سروتیپ وارد بدن میزبان تصادفی گردد می تواند سبب عفونت شود (Abdollahpour, 2016). انسان همواره میزبان تصادفی برای سروتیپ های مختلف لپتوسپیرای محسوب می شود. لپتوسپیرا از پرندگان، خزندگان، دوزیستان و بی مهرگان جدا شده است. از این میان جوندگان، مهم ترین و گسترده ترین مخازن این باکتری هستند و گوشتخواران وحشی در درجه دوم اهمیت قرار دارند (Eydi et al., 2017). در نهایت در هر منطقه جغرافیایی و به خصوص در بروز همه گیری ها در انسان، یافتن حیوانات مخزن و ارتباط آن ها با لپتوسپیروز بسیار ضروری است به این علت که هر حیوان آلوده ای می تواند منشأ آلودگی سایر حیوانات و یا انسان باشد (Ramin et al., 2013; Zahraie Salehi and Shayegh, 2007). مهم ترین راه انتقال لپتوسپیروز در انسان، تماس مستقیم و غیرمستقیم با حیوانات آلوده یا ترشحات آنها است (Zakeri et al., 2010).

مطالعات سرمی در ایران بیانگر حضور لپتوسپیرا در نشخوارکنندگان و تک سمیان است به ویژه حاشیه دریای خزر در استان گیلان، شرایط جلگه ای و آب و هوای معتدل و مرطوب، زمینه زیست و شیوع ای باکتری را فراهم می سازد (New et al., 1993; Rafiei et al., 2012). از این رو به دلیل اهمیت بالای بیماری در ایران و به ویژه در استان گیلان، هدف از این تحقیق بررسی سرواپیدمیولوژیک لپتوسپیروز در اسب های رشت است.

مواد و روش ها

در طی تیرماه تابستان سال ۱۴۰۱ تا اواخر مرداد ماه همان سال با همکاری شبکه دامپزشکی شهر رشت تعداد ۱۲۹ نمونه سرمی از اسب های باشگاه های سوارکاری شهر رشت و اسب هایی که به طور آزاد در باغ های اطراف این شهر نگهداری می شدند، جمع آوری گردید. این



نمونه‌های سرمی با آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) با استفاده از ۵ نوع آنتی ژن لپتوسپیرائی شامل سروتیپ‌های کانیکولا، گریپوتیفوزا، پومونا، هارجو و ایکتره‌موراژیه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شایان‌ذکر است که از فرمول برآورد حجم نمونه $n = (z^2 pq) / d^2$ با ضریب اطمینان ۹۵٪ در این پژوهش استفاده شد و طبق فرمول تعداد نمونه‌ها، ۱۲۹ نمونه برآورد شد.

$$p = 0.5 \quad q = 0.5 \quad d = 0.086$$

پس از خون‌گیری، لوله‌های موردنظر کدگذاری شده و کد موردنظر در فرم مخصوص مشخصات همراه با وضعیت ویژه هر دام ثبت گردید. جهت نگهداری کوتاه‌مدت میکروتیوب‌های حاوی سرم به یخچال ۴ درجه سانتیگراد و به‌منظور نگهداری بلندمدت به فریزر ۱۸- درجه سانتیگراد منتقل شدند و سپس انتقال نمونه‌ها به‌منظور انجام تست میکروآگلوتیناسیون به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز واقع در بیمارستان آموزشی و پژوهشی محمد شهر دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صورت گرفت. اولین مرحله از این آزمایش جداسازی آنتی‌ژن‌هاست. در مطالعه حاضر از پنج سروتیپ لپتوسپیرا با تراکم استاندارد 2×10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شده است. در ضمن تراکم باکتری‌ها در نمونه‌ای که از محیط برداشت می‌شود به کمک میکروسکوپ زمینه تاریک و با استفاده از لام مخصوص شمارش باکتری ارزیابی شده و در صورتی که تراکم باکتری‌ها بیش از حد استاندارد باشد به آن مقدار مناسب محیط رقیق‌کننده استریل اضافه می‌شود. تعداد باکتری توسط لام مخصوص شمارش لپتوسپیرا شمارش شده و رقت آن با افزودن PBS در حد موردنظر تنظیم شد. مرحله بعدی تهیه رقت ۱:۵۰ از سرم‌های مورد آزمایش است. در این مرحله از هر نمونه سرم رقت ۱:۵۰ تهیه گردید.

به‌این ترتیب که به میزان ۹۸۰ میکرولیتر PBS به درون میکروتیوب انتقال داده شد، سپس ۲۰ میکرولیتر از سرم مورد آزمایش به آن افزوده، به‌این ترتیب رقت ۱:۵۰ از سرم مورد آزمایش به دست آمد. آزمایش MAT به‌طور کلی مطابق با روش پیشنهادی WHO و با اندکی تغییرات در آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز واقع در بیمارستان آموزشی و پژوهشی محمد شهر دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گردیده و جزئیات آزمایش به شرح زیر است:

۱- ۱۰ میکرولیتر از میکروتیوب حاوی آنتی‌ژن در هر مربع لام به‌صورت قطره‌ای کوچک قرار داده شد. ۸ بار این کار تکرار می‌شود تا در نهایت در هر مربع یک قطره آنتی‌ژن قرار داشته باشد.

۲- ابتدا سرسمپلر تعویض گردید، سپس ۱۰ میکرولیتر از هر یک از ۸ نمونه سرم مورد آزمایش، با رقت ۱:۵۰ به شکل قطره‌ای دیگر، در مجاورت قطره آنتی‌ژن قرار داده شد. در انتهای این مرحله رقت نهائی ۱:۱۰۰ از هر یک از نمونه‌های سرمی در مجاورت آنتی‌ژن به دست آمد. لازم به ذکر است که در هر لام ۸ نمونه سرمی، مطابق با تعداد مربع‌ها، قابل بررسی است که همگی هر بار تنها با یک سروتیپ مشخص مجاور می‌گردند. برای آزمایش سروتیپ‌های دیگر، آزمایش تکرار می‌شود.

۳- پس از مخلوط کردن هر ۸ نمونه سرمی با آنتی‌ژن موردنظر، به‌منظور جلوگیری از خشک شدن مخلوط آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، بلافاصله لام در داخل بوات به روی پایه‌های شیشه‌ای قرار داده شد.

۴- بوات دوپتری برای مدت ۹۰ دقیقه در گرم‌خانه با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، برای ایجاد دمای مناسب به‌منظور واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی قرار داده شد.

۵- سپس با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ تمام قسمت‌های هر قطره موجود در هر مربع، مورد بررسی قرار داده می‌شوند.



تعداد	درصد	
۶	۴۶۵	گریپوتیفوزا
۵	۳۸۸	هارجو
۳	۲۳۲	کانیکولا
۳	۲۳۲	ایکتروهموراژیه

بررسی‌های آماری هیچ ارتباط معناداری میان جنسیت (جدول ۳)، سن (جدول ۴) و محل نگهداری (جدول ۵) با میزان شیوع بیماری در منطقه مورد مطالعه را نشان نمی‌دهد.

جدول ۳. بررسی توزیع فراوانی ابتلا به بیماری در اسب‌های مورد تحقیق بر حسب جنسیت

جنس	تعداد	درصد	مثبت	تعداد	درصد	منفی	جمع کل
نریان	۶	۴/۶۵	۴۵	۳۴/۸۹	۵۱	۳۹/۵۴	
مادیان	۱۱	۸/۵۲	۶۷	۵۱/۹۴	۷۸	۶۰/۴۶	
جمع	۱۷	۱۳/۱۷	۱۱۲	۸۶/۸۳	۱۲۹	۱۰۰	

جدول ۴. بررسی توزیع فراوانی ابتلا به بیماری در اسب‌های مورد تحقیق بر حسب سن

گروه سنی	تعداد کل	تعداد مثبت	درصد مثبت	تعداد منفی	درصد منفی
۱ تا ۳	۴۰	۶	۴/۶۵	۳۴	۲۶/۳۵
۳ تا ۶	۴۸	۴	۳/۱۰	۴۴	۳۴/۱۰
۶ تا ۹	۲۵	۴	۳/۱۰	۲۱	۱۶/۲۸
بالای ۹	۱۶	۳	۲/۳۲	۱۳	۱۰/۰۷
جمع	۱۲۹	۱۷	۱۳/۱۷	۱۱۲	۸۶/۸۳

جدول ۵. بررسی توزیع فراوانی ابتلا به بیماری در اسب‌های مورد تحقیق بر حسب محل نگهداری

محل نگهداری	تعداد کل	تعداد مثبت	درصد مثبت	تعداد منفی	درصد منفی
باغ	۷۴	۱۱	۸/۵۲	۶۳	۴۸/۸۴
باشگاه	۵۵	۶	۴/۶۵	۴۹	۳۷/۹۹

بحث و نتیجه‌گیری

بر پایه استاندارد WHO نمونه‌های با درجه آگلوتیناسیون ۱+ منفی، با درجه آگلوتیناسیون ۲+ مشکوک، و با درجه آگلوتیناسیون ۳+ و ۴+ مثبت در نظر گرفته شدند. در مرحله دوم آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی در نمونه‌های سرمی با درجه آگلوتیناسیون ۳+ و ۴+ با روش تیتراسیون، تیتراهای سرمی بیش از ۱:۱۰۰ جست‌وجو گردید.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده می‌گردد. در این تحقیق ارتباط بین میزان شیوع لپتوسپیروزیس با جنسیت، سن و محل نگهداری اسب‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در طی بررسی انجام شده از مجموع ۱۲۹ نمونه اخذ شده از اسب‌های منطقه تعداد ۱۷ نمونه (۱۳،۱۷٪) از نظر میکرو آگلوتیناسیون مثبت ارزیابی شدند (نمودار ۱-). نمونه‌ها به ترتیب شامل سروتیپ‌های گریپوتیفوزا، هارجو، ایکتروهموراژیه و کانیکولا بودند. بیشترین واکنش مثبت سرمی مربوط به سروتیپ گریپوتیفوزا با ۴،۶۵ درصد و پس از آن کمترین واکنش مثبت سرمی مربوط به سروتیپ‌های ایکتروهموراژیه و کانیکولا که هر دو ۲،۳۲ درصد را شامل می‌شوند، می‌باشد. سروتیپ هارجو نیز ۳،۸۸ درصد را شامل می‌شود، شایان ذکر است که سروتیپ پومونا هیچ سهمی از ۱۷ نمونه مثبت را به خود اختصاص نداشت.

جدول ۱: توزیع فراوانی و درصد نمونه‌های مثبت و منفی با آنتی ژن‌های مورد استفاده در کل دام‌ها

مثبت	منفی	جمع کل
۱۷	۱۱۲	۱۲۹
٪۱۳،۱۷	۸۶،۸۳	۱۰۰

جدول ۲. بررسی تعداد و درصد فراوانی سروتیپ‌های لپتوسپیرو

نام سروتیپ موارد واکنش سرمی مثبت



در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی‌داری بین جنسیت، سن و محل نگهداری با میزان آلودگی به لپتوسپیروزیس مشاهده نگردید. علی‌رغم نتایج این مطالعه در مطالعات داخلی و خارجی حداقل ارتباط معنادار بین آلودگی و جنسیت نشان داده شده است. برخی این تفاوت را به شرایط فیزیولوژی و هورمونی جنس ماده نسبت داده‌اند، مطالعات حاکی از وجود اختلاف معنادار میزان آلودگی با سن دارد طوریکه با افزایش سن میزان آلودگی بیشتر می‌شود و بیشترین آلودگی را در اسب‌های بالای ۱۰ سال گزارش کرده‌اند (Zaman et al., 2020). این بیماری خسارات زیادی را به سیستم دامپروری کشور تحمیل می‌کند که ناشی از مرگ دام، کاهش تولید شیر، سقط جنین و سایر اختلالات تولیدمثلی است (Abdollahpour 2016). از سوی دیگر مشترک بودن لپتوسپیروز بین انسان و دام و انتقال بیماری از این طریق به انسان، اهمیت این بیماری را دوچندان می‌کند که نیاز به تأمل و تدبیر راهکارهایی برای کنترل عفونت و تأمین بهداشت عمومی دارد (Malalana et al., 2017).

لپتوسپیروزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان همراه با طیف گسترده شیوع در نقاط مختلف جهان است. در کشور ما مطالعات متعددی که در دهه اخیر انجام شده است که بیانگر افزایش شیوع این بیماری و افزایش تنوع سروتیپ‌های موجود در کشور ما از ۸ سروتیپ به ۱۲ سروتیپ است (Khalili et al., 2020; Chavez-Sanchez et al., 2021; Hedayati and Bahmani 2023).

مطالعه حاضر اولین مطالعه مستقل در شهر رشت بر روی اسب جهت بررسی نقش آن در اپیدمیولوژی بیماری لپتوسپیروزیس است. وضعیت اقلیمی مساعد شهر رشت و استان گیلان از نظر بارندگی فراوان و برخورداری از آب و هوای مرطوب و معتدل اهمیت مطالعه را بالا می‌برد چرا که مناطق دارای آب و هوای معتدل و بارانی، نظیر استان‌های شمالی کشورمان مستعد بیماری یاد شده هستند (Eydi et al., 2017). استان گیلان به دلیل آب و هوای معتدل و بارانی و وجود مزارع وسیع شالیزار یکی از استان‌های مستعد جهت شیوع بعضی از بیماری‌ها از جمله لپتوسپیروزیس می‌باشد که عامل آن نیاز به محیط مرطوب و پربارش دارد (Constable et al., 2016). آلوده بودن آب‌های سطحی استان به سروارهای مختلف لپتوسپیروز در استان گیلان و اهمیت این بیماری در این استان سابق بر این مورد تأکید قرار گرفته است (Anari et al., 2023).

میزان شیوع سرمی بیماری در این مطالعه ۱۳/۱۷٪ گزارش شده است. مطالعه دیگر در ایران شیوع‌های مختلفی را در اسب گزارش نموده‌اند از جمله در بررسی در استان البرز این میزان ۳۷/۷٪، شهر تال (تالش) ۳۸/۳۳٪، اسب‌داری‌های اطراف تهران ۱۵/۱۳٪، منطقه گنبد کاووس ۱۲٪، لرستان ۱۸/۳۸٪، خوزستان ۲۷/۸۸٪، گلستان ۷/۷٪، کردستان ۹/۶٪، اردبیل ۷/۷٪، استان آذربایجان غربی ۱۶/۳٪ و در آذربایجان شرقی ۳۹/۱۸٪ گزارش گردیده است (Khoushheh et al., 2012; HAJI et al., 2016; Zaman, Hassanpour and Abdollahpour 2020; Hashemi et al., 2021; Jeddi et al., 2022; Maleki et al., 2021; Ramin et al., 2023).

این تنوع نشان از اکولوژی متفاوت بیماری تحت تأثیر جغرافیا و تنوع میزبان مخزن دارد طوریکه احتمالاً اهمیت اسب به عنوان میزبان مخزن در شهر رشت و بروز عفونت لپتوسپیروز در آن کمتر از سایر میزبان‌ها است. سروتیپ‌های مورد مشاهده در مطالعه حاضر شامل سروتیپ‌های گریپتوفوزا (۴/۶۵٪)، هارجو (۳/۸۸٪)، ایکتروهموراژیه (۲/۳۲٪) و کانیکولا (۲/۳۲٪) گزارش



شده است. در این مطالعه گریپتوتیفوزا به عنوان سروتیپ شایع تشخیص داده شد.

همچنین این سروار در شهرستانهای تالش و طارم که از نظر نزدیکی و آب و هوای به استان گیلان مشابه دارند. نیز سروار غالب است. هر چند سروارهای غالب مناطق مختلف دیگر با الگوی به دست آمده در اسبهای شهر رشت متفاوتند چنانکه در تبریز پومونا، در ارومیه هارجو و گریپتوتیفوزا، در لرستان کانیکولا و گریپتوتیفوزا، در گنبد کانیکولا و در اسبهای اطراف تهران ایکترهمورازیه سروتیپ غالب می باشند (Vandyousefi 1994; Tabatabayi and Firouzi 2001; Ali and Saeid 2012; JAHED and Hassanpour 2013; Yasouri., Ghane, Doudi, Rezaei, and Naghavi, 2020 Varzegar et al., 2021; Ramin et al., 2023;). در مطالعه دیگری که در استان گیلان بر روی جمعیت گاوها انجام شده است سروارهای کانیکولا، پومونا و گریپتوتیفوزا را به عنوان سروتیپ غالب مورد تاکید قرار داده است. این امر امکان متفاوت بودن الگوی حضور سروتیپ ها در میزبانهای یک منطقه جغرافیای را می تواند تایید نماید. اگر چه میزبان مخزن سروارها از منطقه ای به منطقه دیگر متغیر است. اما بیشترین گزارش ها از مخزن بودن جوندگان برای سروار گریپتوتیفوزا حکایت دارد. که این خود می تواند به بررسی نقش جوندگان در آلودگی میزبانهای دیگر منطقه اشاره نماید این ادعا نیاز به مطالعات تکمیلی دارد (Ahangarcani et al., 2019)

در این مطالعه از مجموع نمونه های مثبت سرمی، ۱۱ نمونه (۸/۵۲٪) مربوط به مادین و ۶ نمونه (۴/۶۵٪) مربوط به نریان بود و اختلاف معنی داری بین جنسیت و شیوع بیماری در منطقه یافت نشد. در مطالعه ای در استان اردبیل از مجموع ۷ نمونه مثبت از جمعیت ۹۰ تایی اسبها، ۵ نمونه مربوط به نریان و ۲ نمونه مربوط به

مادین گزارش شد (Khouzesh et al., 2012)، در حالی که در مطالعه ای در بین اسبهای شهرستان تال میزان شیوع سرمی عفونت لپتوسپیروزی در بین اسبها ۳۳/۳۸٪ بود و ۳۵٪ از اسبهای نر و ۴۵٪ از اسبهای ماده از لحاظ سرولوژیکی مثبت بودند و اختلاف معنی داری بین آلودگی سرولوژیک اسبهای نر و ماده وجود داشت (Yasouri et al., 2020). در مطالعه ای در استان لرستان که بر روی تک سمیان صورت گرفت، نشان داده شد بین گونه های مختلف تک سمیان از نظر آلودگی سرمی اختلاف آماری وجود دارد. ارزیابی آماری و نتایج نشان داد فراوانی واکنش سرمی در اسبهای نر ۹۷۶ درصد و در اسبهای ماده ۲۴/۹۰ درصد است، اما در قاطر و الاغ هیچ مورد مثبتی از واکنش سرمی بر علیه سروارهای مختلف لپتوسپیروزی اینتروگانس در جنس نر دیده نشد و مشخص شد بین جنس نر و ماده در گونه های مختلف تک سمی از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد (Anari et al., 2023).

در مطالعه حال حاضر، ۶ نمونه (۴/۶۵٪) مثبت در رده سنی ۱ تا ۳ سال، ۴ نمونه (۳/۱٪) مثبت در رده سنی ۳ تا ۶، ۴ نمونه (۳/۱٪) مثبت متعلق به رده سنی ۶ تا ۹ سال و ۳ نمونه (۲/۳۲٪) مثبت مربوط به گروه سنی ۹ سال به بالا بودند و ارتباط معنی داری بین سن و شیوع بیماری یافت نشد در حالی که در مطالعه ای در شهر گنبد نتایج نشان دادند بیشترین فراوانی نمونه های مثبت دامی در محدوده سنی ۳ تا ۶ سال قرار داشتند. به عبارتی دیگر با افزایش سن حیوانات، میزان شیوع این بیماری هم افزایش یافته است. پس باتوجه به نتایج به دست آمده، افزایش سن حیوانات، می تواند به عنوان یکی از فاکتورهای خطر رخداد شیوع سرولوژیک لپتوسپیروز مورد اهمیت و تأکید قرار داد (Jahed and Hassanpour, 2013). در مطالعه ای در استان اردبیل، ۷۷٪ از جمعیت ۹۰ تایی



بالای آبهای سطحی و موارد ابتلا در این منطقه لزوم بررسی سایر میزبانها بمانند جوندگان، سگها و نشخوارکنندگان و غیره اهمیت فراوانی دارد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه نویسنده اول است. نویسندگان از مساعی همکاران دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و نیز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر نهایت امتنان را دارند.

منابع

1. Abdollahpour, G. R. (2016). Leptospirosis (1st ed., pp. 46-61). Tehran University. (In Persian)
2. Abdollahpour, G. R., Shafighi, S. T., & Satari, T. S. (2009). Serodiagnosis of leptospirosis in cattle in north of Iran, Gilan. *International Journal of Veterinary Research*, 3(1), 7-10.
3. Ahangarcani, M., Farnaghi, M., Shirzadi, M. R., Pilesjö, P., & Mansourian, A. (2019). Predictive risk mapping of human leptospirosis using support vector machine classification and multilayer perceptron neural network. *Geospatial Health*, 14(1), 53-61.
4. Ali, H., & Saeid, S. (2012). Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules in East Azerbaijan province. *African Journal of Microbiology Research*, 6(20), 4384-4387.
5. Anari, S., Jaydari, A., Shams, N., & Rahimi, H. (2023). Molecular detection of *Leptospira* spp. isolated from aborted ovine genital swabs in Lorestan, Iran, 2019-2020. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 17(1), 107-111.
6. Chavez-Sanchez, J. F., Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z. J., Zapata-Benavides, P., Cedillo-Rosales, S., & Avalos-Ramírez, R. (2021). Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in small ruminants in a semi-arid area of Mexico. Available at SSRN 4498252.

اسب‌ها واکنش سرمی مثبت نشان دادند، ۱۴،۲۸٪ از نمونه‌ها مربوط به گروه سنی یک تا سه سال، ۴۲،۸۵٪ نمونه‌ها در رده سنی ۳ تا ۶ سال، ۲۸،۸۵٪ نمونه‌ها در رده سنی ۶ تا ۹ سال و ۱۴،۲۸٪ از اسب‌ها مربوط به ۹ سال به بالا بودند (Jeddi et al., 2022; Khousheh et al., 2012). در مطالعه‌ای در استان لرستان به دنبال گروه‌بندی تک سمیان به ۴ گروه سنی مشخص شد ۷،۳۲ درصد از اسب‌های مبتلا زیر ۴ سال، ۷،۳۲ درصد ۴ تا ۷ سال، ۲۴،۳۹ درصد ۷ تا ۱۰ سال و ۶۰،۹۷ درصد بالای ۱۰ سال سن داشتند. از این نظر بین گروه سنی کم‌تر از ۷ سال با گروه‌های سنی بالاتر از ۷ سال اختلاف آماری معنی‌داری برقرار بود (Maleki et al., 2021). در این مطالعه از مجموع ۱۲۹ نمونه، ۱۷ نمونه (۱۳،۱۷٪) واکنش سرمی مثبت نشان دادند. از این ۱۷ نمونه، ۱۱ نمونه (۸،۵۲٪) مربوط به جمعیت مادیان و ۶ نمونه (۴،۶۵٪) مربوط به نریان بود. ۶ نمونه مثبت مربوط به گروه سنی ۱ تا ۳ سال، ۴ نمونه در گروه سنی ۳ تا ۶ سال، ۴ نمونه مربوط به ۶ تا ۹ سال و ۳ نمونه بالای ۹ سال بودند. از نظر محل نگهداری، ۱۱ نمونه (۸،۵۲٪) با واکنش سرمی مثبت در باغ و ۶ نمونه (۴،۶۵٪) در باشگاه بودند. سوابق موجود در مراکز علمی کشور حاکی از آن است که این عفونت در اکثر نقاط ایران به‌عنوان یکی از مشکلات دامداری‌ها مطرح است. عفونت با سروتیپ‌های مختلف لپتوسپیرا در مناطق جغرافیایی مختلف بر روی اپیدمیولوژی و پاتوژنز بیماری اهمیت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و بررسی‌های مشابه بر روی دامها، می‌توان به این نکته پی برد که میزان نمونه‌های با واکنش سرمی مثبت، پایین‌تر از میزان مورد انتظار در اسب به دست آمده است. با توجه به آلودگی



15. Malalana, F., Blundell, R. J., Pinchbeck, G. L., & McGowan, C. M. (2017). The role of *Leptospira* spp. in horses affected with recurrent uveitis in the UK. *Equine Veterinary Journal*, **49**(6), 706-709.
16. Maleki, S., Zakian, A., & Abdollahpour, G. (2021). Seroprevalence of *Leptospira interrogans* infection in equids of Lorestan Province: Investigation the role of probable risk factors. *Iranian Veterinary Journal*, **16**(4), 108-118.
17. New Jr, J. C., Wathen, W. G., & Dlutkowski, S. (1993). Prevalence of leptospira antibodies in white-tailed deer, Cades Cove, Great Smoky Mountains National Park, Tennessee, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**(4), 561-567.
18. Rafiei, A., Babamahmoodi, F., Alizqadeh Navaee, R., & Valadan, R. (2012). Review of leptospirosis in Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, **22**(94), 102-110.
19. Ramin, A., Abdollahpour, G. H., & Irannejad, S. (2013). Determination of seroprevalence of *Leptospira* serotypes in Urmia equine. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences*, **7**(1), 59-66.
20. Ramin, A., Abdollahpour, G., Hosseinzadeh, A., Azizzadeh, F., Ramin, P., Sanajo, D., & Nezhad, S. I. (2023). Comparison of anti-*Leptospira* antibodies by microscopic agglutination test in ruminants and equines of Urmia, Iran. In *Veterinary Research Forum*, **14**(4), p. 229.
21. Rycroft, A. N. (2023). *Fundamentals of Veterinary Microbiology*. John Wiley & Sons.
22. Tabatabayi, A. H., & Firouzi, R. (2001). *Diseases of Animal Due to Bacteria* (pp. 431-445). Tehran University Press. (In Persian)
23. Vandyousefi, J. (1994). New findings of leptospirosis in Razi Vaccine Institute. *Pajouhesh va Sazandeghi Journal*, **25**, 72-75. (In Persian)
24. Varzegar, P., Bayani, M., Kalantari, N., Nasiri-Kenari, M., Navaie, B. A., Mollalo, A., & Rostami, A. (2021).
7. Eydi, J., Golchin, M., Sakhaee, E., Amiri, H. R., & Fayed, M. R. (2017). Detection of equine leptospiral antibodies by latex agglutination test in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, **26**, 647-650.
8. Haji, H. M., Nafisi, M. A., Lotfollazadeh, S., Ghorbanpour, M., & Abdollahpour, G. (2016). Seroprevalence of *Leptospira interrogans* infection in horses from some horse clubs in Tehran by microscopic agglutination test (MAT). *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, **4**(9), 347-365.
9. Hashemi, S. A., Arzamani, K., Abdollahpour, G., Beheshti, N., Alavinia, M., Azimian, A., Neela, V. K., van Belkum, A., & Ghasemzadeh-Moghaddam, H. (2021). Seroprevalence of *Leptospira* infection in occupational risk groups in North Khorasan province, Iran. *Heliyon*, **7**(1).
10. Hedayati, M. A., & Bahmani, N. (2023). Most important bacterial and parasitic zoonotic diseases in Iran. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, **34**(1), 12-21.
11. Jahed, D. O., & Hassanpour, A. (2013). Survey of risk factors for the prevalence of leptospiral infection in horses of Gonbad area. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, **7**(26), 1844-1907.
12. Jeddi, M., Hassanpour, A., & Moghaddam, S. (2022). Seroepidemiological analysis of leptospirosis in sheep in Meshginshahr city, Iran using microscopic agglutination test. *Journal of Zoonotic Diseases*, **6**(1), 17-24.
13. Khalili, M., Sakhaee, E., Amiri, F. B., Safat, A. A., Afshar, D., & Esmaeili, S. (2020). Serological evidence of leptospirosis in Iran; A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, **138**, 103833.
14. Khoushah, Y., Hassanpour, A., Abdollahpour, G., & Moghaddam, S. (2012). Seroprevalence of leptospira infection in horses in Ardabil-Iran. *Global Veterinaria*, **9**(5), 586-589.



27. Zakeri, S., Khorami, N., Ganji, Z. F., Sepahian, N., Malmasi, A. A., Gouya, M. M., & Djadid, N. D. (2010). *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**(2), 273-277.
28. Zaman, N., Hassanpour, A., & Abdollahpour, G. (2020). Serologic prevalence of leptospiral infection in the horses in Kurdistan Province in Iran. *Journal of Zoonotic Diseases*, **4**(2), 25-38.
- Seroprevalence of *Strongyloides stercoralis* among patients with leptospirosis in northern Iran: A descriptive cross-sectional study. *Journal of Helminthology*, **95**, e34.
25. Yasouri, S. R., Ghane, M., Doudi, M., Rezaei, A., & Naghavi, N. S. (2020). A study of leptospirosis epidemiology in Iran and diagnostic techniques for human, livestock and environment samples. *Medical Laboratory Journal*, **14**(6).
26. Zahraie Salehi, J., & Shayegh, T. (2007). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases* (1st ed.). Tehran University. (In Persian)



A sero-epidemiologic study of leptospirosis in horses in Rasht

Argavan Shafaei¹, Jalal shayegh^{*1}, Gholamreza Abdollahpour²

¹Department of Veterinary Medicine, Shab.C, Islamic Azad Univesrity, Shabestar, Iran

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 19 Feburary 2025 Accepted: 23 July 2025

Abstract

Echinococcosis is one of the common parasitic diseases between humans and animals, whose symptoms appear with the long-term growth of the babies of this cestode in the body of the intermediate host, generally ruminants, and humans are known as the accidental and final host for this parasite. Although this disease in It is not reported in some countries, it has a global distribution, and considering the zoonotic importance of this disease, it is necessary to know the strains and determine the level of infection with this parasite in the intermediate hosts, because the interruption of the developmental cycle of the parasite in the intermediate hosts and the final host is very important and also this parasite has a number of species or strains within the species that this genetic diversity can be potentially important in epidemiology and disease control and making vaccines and therefore the study of mitochondrial DNA sequence and phylogenetic studies based on The DNA of this cestode is very important. 244 samples from ruminants (sheep, cows, camels, and goats) slaughtered in the industrial slaughterhouses of Isfahan province (61 infected liver samples, including two groups of 31 males and 30 females) were collected during the period from April to September of 2022 and After preparing protoscoleces from the existing hydatid cysts, DNA was extracted using a DNA extraction kit, PCR reaction using primers BD1 (Forward) and 4S (Reverse) which can amplify the ribosomal genome of the rDNA-ITS1 region. and led to the production of a PCR product with a length of 1000bp was used and subjected to enzymatic digestion (PCR-RFLP) using endonuclease enzymes AluI, RsaI, HpaII, and TaqI and finally the results were obtained using SPSS version 24 software and with Chi-square test (X^2) was used for statistical analysis and the significance level of the research ($P < 0.05$) was considered. The results show definite contamination with *E. granulosus* and sheep strain (G1) caused by the sheep-dog cycle in all the samples obtained from the liver of ruminants, and in the comparison and statistical analysis, there is a significant difference between the type of contamination with different strains between There was no male or female sex. This study can confirm the previous results about the predominance of the sheep strain in Iran, so it is recommended to pay special attention to this issue in order to control and prevent the transmission of this parasite in the sheep-dog cycle.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, hydatid cyst, strain determination, Isfahan, Iran

* Corresponding Author: Jalal shayegh

Address: Department of Veterinary Medicine, Shab.C, Islamic Azad Univesrity, Shabestar, Iran

Email: Jalalshayegh@iau.ir



بررسی تولید آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و طیور تولید شده در شهرستان قم به روش الایزا

سید عرفان حسینی نسب^{۱*}، ابراهیم رحیمی^۲

۱- دانش آموخته بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد

اسلامی، شهرکرد، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۶

چکیده

آفلاتوکسین‌ها از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که سبب کاهش نگهداری مواد غذایی و تغییر خواص ارگانولپتیک محصولات کشاورزی می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تولید آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و طیور تولید شده در شهرستان قم به روش الایزا می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه خوراک دام و طیور شامل ۲۵ نمونه خوراک دام و ۲۵ نمونه خوراک طیور از مراکز تولید این محصولات در شهرستان قم به صورت تصادفی نمونه‌گیری و به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل شد. نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌های خوراک دام و تمامی نمونه‌های و خوراک طیور آلوده به سم آفلاتوکسین B_1 بودند. در بین خوراک طیور نمونه‌گیری شده، میزان آفلاتوکسین B_1 در به ترتیب $1/62$ و $7/10$ میکروگرم بر کیلوگرم بود. نتایج نشان داد که از میان ۵۰ نمونه خوراک دام و طیور مورد بررسی هیچ کدام فراتر از استاندارد ملی ایران نبود؛ بنابراین در هیچ کدام از نمونه‌ها آلودگی بیشتر از ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم مشاهده نشد. آنالیز آماری در نمونه خوراک طیور نشان داد میانگین آلودگی به سم آفلاتوکسین B_1 $3/74 \pm 0/95$ محاسبه شد و همچنین میزان واریانس نمونه‌ها نیز ۰/۹۶ بود. در تحقیق حاضر نشان داده شد که میزان آلودگی به آفلاتوکسین در وضعیت مطلوبی است، اما جهت کاهش آفلاتوکسین و کاهش ریسک مخاطرات برای امنیت غذایی و سلامتی مصرف‌کنندگان، باید استانداردهای سختگیرانه‌ای را برای مواد مستعد به ایجاد آفلاتوکسین تعیین کرد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین B_1 ، خوراک دام، خوراک طیور، قم

*نویسنده مسئول: سید عرفان حسینی نسب

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

پست الکترونیک: serfan1030@gmail.com

مقدمه

غلات و منابع پروتئین گیاهی مورد استفاده در خوراک دام و طیور با آلاینده‌های تولید شده توسط کپک‌ها در طول تولید و ذخیره سازی محصول مرتبط است. در میان آلاینده‌ها، آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ‌ها نه تنها می‌توانند غذا و خوراک را دستخوش تغییراتی کنند، بلکه می‌توانند بر سلامت انسان و حیوانات تأثیر منفی بگذارند، زیرا ممکن است متابولیت‌های سمی یا مایکوتوکسین‌ها را تولید کنند (Kajuna et al., 2013). سلامت و ایمنی مواد غذایی از عوامل کلیدی و بسیار با اهمیت برای جامعه بوده و در صورتی که در ماده غذایی در حین تولید، نگهداری و عرضه آن آلودگی ایجاد شود، ممکن است منجر به ایجاد تغییراتی شده و ماده غذایی غیر قابل استفاده گردد. از جمله این آلودگی‌ها می‌توان به مایکوتوکسین‌ها اشاره کرد. مایکوتوکسین‌ها عموماً توسط گونه‌های متعددی از جنس‌های قارچی از جمله *Aspergillus spp.*، *Fusarium spp.* و *Penicillium spp.* در مواد غذایی انسان و دام تولید می‌شوند (Borchers et al., 2010; Kamboj et al., 2020).

رشد و تکثیر قارچ‌ها و متعاقب آن تولید مایکوتوکسین‌ها در محصولات زراعی در مراحل قبل و پس از برداشت و یا در طول ذخیره سازی در انبارهایی تحت شرایط دمایی و رطوبت نامناسب رخ می‌دهد. سالانه منجر به ایجاد ضرر و زیان‌های بزرگ اقتصادی، از جمله مرگ انسان‌ها و حیوانات، افت محصولات علوفه‌ای و غذای دام خواهند شد. بر اساس اظهار نظر FAO سالانه ۲۵ درصد غذای دنیا به مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌شود (Jallow et al., 2021; Kumar et al., 2021; Ojiambo et al., 2018).

آفلاتوکسین از جمله مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها است که عمدتاً توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به ویژه *A. nomius* و *A. parasiticus* تولید می‌شوند. تولید این گروه از سموم قارچی ابتدا در *A. flavus* شناسایی شدند و به همین دلیل به نام آفلاتوکسین خوانده می‌شوند. کلمه آفلاتوکسین از حروف اول اسم قارچ آسپرژیلوس (A) و گونه تولید کننده آن یعنی فلاووس (fla) و با پسوند توکسین (toxin) به معنای سم گرفته شده است. این سموم که حدود ۲۰ نوع سم مرتبط می‌باشند، فلورسنت بوده و در معرض نور ماوراء بنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر از خود نور ساطع می‌کنند (Jallow et al., 2021; Ojiambo et al., 2018).

A. flavus معمولاً در محیط‌های معتدل و نیمه گرم و مرطوب و *A. parasiticus* در محیط‌های گرم و مرطوب بهتر رشد می‌کند از آنجایی که شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب به تولید آفلاتوکسین کمک می‌کند، آلودگی دانه‌های خوراک به آفلاتوکسین در کشورهای گرمسیری شایع تر است. دامنه دمایی مطلوب آفلاتوکسین ۱۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس است، دمای بهینه آن ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس می‌باشد. در فعالیت آبی (aw) ۰/۷۵ تا ۰/۹۹ و رشد بهینه آن ۰/۹۴ است. (Kumar et al., 2021; Peles et al., 2021).

جهت اندازه گیری آفلاتوکسین روش‌های مختلفی همچون: کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و ELISA بهره برد (Jiménez-Pérez et al., 2021; Liu et al., 2020).

آفلاتوکسین‌ها با بهره‌وری پایین، سرکوب سیستم ایمنی، آسیب‌های کبدی و کلیوی، اثرات سرطان‌زا و تراتوژن همراه هستند. آن‌ها به دلیل اثرات مختلف بیوشیمیایی از جمله تأثیر بر روی متابولیسم انرژی، کربوهیدرات و



چربی و اثر بر روی سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک و همچنین اثرات بیولوژیکی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، ایجاد مسمومیت کلیوی و کبدی و اثر تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Peles et al., 2021; Shabeer et al., 2022).

اصلی‌ترین عضو درگیرشونده توسط آفلاتوکسین کبد است. مصرف طولانی مدت مواد غذایی آلوده به این توکسین می‌تواند سبب ایجاد اثرات سوء در بافت کبد از جمله: صدمه به بافت و سلول‌های کبدی، و ناهنجاری‌های کاملاً واضح و یا ریز و میکروسکوپی در آن شود. این توکسین به عنوان یک عامل مهم سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، هپاتوتوکسی، تراژونیک و موتاژنیک مطرح است. AFB_1 یک سرطان‌زای فعال است که می‌تواند سنتز نوکلئیک اسید را از طریق برهمکنش مستقیم با آنزیم‌های درگیر یا توسط یک الگوی توکسین-DNA مهار کند. لذا با توجه به مخاطرات ذکر شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی تولید آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و طیور تولید شده در شهرستان قم به روش الیزا است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه شامل ۲۵ نمونه خوراک دام و ۲۵ نمونه خوراک طیور از کارخانجات تولیدکننده در شهرستان قم نمونه‌گیری و جهت عصاره‌گیری و ردیابی آفلاتوکسین به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل شدند.

عصاره‌گیری

در یک بالن ژوژه ۲ گرم از نمونه آسیاب شده، ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول آلفا آمیلاز مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت

۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد، سپس با افزودن ۷ میلی‌لیتر متانول خالص به نمونه‌ها، عصاره نمونه‌ها به کمک فیلترهای کاغذی استخراج شد. سپس در یک لوله سانتریفوژ ۲ میلی‌متر از عصاره به دست آمده، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان افزوده و در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (۱۰ درجه سلسیوس) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه بالایی دور ریخته شد و لایه زیر در درجه حرارت ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد تا دی‌کلرومتان موجود تبخیر شود. در مرحله بعد با اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر متانول، ۱/۵ میلی‌لیتر هپتال، به هر یک از نمونه‌ها، ترکیب حاصله سانتریفوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از لایه متانول با ۴۰۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده رقیق شد (Mohammadi et al., 2021).

ردیابی آفلاتوکسین B_1 به روش الیزا

مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، میزان آفلاتوکسین در نمونه اندازه‌گیری گردید؛ به ترتیب ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های B_1 و نمونه‌های آماده سازی شده به چاهک استاندارد آفلاتوکسین میکروپلیت اضافه شده (جهت افزایش دقت کار برای هر نمونه دو چاهک در نظر گرفته شد). ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه شده با آنزیم به چاهک‌ها اضافه شده و سپس به مدت ۲ ساعت به دور از نور در درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس مایع موجود در چاهک‌ها میکروپلیت تخلیه شده و همه چاهک‌ها با بافر مخصوص شستشو گردید (عمل شستشو دوبار تکرار شد). ۵۰ میکرولیتر کروموژن به چاهک‌ها اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق در تاریکی نگهداری گردید. طی این مرحله رنگ آبی در نمونه‌ها ایجاد شد. غلظت رنگ با غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌ها و



استانداردها نسبت عکس دارند و نهایتاً با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده، در این مرحله رنگ آبی به زرد تبدیل شد. میزان جذب نمونه‌ها با قرائت کننده مخصوص الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. با تقسیم میزان جذب نمونه‌ها و استانداردها (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ نانوگرم در لیتر) در میزان جذب استاندارد صفر، ضرب در ۱۰۰، درصد جذب به دست می‌آید. براساس درصد جذب نمونه‌های استاندارد و میزان آفلاتوکسین B_1 موجود در نمونه‌های استاندارد، بر حسب میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد (Mohammadi et al., 2021; Salemi and Faghani, 2014)

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده از این آزمون با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و از آزمون آماری برای یک متغیر نرمال در یک گروه و روش تعیین میانگین و انحراف معیار استفاده و نمودارهای فوق با استفاده از نرم افزار Excel-2013 ترسیم گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، میزان آلودگی به سم آفلاتوکسین B_1 در ۲۵ نمونه غذایی دام و طیور بررسی شد. طبق جدول ۱، نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌های خوراک دام و تمامی نمونه‌های و خوراک طیور آلوده به سم آفلاتوکسین B_1 بودند. در بین خوراک طیور نمونه‌گیری شده، میزان آفلاتوکسین B_1 در به ترتیب ۱/۶۲ و ۷/۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود. نتایج نشان داد که از میان ۵۰ نمونه خوراک دام و طیور مورد بررسی هیچ کدام فراتر از استاندارد ملی ایران نبود؛ بنابراین در هیچ کدام از نمونه‌ها آلودگی بیشتر از ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم مشاهده نشد. آنالیز آماری در نمونه خوراک طیور نشان داد میانگین

آلودگی به سم آفلاتوکسین B_1 $3/74 \pm 0/95$ محاسبه شد و همچنین میزان واریانس نمونه‌ها نیز ۰/۹۶ بود. نتایج به دست آمده در مورد بررسی آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام نشان داد که در بین ۲۵ نمونه مورد بررسی کمترین و بیشترین آفلاتوکسین B_1 به ترتیب ۱/۵۱ و ۷/۶۰ میکروگرم بر کیلوگرم نمونه محاسبه شد؛ که در میان ۲۵ نمونه مورد بررسی هیچ کدام از نمونه‌ها، فراتر از استاندارد ملی ایران نبودند. همانگونه که در جدول ۲ مشخص شده است، سایر نمونه‌های مورد بررسی کمتر از میزان استاندارد ایران به این سم آلوده بودند. درحالی که برحسب استاندارد جهانی حداقل میزان آلودگی به سم در هر دو جامعه آماری دیده شد. چرا که حد استاندارد جهانی ۱-۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بیان شده و در این مطالعه حداقل آلودگی به سم آفلاتوکسین بر حسب استاندارد جهانی را داشت. نتیجه آماری میزان آلودگی در نمونه خوراک دام نشان داد میانگین آلودگی به سم آفلاتوکسین B_1 $4/55 \pm 0/7$ محاسبه شد و همچنین میزان واریانس نیز ۴/۹۰ برآورد شد. میانگین غلظت آفلاتوکسین B_1 در تمامی نمونه‌ها، در جدول ۲ مشخص شده است.

میانگین میزان غلظت سم آفلاتوکسین B_1 در نمونه‌های خوراک دام و طیور نمونه‌گیری شده در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است، در شکل زیر، میزان بررسی آفلاتوکسین B_1 موجود در نمونه‌های مورد بررسی با نمونه استاندارد مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج نشان‌دهنده این است که میزان آفلاتوکسین مورد بررسی در این مطالعه هم در نمونه خوراک دام و هم در نمونه خوراک طیور کمتر از حد استاندارد موجود بوده است. لذا با توجه به مقایسه میانگین حاصل از آزمون آماری دانکن می‌توان گفت، بین میزان آفلاتوکسین B_1 در نمونه‌های مورد بررسی (خوراک دام و خوراک



بررسی در این مطالعه هم در نمونه خوراک دام و هم در نمونه خوراک طیور کمتر از حد استاندارد موجود بوده است. لذا با توجه به مقایسه میانگین حاصل از آزمون آماری دانکن می توان گفت، بین میزان آفلاتوکسین B_1 در نمونه های مورد بررسی (خوراک دام و خوراک طیور) نسبت به شاهد (نمونه استاندارد) اختلاف آماری معنی داری در سطح مورد بررسی وجود داشته است ($p < 0.05$)؛ اما بین دو نمونه مورد بررسی اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ درصد وجود نداشت ($p > 0.05$).

طیور) نسبت به شاهد (نمونه استاندارد) اختلاف آماری معنی داری در سطح مورد بررسی وجود داشته است ($p < 0.05$)؛ اما بین دو نمونه مورد بررسی اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ درصد وجود نداشت ($p > 0.05$). میانگین میزان غلظت سم آفلاتوکسین B_1 در نمونه های خوراک دام و طیور نمونه گیری شده در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشخص است، در شکل زیر، میزان بررسی آفلاتوکسین B_1 موجود در نمونه های مورد بررسی با نمونه استاندارد مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج نشان دهنده این است که میزان آفلاتوکسین مورد

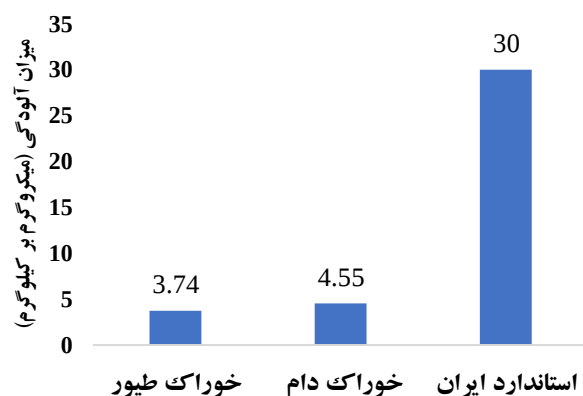
جدول (۱) - میزان میانگین و واریانس میزان غلظت سم آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و طیور بر حسب میکروگرم بر کیلوگرم

نوع نمونه	میانگین	میزان	واریانس	کمترین	بیشترین	سطح معنی داری
خوراک دام	4.55 ± 2.07	۳۰	۴/۹۰	۱/۵۱	۷/۶۰	۰/۰۰۳**
خوراک طیور	3.74 ± 0.95	۳۰	۰/۹۶	۱/۶۲	۷/۱۰	۰/۰۰۲**

** تفاوت با مقدار استاندارد به احتمال ۹۹ درصد معنی دار است ($P < 0.01$).

کیلوگرم و مطابق استاندارد جهانی رنج های مختلف محدوده ۵ تا ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم ذکر شده است (Becha and Devi, 2013; Khalifa et al., 2022)، بنابراین با توجه به شرایط آب و هوایی هر منطقه، استانداردهای مجاز آفلاتوکسین متغیر است.

آلودگی مواد غذایی یا خوراک دام و طیور به سموم قارچی باعث کاهش ایمنی و کیفیت آن شده و زیان زیادی را ایجاد می کند. با این حال، سازمان غذا و دارو، آفلاتوکسین B_1 را به عنوان یک آلاینده غذایی اجتناب ناپذیر می داند و سطوح نظارتی را برای آن تعیین کرده است. سطح مجاز برای خوراک طیور ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین شده است (Naveed et al., 2022). با توجه به موارد ذکر شده میزان حد مجاز مصرف روزانه این سموم توسط سازمان بهداشت جهانی و سازمان استاندارد ایران تعیین شده است (استاندارد ملی ایران)،



شکل (۱). مقایسه میزان آفلاتوکسین B_1 خوراک در محل های مختلف با یکدیگر و میزان استاندارد (میکروگرم بر کیلوگرم)

بحث و نتیجه گیری

آژانس بین المللی سرطان و سازمان بهداشت جهانی، آفلاتوکسین B_1 را در گروه یک ترکیبات سرطانزا تقسیم بندی کرد و حداکثر میزان آفلاتوکسین B_1 را در مواد غذایی، مطابق استاندارد ایران، ۳۰ میکروگرم بر

در این مطالعه که به بررسی ۲۵ خوراک دام و ۲۵ خوراک طیور پرداخته شد که در این بین هیچ کدام از نمونه‌ها، توکسین تولید شده فراتر از محدوده تعیین شده توسط استاندارد ایران و همچنین غذا و دارو نداشتند. لذا در همین راستا مطالعه زابلی و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای مشابه دریافتند که تمام نمونه‌ها آلوده به آفلاتوکسین B_1 بودند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد، اما آنها گزارش دادند که ۱۰ درصد نمونه‌ها آلودگی فراتر از استاندارد ایران بوده که با مطالعه حاضر از لحاظ میزان آلودگی مطابقتی ندارد (Zaboli et al., 2014). در این مطالعه هیچ کدام از نمونه‌ها فراتر از استاندارد آلودگی نداشتند. مطالعه محمودنوی و همکاران (۲۰۲۲) بر روی آلودگی خوراک طیور نشان دادند که میانگین به دست آمده در محدوده ۵۶/۳۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود؛ و ۱۰۰ درصد نمونه‌ها آلودگی فراتر از استاندارد جهانی داشتند (Naveed et al., 2022)، در حالی که با نتایج تحقیق حاضر مطابقتی ندارد. همچنین مطالعه Nishimwe و همکاران (۲۰۱۹) بر روی ۲۲۵ نمونه خوراک دام و ۳۰۹ نمونه خوراک طیور نشان دادند که خوراک دام ۴۳/۶۵ میکروگرم بر کیلوگرم و خوراک طیور ۴۸/۴ میکروگرم بر کیلوگرم به آفلاتوکسین B_1 آلوده بودند (Nishimwe et al., 2019)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقتی ندارد. در این مطالعه میانگین آلودگی در خوراک دام ۴/۵۵ و برای خوراک طیور ۳/۷۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود.

تحقیق مشابهی توسط جهانبخش و همکاران (۱۳۹۸) انجام گرفت که دریافتند که از مجموع ۱۸۰ نمونه آرد، ۱۴۴ نمونه و از ۶۰ نمونه سبوس گندم ۵۴ نمونه آلودگی به آفلاتوکسین B_1 مثبت شد، اما هیچ کدام از نمونه‌های آرد و سبوس فراتر از استاندارد ملی ایران نبودند (Jahanbakhsh et al., 2020) که با نتایج به دست آمده

از تحقیق حاضر هم‌سو است. تحقیق Kotinagu و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه مشابهی بر روی آلودگی خوراک طیور به آفلاتوکسین B_1 به روش HPLC دریافتند که از ۴۸ نمونه خوراک دام، آفلاتوکسین B_1 در ۱۶ نمونه (۳۳ درصد)، شناسایی شد، در حالی که در ترکیبات خوراک طیور از ۴۹ نمونه، ۱۳ نمونه (۲۴/۵ درصد) برای آفلاتوکسین B_1 مثبت بودند (Kotinagu et al., 2015) و هیچ کدام فراتر از استاندارد نبوده که با نتایج تحقیق حاضر هم‌سو است.

کرمی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای مشابه به این شرح گزارش داد که آلودگی‌های AFB_1 در ۳۷۳ نمونه جمع‌آوری شده طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۸ در مرحله برداشت، از مناطق مختلف زراعی منطقه عمده تولید ذرت ایران شامل اردبیل (شمال غرب)، خوزستان (جنوب غرب) و فارس در جنوب ایران نشان داد که سطح AFB_1 توسط CD-ELISA تعیین شد و در ۱۴۶ نمونه (۴۳/۶ درصد) شناسایی شد که در آنها تنها ۲۲/۵ درصد بالاتر از MRL آلوده بودند (Karami-Osboo et al., 2012)، که با نتایج مطالعه حاضر ارتباط دارد. مطالعه معماری و همکاران (۲۰۱۷) بر روی آلودگی آفلاتوکسین B_1 نشان از آلودگی ۱۶/۶۷ درصدی فراتر از استاندارد ایران دارد (Memari et al., 2017) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت ندارد.

به گزارش Kana و همکاران (۲۰۱۳)، از مجموع ۲۰۱ نمونه خوراک دام و طیور در کامرون ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به آفلاتوکسین B_1 آلوده بودند که رنج آلودگی در محدوده ۵۲-۲ میکروگرم بر کیلوگرم بود (Kana et al., 2013)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقتی ندارد. در این مطالعه میانگین آلودگی در خوراک دام ۴/۵۵ و برای خوراک طیور ۳/۷۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود.



جدول (۲) - میزان غلظت سم آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و طیور بر حسب میکروگرم بر کیلوگرم

غلظت سم آفلاتوکسین B_1 در خوراک		تعداد نمونه
دام	طیور	
۱/۵۱	۳/۱	۱
۱/۹۵	۴/۴	۲
۲/۴	۵	۳
۲/۲	۲/۵	۴
۲/۸	۳/۹	۵
۲/۳	۵/۹۰	۶
۲/۴	۴/۳	۷
۲/۸	۶/۵	۸
۳/۹	۲/۹	۹
۳/۱	۴/۳	۱۰
۳/۲	۲/۴	۱۱
۲/۲	۶/۳	۱۲
۳	۵/۸	۱۳
۴/۲	۳/۲	۱۴
۲/۸	۱/۶۲	۱۵
۵/۸	۴/۸	۱۶
۷/۶	۵/۲	۱۷
۲/۷	۵/۴	۱۸
۷/۴	۶/۸	۱۹
۶/۲	۶/۳	۲۰
۵/۸	۶/۵	۲۱
۶/۱	۴/۳	۲۲
۴/۳	۳/۹	۲۳
۲/۶	۲/۸	۲۴
۴/۴	۶/۳	۲۵

طیور ۷۳ میکروگرم بر کیلوگرم بود (Roy et al., 2013)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو نمی- باشد. مطالعه Rossi و همکاران (۲۰۱۲) بر روی

مطالعه Roy و همکاران (۲۰۰۹)، بر روی آلودگی مواد غذایی و خوراک طیور در بنگلادش نشان دادند که میانگین سطح آفلاتوکسین B_1 در بین نمونه‌های خوراک

آلودگی خوراک مرغداریه‌ها به آفلاتوکسین B_1 نشان دادند که آفلاتوکسین در ۸۸/۲ درصد از ۳۴ نمونه خوراک جوجه‌های گوشتی با روش ELISA و HPLC به ترتیب با ۱۰/۴۸ میکروگرم بر کیلوگرم و ۸/۴۱ میکروگرم بر کیلوگرم شناسایی شد، در حالی که ۹۲ درصد از نمونه‌های خوراک مرغ تخم‌گذار (n = 36) آفلاتوکسین B_1 را نشان دادند (Rossi et al., 2012)، در مطالعه حاضر تمام نمونه‌ها به آفلاتوکسین B_1 آلوده بودند اما میانگین به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقتی با مطالعه نامبرده ندارد. در مطالعه‌ای مشابه در نیجریه دریافتند که میزان آلودگی به آفلاتوکسین B_1 در خوراک مرغداری‌ها، به صورت میانگین ۱۳/۵ میکروگرم بر کیلوگرم می‌باشد (Kehinde et al., 2014)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت ندارد.

نتیجه‌گیری

بین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با بسیاری از مطالعات پیشین اختلافات معنی‌داری وجود داشت. از مهم‌ترین دلایل این اختلافات می‌توان به نحوه ذخیره‌سازی و انبار محصولات که در خوراک طیور استفاده می‌شوند و اختلاف دما و رطوبت بین محل نمونه‌گیری مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌ها اشاره کرد؛ چرا که سهل‌انگاری در شیوه‌های تخصصی و بهداشتی برداشت و مکان‌های دپو و ذخیره‌سازی این محصول، سبب تجمع مایکوتوکسین‌ها و متعاقب آن تولید آفلاتوکسین می‌شود. سطح آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام و مواد غذایی برای سلامت انسان مهم است، زیرا تقریباً ۱-۲ درصد از آفلاتوکسین B_1 در

خوراک دام به آفلاتوکسین M_1 در شیر تبدیل می‌شود. بنابراین، غلظت آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام، بالاتر از استاندارد، ممکن است باعث شود شیر حاوی آفلاتوکسین M_1 بالاتری باشد. تحقیقات نشان داده است که در کشورهای در حال توسعه، بسیاری از افراد بطور مزمن در معرض سطوح پایین آفلاتوکسین B_1 در رژیم غذایی خود قرار دارند و به همین دلیل میزان درگیری افراد در این جوامع به سرطان کبد بالا است (Wild and Gong, 2010). رویکردهایی مانند توسعه واریته‌های مقاوم، کنترل بیولوژیکی، شیوه‌های نوین کشاورزی و مدیریت-های نوین و یکپارچه در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین می‌تواند سبب کاهش بیش از پیش آلودگی به این سموم شود. به طور معمول، غلات، آجیل و مغزجات را نباید برای مدت طولانی (بیش از چند ماه) قبل از استفاده نگهداری کرد. ذخیره سازی باید در یک محیط خشک (با رطوبت کم) خنک باشد و خوراک یا مواد خوراک باید از منابع شناخته شده و معتبری خریداری شود که در آنجا با دقت مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنالیز نمونه‌های خوراک دام و طیور حکایت از پائین بودن سطح آلودگی به آفلاتوکسین را دارد؛ بنابراین با تلاش مستمر و اجرای قوانین دقیق و به روز می‌توان از رخداد آفلاتوکسین جلوگیری کرد و به این صورت سلامت مردم را بیمه کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه



International Journal of Chemical Studies **8**, 358-368.

8. Kana, J. R., Gnonlonfin, B. G. J., Harvey, J., Wainaina, J., Wanjuki, I., Skilton, R. A., and Tegua, A. (2013). Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins* **5**, 884-894.
9. Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M., and Sarkari, S. (2012). Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control* **23**, 271-274.
10. Kehinde, M., Oluwafemi, F., Itoandon, E., Orji, F., and Ajayi, O. (2014). Fungal profile and aflatoxin contamination in poultry feeds sold in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. *Nigerian Food Journal* **32**, 73-79.
11. Khalifa, E., Mohesien, M. T., Mossa, M. I., Piekutowska, M., Alsuhaibani, A. M., Abdel-Wahab, B. A., Sotohy, S. A., Ghosh, S., Helmy, Y. A., and Hussein, M. (2022). Diversity of toxigenic fungi in livestock and poultry feedstuffs. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **19**, 7250.
12. Kotinagu, K., Mohanamba, T., and Kumari, L. R. (2015). Assessment of aflatoxin B1 in livestock feed and feed ingredients by high-performance thin layer chromatography. *Veterinary world* **8**, ۱۳۹۶.
13. Kumar, A., Pathak, H., Bhadauria, S., and Sudan, J. (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition* **3**, 1-9.
14. Liu, D., Li, W., Zhu, C., Li, Y., Shen, X., Li, L., Yan, X., and You, T. (2020). Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **133**, 115966.

آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافع برای اعلام ندارند.

منابع

1. Becha, B. B., and Devi, S. (2013). Aflatoxin levels in feeds and feed ingredients of livestock and poultry in Kerala. *Journal of Veterinary medicine and Animal Science* **44**, 76-78.
2. Borchers, A., Teuber, S. S., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2010). Food safety. *Clinical reviews in allergy & immunology* **39**, 95-141.
3. Jahanbakhsh, M., Afshar, A., Momeni Feeli, S., Ebrahimi, T., Mirzaei, M., Farid, M., and Pabast, M. (2020). Determination of aflatoxin B1 in wheat flours factories of alborz province, Iran. *Journal of Environmental Health Engineering*, 15-23.
4. Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., and Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive reviews in food science and food safety*-2332,20.381-2332.
5. Jiménez-Pérez, C., Alatorre-Santamaría, S., Tello-Solís, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., and Cruz-Guerrero, A. (2021). Analysis of aflatoxin M1 contamination in milk and cheese produced in Mexico: a review. *World Mycotoxin Journal* **14**, 269-285.
6. Kajuna, F., Temba, B., and Mosha, R. (2013). Surveillance of aflatoxin B1 contamination in chicken commercial feeds in Morogoro, Tanzania. *Livestock Research for Rural Development* **25**, 51.
7. Kamboj, S., Gupta, N., Bandral, J. D., Gandotra, G., and Anjum, N. (2020). Food safety and hygiene: a review.



- aflatoxin contamination in commodities. *Toxins* **13**, 104.
21. Rossi, C. N., Takabayashi, C. R., Ono, M. A., Saito, G. H., Itano, E. N., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., and Ono, E. Y. S. (2012). Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. *Food Chemistry* **132**, 2211-2216.
 22. Roy, M., Harris, J., Afreen, S., Deak, E., Gade, L., Balajee, S. A., Park, B., Chiller, T., and Luby, S. (2013). Aflatoxin contamination in food commodities in Bangladesh. *Food Additives and Contaminants: Part B* **6**, 17-23.
 23. Salemi, A., and Faghani, M. (2014). salami N. Determination of aflatoxin B1 in broiler feed in the poultry farms of isfahan province. *J Vet Sci* **5**, 117-23.
 24. Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A., and Ali, A. (2022). Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. *Toxins* **14**, 307.
 25. Wild, C. P., and Gong, Y. Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* **31**, 71-82.
 26. Zaboli, F., Gholampour Azizi, I., Rouhi, S., and Azimi, M. (2014). Determination of aflatoxin in wheat flour samples by ELISA in Chalus city (Mazandaran province). *Zanko Journal of Medical Sciences* **15**, 60-67.
 15. Memari, H., Ebrahimi Mohammadi, K., and Esmaeilzadeh, P. (2017). Total Aflatoxin", "Aflatoxin B1" and "Ochratoxin A" Residues in Wheat Flour Produced in Kurdistan Province-Iran. *Medical Laboratory Journal* **11**, 1-6.
 16. Mohammadi, S., Ghahremani, E., Dehestaniathar, S., Zandi, S., Zakariai, A., Mohammadi, M., and Karimi, Z. (2021). Determination of aflatoxin B1 concentration in poultry feed in the poultry farms of Sanandaj using ELISA method. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* **25**, 49-56.
 17. Naveed, M., Haleem, K. S., Ghazanfar, S., Tauseef, I., Bano, N., Adetunji, C. O., Saleem, M. H., Alshaya, H., and Paray, B. A. (2022). Quantitative estimation of aflatoxin level in poultry feed in selected poultry farms. *BioMed Research International* **2022**.
 18. Nishimwe, K., Bowers, E., Ayabagabo, J. d. D., Habimana, R., Mutiga, S., and Maier, D. (2019). Assessment of aflatoxin and fumonisin contamination and associated risk factors in feed and feed ingredients in Rwanda. *Toxins* **11**, 270.
 19. Ojiambo, P. S., Battilani, P., Cary, J. W., Blum, B. H., and Carbone, I. (2018). Cultural and genetic approaches to manage aflatoxin contamination: Recent insights provide opportunities for improved control. *Phytopathology* **108**, 1024-1037.
 20. Peles, F., Sipos, P., Kovács, S., Györi, Z., Pócsi, I., and Pusztahelyi, T. (2021). Biological control and mitigation of



Investigating the occurrence of aflatoxin B₁ in livestock and poultry feed produced in Qom County by ELISA method

Seyed Erfan Hossein Nasab^{*1}, Ebrahim Rahimi²

¹ Graduated of Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 27 October 2023 Accepted: 05 June 2024

Abstract

Aflatoxins are secondary products of fungi that reduce food storage and change the organoleptic properties of agricultural products. The purpose of this study is to investigate the occurrence of aflatoxin B₁ in livestock and poultry feed produced in Qom county by ELISA method. In this study, 50 samples of livestock and poultry feed, including 25 samples of livestock feed and 25 samples of poultry feed, were randomly sampled from the production centers of these products in Qom County and transferred to the food hygiene laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of Shahrekord Azad University. The results showed that all animal feed samples and all poultry feed samples were contaminated with aflatoxin B₁. Among the sampled poultry feed, the amount of aflatoxin B₁ was 1.62 and 7.10 µg/kg, respectively. The results showed that among the 50 animal and poultry feed samples examined, none exceeded the national standard of Iran; Therefore, no pollution more than 30 µg/kg was observed in any of the samples. Statistical analysis of the poultry feed sample showed that the average contamination with aflatoxin B₁ was calculated as 3.74±0.95 and the variance of the samples was also 0.96. In the current research, it was shown that the level of aflatoxin contamination is in a favorable condition, but in order to reduce aflatoxin and reduce the risk of hazards for food safety and health of consumers, strict standards should be set for substances prone to aflatoxin formation.

Keywords: aflatoxin B₁, animal feed, poultry feed, Qom

** Corresponding Author: Seyed Erfan Hossein Nasab*

Address: Graduated of Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: serfan1030@gmail.com

بررسی توانایی تولید بیوفیلیم در سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از نمونه های گوشت انواع طیور

مرضیه نظری مقدم^۱، ابراهیم رحیمی*^۱، امیر شاکریان^۱، حسن ممتاز^۲

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

۲- گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۲

چکیده

سالمونلا یکی از شایع ترین عوامل بیماری های منتقله از راه غذا می باشد. فرآورده های حاصل از طیور رایج ترین محصولات غذایی از جمله گوشت و تخم مرغ هستند که در شیوع سالمونلوز انسان نقش دارند. تشکیل بیوفیلیم یکی از عوامل بیماری زایی باکتری سالمونلا به ویژه در صنایع غذایی محسوب می شود که به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف را می دهد. این مطالعه با هدف بررسی توانایی ایجاد بیوفیلیم از سالمونلاهای جدا شده از گوشت انواع طیور (مرغ، بوقلمون، بلدرچین، کبک، اردک و غاز) انجام گرفته است. ۴۴۰ نمونه گوشت طیور مختلف از نواحی مختلف کشور جمع آوری و توسط تست های میکروبی و بیوشیمیایی اختصاصی و با استفاده از آزمون PCR باکتری سالمونلا شناسایی گردید. به منظور بررسی توانایی تولید بیوفیلیم از روش تیتراسیون در میکروپلیت استفاده شد. در مطالعه حاضر، در مجموع ۳۶ ایزوله سالمونلا از انواع گوشت طیور جداسازی شد که همه موارد سالمونلا تیفی موریوم شناسایی شدند. داده های به دست آمده از دستگاه الیزا ریدر نشان داد که همه جدایه ها (۳۶ ایزوله سالمونلا) قادر به تولید بیوفیلیم به درجات مختلف بودند. که در این میان ۵۲/۰۲ درصد توانایی اتصال قوی، ۳۴/۱۵ درصد توانایی اتصال متوسط و ۱۳/۸۳ درصد توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلیم نشان دادند. نمونه های کبک، در بین سایر نمونه ها دارای بیشترین توانایی اتصال (۹۲/۶) بودند. با توجه به توانایی ایجاد بیوفیلیم سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی، گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها و از طرفی افزایش روزافزون گاستروانتریت های غذایی ناشی از سالمونلا لزوم مراقبت بیشتر و رعایت سطح بالاتر بهداشت در تهیه، تولید، بسته بندی و عرضه مواد غذایی در سطح جامعه به نظر می رسد.

کلمات کلیدی: سالمونلا، بیوفیلیم، بیماری های منتقله از غذا، گوشت طیور

* نویسنده مسئول: ابراهیم رحیمی

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

پست الکترونیک: Ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، بیماری‌های منتقله از غذا همچنان یک مشکل مهم در سطح جهانی مطرح می‌گردند (Ćwiek et al., 2020). سالمونلا یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌های منتقله از راه غذا در سراسر دنیا می‌باشد. در گونه‌های سالمونلا/اتریکا، تنوع قابل توجهی در میان زیرگونه‌ها و سرووارهای متعدد وجود دارد. در مجموع، این‌ها میکروب‌هایی با دامنه میزبان متغیر، از گیاهی و حیوانی گرفته تا سرووارهای بسیار بیماری‌زا و اختصاصی برای انسان را، به خود اختصاص می‌دهند. با وجود این تفاوت‌ها، بسیاری از گونه‌های سالمونلا در توانایی تشکیل بیوفیلم و توانایی ایجاد بیماری حاد، نهفته یا مزمن مشترک هستند (Harrell et al., 2021). این باکتری با استفاده از فلاژل و دیگر فاکتورهای ویروالانس خود توانایی آلوده کردن سطح مواد غذایی و ایجاد بیوفیلم را دارد (Ćwiek et al., 2019). بیوفیلم‌ها جوامع پیچیده‌ای هستند که در پاسخ به محرک‌های محیطی منفی مانند تغییرات دما، اکسیژن، اسمولاریته، در دسترس بودن مواد مغذی، یا تغییرات pH تشکیل و گسترش پیدا می‌کنند. بیوفیلم‌ها ممکن است بر روی بسیاری از سطوح زنده یا غیرزنده، از جمله محیط (دریاچه‌ها، رودخانه‌ها، خاک، پوشش سنگی، گیاهان آبی و رسوبات)، غذا، خطوط لوله آب، دستگاه‌های پزشکی، تجهیزات پردازش مواد غذایی، تشکیل شوند (Aleksandrowicz et al., 2023). رشد باکتری‌ها به حالت بیوفیلم روی سطوح، انتقال آن‌ها را آسان‌تر و از بین بردنشان را مشکل می‌کند. زیرا سلول‌های بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های آزاد، در مقابل یوسایدها و ضد عفونی‌کننده‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Osland et al., 2023). از طرفی توانایی تشکیل بیوفیلم موجب افزایش مقاومت ذاتی

باکتری به آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد، تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان‌های ضد میکروبی را کاهش می‌دهد که در نهایت هزینه‌های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت (Abebe et al., 2020). توانایی باکتری در اتصال به سطوح بیجان و تشکیل بیوفیلم دغدغه بسیاری از صنایع از جمله فرآوری محصولات گوشتی است. در این صنایع، پاکسازی ناقص سطوح منجر به تجمع مواد آلی و غیرآلی می‌شود و حضور آب در این نقاط، امکان تشکیل بیوفیلم را افزایش می‌دهد (Giaouris et al., 2014). رشد بیوفیلم‌ها روی تجهیزات فرآوری غذا، باعث ایجاد آلودگی میکروبی در محصول فرآیند شده و در نتیجه منجر به کاهش مدت زمان نگهداری محصول و افزایش شیوع بیماری‌های ناشی از غذا به ویژه مربوط به لیستریامونوسیتوز و سالمونلا می‌شود. این بیوفیل‌ها شامل میکروارگانیزم‌های مولد فساد یا پاتوژن هستند (Sirdani and Soltan, 2018).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی موضوع و از آنجاکه که اطلاعات اندکی در رابطه با تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفی موریوم در فراورده‌های غذایی در کشورمان وجود دارد، هدف از این تحقیق، بررسی تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفی موریوم در گوشت انواع طیور در نظر گرفته شد.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتری

مطالعه حاضر که از نوع تصادفی ساده است در سال ۱۳۹۹ بر روی ۴۴۰ نمونه گوشت طیور مختلف جمع آوری شده از مناطق شمال، جنوب و مرکز کشور شامل ۸۰ نمونه گوشت مرغ، ۸۰ نمونه گوشت بلدرچین، ۸۰ نمونه گوشت کبک، ۸۰ نمونه گوشت بوقلمون، ۶۰ نمونه گوشت ارک، ۶۰ نمونه گوشت غاز انجام گرفت



به منظور جداسازی باکتری های سالمونلا از گوشت طیور، ۱۰ گرم از نمونه هموژن شده به ۹۰ سی سی محیط غنی کننده لاکتوز برات منتقل شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. پس از خروج از انکوباسیون بر روی محیط کشت جامد سالمونلا - شینگلا آگار (SSA) به صورت سطحی کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس از نظر کلنی های مشکوک به سالمونلا بررسی شدند. در صورت منفی بودن نتیجه، انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه پیدا می کرد. نمونه هایی که پس از این مدت فاقد کلنی - های مشکوک به صورت رنگ پریده یا زرد با مرکزی خاکستری و سیاه بودند منفی تلقی و حذف می شدند. جهت تایید کلنی های مشکوک و تایید وجود این باکتری آزمون تشخیص و افتراق و سایر آزمایش های بیوشیمیایی از جمله کشت در آگارهای اوره، سیمون سترات و محیط متیل رد - وژپروسکویر (MR-VP) و پپتون واتر بر روی آن ها صورت گرفت. بعد از انجام آزمون تشخیصی و افتراقی بر روی پرگنه های مشکوک و تایید وجود این باکتری، نمونه های سالمونلا مثبت به منظور تشخیص مولکولی DNA آن ها استخراج گردید (Monadi et al., 2015).

به منظور بررسی های مولکولی، از کلونی های تایید شده به روش جوشاندن، استخراج DNA صورت گرفت. در ابتدا به منظور استخراج DNA، سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در آب مقطر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه داخل آب جوش (۹۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. پس از یک مرحله سانتریفوژ به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، محلول رویی به عنوان منبع DNA برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق جدایه های سالمونلا برای تایید و تعیین سرووار مورد آزمایش PCR قرار گرفت. برای

تعیین سروتپ، از پرایمرهای ژن *fliB* *fliC* *inv* و *rfbJ* برای سالمونلا تیفی موریوم در PCR استفاده گردید (جدول ۱). پرایمر مورد استفاده، طول، اندازه محصول، ژن هدف و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. برای کنترل منفی از آب مقطر و کنترل مثبت سوش های سالمونلا تیفی موریوم موجود در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد استفاده گردید. برنامه سیکل حرارتی ترموسایکلر طبق منابع موجود در جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفت (Hssanzadeh et al., 2009).

تست توانایی ایجاد بیوفیلیم با استفاده از روش تیتراسیون در میکروپلیت

بررسی توانایی ایجاد بیوفیلیم با استفاده از روش تیتراسیون در میکروپلیت بر اساس دستورالعمل بکار رفته توسط پیترز و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت (Bozorgmehri et al., 2009). پس از کشت در محیط آبگوشت TSB یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از رقیق سازی در محیط TSB تازه میزان ۱۵۰ ماکرولیترا این سوسپانسیون سلولی در میکروپلیت های پلی استیرن ۹۶ خانه ای ریخته شد. پس از اینکه ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت به آرامی سه مرتبه توسط ۲۰۰ میکرولیتر PBS شسته و به صورت وارونه قرار داده شد تا پلیت خشک گردد. جهت فیکس کردن بیوفیلیم ها از متانول ۹۹ درصد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید و پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. به تمام خانه ها ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲ درصد اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه پلیت ها با آب شسته شدند تا رنگ اضافی از گوده ها خارج شود. سپس رنگ های باند شده با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر از اسیداستیک ۳۳ درصد



جدول ۲. طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلیم به وسیله روش میکرو تیتز پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلیم	محاسبه میزان حد نصاب	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری (OD)
قوی	$OD > 4 * ODC$	$OD > 0.332$
متوسط	$2 * ODC < OD \leq 4 * ODC$	$0.166 < OD \leq 0.332$
ضعیف	$OD < OD \leq 2 * ODC$	$0.083 < OD \leq 0.166$
عدم اتصال	$OD \leq 0.083$	$OD \leq 0.083$

چگالی نوری OD: کنترل منفی $3 * SD$ + میانگین کنترل منفی ODC:OD

جدول ۳. نتایج کشت مولکولی و توانایی تولید بیوفیلیم سالمونلاهای جداسازی شده از انواع گوشت طیور

توانایی تولید بیوفیلیم (n=۳۶)			آزمون PCR	
توانایی اتصال جدایه ها (درصد)			تعداد موارد مثبت (درصد آلودگی)	
توانایی اتصال ضعیف	توانایی اتصال متوسط	توانایی اتصال قوی	نوع نمونه	
۳۳/۳	۱۴/۳	۵۲/۴	۷(۸/۷۵)	گوشت مرغ (n=۸۰)
۱۹/۰۸	۳۳/۳	۴۷/۶۲	۷(۸/۷۵)	گوشت بوقلمون (n=۸۰)
۸/۴	۳۳/۳	۵۸/۳	۴(۶/۷)	گوشت اردک (n=۶۰)
۲۲/۲	۳۳/۳	۴۴/۵	۳(۵)	گوشت غاز (n=۶۰)
-	۷/۴	۹۲/۶	۹(۱۱/۲۵)	گوشت کبک (n=۸۰)
-	۸۳/۳	۱۶/۷	۶(۷/۵)	گوشت بلدرچین (n=۸۰)
۱۳/۸۳	۳۴/۱۵	۵۲/۰۲	۳۶(۹)	تعداد کل (n=۴۰۰)

به درجات مختلف بودند. که در این میان ۵۲/۰۲ درصد توانایی اتصال قوی، ۳۴/۱۵ درصد توانایی اتصال متوسط و ۱۳/۸۳ درصد توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلیم نشان دادند. نمونه های کبک، در بین سایر نمونه ها دارای بیشترین توانایی اتصال (۹۲/۶) بودند. نتایج مربوط به انواع گوشت طیور در جدول ۳ بیان شده است.

در این مطالعه همه جدایه ها (۳۶ ایزوله سالمونلا) به- دست آمده از گوشت انواع طیور توانایی ایجاد بیوفیلیم را در سطح بالایی دارا بودند، در صورتی که در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۸ توسط سیردانی و همکارش بر روی سالمونلاهای جدا شده از گوشت قرمز، مرغ، تخم مرغ و سبزی، تنها ۲ جدایه از ۸ جدایه سالمونلا توانایی تولید بیوفیلیم را داشتند (Sirdani and Soltan Dallal, 2018). در مطالعه انجام شده توسط قاسم مهدی و

در این پژوهش به منظور تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده از انجام آزمایش، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۸/۰، تست Chi-Square و آنالیز تست دو جانبه فیشر (Fisher's exact two taild test) بررسی های آماری انجام پذیرفت و در مقادیر $P < ۰/۰۵$ تفاوتها معنا دار شناخته شدند.

نتایج

در مطالعه حاضر، در مجموع ۳۶ ایزوله سالمونلا از انواع گوشت طیور پس از کشت و آزمون PCR جداسازی شد که همه موارد سالمونلا تیفی موریوم شناسایی شدند (جدول ۳).

توانایی تولید بیوفیلیم جدایه ها

داده های به دست آمده از دستگاه الیزا ریدر نشان داد که همه جدایه ها (۳۶ ایزوله سالمونلا) قادر به تولید بیوفیلیم



همکارانش در سال ۲۰۱۵، الگوی مقاومت دارویی و تشکیل بیوفیلم *سالمونلا تیفی* موریوم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن‌ها نشان داد بیشتر نمونه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند این درحالیست که نتایج حاصل از مطالعه ما میزان بالایی از تشکیل بیوفیلم را نشان داد (Ghasemmahdi et al., 2015). سیلوا و همکارانش توانایی تولید بیوفیلم گونه‌های مختلف *سالمونلا* را در طیور بررسی کردند که نتایج این مطالعه نشان داد که *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا مینوسوتا* هر دو به عنوان تولیدکنندگان بیوفیلم با شدت متوسط طبقه‌بندی شدند در صورتی که *سالمونلا تیفی* موریوم توانایی تولید بیوفیلم با شدت پایین را نشان داد که مغایر با نتایج مطالعه ما بود (Silva et al., 2019). در آمریکا محققان اثر استرس اکسیداتیو ناشی از کلر بر تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های مختلف *سالمونلا* بر روی سطوح پلی استایرن و فولاد ضد زنگ را در سه دما (۲۵، ۳۰ و ۴ درجه سلسیوس) آزمایش کردند به غیر از دمای ۴ درجه که هیچکدام از جدایه‌ها بیوفیلم تشکیل ندادند. در دو دمای دیگر بیوفیلم قوی ایجاد نمودند (Dhakal et al., 2019). مطالعات بسیاری در مناطق مختلف جهان انجام گرفته است که نتایج آن‌ها با مطالعه حاضر نزدیکی دارد که به تفسیر بیان شده‌اند.

نتایج مطالعه تاجیک و همکاران نشان داد که *سالمونلا تیفی* موریوم توانایی تشکیل بیوفیلم در استیل زنگ زن را دارد (Tajik et al., 2019). در مطالعه انجام شده توسط بشارتی و همکارش در تهران از ۷۵ نمونه گوشت مرغ آلوده به *سالمونلا*، ۶۹ مورد (۹۲ درصد) بیوفیلم تشکیل دادند (Besharati et al., 2020). که نتایج این بررسی نزدیکی بیشتری به مطالعه حاضر دارد. در سال ۲۰۲۳ در کلمبیا محققان مطالعاتی را بر روی تشکیل بیوفیلم *سالمونلا* در توت فرنگی‌های ذخیره شده در

دمای ۴ و دمای ۷ درجه سلسیوس انجام دادند که تشکیل بیوفیلم را در همه دماها نشان داد (Pérez-Lavalle et al., 2023). در مطالعه‌ای که Ćwiek و همکارانش در سال ۲۰۲۰ انجام دادند *سالمونلا انترتیدیس* جدا شده از طیور (جوجه‌های گوشتی، جوجه‌های گوشتی بوقلمون و مرغ‌های تخمگذار) و مدفوع انسان از نظر تولید بیوفیلم بررسی شدند که هر دو مورد توانایی تولید بیوفیلم را داشتند اما سویه‌های جدا شده از رشد بیوفیلم بهتری را نسبت به سویه‌های جدا شده از انسان نشان دادند (Ćwiek et al., 2020).

در مطالعه منافی و همکارانش از ۱۲۰ نمونه گوشت (گوشت گاو و گوسفند) و سطوح تماس با گوشت در خرده‌فروشی‌ها ۲۹ نمونه *سالمونلا* شناسایی شد که ۳ جدایه *سالمونلا تیفی* موریوم و سایر جدایه‌ها متعلق به دیگر گونه‌ها در نظر گرفته شد. که بیشتر نمونه‌های *سالمونلا* توانایی تولید بیوفیلم را داشتند (Manafi et al., 2020). مطالعه‌ای در کشور نروژ بر روی سویه‌های وحشی *سالمونلا* در خوک نشان داد که این سویه‌ها توانایی تولید بیوفیلم بالایی دارند از طرفی میانگین تولید بیوفیلم سویه‌های *سالمونلا تیفی* موریوم نیز نسبت به سویه *سالمونلا* دربی تفاوت معنی‌داری دارد (Osland et al., 2023). در سال ۲۰۲۱ محققان مکزیکی نشان دادند که سروتیپ‌های *سالمونلا* می‌توانند بیوفیلم‌هایی را در محصولات غذایی تازه ایجاد کنند. ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش رنگ آمیزی کریستال ویولت نشان داد که ۹۵/۶ درصد از سویه‌های *سالمونلا* تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند (Avila-Novoa et al., 2021).

احمدپور و همکارانش در سال ۲۰۲۲ توانایی تولید بیوفیلم *سالمونلا تیفی* موریوم جدا شده از طیور را مورد بررسی قرار دادند که همه جدایه‌ها توانایی تولید بیوفیلم



را دارا بودند (Ahmadpour et al., 2022). محققان آلمانی توانایی تولید بیوفیلم سالمونلا تیفی مورיום و تاثیر ضد عفونی کننده ها در از بین بردن این باکتری را مورد ارزیابی قرار دادند که جدایه ها توانایی تولید بیوفیلم را نشان دادند (Richter et al., 2023). در ترکیه سال ۲۰۲۱ تشکیل بیوفیلم توسط سویه های سالمونلا از نظر کیفی و کمی تحت شرایط جوجه کشی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. که گونه سالمونلا انتریتیدیس بیوفیلم های قوی تشکیل دادند (Shatila et al., 2021). بشیر و همکارانش توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سالمونلا های پایدار در محیط کارخانجات تولید کننده غذای حیوانات خانگی را بررسی کردند و نشان دادند که همه سویه های جداسازی شده توانایی تولید بیوفیلم قوی را دارا بودند (Bashir et al., 2019).

تفاوت در شیوع سالمونلا و توانایی تولید بیوفیلم این باکتری، در کشورها و مناطق مختلف می تواند به دلیل تفاوت در شیوه های پرورش طیور، فرآوری، وضعیت بهداشتی، نحوه ضد عفونی و نظافت سطوح در ارتباط با ماده غذایی، نوع ضد عفونی کننده ها، نظارت بر فروشگاه های عرضه گوشت و همچنین به دلیل تفاوت در روش های مورد استفاده برای جداسازی سالمونلا و شناسایی تولید بیوفیلم باشد. سالمونلا یکی از عوامل مهم بیماری های منتقله از غذا می باشد که در صورت عدم درمان مناسب می تواند منجر به مرگ و میر بالایی گردد. توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه های سالمونلا می تواند در افزایش تهاجم و حدت آن نقش داشته باشد. این مسئله افزایش توانایی بیوفیلم در کشور ما می تواند معضلی در روند درمانی و پاسخ به درمان علی الخصوص درمان آنتی بیوتیکی به وجود بیاورد (Manafi et al., 2020).

نتیجه گیری کلی

مطالعات مختلف، توانایی بالای این باکتری را برای اتصال و تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف نشان داده اند. در صنایع غذایی، اتصال باکتری های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرایندهای تولید و بسته بندی آن ها و سرانجام، تشکیل بیوفیلم های میکروبی، می تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فراورده های غذایی و انتقال بیماری ها باشد. رشد باکتری ها به حالت بیوفیلم روی سطوح، انتقال آن ها را آسان تر و از بین بردنشان را مشکل می کند. زیرا سلول های بیوفیلم در مقایسه با سلول های آزاد، در مقابل بیوسایدها و ضد عفونی کننده ها مقاومت بیشتری نشان می دهند (Zhang et al., 2021). و در نتیجه منجر به کاهش مدت زمان نگهداری محصول و افزایش شیوع بیماری های ناشی از غذا می شود. از طرفی درصد قابل توجهی از مقاومت دارویی بالینی و متعاقب آن شکست در درمان با تشکیل بیوفیلم مرتبط می باشد. لذا شناسایی و کنترل بیوفیلم در کشتارگاه ها و کارخانجات مواد غذایی می تواند از لحاظ اقتصادی و درمانی موثر باشد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Abebe G.M. 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. Int J Microbiol. 20:1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>.
2. Ahmadpour M, Movassagh M.H, Hosseinzadeh S. 2022. Extract and Evaluation of the effect of Satureja sahendica hydroalcoholic Trisodium Phosphate on biofilm formation of Salmonella Typhimurium isolated from poultry. JFM. 9(4):74-88. (In Persian).
3. Aleksandrowicz A, Carolak E, Dutkiewicz A, Błachut A, Waszczuk W, and Grzymajlo K. 2023. Better together—



- Different Temperatures, Nutrient Conditions, and Substrates. *J Food Prot.* **82**(1):78-92. Doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-119. PMID: 30586327.
10. Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Moretro T. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* **97**(3):298-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>. PMID: 23747091
 11. Ghasemmahdi H, Tajik H, Moradi M, Mardani K, Modaresi R, Badali A, Dilmaghani M. 2015. Antibiotic resistance pattern and biofilm formation ability of clinically isolates of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *International Journal of Enteric Pathogens.* **3** (2):4-27372.
 12. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, & McLachlan JB. 2021. *Salmonella* biofilm formation, chronic infection, and immunity within the intestine and hepatobiliary tract. *Front Cell Infect Microbiol.* **10**. Doi: 10.3389/fcimb.2020.624622.
 13. Hassanzadeh, M, Emaddi Chashni, S.H, Bozorgmehri Fard, M.H, Mirzaie, S. 2009. Characterization of the *Salmonella* Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance Analysis. *Archives of Razi Institute.* **64**: 77-83.
 14. Bozorgmehri Fard M.H, Hassanzadeh M, Emaddi Chashni S.H, Mirzaie S. 2009. Characterization of the *Salmonella* Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance Analysis. *Archives of Razi Institute.* **64**(2):77-83. Doi: 10.22092/ARI.2009.103836.
 15. Manafi L, Aliakbarlu J, Dastmalchi Saei H. 2020. Antibiotic resistance and biofilm formation ability of *Salmonella* serotypes isolated from beef, mutton, and meat contact surfaces at retail. *J Salmonella biofilm-associated antibiotic resistance.* *Gut Microbes.* **15** (1): 2229937. Doi: 10.1080/19490976.2023.2229937 . PMID: 37401756.
 4. Avila-Novoa MG, Guerrero-Medina PJ, Navarrete-Sahagún V, Gómez-Olmos I, Velázquez-Suárez NY, Cruz-Color L, Gutiérrez-Lomelí M. 2021. Biofilm Formation by Multidrug-Resistant Serotypes of *Salmonella* Isolated from Fresh Products: Effects of Nutritional and Environmental Conditions. *Appl. Sci.* **11**(8), 3581. <https://doi.org/10.3390/app11083581>
 5. Besharati S, Owlia P. 2020. Evaluation of biofilm production capacity in *salmonella* isolated from chicken meat in Tehran municipally daily fruit and vegetable markets. *Daneshvar Medicine.* **28**(1):146. 62-67. (In Persian).
 6. Bashir A, Azeem A, Stedman Y, Hilton A. 2019. Pet Food Factory Isolates of *Salmonella* Serotypes Do Not Demonstrate Enhanced Biofilm Formation Compared to Serotype-Matched Clinical and Veterinary Isolates. *Hindawi. BioMed Research International.* Volume 2019, Article ID 8569459, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/8569459>.
 7. Ćwiek K, Korzekwa K, Tabiś A, Bania J, Bugla-Płoskońska G, & Wieliczko A. 2020. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. *Pathogens.* **9**(8): 643. Doi: 10.3390/pathogens9080643. PMID: 32784631.
 8. Ćwiek K, Bugla-Płoskońska G, Wieliczko A. 2019. *Salmonella* biofilm development: Structure and significance. *Postepy Hig Med Dosw.* **73**: 937-943. DOI: 10.5604/01.3001.0013.7866.
 9. Dhakal J, Sharma C, Nannapaneni R, McDANIEL C, Kim T, Kiess A. 2019. Effect of Chlorine-Induced Sublethal Oxidative Stress on the Biofilm-Forming Ability of *Salmonella* at



- Microbiol. **76**(1):124-129. Doi: 10.1007/s00284-018-1599-5. PMID: 30560366.
21. Sirdani A, Soltan Dallal M. 2018. Investigating the Ability of Producing Biofilm by Isolated Salmonella from Food. AUMJ. **7**(4), 306-314. (In Persian).
 22. Shatila F, Yaşa I, Tansel Yalçın H. 2021. Biofilm Formation by Salmonella enterica Strains. Curr Microbiol. **78**(4):1150-1158. Doi: 10.1007/s00284-021-02373-4. PMID: 33609163.
 23. Tajik H, Moradi M, Alipour M, Ghasemmahdi H. 2019. Biofilm Formation of Salmonella Typhimurium on Stainless Steel in Red Meat Model and the Effect of Bacteriophage on Bacterial Biofilm. IJMM **12**(3): 179-188. (In Persian).
 24. Zhang Y, Ge H, Lin W, Song Y, Ge F, Huang X, Meng X. 2021. Effect of different disinfection treatments on the adhesion and separation of biofilm on stainless steel surface. Water Sci Technol. **83** (4):877-885. DOI: 10.2166/wst.2021.028. PMID: 33617494.
 - Food Sci. **85**(8):2516-2522. Doi: 10.1111/1750-3841.15335. PMID: 32671849.
 16. Monadi M, Kargar M, Naghiha A, Najafi A, Mohammadi R. 2015. Molecular Detection of Salmonella serovar isolated from eggs. Mljgoms. **9**(1):17-24. (In Persian).
 17. Osland A, Oastler C, Konrat K, Nesse L, Brook E, Richter A, Gosling R, Arvand M, & Vestby L. 2023. Evaluation of Disinfectant Efficacy against Biofilm-Residing Wild-Type Salmonella from the Porcine Industry. Antibiotics. **12**(7), 1189. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071189>
 18. Pérez-Lavalle L, Valero A, Cejudo-Gómez M, Carrasco E. 2023. Fate and biofilm formation of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson on fresh strawberries stored under refrigeration and room temperatures. Food Control. **153**, 109906. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109906>.
 19. Richter A, Konrat K, Osland A, Brook E, Oastler C, Vestby L, Gosling R, Nesse L, Arvad M. 2023. Evaluation of Biofilm Cultivation Models for Efficacy Testing of Disinfectants against Salmonella Typhimurium Biofilms. Microorganisms. **11**(3):761. Doi: 10.3390/microorganisms11030761. PMID: 36985334.
 20. Silva P, Goulart L R, Reis T, Mendonça E, Melo R, Penha V, Peres P, Hoepers P, Beletti M, Fonseca B. 2019. Biofilm Formation in Different Salmonella Serotypes Isolated from Poultry. Curr



Ability to produce biofilm in *Salmonella typhimurium* isolated from poultry meat samples

Marziye Nazari Moghadam¹, Ebrahim Rahimi^{*1}, Amir Shakerian¹ and Hassan Momtaz²

¹ Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 03 December 2024 Accepted: 14 October 2025

Abstract

Salmonella is one of the most common causes of foodborne diseases. Poultry products are the most common food products, including meat and eggs, which contribute to the spread of human salmonellosis. Biofilm formation is one of the pathogenic factors of *Salmonella* bacteria, especially in the food industry, which allows the bacteria to attach to different surfaces. This study was conducted with the aim of investigating the biofilm formation ability of *Salmonella* isolated from poultry meat (chicken, turkey, quail, partridge, duck and goose). 440 different poultry meat samples were collected from different regions of the country and identified by special microbial and biochemical tests and by using PCR test of *Salmonella* bacteria. In order to check the ability of biofilm production, titration method was used in microplate. In the present study, a total of 36 *Salmonella* isolates were isolated from poultry meat, and all *Salmonella* Typhimurium cases were identified. The data obtained from ELISA reader device showed that all isolates (36 *Salmonella* isolates) were able to produce biofilm to different degrees. Among them, 52.02% showed strong binding ability, 34.15% moderate binding ability and 13.83% weak binding ability in biofilm production. Quebec samples had the highest binding ability (92.6) among other samples. Due to the ability to create biofilms of *Salmonella* isolated from food, the spread of their antibiotic resistance, and on the other hand, the increasing increase in gastroenteritis. Foods caused by *Salmonella* seem to require more care and compliance with a higher level of hygiene in the preparation, production, packaging and supply of food at the community level.

Keywords: *Salmonella*, biofilm, foodborne diseases, poultry meat.

* Corresponding Author: Ebrahim Rahimi

Address: Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: Ebrahimrahimi55@yahoo.com



ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم ژلاتین/کیتوزان فعال شده با نانومولسیون عصاره خوشاریزه علیه پاتوژن های غذایی در شرایط آزمایشگاهی

ملیکا جنبانی^۱، مسلم نیریز نقدهی^۱، زهره مشاک^{۳*}

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد، ارومیه، ایران

۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۲

چکیده

با توجه به چالش های زیست محیطی و ایمنی ناشی از بسته بندی های بر پایه نفت، استفاده از فیلم های زیست فعال با منشأ طبیعی در صنایع غذایی به عنوان جایگزینی پایدار مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر نانومولسیون عصاره *Eryngium platyloba* بر خواص عملکردی فیلم های پایه ژلاتین و کیتوزان انجام شد. نانومولسیون با روش های هم زن مغناطیسی و اولتراسوند تهیه گردید. طی بررسی ترکیبات عصاره با HPLC، شش ترکیب فنلی Epicatechin (۴۵/۹۹ ppm)، Apigenin (۴۱/۵۶ ppm)، Kaempferol (۳۳/۵۶ ppm)، Quercetin (۳۱/۷۸ ppm)، Luteolin (۲۰/۶۶ ppm) و p-Coumaric acid (۲۰/۶۶ ppm) در عصاره آبی خوشاریزه شناسایی شدند. محتوی فیل و فلاونوئید عصاره آبی خوشاریزه به ترتیب برابر ۱۸/۷۵ mgGAE/ml و ۸/۳۳ mgQUE/g بود. تصاویر SEM ذرات نانومولسیون دارای شکل کروی، سطح صاف و پراکندگی مناسب در ماتریس فیلم بسته بندی پایه را تأیید کرد. شاخص پراکندگی پایین ($PDI < 0.3$) بیانگر پایداری فیزیکی نانومولسیون بود. در نهایت فیلم های فعال در ۵ تیمار مختلف Co: ژلاتین / T₁: ژلاتین + کیتوزان / T₂: T₃ و T₄ (به ترتیب حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی نانومولسیون) تهیه شدند. آزمون های آنتی باکتریالی و آنتی اکسیدانی نشان داد که فیلم های حاوی نانومولسیون خوشاریزه به ویژه در غلظت ۱۵ درصد (تیمار T₄) فعالیت آنتی باکتریایی قابل توجهی علیه پاتوژن های غذایی به ترتیب *S. aureus* < *L. monocytogenes* < *E. coli* < *S. typhimurium* را نشان دادند. همچنین افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم ها با استفاده از آزمون های DPPH و ABTS نشان داد که قدرت آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت نانومولسیون به طور معناداری بهبود یافت. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان دهنده اثربخشی نانومولسیون عصاره خوشاریزه در بهبود عملکرد زیستی فیلم های بسته بندی بوده و می تواند به عنوان جایگزینی طبیعی و پایدار برای مواد نگهدارنده شیمیایی در صنایع غذایی معرفی گردد.

کلمات کلیدی: بسته بندی مواد غذایی، زیست تخریب پذیر، فیلم فعال، نانومولسیون، *Eryngium platyloba*

* نویسنده مسئول: زهره مشاک

آدرس: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

پست الکترونیک: mashak@kiauo.ac.ir

مقدمه

بسته‌بندی‌های پلاستیکی متداول با منشأ نفتی (مانند پلی‌اتیلن ترفتالات، پلی‌پروپیلن، پلی‌استایرن) به دلیل غیرقابل تجزیه‌بودن، آزادسازی ترکیبات سمی و تولید میکروپلاستیک‌ها چالش‌های جدی زیست‌محیطی و مخاطرات بالقوه برای سلامت انسان ایجاد می‌کنند. این عوامل موجب نگرانی‌های گسترده در زمینه ایمنی، پایداری و مدیریت پسماندهای بسته‌بندی شده است (Abedi-Firoozjah et al., 2025). بنابراین، در سال‌های اخیر بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب‌پذیر مبتنی بر بیوپلیمرها (مانند پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها) و ترکیبات آن‌ها مورد توجه گسترده پژوهشگران قرار گرفته‌اند (Bahramian et al., 2025). در میان پلی-ساکاریدهای طبیعی، کیتوزان، یک پلی‌ساکارید خطی، از N-استیل-D-گلوکزآمین و D-گلوکزآمین تشکیل شده و توسط پیوندهای β -1-4-گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. کیتوزان به دلیل ویژگی‌هایی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، بی‌بو بودن، فعالیت ضد میکروبی و توانایی تشکیل فیلم، این پلیمر طبیعی به‌طور گسترده به‌عنوان ماتریس پایه در توسعه فیلم‌های بسته‌بندی فعال برای مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است (Zhao et al., 2025). با این حال، مطالعات نشان داده که ترکیب بیوپلیمرها موجب بهبود خواص فیزیکوشیمیایی، از جمله افزایش عملکرد سدکنندگی و ارتقاء ویژگی‌های عملکردی فیلم‌های بسته‌بندی می‌شود (Ponnusamy et al., 2025). ژلاتین، پلی‌پپتید خطی یونی آبدوست با ساختار یونی است که به‌دلیل محتوای بالای اسیدهای آمینه‌ای مانند پرولین، گلیسین و هیدروکسی‌پرولین، قابلیت تشکیل فیلم‌های انعطاف‌پذیر را داراست. علاوه بر این، ژلاتین همچنین دارای ویژگی‌های عملکردی مانند تشکیل ژل، مانع بخار

آب، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری است که آن را به گزینه‌ای مناسب برای کاربرد در بسته‌بندی‌های زیست‌فعال تبدیل می‌کند (Xu et al., 2025; Shahbazi et al., 2025).

بسته‌بندی مواد غذایی به‌عنوان لایه‌ای محافظ بر سطح غذا، نقش کلیدی در حفظ کیفیت، افزایش ماندگاری، و محافظت از محصول در برابر عوامل محیطی، فیزیکی و میکروبی ایفا می‌کند (Liang et al., 2025). اخیراً، محققان در سراسر جهان به توسعه فناوری‌هایی برای به حداقل رساندن رشد عوامل بیماری‌زای ناشی از غذا از طریق بسته‌بندی فعال مواد غذایی علاقه‌مند شده‌اند (Wagh et al., 2025). مهاجرت ترکیبات زیست‌فعال به سطح ماده غذایی موجب مهار یا تأخیر در رشد عوامل بیماری‌زا می‌شود. اثربخشی این نوع بسته‌بندی‌ها به توانایی ترکیب ضد میکروبی در مهاجرت مؤثر به ناحیه‌ای که فساد آغاز می‌شود وابسته است، به‌گونه‌ای که حضور به‌موقع و کافی این ترکیبات در محل هدف، نقش تعیین‌کننده‌ای در کنترل میکروبی و افزایش ایمنی محصول دارد و در نهایت به حفظ طعم، ظاهر، ارزش تغذیه‌ای و کاهش فساد مواد غذایی کمک می‌کند (Kadirvel et al., 2025). این نوع بسته‌بندی را می‌توان با کپسوله کردن عامل ضد میکروبی در مواد بسته‌بندی توسعه داد (Wagh et al., 2025). خوش‌اریزه با نام علمی (*Echinophora cinerea*) گیاهی از خانواده چتریان است. سه گونه این گیاه نام‌های *E. chrysanth*، *E. lamondiana* و *E. trichophylla* بومی ترکیه و گونه *E. cinerea* و *E. platyloba* بومی ایران هستند (Nasiri et al., 2024). مطالعات نشان داده عصاره این گیاه به دلیل ترکیباتی آلكالوئیدها و فلاونوئیدهایی نظیر اسیدهای کربوکسیلی، لینالول، اوژنول، سیترونلول، فarnesol، ترپن‌ها، میرسن، کوریستن، کامفرول



خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی خوبی دارند (Sahin et al., 2024; Pilevar et al., 2024). به منظور دستیابی به یک سامانه بسته بندی فعال، این مطالعه با هدف تهیه نانوامولسیون عصاره خوشاریزه و فرمولاسیون فیلمی بر پایه کیتوزان/ژلاتین انجام شد؛ فیلمی که در آن نانوامولسیون در غلظت های مختلف به کار گرفته شد تا اثرات عملکردی و ضد میکروبی آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

مواد اولیه

گیاه خوشاریزه (*E. platyloba*) از شهرستان سرایان استان خراسان جنوبی (ایران) جمع آوری شد که بعد از تأیید گونه توسط کارشناسان پژوهشکده دارویی کرج جهت انجام تحقیق استفاده شد. همچنین، سویه های مورد بررسی شامل باکتری /شریشیاکلی (ATCC 1533)، لیستریا مونوسیترنوز (ATCC 1299)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 1826) و سالمونلاتیفی موریوم (ATCC 1609) از انستیتو پاستور (ایران)، مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck (آلمان) و محیط های کشت از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

استخراج و تهیه نانوامولسیون عصاره خوشاریزه

پس از حذف ناخالصی ها (برگ، خار و سایر بخش های غیر از گلبرگ) از گیاه خوشاریزه، اندام های گیاه جهت تهیه عصاره در آون الکتریکی (Memmert، آلمان) خشک شدند در ادامه ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده گیاه با ۵۰۰ میلی لیتر حلال آب مخلوط و یک شبانه روز روی همزن مغناطیسی (IKA، آلمان) گرفت. سپس مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد. جهت تهیه نانوامولسیون، عصاره به نسبت مساوی با توین ۸۰، به عنوان سورفکتانت، بخوبی مخلوط شدند. سپس فاز آبی (آب مقطر) به وسیله اسید سیتریک ۰/۳ درصد اسیدی شده و

مخلوط فاز روغنی با پلی گلیسرول پلی رسینولات مخلوط شد و سورفکتانت بر روی همزن مغناطیسی با سرعت دورانی ۷۰۰ دور در دقیقه به آرامی به فاز آبی، به منظور تهیه پیش مخلوط امولسیونی، اضافه شد. پیش مخلوط امولسیونی تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Daihan، کره جنوبی) با توان ۱۰۰ وات و ۴۰ کیلوهرتز برای تهیه نانو امولسیون ها قرار گرفتند. به این ترتیب نانو امولسیون مورد نظر تهیه شد (Marsup et al., 2020).

تهیه فیلم های فعال

فیلم های خوراکی ژلاتین / کیتوزان / نانوامولسیون خوشاریزه با استفاده از روش ریخته گری محلول ساخته شدند. برای این منظور ابتدا ۲/۹ گرم از کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر محلول اسید استیک ۱/۴ درصد حل شد تا محلول ۲/۹ درصد تشکیل گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۸ ساعت با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه همزده شد. در ادامه ۱۲ گرم از ژلاتین ماهی، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر (محلول ۱۲ درصد) حل و به مدت ۱ ساعت در ۴۰۰ دور در دقیقه همزده شد. از گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر استفاده شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه حرارت داده شد. متعاقباً نانوامولسیون ها (در غلظت ها ۵، ۱۰، ۱۵ درصد وزنی/حجمی) به محلول فیلم کامپوزیتی افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰ rpm همزده شد. سپس، تمام فرمولاسیون ها بر روی ظروف پتری دیش (قطر = ۱۰ سانتی متر) ریخته شد و قبل از بررسی بیشتر در هوا در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (دمای محیط) خشک شدند (Teymoorian et al., 2024).

آزمون ها



سلسیوس و با زاویه ۹۰ درجه مشخص گردید (Hashem et al., 2024).

- بررسی مورفولوژی نانوامولسیون عصاره خوشاریزه: ساختار نانوامولسیون، مورفولوژی سطح و اندازه با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به دست آمد. نمونه بر روی کاغذ صافی رسوب داده شد و با انجماد سریع در نیتروژن مایع تهیه شد و در نهایت متالیزاسیون با طلا انجام شد. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد (de Souza Iacia et al., 2024).

- تعیین قطر هاله عدم رشد فیلم‌های فعال: فعالیت آنتی‌باکتریالی قطر هاله عدم رشد فیلم‌های فعال در برابر پاتوژن‌های *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی* موریوم به روش انتشار دیسک با استفاده از دیسک‌های با قطر ۱۰ میلی‌لیتر در محیط Brain Heart Infusion Agar ارزیابی شد. عمل کشت سطحی باکتری‌ها روی دیسک-ها با استفاده از ۰/۱ میلی‌لیتر کشت مایع از هر سویه باکتری (برابر با 10^6-10^7 cfu/ml) صورت گرفت. پلیت‌ها سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه-گذاری (Binder, Germany) شدند. قطر هاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس (Mitutoyo, Japan) با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Song et al., 2020).

- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)^۳ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۴: تعیین MIC و MBC به روش دیسک دیفیوژن آگار روی محیط کشت مولر هیتون آگار انجام شد. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۵۰ میکرولیتر از سوپانسیون میکروبی آماده شده اضافه و به

- شناسایی ترکیبات فنولی عصاره خوشاریزه با دستگاه^۱ HPLC: آنالیز (HPLC (Agilent, USA با Beckman HPLC با پمپ مدل ۱۲۷، آشکارساز UV مدل ۱۶۶ و سیستم عامل ۳۲ KARAT Software انجام شد. ترکیبات فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با سرعت کم ۱ میلی‌لیتر در دقیقه شناسایی شدند. کارکرد ستون دستگاه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم بود. جداسازی در یک سیستم پمپاژ دوگانه با تغییر نسبت ۲/۵ درصد (v/v) اسید استیک در آب (فاز متحرک A) و ۷۰ درصد متانول در آب (فاز متحرک B) انجام شد. برنامه شستشوی گرادیان حلال به شرح زیر بود: ۱۰ تا ۲۶ درصد (v/v) B در ۱۰ دقیقه، تا ۷۰ درصد B در ۲۰ دقیقه و در نهایت تا ۹۰ درصد B در ۲۵ تا ۳۱ دقیقه. حجم تزریق برای همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بود. ترکیبات فنلی با تطبیق زمان ماند و ویژگی‌های طیفی آن‌ها با استانداردها آنالیز شدند (Adil et al., 2024).

- محتوی فنل و فلاونوئیدی نانوامولسیون عصاره خوشاریزه: محتوای فنلی کل با استفاده از روش Folin-Ciocalteu در طول موج ۷۶۰ نانومتر و محتوی فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$) در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Royani et al., 2023).

- اندازه‌گیری میانگین قطر حجمی قطرات نانوامولسیون عصاره خوشاریزه: به منظور اندازه-گیری میانگین قطر حجمی قطرات ابتدا همه نانو امولسیون‌ها به منظور جلوگیری از پراکنش متعدد ذرات^۲ با نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شد و به وسیله دستگاه^۳ Malvern DLS، اندازه قطرات در دمای ۲۵ درجه

³ Dynamic light scattering

⁴ Minimal inhibitory concentration

⁵ Minimum bactericidal concentration

¹ High-Performance Liquid Chromatography

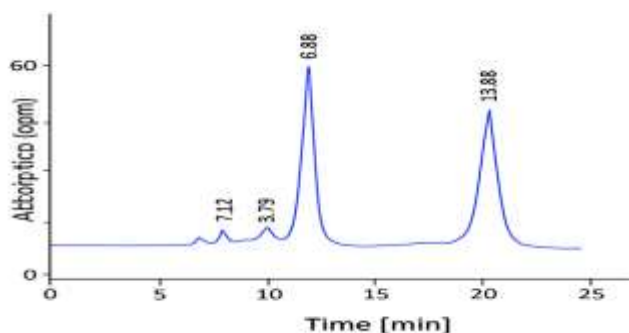
² Multiple Scattering



تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین گردید. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

یافته‌ها

کروماتوگرام ترکیبات عصاره خوشاریزه در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق نتایج ۶ ترکیب فنلی و فلاونوئیدی در عصاره آبی خوشاریزه شناسایی شد که به ترتیب فراوانی Epicatechin (۴۵/۹۹ ppm)، Apigenin (۳۳/۵۶ ppm)، Kaempferol (۴۱/۵۶ ppm) و Quercetin (۳۱/۷۸ ppm) Luteolin (۲۰/۶۶ ppm) و p-Coumaric acid (۲۰/۶۶ ppm) بود.



شکل ۱. کروماتوگرام ترکیبات عصاره خوشاریزه

شناسایی شده با HPLC

مطابق جدول ۱ محتوی فنل و فلاونوئید و نانومولسیون عصاره خوشاریزه را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد محتوی فنل و فلاونوئید در عصاره خوشاریزه بطورمعناداری از نانومولسیون بالاتر بود ($p < 0.05$).

اندازه ذرات بر حسب نانومتر، مقدار آن‌ها بر حسب درصد همچنین پیک‌های منتخب نانومولسیون در شکل ۲ ارائه شده‌اند. منحنی بدست آمده تک قله‌ای با گستردگی پهنای ۳۱ نانومتر بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اندازه ذرات به ترتیب فراوانی ۸۴/۵ درصد

مدت ۲۴ ساعت باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. جهت تعیین MIC کدورت لوله‌ها بررسی و گزارش شد. برای تعیین MBC عصاره‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌هایی که رشد میکروارگانیسم نداشتند، برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. تمامی نمونه‌ها مجدداً داخل انکوباتور مطابق با شرایطی که قبلاً شرح داده شد قرار گرفتند. سپس جهت میزان MBC عدم رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی و گزارش شد (Song et al., 2020).

-تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی-اکسیدانی فیلم‌ها به دو روش DPPH و ABTS ارزیابی شد. ابتدا فیلم‌های (۲×۲ سانتی‌متر) به مدت ۲ ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر متانول غوطه‌ور و سپس با شتاب $10000 \times g$ و ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany) شدند. سوپرناتانت برای آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی جمع‌آوری شدند. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، سوپرناتانت‌ها با معرف DPPH ۰/۰۰۲ درصد متانول و تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ABTS، سوپرناتانت‌ها با معرف ABTS ۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی متانولی مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری مخلوط‌ها در تاریکی میزان جذب با استفاده از یک اسپکتروفتومتر مرئی UV در ۷۳۴ و ۵۱۷ نانومتر به ترتیب برای ABTS و DPPH اندازه‌گیری شد (Ezati and Rhim, 2020).

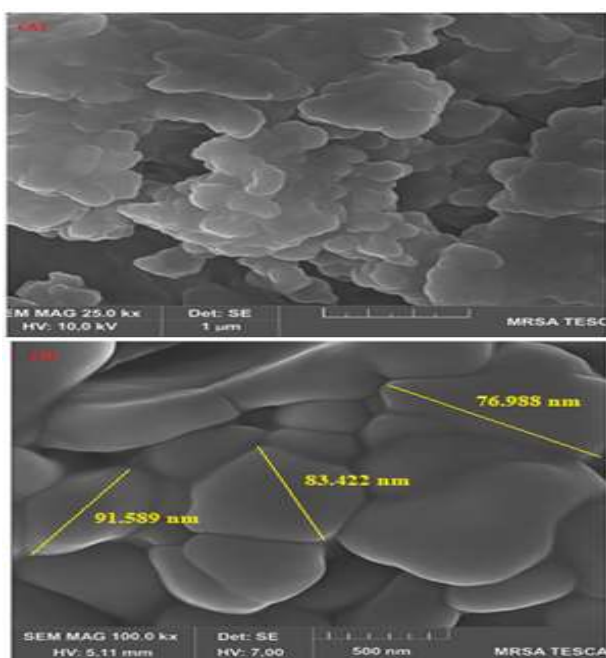
رابطه (۱)

$$I\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به دست آمده در آزمایشات برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شدند. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه و

(Co) فاقد هرگونه فعالیت آنتی‌باکتریال علیه پاتوژن‌ها بود ($p>0.05$). افزودن کیتوزان و نانومولسیون عصاره خوشاریزه در فرمولاسیون فیلم‌های فعال سبب افزایش معنادار فعالیت آنتی‌باکتریال آن‌ها شد ($p<0.05$). همچنین با افزایش درصد نانومولسیون عصاره خوشاریزه از ۱۰ به ۱۵ درصد افزایش معنادار فعالیت آنتی‌باکتریال فیلم‌های فعال مشهودتر بود ($p<0.05$). در مقایسه بین پاتوژن‌ها باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری به فیلم‌های فعال داشتند ($p<0.05$).



شکل ۳. موفولوژی نانومولسیون عصاره خوشاریزه (A): در بزرگ نمایی $1 \mu\text{m}$ / (B): در بزرگ نمایی 500 nm در جدول ۲. نتایج میزان باکتریواستاتیک (MIC) و باکتریوسیدال (MBC) نمونه‌های فیلم فعال نشان داده شده است. مطابق نتایج فیلم شاهد فاقد هرگونه فعالیت مهار رشد علیه پاتوژن‌ها بود ($p>0.05$). درمقابل ادغام پلیمر کیتوزان در فرمولاسیون پایه فیلم‌های فعال منجر به مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت شد ($p<0.05$). همچنین، فیلم‌های فعال حاوی نانومولسیون عصاره آبی

(۹۱/۲۸ نانومتر)، ۹/۷ درصد (۷۸/۸۲ نانومتر)، ۵/۴ درصد (۱۰۵/۷ نانومتر)، ۱/۱ درصد (۱۲۲/۴ نانومتر) و ۰/۳ درصد (۶۸/۰۶ نانومتر) بود. میزان شاخص چند پراکندگی (PDI) نانومولسیون‌ها برابر با ۰/۲۷۱ بود.

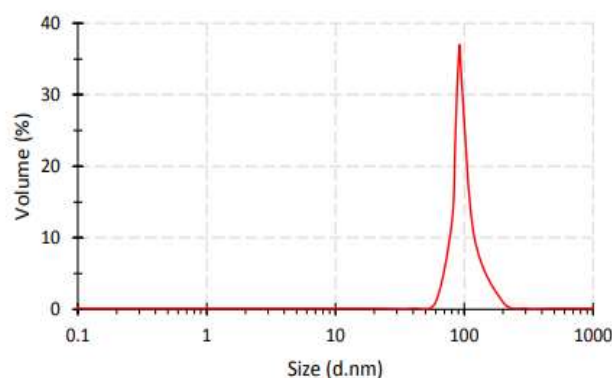
جدول ۱. نتایج میانگین محتوی فنل و فلاونوئید

نوع عصاره	فنل (mgGAE/ml)	فلاونوئیدها (mgQUE/ml)
خوشاریزه	18.75 ± 0.09^a	8.33 ± 0.12^a

*نتایج در سه تکرار گزار شده است ($n=3$).

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار در هر ستون است ($p<0.05$).

Size Distribution by Volume



شکل ۲. توزیع اندازه ذرات نانومولسیون‌ها

نانومولسیون‌ها حاوی عصاره خوشاریزه تحت بزرگنمایی‌های مختلف برای تأیید شکل و توزیع کروی آن‌ها مشاهده شدند (شکل ۳). تشکیل خوشه‌ها به دلیل برهمکنش‌های بنیادی بین ذره‌ای تقویت‌شده‌ای است که در اثر کاهش اندازه ذرات رخ می‌دهد.

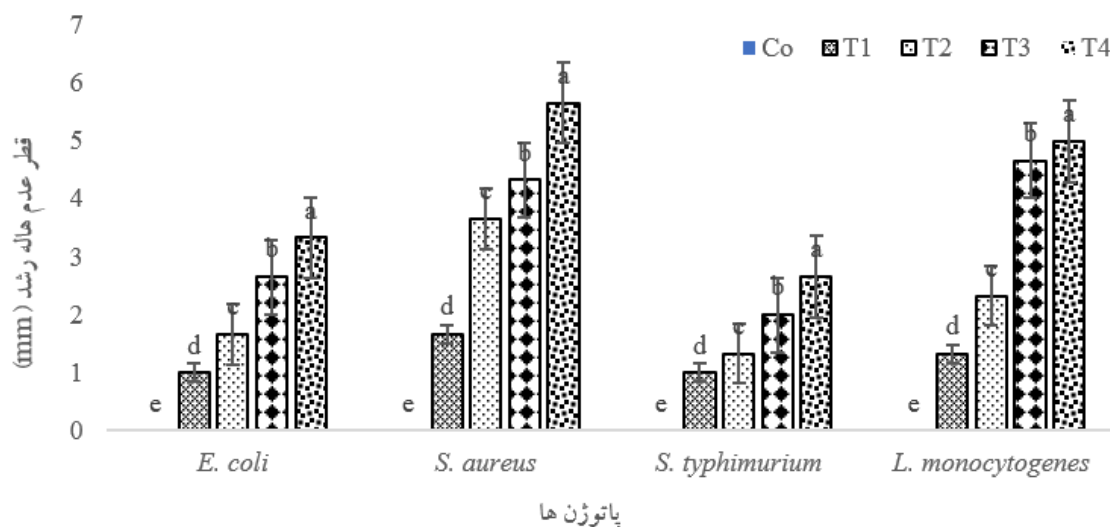
نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد فیلم‌های بسته‌بندی فعال بر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و گرم منفی (*Listeria monocytogenes* و *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium*) در شکل ۴ نشان داده شده است. مطابق نتایج نمونه شاهد

⁶ Poly Dispersity Index



باکتریسیدال علیه هر دو گروه گرم مثبت و گرم منفی شد ($p < 0.05$). به طور کلی، با افزایش درصد نانومولسیون عصاره خوشاریزه در فرمولاسیون، افزایش معناداری در فعالیت آنتی باکتریال، شامل اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال، مشاهده گردید ($p < 0.05$).

خوشاریزه بر روی هر دو گونه گرم مثبت و گرم منفی فعالیت مهارکنندگی نشان دادند ($p < 0.05$). نتایج همچنین بیانگر آن بود که نمونه شاهد (Co)، T_1 و T_2 فاقد اثر باکتریسیدال علیه پاتوژن‌های مورد بررسی بودند ($p > 0.05$). درحالیکه افزودن ۱۰ درصد و بیشتر نانومولسیون عصاره خوشاریزه منجر به بروز فعالیت



شکل ۴. نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد فیلم‌های فعال پاتوژن‌های مورد بررسی

جدول ۲. نتایج میانگین فعالیت مهارکنندگی و کشندگی نمونه‌های فیلم فعال پاتوژن‌های منتخب

MBC (mg/l)				MIC (mg/l)				نمونه‌ها
<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i> ml	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^d	Co
0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	$12/33 \pm 23/57^a$	0.00 ± 0.00^d	$99/99 \pm 23/57^a$	0.00 ± 0.00^d	T1
0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c	$33/33 \pm 11/78^b$	$99/99 \pm 23/57^a$	$20/13 \pm 8/89^b$	$41/66 \pm 11/78^a$	T2
$33/33 \pm 11/78^a$	$99/99 \pm 23/57^a$	$25/00 \pm 0.00^a$	$50/00 \pm 0.00^a$	$19/99 \pm 5/89^c$	$33/33 \pm 11/78^b$	$10/41 \pm 2/94^c$	$29/16 \pm 15/59^b$	T3
$19/99 \pm 5/89^b$	$41/66 \pm 11/78^b$	$10/41 \pm 2/94^b$	$33/33 \pm 11/78^b$	$10/41 \pm 2/94^d$	$19/99 \pm 5/89^c$	$8/33 \pm 2/94^d$	$12/50 \pm 0.00^c$	T4

Co: نمونه شاهد (ژلاتین) / T_1 : ژلاتین + کیتوزان / T_2 : ژلاتین + کیتوزان + ۵ درصد نانومولسیون عصاره / T_3 : ژلاتین + کیتوزان + ۱۰ درصد نانومولسیون عصاره / T_4 : ژلاتین + کیتوزان + ۱۵ درصد نانومولسیون عصاره

* نتایج در سه تکرار گزارش شده است ($n=3$). * حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار در هر ستون است ($p < 0.05$)

درمقابل، افزودن کیتوزان و نانومولسیون عصاره خوشاریزه در فرمولاسیون فیلم‌های فعال سبب افزایش معنادار فعالیت آنتی اکسیدانی آنها شد ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد با افزایش درصد نانومولسیون

در جدول ۳. نتایج میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های فیلم فعال به دو روش DPPH و ABTS ارائه شده است. مطابق با نتایج فیلم شاهد (Co) کمترین فعالیت آنتی-اکسیدانی در هر دو روش را نشان داد ($p < 0.05$).

عصاره خوشاریزه از ۵ به ۱۵ درصد منجر به افزایش معنادار فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم فعال در هر دو روش شد ($p < 0.05$).

جدول ۳. نتایج میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه-های فیلم فعال پاتوژن های منتخب

تیمارها	DPPH (mg/ml)	ATBS (mg/ml)
C0	$153/0.3 \pm 3/49^a$	$111/20 \pm 7/34^a$
T1	$119/73 \pm 3/76^b$	$89/67 \pm 1/74^b$
T2	$55/54 \pm 0/81^c$	$42/31 \pm 0/77^c$
T3	$43/60 \pm 0/28^d$	$24/18 \pm 0/07^d$
T4	$22/73 \pm 0/28^e$	$17/06 \pm 0/06^e$

C0: نمونه شاهد (ژلاتین) / T1: ژلاتین + کیتوزان / T2: ژلاتین + کیتوزان + ۵ درصد نانومولسیون عصاره / T3: ژلاتین + کیتوزان + ۱۰ درصد نانومولسیون عصاره / T4: ژلاتین + کیتوزان + ۱۵ درصد نانومولسیون عصاره

* نتایج در سه تکرار گزارش شده است (n=3).

* حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در هر ستون است (0.05).

بحث

گیاه *E. platyloba* یا همان گیاه خوشاریزه سرشار از طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه مانند تانن ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها نظیر اسیدهای کربوکسیلی، لینالول، اوژنول، سیترونلول، فarnesol، نرول، ترپن ها، میرسن، کرسستین، کامفرول بوده که خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی آنها تأیید شده است (Pilevar et al., 2024). مطابق نتایج کروماتوگرام (شکل ۱) شش ترکیب فنلی و فلاونوئیدی Epicatechin، Luteolin، Quercetin، Kaempferol، Apigenin، p-Coumaric acid در عصاره آبی مورد بررسی این مطالعه شناسایی شد. Khedher و همکاران در سال 2021 با بررسی پروفایل فنولی ریشه های *E. spinosissimus* نشان دادند که اسیدهای p-کوماریک و سینامیک به عنوان اسیدهای فنولی غالب و کائمبرول

به عنوان فلاونوئید غالب در عصاره اتانولی شناسایی شدند. Dyankov و همکاران در سال 2025 هفت ترکیب فنلی اسیدهای فنلی کلروژنیک اسید، پارا-کوماریک اسید، فرولیک اسید، سالیسیلیک اسید و رزمارینیک اسید؛ فلاونول گلیکوزید روتین (یا کوئرستین-3-O-روتینوزید) و فلاونون گلیکوزید هسپریدین (یا هسپریتین-7-O-روتینوزید را در عصاره *E. platyloba* گیاه شناسایی کردند. تفاوت در ترکیبات شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات پیشین تأثیر شرایط جغرافیایی را تأیید می کند. مطالعات نشان داده است که نوع، میزان ترکیبات و مواد مؤثره موجود در اسانس و عصاره گیاهان تابع موقعیت جغرافیایی، تغییرات فصلی، فاز رویشی یا زایشی گیاه است (Al-Askar et al., 2023). ترکیبات فنلی، متابولیت های ثانویه ای هستند که به طور گسترده در بافت های گیاهی یافت می شوند و می توانند به عنوان عوامل کاهنده در برابر گونه های فعال اکسیژن/نیتروژن که گفته می شود باعث آسیب اکسیداتیو در بافت بدن می شوند، عمل کنند (Arjeh et al., 2022). فلاونوئیدها نیز خانواده ای از ترکیبات فنلی طبیعی با پراکندگی وسیع هستند که به عنوان متابولیت های ثانویه در پاسخ به عوامل زیستی و غیرزیستی تولید می شوند. این ترکیبات، همراه با سایر فنول ها، دارای فعالیت های زیستی مهمی از جمله اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد پلاکتی و سایر خواص درمانی هستند (Kozłowska and Szostak-Węgierek, 2018). محتوی فنل و فلاونوئید عصاره خوشاریزه مورد بررسی در این مطالعه به ترتیب برابر با ۱۸/۷۵ mgGAE/ml و ۸/۳۳ mgQUE/ml بود. Khazai و همکاران در سال 2011 گزارش کردند محتوی فنل کل و فلاونوئید عصاره های متانولی، هیدروالکلی و آبی خوشاریزه را به ترتیب در بازه بین



شکل ۳-B اندازه‌گیری‌های انجام‌شده (۷۶/۹۸۸، ۸۳/۴۴۲ و ۹۱/۵۸۹ نانومتر) تأیید می‌کنند که ذرات در محدوده مطلوب نانو قرار دارند و نشان‌دهنده پایداری فیزیکی، قابلیت نفوذ بالا، و امکان استفاده در سیستم‌های زیست‌فعال مانند بسته‌بندی‌های هوشمند یا حامل‌های دارویی است (Langaroudi and Kazemi, 2019). ساختار یکنواخت و توزیع مناسب ذرات در هر دو تصویر، نشان‌دهنده اثربخشی روش تهیه نانومولسیون در این مطالعه است که منجر به کاهش اندازه ذرات و افزایش پایداری سیستم شده است. چنین ساختاری می‌تواند موجب افزایش فراهمی زیستی ترکیبات فعال گیاه خوشاریزه و بهبود عملکرد ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی نهایی شود (Hassanshahian et al., 2020). نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال فیلم‌های فعال به روش قطر عدم هاله رشد (شکل ۴) و تعیین میزان MIC و MBC (جدول ۲) نشان داد که فیلم‌های ژلاتینی خالص فاقد هرگونه فعالیت مهارکننده علیه پاتوژن‌های مورد بررسی بودند. در حالی که با افزودن کیتوزان به ماتریس ژلاتین، فعالیت آنتی‌باکتریال قابل توجهی در فیلم‌ها مشاهده شد. این اثر می‌تواند به دلیل خاصیت کاتیونی کیتوزان نسبت داده شود بطوریکه گروه‌های NH_3 (به عنوان بار مثبت) موجود در مونومر گلوکزآمین در مولکول‌های کیتوزان از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی با بارهای منفی موجود در غشای سلول‌های میکروبی، موجب اختلال در ساختار غشا و نشت اجزای درون‌سلولی می‌شوند. علاوه بر این، نفوذپذیری انتخابی کیتوزان به گازهای اکسیژن و دی‌اکسید کربن منجر به کاهش انتقال اکسیژن محصولات غذایی می‌شود و در نتیجه، پایداری و ماندگاری آن‌ها را افزایش می‌دهد (Yaghoubi et al., 2021). ز سوی دیگر، فیلم‌های فعال حاوی نانومولسیون عصاره آبی خوشاریزه، افزایش معناداری در فعالیت

۱/۱۸ mg/ml تا ۳/۱۵ و ۸/۱۵ تا ۳/۱۶ قرار داشت. Azadmanesh و همکاران در سال 2025 نشان دادند که میزان فنل کل عصاره *E. platyloba* برابر با μg ۲۵/۸۴ GAE/ml و میزان فلاوونوئید عصاره μg ۵۱/۱۶۴ بود. در شکل ۲، نتایج حاصل از بررسی توزیع اندازه ذرات نانومولسیون‌ها نشان داد که منحنی به‌دست آمده دارای یک پیک منفرد (تک‌قله‌ای) بوده و شاخص پراکندگی اندازه ذرات PDI برابر با ۰/۲۷۱ بود. شاخص PDI بیانگر میزان یکنواختی اندازه قطرات در نانومولسیون است؛ به‌طوری‌که مقدار بالاتر آن نشان‌دهنده پراکندگی بیشتر و یکنواختی کمتر اندازه ذرات می‌باشد (Parseghian et al., 2025). در این مطالعه، مقدار پایین PDI نشان‌دهنده همگنی مطلوب و پایداری کلی نانومولسیون تهیه‌شده بود. فرمولاسیون‌های نانو، بر اساس اندازه قطرات کوچک (در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر)، پایداری ترمودینامیکی بالا، سطح تماس افزایش‌یافته و فراهمی زیستی بهبودیافته، به‌عنوان حامل‌های مؤثر در کاربردهای نگهداری مواد غذایی شناخته می‌شوند (Solans et al., 2002). در همین راستا، مطالعات Kebriti و همکاران در سال 2025 و Moazzezi و همکاران و در سال 2024 نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند که مؤید یافته‌های این تحقیق است.

در تصاویر SEM نانومولسیون‌های خوشاریزه (شکل ۳-A) تجمعی از ذرات کروی با سطح نسبتاً صاف مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده موفقیت در تشکیل نانومولسیون پایدار با استفاده از سورفکتانت‌های طبیعی موجود در عصاره گیاه است (Hassanshahian et al., 2020). این مورفولوژی کروی و یکنواخت، بیانگر توزیع مناسب فاز روغنی در ماتریس آبی و کاهش کشش سطحی بین فازهاست (Wang et al., 2023). در



آنتی‌باکتریال نشان دادند که این اثر به صورت وابسته به غلظت نانومولسیون گزارش شد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌های گیاهی، از طریق مکانیسم‌های گوناگون در مهار رشد میکروارگانیسم‌ها نقش دارند. این مکانیسم‌ها شامل اختلال در انتشار سلولی، تداخل با عملکرد غشای سلولی (مانند انتقال الکترون، نشت مواد مغذی و اختلال در تعادل یونی)، ممانعت از سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، مهار فعالیت آنزیمی، برهم‌کنش با پروتئین‌های غشایی و جایگزینی گروه‌های آلکیل با هسته فنلی می‌باشند. این مجموعه مکانیسم‌ها موجب آسیب ساختاری و عملکردی به سلول‌های میکروبی شده و در نهایت منجر به توقف رشد یا مرگ آن‌ها می‌گردد (Lima et al., 2020). نانومولسیون‌ها با ایجاد اختلال در غشای بیرونی، اثرات مهارکنندگی گسترده‌ای در برابر باکتری‌ها، ویروس‌های دارای پوشش و قارچ‌ها دارند. نانومولسیون‌ها از نظر ترمودینامیکی برای همجوشی با غشای لیپیدی مناسب هستند و این اثر با جذب الکترواستاتیکی بین بار کاتیونی نانومولسیون و بار آنیونی در پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد و بنا به همین دلیل منجر به لیز سلولی و مرگ پاتوژن می‌گردد (Dabowl et al., 2021). مطابق نتایج آزمون‌های آنتی‌باکتریال فیلم‌های فعال، میزان حساسیت پاتوژن‌ها به ترتیب شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* > *لیستریا مونوسیتوژنز* > *اشریشیا کلی* > *سالمونلا تیفی* موریوم بود. این تفاوت در حساسیت را می‌توان به ساختار و ترکیب مولکولی دیواره سلولی باکتری‌ها نسبت داد. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره‌ای ضخیم از پپتیدوگلیکان هستند که فاقد غشای خارجی بوده و در نتیجه، نفوذ ترکیبات زیست‌فعال به داخل سلول آسان‌تر صورت می‌گیرد. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی دارای ساختاری پیچیده‌تر

هستند که شامل دو غشای لیپیدی مجزا (غشای سیتوپلاسمی و غشای بیرونی) و یک لایه نازک از پپتیدوگلیکان در میان آن‌هاست. در نتیجه غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی به عنوان یک مانع انتخابی عمل کرده و از ورود بسیاری از ترکیبات فعال جلوگیری می‌کند (Epan et al., 2016). مطالعات Mathiazhagan و همکاران در سال 2021 و Bonilla و همکاران در سال 2014 نیز تأیید کرده‌اند که باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری در برابر فیلم‌های فعال حاوی نانومولسیون‌های گیاهی از خود نشان می‌دهند. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا بود. مطالعات نشان داده ترکیبات فنلی (مانند اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌ها) موجود در عصاره گیاهان از طریق مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و جلوگیری از تشکیل ROS با شلاته کردن یون‌های فلزی، مهار آنزیم، انتقال اتم هیدروژن، انتقال الکترون تکی و غیره فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (Truong et al., 2018). نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های فعال با استفاده از روش‌های DPPH و ABTS نشان داد که افزودن ماتریس پلیمری کیتوزان و نانومولسیون عصاره آبی خوشاریزه به فرمولاسیون فیلم‌ها، منجر به افزایش معنادار فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شد. این افزایش به‌ویژه در نمونه‌هایی که حاوی نانومولسیون در غلظت‌های بالاتر بودند، مشهودتر بود. نشان داده شده که کیتوزان دارای فعالیت مهارکنندگی تأیید شده علیه گونه‌های مختلف رادیکال است. این خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عوامل ساختاری مانند درجه داکتیلاسیون و وزن مولکولی کیتوزان وابسته است؛ به‌طوری‌که افزایش درجه داکتیلاسیون موجب افزایش تراکم گروه‌های آمینی ($-NH_2$) در زنجیره پلیمری شده و نقش کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌ها ایفا می‌کند.



- applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **288**, p.138717.
- Adil, M., Filimban, F.Z., Ambrin, Quddoos, A., Sher, A.A. and Naseer, M., 2024. Phytochemical screening, HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant effect of *Euphorbia parviflora* L.(Euphorbiaceae Juss.). *Scientific reports*, **14**(1), p.5627.
 - Al-Askar, A.A., Bashir, S., Mohamed, A.E., Sharaf, O.A., Nabil, R., Su, Y., Abdelkhalek, A. and Behiry, S.I., 2023. Antimicrobial efficacy and HPLC analysis of polyphenolic compounds in a whole-plant extract of *Eryngium campestre*. *Separations*, **10**(6), p.362.
 - Arjeh, E., Khodaei, S.M., Barzegar, M., Pirs, S., Karimi Sani, I., Rahati, S. and Mohammadi, F., 2022. Phenolic compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties. *Food science & nutrition*, **10**(12), pp. 4238-4246
 - Bahramian, B., Abedi-Firoozjah, R., Kiani-Salmi, N., Ebrahimi, A., Oladzadabbasabadi, N., Moradiyan, M.H., Khezerlou, A., Mazloomi, S.M., Ehsani, A. and Tavassoli, M., 2025. Development of polycaprolactone-based electrospun nanofiber incorporated lemon beebrush essential oil-loaded metal-organic frameworks as a novel active food packaging for meat preservation. *Food Control*, **168**, p.110981.
 - Dabowl, A.E. and Mohsenzadeh, M., 2021, December. Physicochemical, antioxidant, antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* essential oil nanoemulsion on *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 12, No. 4, p. 437).
 - de Souza Iacia, M.V.M., Mendes, M.E.F., de Oliveira Vieira, K.C., Ruiz, G.C.M., Constantino, C.J.L., da Silva Martin, C., Job, A.E., Nai, G.A. and Eller, L.K.W., 2024. Evaluation of curcumin nanoemulsion effect to prevent intestinal

این گروه‌های فعال می‌توانند از طریق اهدای پروتون یا الکترون، رادیکال‌های آزاد را غیرفعال کنند (Sousa et al., 2009). از سوی دیگر محتوای فنلی بالا در عصاره‌های گیاهی نقش مهمی در افزایش ظرفیت حذف رادیکال آزاد توسط فیلم‌های فعال ایفا می‌کند (Sadadekar et al., 2023). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های فعال حاوی نانوامولسیون‌های گیاهی نیز در مطالعات متعدد مورد تأیید قرار گرفته است (Nasution et al., 2024; Ghasemi Pirbalouti et al., 2016).

نتیجه‌گیری کلی

فرمولاسیون فیلم‌های فعال بر پایه کیتوزان و ژلاتین، همراه با نانوامولسیون عصاره *E. platyloba*، منجر به بهبود معنادار خواص عملکردی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی شد. افزایش غلظت نانوامولسیون موجب ارتقاء ظرفیت حذف رادیکال‌های آزاد و فعالیت ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های غذایی گردید. ساختار نانومتری ذرات، یکنواختی سطحی و شاخص پراکندگی پایین، پایداری فیزیکی نانوامولسیون را تأیید کرد. ترکیبات فنلی و کاتیونی موجود در عصاره و کیتوزان از طریق مکانیسم‌های مولکولی مؤثر، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم‌ها شدند. این نتایج، پتانسیل بالای این فیلم‌های زیست‌پایه را برای جایگزینی بسته‌بندی‌های برپایه نفت در صنایع غذایی نشان می‌دهد.

منابع

- Abedi-Firoozjah, R., Bahramian, B., Tavassoli, M., Ahmadi, N., Noori, S.M.A., Hashemi, M., Oladzadabbasabadi, N., Assadpour, E., Zhang, F. and Jafari, S.M., 2025. A comprehensive review of gum-based electrospun nanofibers for food packaging: Preparation, developments, and potential



- safety. *Packaging Technology and Science*, **38**(2), pp.145-162.
15. Khedher, O., Rigane, G., Riguene, H., Ben Salem, R. and Moussaoui, Y., 2021. Phenolic profile (HPLC-UV) analysis and biological activities of two organic extracts from *Echinops spinosissimus* Turra roots growing in Tunisia. *Natural Product Research*, **35**(24), pp.5786-5793
16. Kozłowska, A. and Szostak-Węgierek, D., 2018. Flavonoids—food sources, health benefits, and mechanisms involved. *Bioactive molecules in food*, pp.1-27.
17. Langaroudi, N. and Motakef Kazemi, N., 2019. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomedicine Research Journal*, **4**(1), pp.48-55.
18. Liang, S., Wang, X., Wei, C., Xie, L. and Dang, X., 2025. Engineering a natural multifunctional biomass-based composite nanosystem for active smart packaging and colorimetric labels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **13**(8), pp.3066-3077.
19. Lima, A.S., Maia, D.V., Haubert, L., Oliveira, T.L., Fiorentini, Â.M., Rombaldi, C.V. and da Silva, W.P., 2020. Action mechanism of araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) hydroalcoholic extract against *Staphylococcus aureus*. *Lwt*, **119**, p.108884.
20. Marsup, P., Yeerong, K., Neimkhum, W., Sirithunyalug, J., Anuchapreeda, S., To-Anun, C. and Chaiyana, W., 2020. Enhancement of chemical stability and dermal delivery of *Cordyceps militaris* extracts by nanoemulsion. *Nanomaterials*, **10**(8), p.1565.
21. Mathiazhagan, S., Periasamy, V. and Vadivel, A., 2021. Ecofriendly antimicrobial *Acalypha indica* leaf extract immobilized polycaprolactone nanofibrous mat for food package applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, **45**(4), p.e15302.
8. Dyankov, S., Ivanova, S., Ivanov, K., Slavova, I., Ermenlieva, N., Georgieva, E., Bozhkova, M. and Stamova, S., 2025. Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity of *Echinophora tenuifolia* L. subsp. *sibthorpiana*. *Pharmacia*, **72**, pp.1-7.
9. Epand, R.M., Walker, C., Epand, R.F. and Magarvey, N.A., 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1858**(5), pp.980-987.
10. Ezati, P. and Rhim, J.W., 2020. pH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **230**, p.115638.
11. Ghasemi Pirbalouti, A. and Gholipour, Z., 2016. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Echinophora cinerea* harvested at two phenological stages. *Journal of Essential oil Research*, **28**(6), pp.501-511.
12. Hashem, A.H., Doghish, A.S., Ismail, A., Hassanin, M.M., Okla, M.K., Saleh, I.A., AbdElgawad, H. and Shehabeldine, A.M., 2024. A novel nanoemulsion based on clove and thyme essential oils: Characterization, antibacterial, antibiofilm and anticancer activities. *Electronic Journal of Biotechnology*, **68**, pp.20-30.
13. Hassanshahian, M., Saadatfar, A. and Masoumipour, F., 2020. Formulation and characterization of nanoemulsion from *Alhagi maurorum* essential oil and study of its antimicrobial, antibiofilm, and plasmid curing activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **18**(2), pp.1015-1027.
14. Kadirvel, V., Palanisamy, Y. and Ganesan, N.D., 2025. Active packaging system—an overview of recent advances for enhanced food quality and



- films incorporated with fennel (*Foeniculum vulgare*) essential oil and potato (*Solanum tuberosum*) peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, **60**(3), pp.938-946.
29. Şahin, O., Kanbolat, Ş., Çolak, N.U., Badem, M., Subaş, T., Şener, S.Ö., Korkmaz, N., Kalaycıoğlu, A.T., Öztürk, E., Sayım, A.Ü. and Aliyazıcıoğlu, R., 2025. Investigation of Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Echinophora chrysantha*: Microwave-Assisted Hydrodistillation and SPME Analysis of its Essential Oils. *Chemistry & Biodiversity*, **22**(2), p.e202401366.
30. Shahbazi, Y., Shavisi, N. and Barati, A., 2025. Active packaging nanofiber mats based on xanthan gum-gelatin incorporated with ginger carbon dots and *Ziziphora clinopodioides* essential oil: Properties and shelf-life extension of peeled shrimps. *International Journal of Biological Macromolecules*, p.147152.
31. Solans, C., Esquena, J., Forgiarini, A., Usón Sanchiz, N., Morales, D., Izquierdo, P., Azemar Sazatornil, N. and García-Celma, M.J., 2002. Nano-emulsions: formation, properties, and applications.
32. Song, J., Feng, H., Wu, M., Chen, L., Xia, W. and Zhang, W., 2020. Preparation and characterization of arginine-modified chitosan/hydroxypropyl methylcellulose antibacterial film. *International Journal of Biological Macromolecules*, **145**, pp.750-758.
33. Sousa, F., Guebitz, G.M. and Kokol, V., 2009. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry*, **44**(7), pp.749-756.
34. Teymoorian, M., Moghimi, R., Hosseinzadeh, R., Zandi, F. and Lakouraj, M.M., 2024. Fabrication the emulsion-based edible film containing *Dracocephalum kotschy* Boiss essential oil using chitosan–gelatin composite for grape preservation. *Carbohydrate Polymer*
22. Nasiri, A., 2024. Essential Oil Profile in Different Parts of *Echinophora cinerea* (Boiss). *Agrotechniques in Industrial Crops*.
23. Nasution, H., Harahap, H., Julianti, E., Safitri, A. and Jaafar, M., 2024. Properties of active packaging of PLA-PCL film integrated with chitosan as an antibacterial agent and *syzygium cumini* seed extract as an antioxidant agent. *Heliyon*, **10**(1).
24. Parseghian, L., Behboudi, H., Ebrahimi, S.N. and Rafati, H., 2025. Antiproliferative activity of prepared Aloe vera leaf skin extract-loaded essential oil nanoemulsions using Box-Behnken design. *Industrial Crops and Products*, **228**, p.120928.
25. Pilevar, Z., Martirosyan, D., Ranaei, V., Taghizadeh, M., Balasjin, N., Ferdousi, R. and Hosseini, H., 2024. Biological activities, chemical and bioactive compounds of *Echinophora platyloba* DC: A systematic review. *Bioactive Compounds in Health and Disease-Online* ISSN: 2574-0334; Print ISSN: 2769-2426, **7**(2), pp.95-109.
26. Ponnusamy, A., Khan, A., Prodpran, T., Kim, J.T., Benjakul, S. and Rhim, J.W., 2025. Active packaging film based on chitosan/gelatin blend incorporated with mango peel carbon dots: Properties and shelf-life extension of minced pork. *International Journal of Biological Macromolecules*, **288**, p.138692.
27. Royani, A., Hanafi, M., Lotulung, P.D.N., Julistiono, H., Dinoto, A. and Manaf, A., 2023. Analysis of the antibacterial activity and the total phenolic and flavonoid contents of the *moringa oleifera* leaf extract as an antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientifica*, **2023**(1), p.5782063.
28. Sadadekar, A.S., Shruthy, R., Preetha, R., Kumar, N., Pande, K.R. and Nagamaniammai, G., 2023. Enhanced antimicrobial and antioxidant properties of Nano chitosan and pectin based biodegradable active packaging



38. Xu, X., Xi, Y. and Weng, Y., 2025. Gelatin-based materials: fabrication, properties and applications in the food packaging system. *RSC advances*, 15(37), pp.30605-30621.
39. Yaghoubi, M., Ayaseh, A., Alirezalu, K., Nemati, Z., Pateiro, M. and Lorenzo, J.M., 2021. Effect of chitosan coating incorporated with *Artemisia fragrans* essential oil on fresh chicken meat during refrigerated storage. *Polymers*, 13(5), p.716.
40. Zhao, J., Yang, H., Li, C., Xu, Z., Shan, P., Fu, C., Tao, Y., Hu, J., Wang, H. and Du, J., 2025. Eco-friendly chitosan-based composite film with anti-dissolution capacity as active packaging for fruit preservation. *Food Hydrocolloids*, 163, p.111146.
- Technologies and Applications*, 7, p.100444.
35. Truong, V.L., Jun, M. and Jeong, W.S., 2018. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44(1), pp.36-49.
36. Wagh, R.V., Priyadarshi, R., Khan, A., Riahi, Z., Packialakshmi, J.S., Kumar, P., Rindhe, S.N. and Rhim, J.W., 2025. The role of active packaging in the defense against foodborne pathogens with particular attention to bacteriophages. *Microorganisms*, 13(2), p.401.
37. Wang X, Anton H, Vandamme T, Anton N. Updated insight into the characterization of nano-emulsions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2023 Jan 2;20(1):93-114.



Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of gelatin/chitosan film activated with nano-emulsion of *Eryngium platyloba* extract against *in vitro* foodborne pathogens

Melika Jenabi¹, Moslem Neyriz-Naghadehi¹, Zohreh Meshak^{*2}

¹ Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

² Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 15 September 2025 Accepted: 13 November 2025

Abstract

Due to environmental and safety concerns associated with petroleum-based packaging, the use of bioactive films derived from natural sources has gained attention as a sustainable alternative in the food industry. This study aimed to evaluate the effect of nano-emulsion containing *Eryngium platyloba* extract on the functional properties of gelatin/chitosan-based films. The nano-emulsion was prepared using magnetic stirring and ultrasound techniques. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the aqueous extract identified six phenolic compounds: Epicatechin (99.45 ppm), Apigenin (56.41 ppm), Kaempferol (56.33 ppm), Quercetin (78.31 ppm), Luteolin (66.20 ppm), and p-Coumaric acid (66.20 ppm). The total phenolic and flavonoid contents of the extract were measured as 18.75 mg GAE/ml and 8.33 mg QUE/g, respectively.

Scanning electron microscopy (SEM) images confirmed that the nano-emulsion particles were spherical, smooth-surfaced, and well-dispersed within the packaging film matrix. A low polydispersity index ($PDI < 0.3$) indicated good physical stability of the nano-emulsion. Five film formulations were developed: Co (gelatin only), T1 (gelatin + chitosan), and T2, T3, T4 containing 5%, 10%, and 15% (w/w) nano-emulsion, respectively. Antibacterial and antioxidant assays revealed that films containing the nano-emulsion—particularly at 15% concentration (T4)—exhibited significant antibacterial activity against selected foodborne pathogens in the following order: *S. aureus* > *L. monocytogenes* > *E. coli* > *S. typhimurium*. Furthermore, antioxidant activity assessed via DPPH and ABTS assays showed a statistically significant increase in radical scavenging capacity with higher nano-emulsion concentrations. Overall, the results demonstrate the effectiveness of *Eryngium platyloba* nano-emulsion in enhancing the bio functional performance of packaging films and suggest its potential as a natural and sustainable alternative to synthetic preservatives in the food industry.

Keywords: Food Packaging, Biodegradable, Active Film, Nano-emulsion, *Eryngium platyloba*

* Corresponding Author: Zohreh Meshak

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Email: mashak@kiaau.ac.ir; ORCID: 0000-0002-6814-6300

ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدایه های اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده در اصفهان

دانیال گل کاریان^۱، مجید غلامی آهنگران^{۲*}، آسیه احمدی دستگردی^۳

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

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

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

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۸

چکیده

در این مطالعه ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلی از لاشه قناری های تلف شده و ۲۲ جدایه اشریشیا کلی از سواب کلواک قناری های به ظاهر سالم مورد مطالعه قرار گرفت. پس از تایید باکتری، با تست های میکروبی و بیوشیمیایی، مقاومت جدایه ها نسبت به سفوتاکسیم مشخص شد و با دیسک های ترکیبی با کلاولانیک اسید به شناسایی موارد اشریشیا کلی تولید کننده ESBL پرداخته شد. جدایه های مولد بتالاکتاماز از نظر ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد از مجموع ۱۰۰ سویه اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده، ۲۰ جدایه از نظر فنوتیپی قادر به تولید بتالاکتاماز می باشد. از ۲۰ جدایه تولید کننده بتالاکتاماز، ۱۳ جدایه قادر به تکثیر قطعات ژنومی حاوی ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV می باشند. بیشترین ژن بتالاکتاماز ردیابی شده در هر دو گروه پرندگان زینتی از نوع blaCTX می باشد و ژن blaSHV در هیچ کدام از پرندگان ردیابی نشد. در سویه های اشریشیا کلی جدا شده، درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم با ردیابی ژن blaCTX ارتباط دارد به طوریکه تمامی جدایه های مقاوم واجد ژن blaCTX بودند. با توجه به شیوع سویه های مولد بتالاکتاماز در اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده و امکان انتقال این ژن ها همراه با سایر ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی به سایر باکتری ها لازم است در درمان پرندگان زینتی از آنتی بیوتیک های مجاز و با رعایت دوز و دوره مصرف استفاده نمود. بطور کلی، به نظر می رسد استفاده نادرست از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می تواند منشأ شکل گیری و انتشار سویه های مولد بتالاکتاماز در پرندگان زینتی باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی، بتالاکتاماز، قناری، مقاومت آنتی بیوتیکی

*نویسنده مسئول: مجید غلامی آهنگران

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

پست الکترونیک: mgholami6@gmail.com

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از باکتری های گرم منفی که عموماً در دستگاه گوارش حیوانات خونگرم و انسان یافت می شود. در هر گرم مدفوع یک تا صد میلیون اشریشیا کلی وجود دارد که حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد آنها بیمارزا هستند (Gholami-Ahangaran et al., 2022). این باکتری می تواند در پرندگان باعث عوارضی شود که اصطلاحاً به آن کلی باسیلوز می گویند. کلی باسیلوز چهره های متفاوتی دارد که از مهم ترین آن ها می توان به کلی سپتی سمی، عفونت کیسه زرده، سلولیت، سندرم تورم سر، کلی گرانولوما، تورم ناف، تورم مفصل، پن افتالمیت و مشکلات گوارشی (انتریت) اشاره کرد (Nolan et al., 2013).

عفونت کلی باسیلوز در پرندگان از نظر اقتصادی بسیار اهمیت دارد. هزینه های درمان، تلفات، و عقب افتادگی از رشد از عواقب این بیماری در پرورش پرندگان زینتی است. همچنین، ممکن است در بسیاری از بیماری های پرندگان این باکتری به عنوان یک عامل ثانویه اضافه شود و بیماری را پیچیده کند (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). عموماً در پرندگان با مشاهده هر یک از علائم کلی باسیلوز به درمان رو می آورند و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مورد استفاده قرار می گیرد. با این حال ممکن است سویه های شایع از حدت بالایی برخوردار باشند و یا نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک های تجاری مقاوم باشند و درمان با شکست مواجه شود (Gholami-Ahangaran et al., 2021b). استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف به طور متوالی، به میزان زیاد و بدون تجویز دامپزشک متخصص می تواند منجر به پیدایش سویه های مقاوم شود که علاوه بر مشکل سازی درمان در بیماری های پرندگان زینتی، احتمال انتقال آن ها از پرندگان زینتی به صاحبان پرنده

در اثر تماس های نزدیک امکان پذیر است (Akond, 2009).

آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (Extended Spectrum Beta-Lactamase; ESBL)، یک آنزیم موتاسیون یافته بتالاکتاماز است که باعث غیرفعال شدن آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود. ژن های ESBL قدرت بالایی در هیدرولیز نسل سوم سفالوسپورین ها دارند. ژن های اصلی ESBL شامل bla_{TEM} ، bla_{CTX} و bla_{SHV} هستند که به ترتیب می توانند سفوتاکسیماز، تمونریا و سولفهیدریل را کد کنند (Paterson and Bonomo, 2005). ESBL به طور معمول توسط باکتری های انتروباکتریاسه مخصوصاً اشریشیا کلی و کلبسیلا تولید می شود. اشریشیا کلی که بسیار به مقاوم شدن حساس است می تواند ژن های کد کننده ESBL را دریافت کند و تولید آنزیم بتالاکتاماز کند. معمولاً باکتری های واجد ژن های ESBL علیه آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون ها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و سولفامتوکسازول + تری متوپریم مقاوم می شود (Singh, 1999). شواهد زیادی وجود دارد که بیان می کند ژن های مقاومت از منابع غذایی از جمله گوشت طیور و یا سایر منابع آلودگی به فلور و باکتری های دیگر انسانی منتقل می گردد (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). از آن جایی که ژن های تولید کننده بتالاکتاماز بر روی پلاسمیدها هستند امکان انتقال این ژن های مقاومت به سادگی امکان پذیر است. انتقال ژن های مقاومت می تواند در عدم پاسخ مناسب به درمان، در بیماری های عفونی انسان حایز اهمیت باشد و درمان بیماری های عفونی را در انسان با مشکل مواجه کند. اشریشیا کلی مولد ESBL در محیط و بیماری های عفونی دام و پرندگان یک خطر بالقوه برای سلامتی انسان است و احتمال انتقال مقاومت آنتی بیوتیک ها را



به انسان افزایش می دهد (Paterson and Bonomo, 2005). از آنجایی که معمولاً رابطه عاطفی و نزدیکی بین پرندگان زینتی و صاحبان آنها وجود دارد به نظر می رسد پرندگان زینتی می توانند به عنوان یک منبع آلودگی برای انسان خصوصاً کودکان مطرح باشند (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). از طرفی مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها می تواند در میزان شیوع این گونه مقاومت ها در پرندگان زینتی نقش عمده ای داشته باشد. لذا در این بررسی به بررسی الگوی ژن های مولد بتالاكتاماز به عنوان یکی از مکانیسم های مهم مقاومت در اشریشیاکلی پرداخته می شود تا میزان فراوانی این ژن ها در قناری های آلوده به کلی باسیلوز بررسی و مقایسه قرار گیرد و احتمال آلودگی قناری با اشریشیاکلی بیماریزای حامل ژن های مولد ESBL مورد بررسی قرار گیرد

مواد و روش ها نمونه گیری

در این بررسی از ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی به دست آمده از ۱۲۰ قناری تلف شده در استان اصفهان استفاده شد. به این ترتیب که پس از کالبدگشایی پرندگان تلف شده و سوزاندن سطح قلب و کبد، از بافت قلب و کبد با سواب استریل نمونه گیری شد و سواب ها در نوترینت براث به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه ها بر روی محیط کشت مک کانکی به صورت خطی کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. علاوه بر آن، ۲۲ جدایه اشریشیاکلی از ۱۲۰ سواب کلواک پرندگان به ظاهر سالم موجود در پرند فروشی ها تهیه شد.

جداسازی و شناسایی اشریشیاکلی

در صورت رویت شدن پرگنه های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ) روی محیط کشت مک کانکی، از پرگنه های مشکوک بر روی محیط EMB به صورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی نمودند به صورت اولیه به عنوان باکتری اشریشیاکلی شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه ها تست های افتراقی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سیترات (IMVIC) انجام شد. در صورتی که از لحاظ تست های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سیترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی بودند به عنوان اشریشیاکلی شناسایی شدند (Feng et al., 2002).

شناسایی فنوتیپی جدایه های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف

پس از شناسایی، تایید و خالص سازی پرگنه های اشریشیاکلی، حساسیت آنها نسبت به سفنازیدیم (CAZ, 30µg) و سفوتاکسیم (CTX, 30µg) بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) بررسی گردید. بر اساس توصیه این موسسه، سویه هایی که قطر هاله ممانعت کنندگی آنها برای سفنازیدیم کمتر یا مساوی ۲۲ میلیمتر و برای سفوتاکسیم کمتر یا مساوی ۲۷ میلی متر باشد از نظر این آنتی بیوتیک ها مقاوم شناخته می شود (Shaheen et al., 2011).

طبق دستورالعمل CLSI شناسایی جدایه های واجد بتالاكتاماز وسیع الطیف (ESBL)، بر اساس اختلاف اندازه قطر هاله مهار کنندگی آنتی بیوتیک های ترکیبی با آنتی بیوتیک های غیر ترکیبی صورت می پذیرد. براساس دستور العمل CLSI چنانچه هاله ممانعت کنندگی رشد در اطراف دیسک سفنازیدیم /



کلاولانیک اسید (CAZ+C, 30+10 μ g) نسبت به سفنازیدیم (CAZ, 30 μ g) بیشتر یا مساوی ۵ میلیمتر و یا هاله ممانعت کنندگی رشد در اطراف دیسک سفوناکسیم / کلاولانیک اسید (CTX+C, 30+10 μ g) نسبت به سفوناکسیم (CTX, 30 μ g) بیشتر یا مساوی ۵ میلی متر باشد تایید کننده این است که سویه باکتری تلقیح شده تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) می باشد (Paterson and Bonomo, 2005).

در تست های تشخیصی سویه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) به عنوان کنترل مثبت و /شریشیا کلی (25922ATCC) به عنوان کنترل منفی (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) بر اساس توصیه CLSI استفاده گردید.

شناسایی ژنوتیپی جدایه های /شریشیا کلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)

در مرحله اول استخراج DNA از جدایه های مورد نظر به روش جوشاندن طبق دستورالعمل انجام شد (Ghaolami-Ahangaran and Zia-Jahromi, 2014).

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل PCR buffer (۵۰ میلی مول KCL، ۵۰ میلی مول Tris HCL و ۵۰ میلی مول کلرید منیزیم) (۲۰ میکرو لیتر)، dNTPs (۱/۵ میکرو لیتر) (۲/۰ میلی مول)، هر یک از پرایمرها (۱ میکرو لیتر)، Taq DNA polymerase (۰/۵ میکرو لیتر) (Fermentase)، DNA، استخراج شده (۲۰۰ نانومول) (۱ میکرو لیتر) بود. پرایمرهایی که ژن *bla*_{CTX}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} را مورد هدف قرار می دهند محصول ۲۱۴، ۸۴۷ و ۵۹۰ جفت بازی تکثیر می کنند (Acikgoz et al., 2007; Damborg et al., 2016; Junyoung et al., 2009). تکثیر ژن های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف

- آلمان) با برنامه ی سیکل های حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{TEM})، ۶۰ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{CTX}) و ۶۱ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{SHV}) به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله ی بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. دراین بررسی از نشان گر 100bp جهت مشخص نمودن اندازه ی محصول PCR استفاده شد.

در هر مرحله ۲۰ میکرومول از محصول PCR روی ژل یک درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل قرائت می شود.

از ۱۲۰ سواب تهیه شده از کلواک پرندگان سالم ۲۲ سویه اشیریشیا کلی (۲۲ درصد) بر مبنای خصوصیات کشت میکروبی و تست های بیوشیمیایی جدا شد. ۱۰۰ جدایه اشیریشیا کلی تهیه شده از قناری های تلف شده، همگی در محیط مک کانکی به صورت پرگنه های ارغوانی خالص سازی شدند و در محیط EMB رنگ سبز متالیک نشان دادند. در تست های افتراقی IMVIC نیز توانستند تولید ایندول کنند و متیل رد را احیا کنند اما از لحاظ تست های VP و احیای سیترات منفی بودند.

هیچکدام از جدایه های تهیه شده از کلواک پرندگان سالم در تست ترکیبی به عنوان مولد بتالاکتاماز شناخته نشدند. در مجموع ۲۰ جدایه (از ۱۰۰ جدایه اشیریشیا کلی تهیه شده از پرندگان تلف شده) در تست ترکیبی به عنوان سویه های اشیریشیا کلی مولد ESBL شناسایی شدند (۲۰ درصد). از ۲۰ جدایه مولد بتالاکتاماز ۱۰ جدایه با تولید قطر هاله کمتر از ۲۷ میلی متر نسبت به



ردیابی ژن های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف در جدایه های اشریشیاکلی... (گلکاریان و همکاران).....

سفوتاکسیم و با قطر هاله کمتر از ۲۲ میلی متر مقاوم به سفتازیدیم شناخته شدند.

از ۲۰ جدایه اشریشیا کلی مولد ESBL از لحاظ فنوتیپی، ۱۳ جدایه در تعیین ژنوتیپ سویه های مولد ESBL، توانستند ژن های blaCTX، blaTEM و blaSHV را تکثیر کنند (۶۵ درصد جدایه های اشریشیاکلی مولد بتالاكتاماز). تمامی جدایه هایی که از لحاظ ژنوتیپی واجد ژن های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف شناخته شدند در تست ترکیبی نیز مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف شناخته شدند اما ۷ جدایه از مجموع ۲۰ جدایه اشریشیا کلی مولد

بتالاكتاماز وسیع الطیف واجد هیچ کدام از ژن های blaCTX، blaTEM و blaSHV نبودند.

در این بررسی، از مجموع ۱۳ جدایه واجد ژن های مولد ESBL، ۴ جدایه با تکثیر قطعه ۸۴۷ جفت بازی واجد ژن (blaTEM/۳۰ درصد) و ۹ جدایه با تکثیر قطعه ۲۱۴ جفت بازی حامل ژن (blaCTX/۶۹ درصد) بودند. هیچ سویه ای نتوانست قطعه ۵۹۰ جفت بازی مربوط به ژن blaSHV را تکثیر کند و در هیچ جدایه ای دو یا سه ژن مولد ESBL به طور همزمان و توأم ردیابی نشد.

جدول ۱- خصوصیات پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن های ESBL

نام ژن	توالی پرایمر (جهت ۵' به ۳')	اندازه محصول (جفت بازی)	دمای همسرشت سازی (°C)	منبع
<i>blaCTX-M-F</i>	5GATGAACGCTTTCCCATGATG3	۲۱۴	۶۰	(Acikgoz et al., 2007)
<i>blaCTX-M-R</i>	5CGCTGTTATCGCTCATGGTAA3			
<i>blaSHV-F</i>	5GATGAACGCTTTCCCATGATG3	۵۹۰	۶۱	(Junyoung et al., 2009)
<i>blaSHV-R</i>	5CGCTGTTATCGCTCATGGTAA3			
<i>blaTEM-F</i>	5ATGAGTATTCAACATTTCCG3	۸۴۷	۵۸	(Yazdi et al., 2010)
<i>blaTEM-R</i>	5GTCACAGTTACCAATGCTTA3			

جدول ۲- فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه های اشریشیا کلی مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف

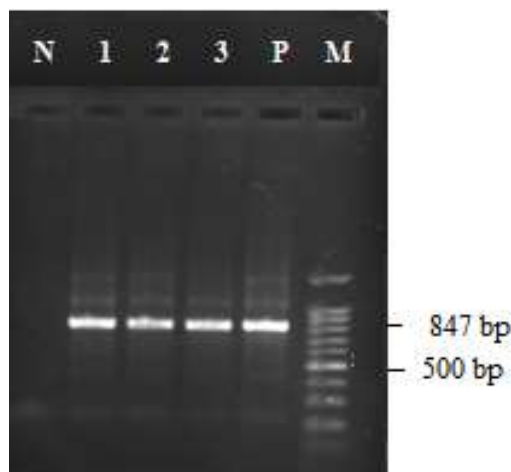
تعداد جدایه / اشریشیاکلی مورد بررسی	فراوانی فنوتیپی جدایه های ESBL	فراوانی ژنوتیپی جدایه های ESBL	فراوانی ژن های کد کننده ESBL
۱۰۰	۲۰	۱۳	۴ <i>blaTEM</i>
			۹ <i>blaCTX</i>
			۰ <i>blaSHV</i>

بحث

باکتری های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها از طریق غذا یا تماس مستقیم با میزبان آلوده به انسان منتقل می شوند. همچنین، باکتری های مقاوم به عنوان ناقل ژن های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها ژن های مقاومت را به سایر عوامل بیماری زا منتقل می کنند (Akond, 2009).

در بین ژن های مولد ESBL ژن blaCTX بیشترین درصد را به خود اختصاص داده است (۶۹/۲ درصد) (نمودار ۱). ۹۰ درصد جدایه های مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم واجد ژن blaCTX بودند (۹ سویه از ۱۰ جدایه مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم).



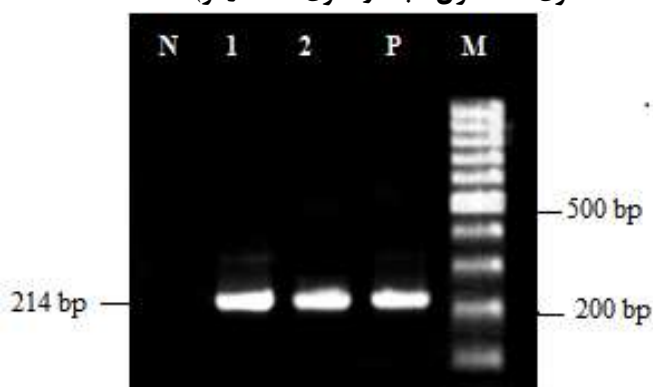


تصویر ۱- ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۸۴۷

جفت بازی ژن *bla*_{TEM}

(ستون N: کنترل منفی، ستون ۱ تا ۳: نمونه های مثبت،

ستون P: کنترل مثبت و ستون M: مارکر)



تصویر ۲- ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۲۱۴ جفت

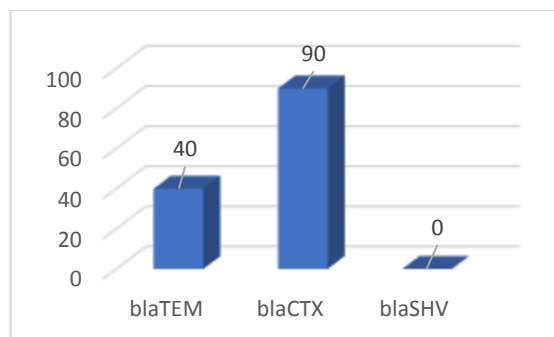
بازی ژن *bla*_{CTX}

(ستون N: کنترل منفی، ستون ۱ و ۲: نمونه های مثبت،

ستون P: کنترل مثبت و ستون M: مارکر)

مطابق با نتایج این مطالعه، برخی مطالعات در مورد جداسازی /شریشیا کلی از نمونه های مدفوع پرندگان وجود دارد (Giacopello et al., 2015; Hidasi et al., 2013). بلزا و همکاران (۲۰۱۹) اظهار داشتند که ۴۸ مورد از ۸۸ نمونه مدفوع قناری از نظر باکتری های *انتروباکتریاسه* مثبت بودند (۵۴/۵ درصد) و /شریشیا کلی از ۴/۵ درصد (۴ نمونه از ۸۸ نمونه) باکتری های *انتروباکتریاسه* جدا شد (Beleza et al., 2019). یافته های مشابه نیز گزارش شده است که ۳/۶ درصد سواب کلوآک قناری های ظاهراً سالم در بلژیک حامل *شریشیا* کلی بودند. (Horn et al., 2015). در مقابل،

تماس نزدیک با پرندگان خانگی یا مدفوع آنها منجر به انتقال و جایگزینی باکتری های مقاوم در دستگاه گوارش می شود که به دنبال آن ژن های مقاوم به فلور میکروبی انسان انتقال می یابد (Van den Bogaard et al., 2001). فلور دستگاه گوارش در اثر انتقال پلاسمیدهای کدکننده ژن مقاومت مقاوم می شود (Nijsten et al., 1996). شواهدی مبنی بر اینکه پرندگان و حیوانات منبعی برای /شریشیا کلی در انسان هستند نشان می دهد که باکتری های مقاوم به دارو ممکن است از حیوانات به انسان و بالعکس از طریق غذای آلوده، محیط و یا از طریق تماس منتقل شوند (Akond, 2009; Damborg et al., 2016). علاوه بر این، درمان نادرست پرندگان خانگی به طور بالقوه مقاومت آنتی بیوتیکی را افزایش می دهد (Giacopello et al., 2015).



نمودار ۱- درصد ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدایه های *شریشیا* کلی

در مطالعه حاضر، به طور متوسط ۲۲ درصد (۲۲ از ۱۰۰) از نمونه های سواب کلوآکی جمع آوری شده از پرندگان سالم به عنوان /شریشیا کلی شناسایی شده است.

برخی مطالعات فراوانی بالاتر اشریشیاکلی را در پرندگان خانگی نشان داده اند. هیداسی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که اشریشیاکلی از ۳۰۰ نمونه مدفوع پرندگان طوطی سان با فراوانی ۳۳/۸۷ درصد تشخیص داده شده است (Hidasi et al., 2013). همچنین، در گنجشک سانان در ۵۰ نمونه مدفوع قناری با علائم بیماری در ایتالیا ۶۲ درصد اشریشیاکلی جدا شد (Giacopello et al., 2015). بعلاوه، در تحقیق دیگری نشان داده شد که سواب های کلوآکی از گنجشک سانان حاوی درصد بالایی از اشریشیاکلی است (۴۰ درصد) (Gaio et al., 2017). بنابراین می توان بیان کرد که شرایط محیطی و وضعیت بهداشتی که حیوانات خانگی در معرض آن قرار دارند، می تواند بر میزان جداسازی اشریشیاکلی تأثیر بگذارد. با توجه به درصد پایین آلودگی به نظر می رسد پرندگان سالم خانگی فقط تعداد کمی اشریشیاکلی در دستگاه گوارش خود نگه می دارند.

در این مطالعه فراوانی ژنهای bla_{SHV} ، bla_{TEM} ، bla_{CTX} در اشریشیاکلی جدا شده از موارد تلفات قناری ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه اگرچه سویه های اشریشیاکلی جدا شده از سواب کلوآکی فاقد توانایی تولید بتالاكتاماز بودند و ژن های کد کننده ESBL را نداشتند اما ۶۵ درصد جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از قناری های تلف شده از لحاظ فنوتیپی مولد بتالاكتاماز بودند که به شکل کلی تفاوت معنی داری بین این دو گروه از لحاظ فراوانی جدایه های مولد بتالاكتاماز وجود داشت.

در خصوص شناسایی و میزان فراوانی سویه های مولد بتالاكتاماز در پرندگان در کشورهای مختلف گزارشات زیادی وجود دارد. در پرتغال از ۱۶ درصد نمونه های مدفوعی حیوانات وحشی سویه های مولد ESBL جداسازی شد (Costa et al., 2006). در آمریکا

گزارشات متفاوتی از جداسازی سویه های مولد ESBL از حیوانات خانگی وجود دارد که از ۳ درصد تا ۴۰ و ۶۸ درصد متغیر است (Shaheen et al., 2011). در بلژیک، در ۴۵ درصد نمونه های کلوآکی اخذ شده از پنج فارم جوجه گوشتی، سویه های اشریشیاکلی مولد ESBL جدا کردند (Smet et al., 2008). در مطالعه دیگری در ۲۲ فارم از ۲۶ فارم جوجه گوشتی اشریشیاکلی مولد ESBL از سواب کلوآکی جوجه ها جدا شد (Dicrikx et al., 2013). در یک مطالعه در آلمان ۸۶/۶۰ درصد لاشه و ۷۲/۵۰ درصد سکوم واجد باکتری های مولد ESBL بودند که اکثر آن ها را اشریشیاکلی تشکیل می دادند (Reich et al., 2013). به هر حال، جدایه های مولد ESBL در تمام جهان در حال افزایش هستند که می تواند نگرانی هایی را در مورد درمان بیماری های با منشأ اشریشیاکلی در انسان و حیوانات به وجود آورد. ژن های عامل سنتز ESBL واقع شده در پلاسمید می توانند سایر ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی مانند آمینوگلیکوزیدها، تری متوپریم و سولفانامیدها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و کونولون ها را با خود حمل کنند و باعث مقاومت چند دارویی (MDR) شوند و انتخاب داروی آنتی بیوتیکی را در موارد عفونت های باکتریایی دچار مشکل کنند (Yilmaz and Dolar, 2017).

درخصوص میزان فراوانی ژن های تولید کننده ESBL همواره یک تغییر اپیدمیولوژیک در حال انجام است (Jafari et al., 2016). در دهه ۱۹۹۰، اشریشیاکلی حاوی ژن های bla_{SHV} و bla_{TEM} به عنوان اصلی ترین اشریشیاکلی واجد ESBL شناخته می شد اما اکنون bla_{CTX-M} به عنوان شایع ترین ژن ESBL مطرح است که این موضوع از سال ۱۹۸۷ مطرح شده است. در مطالعه اخیر نیز مانند سایر مطالعات قبلی، bla_{CTX} به عنوان ژن غالب ESBL (در ۴۵ درصد سویه های اشریشیاکلی جدا



شده از قناری های تلف شده) شناسایی شد و در وهله بعد، bla_{TEM} در ۲۰ درصد جدایه ها ردیابی شد حال آنکه bla_{SHV} در هیچ جدایه ای ردیابی نشد. در آلمان از پرندگان وحشی فقط سویه های واجد bla_{CTX-M} (Guenther et al., 2007) ردیابی شد. حتی در فرانسه در /شریشیا کلی جدا شده از سواب های کلوای پرندگان به ظاهر سالم نیز bla_{CTX-M1} ردیابی شد (Gilich et al., 2007). در پرتغال در اولین گزارش از سویه های مولد بتالاکتاماز در پرندگان لاشخوار، $bla_{CTX-M15}$ ردیابی شد (Radhouani et al., 2010) و در ترکیه نیز برای اولین بار سویه های مولد ESBL جدا شده از کلوک پرندگان زینتی از نوع bla_{CTX-M1} و $bla_{CTX-M15}$ بود (Yilmaz and Dolar, 2017). در یک مطالعه دیگر، در ۲۲ سویه /شریشیا کلی مقاوم به آمپی سیلین جدا شده از مدفوع جوجه های سالم ۱۷ جدایه واجد ژن bla_{TEM} بوده و در این سویه ها ژن bla_{SHV} ردیابی نشد (Dicrikx et al., 2013). در پرتغال، ۳۸/۲۰ درصد نمونه های مدفوعی جوجه های گوشتی در یک کشتارگاه از لحاظ bla_{CTX-M} و bla_{TEM} مثبت بودند (Costa et al., 2009). لذا در راستای ردیابی bla_{CTX} و عدم ردیابی bla_{SHV} در مطالعه اخیر اکثر مطالعات قبلی نیز با نتایج مطالعه اخیر همراستا است. از آنجاییکه اخیراً گزارشاتی از کشورهای مختلف و از جمله در آلمان و آمریکا از وجود bla_{CTX-M} در سویه های /شریشیا کلی جدا شده از موارد انسانی نیز گزارش شده است، ردیابی این ژن های مقاومت به طور همزمان در پرندگان زینتی می تواند باعث نگرانی انتقال این ژن ها از پرندگان دست آموز به صاحبان آن ها شود به طوریکه محققین در ترکیه نشان دادند که سویه های واجد ژن های bla_{CTX-M1} و $bla_{CTX-M15}$ جدا شده از کلوک پرندگان زینتی با سویه های انسانی که به طور معمول جدا می شود همخوانی دارد (Yilmaz and

Dolar, 2017). همچنین، در نیوزیلند به ارتباط بین جداسازی /شریشیا کلی مولد ESBL از حیوانات خانگی و جداسازی این سویه ها از کسانی که از این حیوانات نگهداری می کردند پرداختند و بیان کردند که ۸ سویه از ۱۸ سویه /شریشیا کلی جدا شده از صاحبان حیوانات و ۵ سویه /شریشیا کلی از ۳۶ سویه جدا شده از حیوانات خانگی مولد ESBL بودند. این محققین بیان کردند که سویه های /شریشیا کلی مولد ESBL در نیوزیلند در ایجاد عفونت های ادرای مقاوم به چند دارو (Multiple Drug Resistance; MDR) نقش دارند (Toombs- Ruane et al., 2020). رخداد همزمان مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز و سایر آنتی بیوتیک ها در سویه های مولد بتالاکتاماز می تواند به دلیل محل قرار گیری مشترک ژن های مقاومت به ESBL و سایر آنتی بیوتیک ها بر روی پلاسمید باشد که در انتقال این پلاسمید ها مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز بروز می کند. به هرحال تفاوت در میزان مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است به دلیل منطقه جغرافیایی و تفاوت فرهنگ استفاده از آنتی بیوتیک ها و روش های مورد مطالعه برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باشد.

به طور کلی، عدم استفاده از داروهای انسانی خصوصاً سفتازیدیم و سفوتاکسیم در درمان بیماریهای عفونی قناری و وجود مقاومت علیه این آنتی بیوتیک ها احتمال انتقال ژن های مقاومت را بیشتر می کند و لازم است مراقبت های بیشتری در خصوص پیشگیری از بیماری های عفونی اعمال شود و با جایگزینی ترکیبات بیولوژیک مطمئن بجای مصرف آنتی بیوتیک ها در پرورش قناری از رشد فزاینده مقاومت آنتی بیوتیکی علیه آنتی بیوتیک های با دامنه وسیع که علیه بیماری های عفونی انسان استفاده می شود، جلوگیری شود.

منابع



9. Feng, P., Weagant, S., and Grant, M. (2002). Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, US FDA Centre for Food Safety and Applied Nutrition Publishing, Maryland, USA.
10. Gaio, F.C. (2017). Isolamento, resistência e caracterização das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em Psitacídeos presentes no centro de triagem de animais silvestres do Ceará. Master's Thesis, Postgraduate Program in Veterinary Science, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. 57p.
11. Gholami-Ahangaran, M., and Zia-Jahromi N. (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). Toxicology and Industrial Health, **30**: 724-727.
12. Gholami-Ahangaran, M., Moravvej, A. H., Safizadeh, Z., Nogoorani, V. S., Zokaei, M., and Ghasemian, S. O. (2021). The evaluation of ESBL genes and antibiotic resistance rate in *Escherichia coli* strains isolated from meat and intestinal contents of turkey in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**: 318.
13. Gholami-Ahangaran, M., Karimi-Dehkordi, M., Miranzadeh-Mahabadi, E., and Ahmadi-Dastgerdi, A. (2021). The frequency of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic pet birds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**: 337.
14. Gholami Ahangaran, M., Zinsaz, P., Pourmahdi, O., Ahmadi-Dastgerdi, A., Ostadpour, M., and Soltani, M. (2022). Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Biofilm of Drinking Water System in Poultry Farms. *Acta Veterinaria Eurasia*, **48**: 64-69.
15. Giacobello, C., Foti, M., Fisichella, V. and Piccolo, F.L. (2015). Antibiotic-resistance patterns of Gram-negative bacterial isolates from breeder canaries (*Serinus canaria domestica*) with clinical disease. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **24**: 84-91.
16. Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M. F., Bertini, A., and Nordmann, P. (2007). Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from
1. Acikgoz, Z.C., Koseoglu, E.O., and Kocagoz, S. (2007). CTX-M-3 Beta lactamase producing *Shigella Sonnei* isolated from pediatric Bacillary Dysentery cases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **61** 135-137.
2. Akond, M. (2009). Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *American Journal of Environmental Sciences*, **5**: 47-52.
3. Argudín, M., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O. and Roisin, S. (2017). Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotic*, **6**: 12.
4. Beleza, AJ., Maciel, WC., Carreira, AS., Bezerra, WG., Carmo, CC., Havt, A., Gaio, FC and Teixeira, RS (2019). Detection of Enterobacteriaceae, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* in canaries (*Serinus canaria*) in northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **39**: 201-208.
5. Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., and Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**: 1311-1312.
6. Costa D., Vinue L., Poeta P., Coelho, AC., Matos, M., Sáenz, Y and Torres, C. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, **138**: 339-344.
7. Damborg, P., Broens, E.M., Chomel, B.B., Guenther, S., Pasmans, F., Wagenaar, J.A. and Guardabassi, L. (2016). Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state of the art and future perspectives for targeted research and policy actions. *Journal of Comparative Pathology*, **155**: 27-40.
8. Dierikx, C., Van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H and Mevius, D. (2013). Extended-spectrum β -lactamase and Ampc β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 60-67.



24. Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, **18**: 657-686.
25. Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Gonçalves, A., Sargo, R., Torres, C. and Poeta, P. (2010). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 171-3.
26. Reich, F., Atanassova, V and Klein, G (2013). Extended-spectrum β -lactamase and Ampc-producing *Enterobacteria* in healthy broiler chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, **19**: 1253-1259.
27. Shaheen B.W., Nayak R., Foley S.L. (2011). Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 5666-5675.
28. Singh, S. (1999). Extended-Spectrum beta-lactamases: An overview. Diagnostic Laboratory Services. INC.
29. Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B. and Butaye, P (2008). Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 1238-1243.
30. Toombs-Ruane, L. J., Benschop, J., French, N. P., Biggs, P. J., Midwinter, A. C., Marshall, J. C., and Douwes, J. (2020). Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-and AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the Same Households. *Applied and Environmental Microbiology*, **86**, 100-111.
31. Van den Bogaard, A.E., London, N. and Driessen, C.A.G.G. and Stobberingh, EE (2001). Antibiotic resistance of fecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**: 763-771.
32. Yazdi, M., Nazemi, A., Mirinargasi, M., Khataminejad, M.R., Sharifi, S., and healthy poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 4681-4685.
17. Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Bethe, A., Friedrich, N. D., Goedecke, A. and Ewers, C. (2010). CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. *Environmental microbiology reports*, **2**: 641-645.
18. Hidasi, HW., Neto, JH and Moraes, DM (2013). Enterobacterial detection and *E. coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. *Journal of Avian Medicine Surgery*, **27**: 166-167.
19. Horn, RV., Cardoso, WM., Lopes, ES., Teixeira, RS., Albuquerque, ÁH., Rocha-e-Silva, RC., Machado, DN and Bezerra, WG (2015). Identification and antimicrobial resistance of members from the *Enterobacteriaceae* family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 552-556.
20. Jafari, RA., Motamedi, H., Maleki, E., Ghanbarpour, R and Mayahi, M (2016). Phylogenetic typing and detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from broiler chickens in Ahvaz., Iran. *Veterinary Research Forum*, **7**: 227-232.
21. Junyoung, K., Semi, J., Hogeun, R., Bokkwon, L., Misun, P., Hoanjong, L., Jina, L., and Seonghan, K. (2009). Rapid Detection of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) for *Enterobacteriaceae* by use of a Multiplex PCR-based Method. *Infection and Chemotherapy*, **41**, 181-184.
22. Nijsten, R., London, N., Van Den Bogaard, A. and Stobberingh, E (1996). In-vitro transfer of antibiotic resistance between faecal *Escherichia coli* strains isolated from pig farmers and pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**: 1141-1154.
23. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T., and Logue, C.M. (2013). Colibacillosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Venugopal, N., Nolan, L. (eds.), *Disease of Poultry*. 13th edition, Wiley-Blackwell, Massachusetts, pp. 751-807.



33. Yılmaz, E. Ş., and Dolar, A. (2017). Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* from cage birds. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **26**: 13-18.

Babaikochkaksaraei, M. (2010). Prevalence of SHV/CTXM/ TEM (ESBL) Beta-lactamase Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. *Medical Laboratory Journal*, **4**: 67-74.



Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing genes in *Escherichia coli* strains isolated from dead canaries in Isfahan

Danial Golkarian¹, Majid Gholami-Ahangaran^{2*}, Asiye Ahmadi-Dastgerdi³

¹ Graduated of Veterinary Department, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

² Associated Professor, Department of Veterinary, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

³ Assistance Professor, Department of Food Science and Technology, Arde.C., Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

Received: 4 June 2023

Accepted: 9 November 2023

Abstract

In this study, 100 *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from dead canaries and 22 *E. coli* strains isolated from the cloacal swabs of apparently healthy canaries were studied. After confirming *E. coli* strains with microbial and biochemical tests, the resistance of the strains to ceftazidime and cefotaxime was determined, and ESBL-producing *E. coli* strains were identified using discs combined with clavulanic acid. Beta-lactamase producing strains were investigated for *bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV genes. The results showed that out of a total of 100 *E. coli* strains isolated from dead canaries, 20 strains are phenotypically able to produce beta-lactamase. Out of 20 beta-lactamase producing *E. coli* strains, 13 strains are able to replicate genomic fragments containing *bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV genes. The most β -lactamase gene detected in both groups of canaries is *bla*CTX type, and *bla*SHV gene was not detected in any of the canaries. In the isolated *Escherichia coli* strains, the percentage of resistance to ceftazidime and cefotaxime antibiotics is related to the detection of the *bla*CTX gene, so that all the resistant strains had the *bla*CTX gene. Considering the prevalence of beta-lactamase producing strains in *Escherichia coli* isolated from dead canaries and the possibility of transferring these genes to other bacteria along with other antibiotic resistance genes, it is necessary to treat pet birds with permitted antibiotics and with compliance dose and duration of use. In general, it seems that the incorrect use of broad-spectrum antibiotics can be the origin of the formation and spread of beta-lactamase-producing strains in pet birds.

Keywords: *Escherichia coli*, beta-lactamase, canary, antibiotic resistance

*Corresponding author: Majid Gholami-Ahangaran,

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

Email: mgholami6@gmail.com