مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۱۲-۲۰۳
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

بررسی تقلب استفاده از بافت‌های غیرمجاز در سوسیس و کالباس‌های تولید شده در استان همدان

حدیث قادری[۱]، محمدرضا پژوهی‌الموتی[۲]، علی کلانتری‌حصاری[۳]

[۱] دانش آموخته دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
[۲] گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
[۳] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ شهریور ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۱ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.350769.3308 20.1001.1.20082525.1401.77.4.1.2

چکیده

زمینهٔ مطالعه: امروزه گوشت یکی از نیازهای تغذیه‌ای بسیار مهم جامعه می‌باشد که قیمت آن نسبت به سایر گروه‌های غذایی بالاتر است. در سال‌های اخیر به‌دلیل تغییر سبک زندگی انسان‌ها استفاده از فرآورده‌های گوشتی افزایش چشم‌گیری یافته است. تقلبات در فرآورده‌های گوشتی به‌دلایل مختلف از جمله ارزش اقتصادی گوشت انجام می‌گیرد، از این‌رو به کارگیری روش‌های شناسایی سریع و دقیق این تقلبات بسیار مهم می‌باشد.

هدف: تعیین بافت‌های غیرمجاز با استفاده از روش بافت‌شناسی و همچنین تعیین گونه‌های غیرمجاز به‌کار رفته در سوسیس و کالباس‌های تولید شده در واحدهای تولیدی استان همدان هدف مطالعه حاضر می‌باشد.

روش‌کار: برای این کار در طول سه ماه تابستان ۱۴۰۰، تعداد ۵۰ عدد نمونه از واحدهای تولیدی فعال استان همدان و موجود در سطح بازار شهر همدان جمع‌آوری و برای بررسی بافت‌شناسی و تعیین گونه حیوانی با آزمون PCR به آزمایشگاه انتقال یافت. برای آزمون بافت‌شناسی براساس استاندارد ملی به شماره ۶۱۰۳ نمونه‌ها به‌ترتیب وارد مراحل تثبیت، پاساژ بافتی (آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی به پارافین)، بلوک‌گیری، برش و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین شدند. جهت تعیین نوع گونه حیوانی استفاده شده در تولید نمونه‌های جمع‌آوری شده از روش PCR استفاده شد.

نتایج: وجود بافت‌های غیرمجاز از جمله بافت‌های استخوانی، بافت غضروفی (غضروف مفصلی و تنفسی)، پوست و اندام غده‌ای را نشان داد. همچنین نتایج آزمون PCR نشان داد در ۱۰۰ درصد نمونه‌های با برچسب گوشت قرمز ارزیابی شده، گوشت مرغ یافت شد.

نتیجه‌گیری نهایی: وجود بافت‌های غیرمجاز و استفاده از گوشت مرغ در سوسیس و کالباس‌های با برچسب گوشت قرمز در محصولات تولیدی استان همدان مشهود است.

کلمات کلیدی: بافت‌شناسی، تقلبات، گوشت قرمز، گوشت مرغ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: علی کلانتری‌حصاری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

مقدمه

گوشت به‌عنوان مهم‌ترین منبع پروتئین و انرژی، جزء مهمی از رژیم غذای جوامع انسانی می‌باشد. افزایش تقاضا و محدودیت تولید گوشت به‌عنوان یک چالش برای کشورهای جهان است. با وجود سرانه مصرف بالای گوشت (در حدود ۲۱ کیلوگرم) در برخی از کشورهای صنعتی، مصرف سرانه گوشت در ایران به ۱۱ کیلوگرم می‌رسد که برای نیاز بدن کافی نیست و باعث سوء تغذیه می‌گردد (۱).

فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده یکی از پرمصرف‌ترین محصولات گوشتی در ایران و سراسر دنیا می‌باشند. جوان بودن جمعیت کشور، افزایش اشتغال و همچنین سرعت و سهولت تهیه این فرآورده‌ها، تنوع محصولات، قیمت ارزان و ارزش تغذیه‌ای بالای

این محصولات باعث افزایش مصرف آن‌ها شده است. افزایش قیمت گوشت قرمز نیز تمایل افرادی که توانایی خرید آن را ندارند، به مصرف سایر فرآورده‌های گوشتی به‌ویژه سوسیس و کالباس را افزایش داده است (۲،۳).

Sausages که در ایران به فرآورده‌های گوشتی سوسیس و کالباس موسوم‌اند، به محصولاتی گفته می‌شود که حاوی گوشت و افزودنی باشند. در ایران به فرآورده‌های گوشتی با قطر بزرگ کالباس و با قطر کوچک سوسیس گفته می‌شود. طبق تعریف دیگر فرآورده گوشتی فرآورده‌هایی هستند که حداقل نیمی از آن‌ها از گوشت تشکیل شده است که از نظر مصرف راحت بوده و معمولاً بدون نیاز به پختن مصرف می‌گردند (۴). استفاده از فرآورده‌های گوشتی به‌عنوان تأمین‌کننده پروتئین و جایگزینی آن به‌جای درصدی از گوشت مصرفی می‌تواند پاسخگوی بخشی از نیازهای تغذیه‌ای جامعه باشد. سرانه مصرف سوسیس و کالباس در ایران ۱/۵ کیلوگرم است. بیش از پانصد نوع محصول گوشتی با اسامی مختلف وجود دارد در سایر نقاط در جهان نیز تعداد این محصولات بسیار فراوان می‌باشد و به ۱۲۰۰ نوع می‌رسد (۱).

انواع مختلف سوسیس و کالباس با استفاده از گوشت (۴۰ تا ۹۰ درصد) آرد، نشاسته، پروتئین حیوانی و روغن مایع و غیره تهیه می‌شوند؛ بنابراین این فرآورده‌های غذایی نسبتاً کامل بوده و مواد آن کامل‌تر از گوشت می‌باشد. در صورت افزایش مصرف سوسیس و کالباس از مصرف گوشت کاسته شده و نیازی به واردات گوشت نمی‌باشد (۵).

براساس استاندارد ملی ایران فرآورده گوشتی باید فاقد بافت‌ها و اندام‌های غیرمجاز دام و طیور مانند دستگاه گوارش دام و طیور مانند لب دام، حفره‌های دهانی، زبان، مری، چینه‌دان طیور، پیش‌معده و سنگدان طیور، پیش‌معده‌های دام، شیردان، کبد، روده‌ها و رکتوم، اندام‌های غده‌ای مانند پانکراس، غدد بزاقی و فوق‌کلیوی، اندام‌ها و بافت‌های لنفاوی متراکم شامل: عقده‌های لنفاوی، تیموس، طحال، بورس فابرسیوس، لوزه‌ها و فولیکول لنفاوی، اندام‌های دستگاه تنفس مانند ریه، نای و حنجره اندام‌های دستگاه تناسلی مانند: کلیه، مثانه، کلوآک، پستان، گوشت سر و صورت دام، قلب، دم، پوست، بافت استخوانی، بافت پوششی، بافت عصبی مرکزی، بافت غضروف الاستیک، بافت غضروف شفاف باشد (۴). بافت‌های غیرمجاز ارزش تغذیه‌ای پایینی داشته، از لحاظ بهداشتی نسبت به بافت عضلانی دارای بار میکروبی بالاتری می‌باشند. همچنین برخی از افزودنی‌های گیاهی در فرآورده‌های گوشتی، به‌عنوان مواد آلرژی‌زا تلقی می‌شوند. با توجه به این‌که حضور بافت‌های غیرمجاز در این نوع از فرآورده‌های گوشتی، تهدید جدی برای سلامت مصرف‌کنندگان می‌باشد و همچنین مصرف بعضی از این بافت‌ها از نظر دین اسلام حرام بوده و کراهت شرعی دارد، به‌کارگیری روش‌های تشخیصی اختصاصی برای تشخیص این بافت‌ها ضرورت پیدا می‌کند (۶).

با توجه به قیمت بالای برخی مواد غذایی، تولیدکنندگان می‌توانند آن‌ها را با موادی که دارای هزینه پایین‌تری هستند جایگزین نمایند. همچنین تقلب می‌تواند جایگزینی گونه‌ای با ارزش غذایی کمتر به‌جای گونه‌ای با ارزش غذایی بیشتر نیز باشد. ممکن است افرادی به برخی از رژیم‌های غذایی آلرژی داشته باشند و استفاده از آن‌ها پیامدهای جبران‌ناپذیری را به‌همراه داشته باشد (۷). از جمله تقلب‌هایی که در مورد فرآورده‌های گوشتی انجام می‌شود، می‌توان به افزودن مواد ازته غیرپروتئینی به‌نحوی‌که در آزمون‌های کنترل، مقدار ازت بالاتر به نظر برسد، افزودن پودر استخوان به فرآورده‌های گوشتی مانند سوسیس و کالباس، مخلوط کردن گوشت با گوشت حیوانات ارزان قیمت، افزودن پودر خون به همبرگر و سوسیس و کالباس، رعایت نکردن فرمول و استاندارد فرآورده‌های گوشتی و افزودن مقادیر زیاد مواد پرکننده و افزودن نیتریت و نیترات به‌مقدار بیش از حد، برای بهبود رنگ و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در موارد آلودگی شدید اشاره نمود (۸).

برای تشخیص اختصاصی گونه‌ها و بافت‌های غیرمجاز و شناسایی گروه‌های حیوانی از قبیل نشخوارکنندگان (جهت حفظ سلامت عمومی) و جلوگیری از گسترش بیماری، آزمون سالم بودن تولیدات پروتئینی حیوانی در مواد غذایی به‌کار گرفته می‌شود. در اسلام، فرآورده‌های گوشتی حاوی خوک حرام و گوشت الاغ و اسب مکروه است. از این‌رو، این یک وظیفه مهم برای آزمایشگاه‌های کنترل مواد غذایی است که بتوانند تمایز گونه‌ای مواد خام مورد استفاده برای تهیه غذای صنعتی و شناسایی گونه‌های حیوانی در محصولات غذایی را انجام دهند (۹). آزمایش اصالت گونه‌های جانوری موجود در غذا به‌دلایل اقتصادی، ایمنی، قانونی، مذهبی و بهداشتی مهم است. مقررات برچسب‌گذاری مواد غذایی نیاز به ارزیابی گونه‌های گوشت موجود در محصولات غذایی را بیشتر می‌کند. مصرف محصولات حاوی پروتئین‌های گوشتی اعلام نشده می‌تواند باعث ایجاد واکنش‌های آلرژیک در افراد مستعد شود (۱۰). میزان تقلب در محصولات گوشتی پخته شده بیشتر از گوشت خام است. استفاده از گوشت طیور به‌دلیل اختلاط بافت

مرغ بدون استخوان با فرآورده‌های گوشت قرمز خرد شده یکی از رایج‌ترین تقلبات در تولید فرآورده‌های گوشتی است (۱۱).

استفاده از روش بافت‌شناسی به‌عنوان یک آزمایش کنترل کیفی در صنایع غذایی برای اولین بار از سال ۱۹۱۰ مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های بافت‌شناسی قادر به شناسایی مستقیم و تفریق اجزاء تشکیل‌دهنده فرآورده‌های گوشتی است و امکان تشخیص مستقیم ترکیب و نوع بافت را در فرآورده‌های گوشتی میسر می‌سازد و از آن می‌توان در شناسایی تقلبات بافتی استفاده کرد. بنابراین روش‌های بافت‌شناسی می‌توانند در کنترل کیفیت فرآورده‌های گوشتی حرارت دیـده کمک نمایند و استانداردها و قوانین گوشت و فرآورده‌های آن را تکمیل نمایند. غالب روش بافت‌شناسی صورت گرفته در ارتباط با تشخیص تقلبات فرآورده‌های گوشتی، استفاده از روش معمول رنگ‌آمیزی بافت‌ها (هماتوکسیلین- ائوزین) بوده است (۱۲).

در مطالعه حاضر سعی شد فرآورده‌های تولیدی در کارخانه‌های فعال استان همدان و سوسیس و کالباس‌های موجود در فروشگاه‌های سطح شهر همدان از نظر وجود بافت‌های غیرمجاز و نوع گوشت مورد استفاده مورد ارزیابی قرار گیرند.

مواد و روش کار

این طرح در تابستان ۱۴۰۰ انجام شد. در مطالعه حاضر ۵۰ نمونه سوسیس و کالباس (شامل ۲۷ نمونه سوسیس و ۲۳ نمونه کالباس) از کارخانه‌های فعال استان همدان و نمونه‌های موجود در فروشگاه‌های شهر همدان طی بازه ۳ ماهه و با فواصل ۱۵ روزه جمع‌آوری و پس از کد گذاری به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا همدان منتقل شدند. در مجموع تعداد ۳۲ نمونه از برند A و ۱۸ نمونه از برند B در این طرح نمونه‌برداری شد (جدول ۱).

جهت بررسی بافت‌شناسی، براساس استاندارد ملی ۶۱۰۳ و a۶۱۰۳ از هر محصول تعداد ۱۲ عدد نمونه اخذ و جهت تثبیت در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از تثبیت، نمونه‌ها وارد مراحل پاساژ بافتی (شامل مراحل آبگیری با الکل صعودی، شفاف سازی با گزیلول و آغشتگی با پارافین)، بلوک‌گیری، برش بافتی (با استفاده از دستگاه میکروتوم)، رنگ‌آمیزی (با روش هماتوکسیلین- ائوزین) و بررسی بافتی شدند.

جهت تشخیص منشأ حیوانی عضلات اسکلتی استفاده شده در نمونه‌های جمع‌آوری شده از روش PCR استفاده شد. برای این کار تکه‌های مختلف از سوسیس و کالباس اخذ و تا انجام مراحل PCR در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای نمونه‌برداری از نمونه‌های سوسیس و کالباس با رعایت بهداشت و به‌صورت استریل ۰/۱۰ گرم از نمونه توسط تیغ اسکالپل یک‌بار مصرف جدا و به‌داخل میکروتیوب منتقل شد. جهت استخراج DNA نمونه‌ها از کیت BIOFOOD MIXED kit خریداری شده از شرکت Biotools استفاده شد. این کیت شش گونه حیوانی را که معمولاً در غذای انسان (گاو، گوشت خوک، مرغ، اسب، بز و گوسفند) مورد استفاده قرار می‌گیرند را با استفاده از یک ژن میتوکندریایی بسیار حفاظت شده (سیتوکروم b) شناسایی می‌کند. دستورالعمل کیت BIOFOOD MIXED براساس روش Multiplex PCR بوده که نتیجه آن شامل یک باند اندازه خاص برای هر یک از گونه‌های شناسایی شده می‌باشد. جزئیات پرایمرهای اختصاصی استفاده شده جهت تعیین نوع گوشت هر حیوان در جدول ۲ ارائه شده است. برای استخراج DNA ابتدا نمونه آماده شده با ۶۰۰ میکرولیتر از بافر هضم‌کننده (Lysis Buffer) و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k به‌مدت ۲۰ ثانیه مخلوط (ورتکس) شده سپس داخل بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت قرار داده شد. هر ۱۵ تا ۲۰ دقیقه یک‌بار نمونه‌ها خارج شده و تکان داده شدند. در ادامه ۲۰ میکرولیتر دیگر از پروتئیناز k به نمونه‌ها اضافه و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شدند. سپس به‌مدت ۵ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا محلول کاملاً شفاف شود. در ادامه نمونه‌ها سانتریفیوژ شده (دمای ۳ درجه سانتی‌گراد، با دور RPM ۱۲۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه)، محلول رویی را دور ریخته محلول باقی‌مانده به میکروتیوپ جدید انتقال داده شد. به محلول باقی‌مانده میزان ۵۵۰ میکرولیتر از محلول Binding Buffer اضافه شده و سپس ۱۵ ثانیه مخلوط شدند. محلول حاصل سانتریفیوژ شده (به‌مدت ۱۰ دقیقه و دور RPM ۱۲۰۰) و محلول شفاف رویی مجدداً با شرایط ذکرشده سانتریفیوژ شد. در نهایت خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد.

برای انجام Multiplex PCR ابتدا با استفاده از نرم‌افزار BLAST موجود در سایت اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) میزان اختصاصیت این پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. پس از مطمئن شدن از اختصاصیت این پرایمرها برای مراحل بعدی تکثیر DNA از روش PCR استفاده گردید.

جدول ۱. نمونه‌برداری از انواع برندهای سوسیس و کالباس‌های تولید شده در استان همدان و موجود در فروشگاه‌های شهر همدان.

برند A				
نوع فرآورده	۴۰ تا ۵۰ درصد	۵۱ تا ۶۰ درصد	۶۱ تا ۸۰ درصد	۸۱ تا ۹۰ درصد
سوسیس	۵	۸	۷	۰
کالباس	۳	۰	۶	۳
برند B				
نوع فرآورده	۴۰ تا ۵۰ درصد	۵۱ تا ۶۰ درصد	۶۱ تا ۸۰ درصد	۸۱ تا ۹۰ درصد
سوسیس	۰	۷	۰	۰
کالباس	۰	۵	۶	۰

جدول ۲. پرایمرهای اختصاصی طراحی شده جهت تعیین نوع گوشت هر حیوان (۱۳).

پرایمر	توالی پرایمر (5'→3')	تعداد جفت باز تکثیرشده (bp)
بز	F: ATA TCAATCGGGTTTCTAGGATTTATT R: AGTTGGGATAGCGATAATTATGGTAGT	۱۵۷
مرغ	TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC F: GGG CTA TTG AGC TCA CTG TT R:	۲۲۷
گاو	CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG F: CTTATATTACGGGTCTTACACTTTTCTAG R:	۲۷۴
گوسفند	CTATGAATGCTGTGGCTATTGTCGCA F: TGCGACAATAGCCACAGCATTCATAG R:	۳۲۹
خوک	CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAC A F: R: ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT	۳۹۷
تک‌سمیان	CTATCCGACACACCCAGAAGTAAAG F: GATGCTGGGAAATATGATGATCAGA R:	۴۳۹

جدول ۳. بررسی نمونه‌های دارای بافت غیرمجاز در سوسیس و کالباس‌های تولید شده در استان همدان و موجود در فروشگاه‌های شهر همدان.

سوسیس			کالباس		
بافت‌های غیرمجاز	تعداد	درصد	بافت‌های غیرمجاز	تعداد	درصد
بافت استخوانی	۶	۲۲	بافت استخوانی	۰	۰
بافت غضروفی	۶	۲۵/۷	بافت غضروفی	۳	۲۳
بافت‌های لنفاوی	۰	۰	بافت‌های لنفاوی	۰	۰
گوشت سر و دم	۰	۰	گوشت سر و دم	۰	۰
اندام غده‌ای	۱	۳/۷	اندام غده‌ای	۰	۰
اندام دستگاه تنفس	۱	۳/۷	اندام دستگاه تنفس	۰	۰
اندام دستگاه تناسلی	۰	۰	اندام دستگاه تناسلی	۰	۰
قلب	۰	۰	قلب	۰	۰
پوست	۵	۱۸/۵۱	پوست	۳	۲۰
بافت پوششی	۰	۰	بافت پوششی	۰	۰
بافت عصبی مرکزی	۰	۰	بافت عصبی مرکزی	۰	۰
مجموع نمونه‌های دارای بافت غیرمجاز	۱۹	۷۳/۶۱	مجموع نمونه‌های دارای بافت غیرمجاز	۱۰	۴۳
مجموع نمونه بررسی‌شده	۲۷	۱۰۰	مجموع نمونه بررسی‌شده	۲۳	۱۰۰

نتایج

نتایج بافت‌شناسی: در مطالعه حاضر ۵۰ نمونه (۲۷ نمونه سوسیس و ۲۳ نمونه کالباس) از لحاظ افزودن بافت‌های غیرمجاز به‌روش بافت‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۲۹ نمونه دارای بافت غیرمجاز بودند. مجموع تقلبات در نمونه سوسیس ۱۹ مورد (۷۰ درصد) و در نمونه کالباس ۱۰ مورد (۴۳ درصد) بود. فراوانی این بافت‌های غیرمجاز با تفکیک نمونه در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۴. بررسی تقلبات و بافت‌های غیرمجاز برحسب درصد گوشت در سوسیس و کالباس‌های تولید شده در استان همدان و موجود در فروشگاه‌های شهر همدان.

سوسیس			کالباس		
بافت غیرمجاز	تعداد نمونه‌های ۴۰ تا ۶۰ درصد گوشت	تعداد نمونه‌های ۶۱ تا ۹۰ درصد گوشت	بافت غیرمجاز	تعداد نمونه‌های ۴۰ تا ۶۰ درصد گوشت	تعداد نمونه‌های ۶۱ تا ۹۰ درصد گوشت
بافت استخوانی	۵	۱	بافت استخوانی	۰	۰
بافت غضروفی	۳	۵	بافت غضروفی	۲	۴
اندام دستگاه تنفس	۱	۰	اندام دستگاه تنفس	۰	۰
اندام غده‌ای	۱	۰	اندام غده‌ای	۰	۰
پوست	۷	۱	پوست	۴	۱

بیشترین فراوانی بافت غیرمجاز در نمونه‌های سوسیس و کالباس بافت غضروفی (به‌ترتیب با درصد فراوانی ۲۵/۷ و ۲۳ درصد) بود. در بین سوسیس‌ها و کالباس‌های با درصد گوشت کمتر (۴۰ تا ۶۰ درصد) میزان استفاده از بافت‌های غیرمجاز بیشتر بود و پوست بیشترین فراوانی را در بین بافت‌های غیرمجاز در این محصولات به‌خود اختصاص داده بود. درصد بافت‌های غیرمجاز برحسب درصد گوشت سوسیس‌ها و کالباس‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین در آزمون بافت‌شناسی در دو نمونه کالباس از یک برند مقاطع کیست سارکوسیست در داخل سلول‌های عضلانی نیز مشاهده گردید. تصویر بافت‌های غیرمجاز مشاهده شده در نمونه‌های مورد بررسی در تصویر ۱ ارائه شده است.

نتایج آزمون PCR: نتایج بررسی آزمون **PCR** برای تعیین گونه حیوانی استفاده شده در تولید سوسیس‌ها و کالباس‌ها نشان داد که تمام نمونه‌های مورد بررسی با برچسب گوشت قرمز، گوشت مرغ نیز وجود داشت. در مطالعه حاضر وجود گوشت بز، مرغ، گاو، گوسفند، خوک و تک‌سمیان مورد بررسی قرار گرفت که به جز گوشت مرغ و گوشت گاو گوشت سایر حیوانات مشاهده نشد (تصویر ۲).

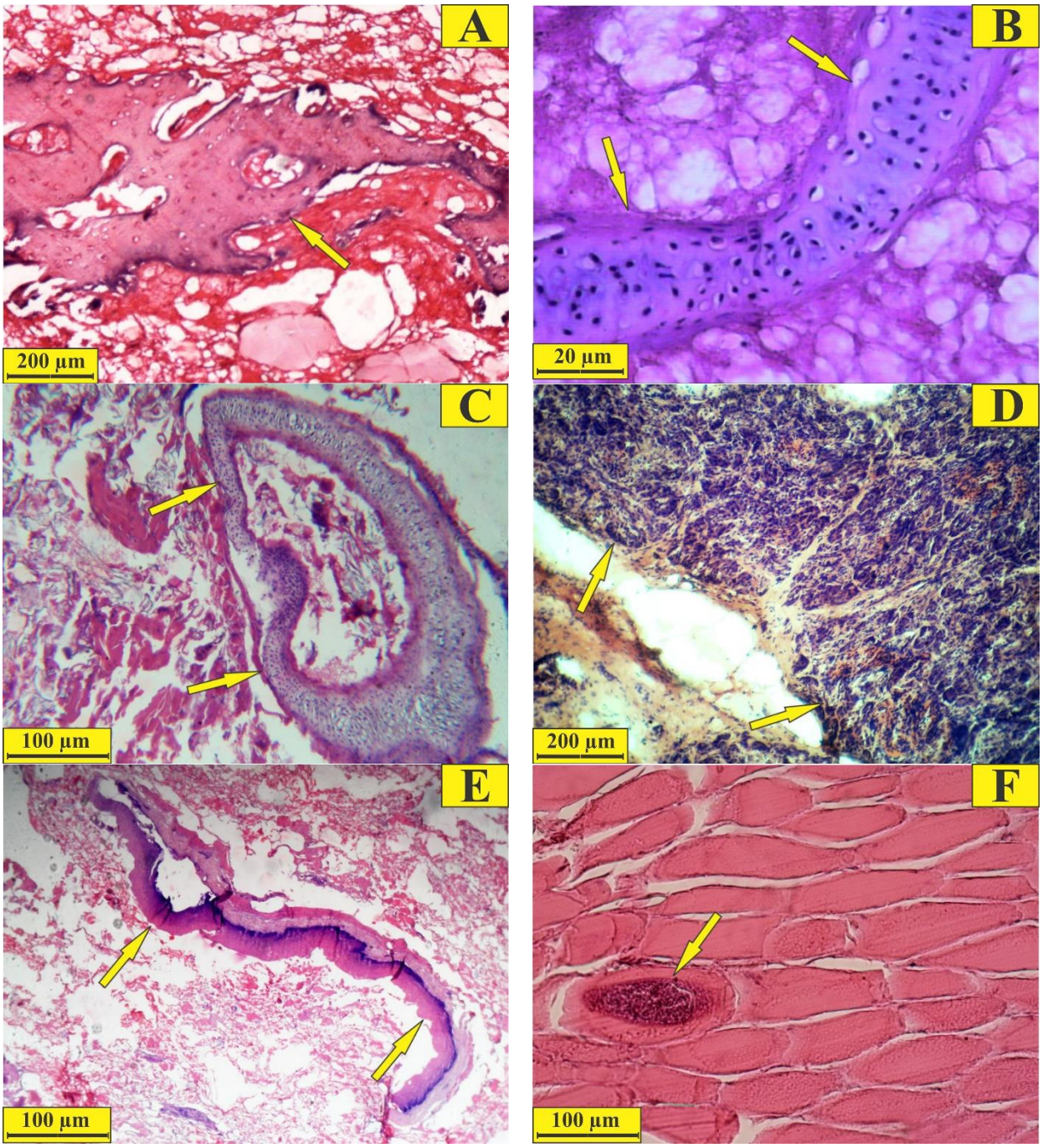
بحث

امروزه مطالبه اطلاعات دقیق و شفاف محصولات غذایی از سوی مصرف‌کنندگان بیش از هر زمان دیگری صورت می‌پذیرد و فرآورده‌های گوشتی نیز از این مسئله مستثنی نیستند. استفاده از تکنیک PCR در تشخیص اصالت گوشت‌ها روش مناسبی است (۱۴). در روش‌های مولکولی شناسایی و اطمینان از تطابق DNA تکثیر شده با توالی پرایمر انتخاب شده، یک مرحله حساس و ضروری است (۱۵). در مطالعه‌ای به‌منظور شناسایی گونه حیوانی استفاده شده در ۹۱ نمونه گوشت گوساله با استفاده از روش PCR، نشان داده شد که در ۲/۴۷ درصد نمونه‌ها گوشت مرغ و ۰/۷ درصد نمونه‌ها گوشت الاغ وجود داشت (۱۶). در مطالعه دیگری با استفاده از آزمون PCR ناخالصی‌های محصولات گوشتی از نظر وجود سویا مورد بررسی گرفت و نتایج نشان داد که ۱۰۰ درصد محصولات سوسیس، ۲۰ درصد کتلت مرغ، ۳۳ درصد محصولات کالباس، ۶۰ درصد محصولات همبرگر و ۱۵ درصد محصولات کباب لقمه سویا داشتند (۱۷).

Alikord و همکاران در سال ۲۰۱۷ از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مرکب جهت شناسایی گوشت مصرفی در فرآورده‌های گوشتی خام و پخته استفاده کردند. یافته‌ها نشان داد در مجموع از شش مورد (۱۷ درصد) تقلب صورت گرفته چهار مورد (۱۱ درصد) مربوط به گوشت اسب و دو مورد (۶ درصد) مربوط به گوشت الاغ بوده است و هیچ‌گونه موردی از گوشت خوک مشاهده نشد. استفاده از گوشت گاو/گوسفند در تمام نمونه‌ها اثبات شد که نشان‌دهنده استفاده از گوشت سایر حیوانات صرفاً جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی بوده است (۱۸).

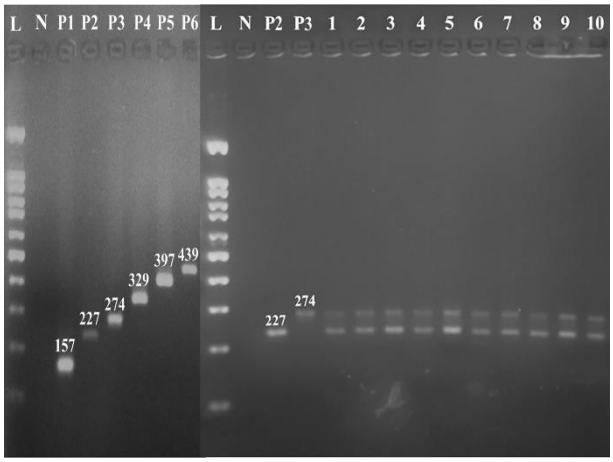
در گزارش Eaqub Ali و همکاران در سال ۲۰۱۵ از روش PCR جهت تعیین منشأ مواد اولیه در تولید فرآورده‌های گوشتی استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده وجود پنج گونه غیرشرعی شامل گوشت گربه، خوک، سگ، میمون و موش در محصولاتی که تحت عنوان غذای حلال به فروش می‌رسیدند بود (۱۹).

یکی از تقلبات رایج، استفاده از گوشت مرغ (که در بازه زمانی مطالعه حاضر قیمت گوشت مرغ یک چهارم گوشت قرمز بود) و آلایش‌های آن بدون درج آن در برچسب فرآورده‌های گوشتی خام و حرارت دیده است. مطالعات نشان می‌دهد که درج اطلاعات نادرست در برچسب فرآورده‌های گوشتی بیش از ۲۰ درصد است (۲۰،۲۱). اختلاط گوشت مرغ و آلایش‌های آن در فرآورده‌های گوشتی که روی آن‌ها برچسب گوشت قرمز درج شده در سال‌های اخیر گزارش شده است. نتایج مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های سوسیس و کالباس که بر روی آن‌ها برچسب گوشت قرار داشت نشان داد که در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها گوشت مرغ به‌کار رفته است.



تصویر ۱. بافت‌های غیرمجاز مشاهده شده در نمونه‌های مورد بررسی. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین. A- مقطع استخوان در فرآورده سوسیس ۴۰ درصد (برند B)؛ B- مقطع غضروف شفاف در فرآورده کالباس ۶۰ درصد (برند A)؛ C- غضروف تنفسی در فرآورده سوسیس ۴۰ درصد (برند A)؛ D- مقطع غده بزاقی در نمونه سوسیس ۴۰ درصد (برند A)؛ E- مقطع پوست در فرآورده سوسیس ۴۰ درصد (برند A)؛ F- مقاطع از کیست سارکوسیست در کالباس ۸۰ درصد (برند B).

در مطالعه Hosseni و همکاران در سال ۲۰۱۴، ده برند مختلف از سوسیس‌های گوشت قرمز تهیه شده از سطح استان تهران به منظور تعیین نوع گوشت به‌کار رفته با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین گوشت گاو و مرغ، پرایمرها براساس ژن سیتوکروم b میتوکندریایی طراحی و قطعات *bp* ۲۷۴ و *bp* ۱۸۳به‌ترتیب برای گوشت گاو و مرغ تکثیر گردید. نتایج PCR اختصاصی نشان داد که تمام نمونه‌ها برخلاف برچسب درج شده روی آن‌ها حاوی آلایش مرغی بودند (۲۲).



تصویر ۲. نتایج آزمون PCR نمونه‌های با برچسب گوشت قرمز. L: نردبان ژنی- N: کنترل منفی- P1: کنترل مثبت گوشت بز (۱۵۷ bp)؛ P2: کنترل مثبت گوشت مرغ (۲۲۷ bp)؛ P3: کنترل مثبت گوشت گاو (۲۷۴ bp)؛ P4: کنترل مثبت گوشت گوسفند (۳۲۹ bp)، P5: کنترل مثبت گوشت خوک (۳۹۷ bp)؛ P6: کنترل مثبت گوشت اسب (۴۳۹ bp)؛ ۱۰-۱: نمونه‌های سوسیس و کالباس مورد آزمون.

در مطالعه‌ای دیگر Lakzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از آزمایش Real Time PCR به شناسایی و اندازه‌گیری میزان بافت‌های مرغی در محصولات گوشتی با برچسب تهیه شده از گوشت قرمز پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان دهنده وجود ۸۴ درصد و ۲۶ درصد بافت مرغ به‌ترتیب در نمونه‌های سوسیس و برگر می‌باشد (۲۳).

Sadeghpour و همکاران در سال ۲۰۲۲ اصالت ۴۷ نمونه گوشت خام و فرآورده‌های گوشتی قرمز شهر تبریز را از نظر اختلاط گوشت و یا سایر قسمت‌های لاشه مرغ در آن‌ها، با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که در نمونه‌های فرآورده‌های صنعتی دارای نشان استاندارد مانند محصولات فرآوری شده و نیمه‌فرآوری شده و چه در گوشت‌های خام، آلایش مرغ به‌صورت اختلاط وجود دارد. به‌طوری‌که مجموعاً در ۸۷/۲۳ درصد از نمونه‌های اخذ شده تقلب صورت گرفته است (۲۴).

Al-Qassab و همکاران در سال ۲۰۱۹ مطالعه‌ای بر روی ۱۱۴ نمونه سوسیس گوشت قرمز با درصدهای ۴۰، ۵۵ و ۷۰ از ۱۰ شرکت مختلف در سطح تهران انجام دادند. پس از استخراج DNA از سوسیس‌های استخراج شده با روش multiplex PCR تکثیر داده شدند. نتایج نشان دادند که در ۶۰ سوسیس (۵۲/۶ درصد) فقط DNA مربوط به مرغ قابل ردیابی بود. در ۴۸ نمونه سوسیس (۴۲/۱ درصد) DNA گاو و مرغ و در ۶ نمونه (۵/۳ درصد) DNA مربوط به گاو قابل تشخیص بودند. استفاده از گوشت مرغ در سوسیس که با برچسب گوشت قرمز عرضه شده، ممکن است به‌علت قیمت ارزان‌تر این گوشت در مقایسه با گوشت قرمز باشد که سبب می‌شود تولیدکننده سود بیشتری دریافت کند (۲۵).

Julini و همکاران در سال ۱۹۷۹ استفاده از بافت‌های غیرمجاز حیوانی مانند عصب، استخوان، پوست، کلیه و پستان را در سوسیس گزارش کردند. در این مطالعه بافت‌های استخوانی و پوست مشاهده شد ولی بافت عصبی، کلیه و پستان مشاهده نشد (۲۶).

Prayson و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی هشت برند مختلف همبرگر در آمریکا مطالعات بافت‌شناسی انجام دادند. که هر هشت برند دارای بافت‌های غیرمجاز همبند، عروق خونی، چربی و اعصاب محیطی بودند؛ و در هفت نمونه عضله اسکلتی، در چهار برند بافت گیاهی، در سه برند بافت غضروفی و بافت استخوان در دو برند همبرگر مشاهده شد (۲۷)؛ و همچنین Prayson و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه مشابهی را بر روی هشت برند هات‌داگ انجام دادند و بافت‌هایی مانند استخوان، کلاژن، عروق خونی، بافت گیاهی، پوست، چربی و اعصاب محیطی مشاهده شدند (۲۸). بافت پوست در این مطالعه مشاهده شد.

در مطالعه دیگری بررسی وجود بافت‌های غیرمجاز بر روی ۲۰ نمونه شامل کباب لقمه، سوسیس، همبرگر دست‌ساز و کباب‌کوبیده انجام شد و نتایج آزمون بافت‌شناسی نشانگر وجود بافت‌هایی مثل بافت همبند که در تمام نمونه‌ها، سنگدان در دو نمونه، چربی در هفت نمونه، سویا در یازده نمونه، غضروف در پنج نمونه و تخمدان در یک نمونه بود (۲۹). در مطالعه حاضر بافت‌های سنگدان و تخمدان مشاهده نشد.

در ایران برای اولین بار Rokni و همکاران در سال ۱۹۹۷ به بررسی بافت‌شناسی و هیستومتریک کالباس‌های حرارت دیده پرداختند که نتایج آن شامل: مشاهده عضلات مخطط به‌صورت توده‌های صورتی‌رنگ به‌عنوان بافت مجاز و مشاهده غده بزاقی و لیگامنت پس‌سری به‌عنوان بافت غیرمجاز در این مطالعه بودند که نشان‌دهنده استفاده از گوشت سر در این فرآورده‌ها بود. در مطالعه حاضر در یک نمونه مقطع بافت غده بزاقی مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده استفاده از گوشت سر و کله باشد، ولی لیگمانت پس‌سری

مشاهده نشد. طبق استاندارد شماره ۲۳۰۳ استفاده از گوشت سر و کله در سوسیس و کالباس غیرمجاز است (۳۰).

همچنین Sadeghi و همکاران در سال ۲۰۱۳ به ارزیابی بافت‌های غیرمجاز در سوسیس و کالباس عرضه‌شده در شهر کرمانشاه پرداختند که نتایج این بررسی نشان داد بافت‌های غیرمجازی از جمله بافت گیاهی در همه نمونه‌ها، بافت چربی، قلبی، غضروف و استخوان بالغ، استخوان نابالغ، طحال، مری، آئورت، غدد بزاقی، غدد ترشحی لوله گوارش، گره لنفاوی، مو، زبان، پستان، اپی‌درم پوست، عصب، بافت همبند، عضله صاف و رگ بود. از تکنیک‌های بافت‌شناسی جهت شناسایی برخی عوامل انگلی نظیر سارکوسیست هم استفاده شده است (۳۱). علاوه بر این Jahed Khaniki و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین به بررسی وجود بافت‌های غیرمجاز در همبرگر پرداختند. نتایج نشان داد که میزان آلودگی نمونه‌ها به انگل سارکوسیست ۶/۲۵ درصد و بافت‌های آماسی ۵ درصد می‌باشد و مقدار زیادی بافت گیاهی نیز مشاهده شد (۳۲). همچنین Jahed Khaniki و Kia در سال ۲۰۰۶ با استفاده از روش بافت‌شناسی به مطالعه میزان شیوع کیست سارکوسیست در فرآورده‌های گوشتی همبرگر ایران پرداخته و نتایج نشان داد که آلودگی نمونه‌ها به انگل سارکوسیست حدود ۶۰ درصد است (۳۳).

در مطالعه دیگری همبرگرهای خام عرضه‌شده در شهر تهران از نظر کیست‌های سارکوسیست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هیچ‌یک از نمونه‌های تولید صنعتی کیست انگل مشاهده نشد؛ اما در یکی از نمونه‌های دست‌ساز کیست انگل مشاهده گردید (۳۴). در مطالعه حاضر هم در دو نمونه از کالباس‌ها انگل سارکوسیست مشاهده گردید.

متأسفانه بحث تقلب در فرآورده‌های گوشتی که مختل‌کننده سلامت جامعه، مغایر با شرع و اخلاق و برهم زننده اعتماد مردم به نظام تجارت سالم می‌باشد موضوعی بسیار مهم در صنعت مواد غذایی می‌باشد. لذا اجباری شدن رعایت استاندارد و کنترل کیفیت در محصولات گوشتی توسط تولیدکنندگان و نظارت جدی بر آن‌ها ضروری است. همچنین شناسایی نوع گوشت مصرفی در محصولات گوشتی به‌دلایل مذهبی، بهداشتی و اقتصادی اهمیت دارد. از این رو در مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی سوسیس و کالباس‌های تولیدی در واحدهای استان همدان و محصولات موجود در فروشگاه‌های شهر همدان با استفاده از آزمون بافت‌شناسی و تکنیک PCR جهت تشخیص تقلبات فرآورده‌های گوشتی استفاده شد. با توجه به نتایج مشاهده شد که بیشترین میزان بافت‌های غیرمجاز شامل بافت‌های استخوان، غضروف و پوست بود، هرچند در برخی نمونه‌های اندام تنفسی و غده‌ای نیز مشاهده گردید. همچنین وجود آلایش‌های مرغی در نمونه‌های گوشت قرمز نیز کاملاً مشهود بود. نتایج نشان داد که روش‌های استفاده شده می‌توانند در کنترل کیفیت فرآورده‌های گوشتی خام و حرارت دیده (سوسیس و کالباس) بسیار مؤثر باشند.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعات نشان داد که امکان استفاده از بافت‌های غیرمجاز در محصولات گوشتی وجود دارد و با توجه به نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی در مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که برخی از سوسیس‌ها و کالباس‌های موجود در شهر همدان دارای بافت‌های غیرمجاز از قبیل استخوان، غضروف، پوست و غدد بزاقی است. همچنین در مطالعه حاضر کیست سارکوسیست نیز مشاهده شد؛ که می‌تواند تهدیدی برای سلامت مصرف‌کنندگان باشد. در نتیجه بایستی بیان داشت که بهتر است کنترل و نظارت دقیق‌تری توسط سازمان‌ها و دستگاه‌های نظارتی و بهداشتی صورت گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از تمام عزیزانی که در طی مطالعه و نگارش این مقاله یاری‌گرمان بودند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Maghami ND, Nabipour A, Mohsenzadeh M, Torabi M. Histological and stereological approaches for detection of tissues and fraud in some meat products. Vet Res Forum. 2022; 13(1): 47. doi: 10.30466/vrf.2020.115238.2742 PMID: 35601776
2. González-Rodríguez M, Redruello-Requejo M, Samaniego-Vaesken MD, Montero-Bravo A, Puga AM, Partearroyo T, et al. Low-and no-calorie sweetener (lncs) presence and consumption among the portuguese adult population. Nutrients. 2021; 13(11): 4186. doi: 10.3390/nu13114186 PMID: 34836441
3. Halagarda M, Wójciak KM. Health and safety aspects of traditional european meat products. a review. Meat Sci. 2022; 184: 108623. doi: 10.1016/j.meatsci.2021.108623 PMID: 34753110
4. Asadi MR, Taghavi M, Kalantari-Hesari A, Ghorbanzadeh B. The role of histological test in reducing the use of unauthorized tissues in meat products between years of 2014

and 2017. VJ. 2019; 128: 31-40. doi: 10.22092/VJ.2019.116357.1387 (In Persian)
5. Long L, Yan W, He Y, Dong L, Xing Z, Li C, et al. Development of a duplex digital PCR method to quantify five genetically modified soybean events. Food Anal Methods. 2022; 15(2): 294-306. doi: 10.1007/s12161-021-02104-2
6. Liscio C, Hopley C. Development of a reference measurement procedure and certified reference material for the determination of hydroxyproline in meat. Food Anal Methods. 2016; 9(6): 1461-9. doi: 10.1007/s12161-015-0329-x
7. Olsen P, Borit M. The components of a food traceability system. Trends Food Sci Technol. 2018; 77: 143-9. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.004
8. Karabasanavar N, Girish PS, Kumar D, Singh SP. Detection of beef adulteration by mitochondrial D-loop based species-specific polymerase chain reaction. Int J Food Prop. 2017; 20(2): 2264-71. doi: 10.1080/10942912.2017.1369103
9. Hossain MM, Uddin SM, Sultana S, Bonny SQ, Khan MF, Chowdhury ZZ, et al. Heptaplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of beef, buffalo, chicken, cat, dog, pork, and fish in raw and heat-treated food products. J Agric Food Chem. 2019; 67(29): 8268-78. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02518
10. Li X, Guan Y. Specific identification of the adulterated components in beef or mutton meats using multiplex PCR. J AOAC Int. 2019; 102(4): 1181-5. doi: 10.5740/jaoacint.18-0338
11. Kuswandi B, Gani AA, Ahmad M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. Food Biosci. 2017; 19: 1-6. doi: 10.1016/j.fbio.2017.05.001
12. Hajimohammadi B, Fattahi K, Kavyani Yekta Z, Sadeghinezhad J, Morovvati H, Akhondzadeh Basti A. Experimental study of the histological method for quantitative detection of meat in kabab and cooked sausage model. J Vet Res. 2020; 75(3): 366-70. doi: 10.22059/JVR.2020.239180.2681 (In Persian)
13. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero M. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol Cell Probes. 2004; 18: 81-7. doi: 10.1016/j.mcp.2003.09.006 PMID: 15051116
14. Cavin C, Cottenet G, Blancpain C, Bessaire T, Frank N, Zbinden P. Food adulteration: from vulnerability assessment to new analytical solutions. CHIMIA. 2016; 70(5): 329-33. doi: 10.2533/chimia.2016.329 PMID: 27198809
15. Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR Assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat Sci. 2007; 77: 649-53. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.05.018 PMID: 22061954
16. Mousavi S, Jahed Khaniki G, Eskandari S, Rabieib M, Mirab Samiee S, Mehdizadeh M. Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. J Food Compost Anal. 2015; 40: 47-51. doi: 10.1016/j.jfca.2014.12.009
17. Bazyari S, Zamanizadeh HZ, Mizani M, Sharifan A. Evaluation of presence of soya protein in some commercial meat products by polymerase chain reaction assays. Food Sci Nutr. 2015; 12: 33-40.
18. Alikord M, Momtaz H, Yadegarfar G, Keramat J, Homayooni Rad A. Identification in meat products authentication. J Food Res. 2017; 27 (4): 73-86.
19. Eaqub Ali M, Abdur Razzak MA, Hamid SB, Rahman MM, Amina M, Rashid NR. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in islamic foods. Food Chem. 2015; 177: 214-24. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.098 PMID: 25660879
20. Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. Species determination-can we detect and quantify meat adulteration? Meat Sci. 2009; 83(2): 165-74. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.003 PMID: 20416768
21. Nešić K, Stojanović D, Baltić MZ. Authentication of meat and meat products vs. Detection of animal species in feed–what is the difference?. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. 2017; 85(1): 012043. doi: 10.1088/1755-1315/85/1/012043
22. Hosseni HS, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M, Sharifan A. Fraud identification in beef sausage in Tehran province using mitochondrial genes of animal species. Food Hyg. 2014; 4(1): 81-9.
23. Lakzadeh L, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Fazeli M. Quantitative detection of chicken meat routine mislabeling in emulsion type sausages and burgers by SYBR green real time PCR assay. Iran Agric Res, 2016; 35(1): 49-54.
24. Sadeghpour A, Pirzadeh-Ashraf Kh, Sehatkhah M, Khandaghi J. Determination of adulteration and authenticity of meat and meat products using chemical properties and PCR technique in Tabriz. J Health Sci. 2022; 11(4): 478-88. doi: 10.29252/j.health.11.4.478 (In Persian)
25. Al-Qassab T, Kamkar A, Shayan P, Khanjari A. Mislabeling in cooked sausage is a seriously increasingly problem in food safety. Iran J Vet Med. 2019; 13(1): 101-13. doi: 10.22059/IJVM.2018.267894.1004935 (In Persian)
26. Julini M, Parisi E, Chicco G. Histological aspects of common frauds in sausage manufacture. Ann Fac Med Chir Univ Studi Perugia. 1979; 26: 231-44.
27. Prayson BE, McMahon JT, Prayson RA. Applying morphologic techniques to evaluate hotdogs: What is in the hotdogs we eat? Ann Diagn Pathol. 2008; 12(2): 98-102 . doi: 10.1016/j.anndiagpath.2007.04.012 PMID: 18325469
28. Prayson BE, McMahon JT, Prayson RA. Fast food hamburgers: What are we really eating? Ann Diagn Pathol. 2008; 12(6): 406-9 .doi: 10.1016/j.anndiagpath.2008.06.002 PMID: 18995204
29. Latorre R, Sadeghinezhad J, Hajimohammadi B, Izadi F, Sheibani MT. Application of morphological method for detection of unauthorized tissues in processed meat products. J Food Qual Hazards Control. 2015; 2(2): 71-4.
30. Rokni N, Rezaian M, Dayani Dardashti A. Histological & histometrical study of different heated sausages. J Vet Res. 1997; 52(1): 62-75.
31. Sadeghi E, Hashemian AH, Mohammadi M, Mohammadi R. Study on the microbiological and chemical characterization of the meat products consumed in Kermanshah in 2012. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7(5): 281-286.
32. Jahed Khaniki Gh, Rokni ND. Histological detection of soya in freezing raw hamburger of Iran. Pajouhesh and Sazandegi. 2004; 62: 71-5.
33. Jahed Khaniki Gh, Kia EB. Detection of the sarcocystis cysts from meat supplied for hamburger in Iran by histological method. J Med Sci. 2006; 6(1): 18-21.
34. Hosseini H, Khaksar R, Shemshadi B. Study of sarcocyst in raw, ready to sell hamburgers in Tehran. Food Sci Nutr. 2008; 4(4): 65-71.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

Investigating the Fraud of Using Unauthorized Tissues in Sausages Produced in Hamadan Province

Hadis Ghaderi[1]✉, Mohammad Reza Pajohi-AlaMoti[2]✉, Ali Kalantari-Hesari[3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran*
[2] *Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran*

10.22059/jvr.2022.350769.3308
Received: *21 September 2022,* ***Accepted:*** *22 November 2022*

Abstract

BACKGROUND: Meat is one of society's most important nutritional needs, the price of which is higher than other food groups. In recent years, the use of meat products has increased due to human lifestyle changes. Fraud in meat products occurs for various reasons, including the economic value of meat. Therefore, it is crucial to use fast and accurate methods of identifying these frauds.

OBJECTIVES: The purpose of this study is to determine the unauthorized tissue by a histological method as well as to determine the unauthorized species used in meat products of factories in Hamadan province.

METHODS: In the summer of 2021, fifty samples were collected from active production units of the Hamedan province that were available in the Hamadan city market and transferred to the laboratory for histological laboratory and animal species determination by PCR test. For the histology test based on the national standard 6103, the samples were subjected to fixation, passage (dehydration, clearing, impregnation with molten paraffin), blocking, sectioning, and H&E staining. PCR method was used to determine the type of animal species used in the production of the collected samples.

RESULTS: The results confirmed the presence of unauthorized tissues, including bone, cartilage (articular and respiratory cartilage), skin, and glandular organ in meat products. Also, PCR test results showed that chicken meat was found in 100% of the samples labeled with beef.

CONCLUSIONS: The presence of illegal tissue and the use of chicken meat in products labeled as beef meat is evident in the sausages produced in Hamadan province.

Keywords: Chicken meat, Counterfeits, Histology, PCR, Red meat

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Ali Kalantari-Hesari, Tel/Fax: 081-34227475 / 081-34227350

How to cite this article:

Ghaderi H, Pajohi-AlaMoti M R, Kalantari-Hesari A. Investigating the Fraud of Using Unauthorized Tissues in Sausages Produced in Hamadan Province. J Vet Res, 2023; 77(4): 203-212. doi: 10.22059/jvr.2022.350769.3308

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sampling sausage brands from Hamedan city stores that were produced in this province.
Table 2. Specific primers were designed to determine the type of animal meat (13).
Table 3. Sausages with unauthorized tissue in Hamedan city stores were produced in this province.
Table 4. Evaluation of unauthorized tissue according to the percentage of sausage meat in Hamedan city stores produced in this province.
Figure 1. Unauthorized tissue was observed in the samples. H&E staining. A- bone in 40 % sausage (brand B); B- hyaline cartilage in 60 % sausage (brand A); C- trachea cartilage in 40 % sausage (brand A); D- Salivary gland in 40 % sausage (brand A); E- skin in 40 % sausage (brand A); F- Sarcocystis cyst in 80 % sausage (brand B).
Figure 2. PCR test results of red meat labeled samples. L- gene ladder; N- negative control; P1- goat meat positive control (157 bp); P2- chicken meat positive control (227 bp); P3- beef positive control (274 bp); P4- sheep meat positive control (329 bp); P5- pig meat positive control; P6- equine meat positive control (439 bp); 1-10- sausage samples.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۲۰-۲۱۳
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

مطالعه اثر ضد باکتریایی ترکیب اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare*) و سرخارگل (*Echinaceae purpurea*) روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*) در شرایط آزمایشگاهی

اشکان زرگر[۱]، مهرداد اردشیری[۱]، علیرضا خسروی[۲]، علی طاهری‌میرقائد[۱]، حسام‌الدین اکبرین[۳]، مهران احمدپور[۴]، علی حدادی[۴]

[۱] *گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۴] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۶ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۵ آذر ماه ۱۴۰۱

10.22059/jvr.2022.276558.2910 20.1001.1.20082525.1401.77.4.2.3

چکیده

زمینهٔ مطالعه: افزایش روزافزون مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به علاوه تجمع آن‌ها در بدن ماهی به دنبال افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های باکتریایی، در کنار عوارض جانبی این ترکیبات بر محیط‌زیست و انسان موجب شده است تا در سال‌های اخیر مطالعات متعددی روی جایگزین‌های احتمالی سالم‌تر مانند ترکیبات گیاهی و اثرات مثبت آن‌ها انجام شود.

هدف: بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علیه باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در شرایط آزمایشگاهی.

روش‌کار: رقت‌های متوالی از ترکیب اسانس جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودایلوشن تهیه گردید. همچنین با استفاده از روش انتشار دیسک حاوی ترکیب اسانس‌ها و نیز آنتی بیوتیک‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری سنجیده شد.

نتایج: غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی، خاصیت کشندگی و غلظت ۶/۲۵ به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی، خاصیت مهارکنندگی رشد را دارند. از طرفی هرچند باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* مورد مطالعه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس‌تر بوده ($P<۰/۰۵$) ولی ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل عملکرد بهتری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری نیز با نتایج حاصل از MIC و MBC مطابقت داشت و حاکی از تأثیر مثبت این ترکیب گیاهی بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود. به علاوه اثر ضدقارچی عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی بر روی گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیداآلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای در کشت روی سابورو دکستروزآگار نشان داده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان از اثرات مثبت باکتری کشی اسانس‌های مذکور در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های تجاری موجود در شرایط آزمایشگاهی داشت. مطالعات بالینی (In vivo) بیشتری در زمینه استفاده از ترکیب اسانس‌های مذکور به جهت مقابله با بیماری لاکتوکوکوزیس مورد نیاز بوده و پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: اثر ضد باکتریایی، اسانس سرخارگل، اسانس مرزنجوش، *لاکتوکوکوس گارویه*، MIC، MBC

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *اشکان زرگر، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری با رشد سالیانه بیش از ۱۰ درصد دارای سریع‌ترین میزان رشد در بین تولیدات دامی در جهان است. در این ارتباط کمبود منابع آبی سبب شده است که پرورش متراکم، جایگزین روش‌های سنتی و نیمه متراکم شود. در این شرایط معمولاً به‌علت بروز استرس، نزدیکی مزارع به یکدیگر و عدم رعایت اصول بهداشتی خطر ابتلا به بیماری‌ها افزایش یافته است که این خود سبب ضررهای اقتصادی کلان در این صنعت شده است (۱). از جمله این بیماری‌ها لاکتوکوکوزیس بوده که عامل آن *لاکتوکوکوس گارویه* است. این باکتری یک کوکسی گرم مثبت، آلفا همولیتیک، بی‌هوازی و غیر متحرک است که توانایی تولید اسپور را ندارد و به صورت جفت یا زنجیره‌های کوتاه قابل مشاهده است (۲). این بیماری تاکنون در بسیاری از گونه‌های مختلف آب شیرین و شور گزارش شده است و هنگامی که درجه حرارت آب به بیش از ۱۵ درجه سانتی‌گراد برسد شدت بیماریزایی بیشتر می‌شود (۳). استفاده مداوم و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و کنترل لاکتوکوکوزیس باعث پیدایش سویه‌های مقاوم باکتری شده است (۴). از طرف دیگر استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر تحمیل هزینه‌های اقتصادی زیاد منجر به باقی ماندن دارو در بافت‌ها و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مصرف کنندگان انسانی و مشکلات زیست محیطی نیز شده است (۵). از این رو در سال‌های اخیر استفاده‌های درمانی و پیشگیرانه از ترکیبات گیاهی که اثرات سوء ترکیبات آنتی‌بیوتیکی را ندارند رو به افزایش است (۶).

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) یکی از گیاهان دارویی با ارزش از خانواده کاسنی (Asteraceae) است که توانسته در دو دهه اخیر جایگاه مهمی در صنایع داروسازی پیدا کند (۷). سرخارگل یکی از مهم‌ترین گیاهان دارای اثر تحریک ایمنی ثابت شده است که در درمان و پیشگیری از سرماخوردگی و دیگر بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود (۸). اسید کافئیک و اسید شیکوریک در سرخارگل دارای خاصیت ضد ویروسی و ترکیب اکیناکوزید آن دارای خاصیت ضدمیکروبی است. به‌نظر می‌رسد ترکیبات گلیکوپروتئینی، پلی‌ساکاریدی، مشتقات اسید کافئیک و آلکیل آمیدی موجود در این گیاه فعالیت سیستم ایمنی را افزایش می‌دهد (۹،۱۱).

گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) که با نام‌های پونه کوهی یا آویشن کوهی نیز شناخته می‌شود، گیاهی یک ساله و علفی و در برخی مواقع دو ساله است. ترکیب اسانس آن بسیار پیچیده و در گونه‌های مختلف متفاوت است. ترکیبات اصلی آن شامل تیمول، کارواکرول، گاما تریپسین، متیل کارواکرول و آلفا بیسابولن است که بر اساس فصل، مکان و شرایط اکولوژیکی این ترکیبات می‌توانند متفاوت باشند (۱۲). مطالعات زیادی بر روی خواص ضد باکتریایی مرزنجوش انجام گرفته است. از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه Saeed و Tariq در سال ۲۰۰۹ اشاره کرد که به تأثیرات ضد باکتریایی این ترکیب گیاهی دلالت داشته است (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی اثر ضد میکروبی اسانس مرزنجوش انجام گرفت نتایج حاکی از آن بود که این اثرات ناشی از اجزای آن خصوصاً تیمول و کارواکرول است (۱۴). Stojković و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اثرات سینرژیستی مرزنجوش و آویشن باغی مطالعه‌ای انجام دادند که نتایج این مطالعه نیز حاکی از آن بود که استفاده از این مواد به‌صورت ترکیبی بیشترین اثرات ممانعت کنندگی را در برابر باکتری‌ها دارد (۱۵).

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیب اسانس‌های گیاهی مرزنجوش و سرخارگل در برابر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* صورت گرفته است.

مواد و روش کار

تهیهٔ عطرمایه‌ها: اسانس‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت پارس ایمن دارو تهیه، ترکیب و تحت عنوان آنتی بیوفین در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه باکتری: جدایه *لاکتوکوکوس گارویه* مورد استفاده در این مطالعه از کلکسیون قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در اختیار قرار گرفت. این ایزوله قبلاً از ماهیان قزل‌آلای بیمار جداسازی شده و به روش‌های ژنتیکی و مولکولی شناسایی شده است.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory Concentration): برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش میکرودایلوشن (Broth Micro Dilution) استفاده گردید. برای آزمایش MIC از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل درب‌دار استفاده شد. این میکروپلیت‌ها دارای هشت ردیف ۱۲ چاهکی به حجم ۲۵۰ میکرولیتر هستند. ابتدا از محیط کشت TSB به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف میزان ۱۰۰ میکرولیتر از

ترکیب گیاهی به همراه ۳ درصد دی متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته شد و در چاهک دوم ریخته شد و بعد از چند بار پر و خالی کردن توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم ریخته شد. این کار تا چاهک دهم ادامه یافت و در نهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری معادل با مک‌فارلند شماره ۱، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. چاهک ۱۱ ام به‌عنوان کنترل منفی (فاقد باکتری) و چاهک ۱۲ ام به‌عنوان کنترل مثبت (فقط حاوی باکتری) در نظر گرفته شد. پس از تلقیح باکتری‌ها، میکروپلیت به مدت ۳۰ ثانیه بر روی شیکر قرار گرفت تا به‌طور یکنواخت مخلوط گردد. سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در ساعت صفر و با طول‌موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در مرحله آخر میکروپلیت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام انکوباسیون، دوباره کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها، هم به‌صورت چشمی و هم توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر خوانده شد و کمترین غلظتی که کدورتی در آن مشاهده نشد به‌عنوان MIC منظور گردید.

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration): برای اندازه‌گیری MBC، از چاهک‌های فاقد کدورت (MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله برداشته شد و بر روی محیط بلاد آگار تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پلیتی که هیچ باکتری در آن رشد نکرد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه آزمایشات با سه تکرار انجام شدند (۱۶).

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد: به‌منظور سنجش خاصیت ضد باکتریایی این ترکیب گیاهی، روش انتشار دیسک و اندازه‌گیری هاله عدم رشد انجام شد. بدین منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند شماره یک (cfu ۱۰۸×۳ در هر میلی لیتر)، با استفاده از سمپلر به میزان ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط ژلوز خون ریخته شد. سپس به‌وسیله پیپت پاستور خم‌شده به‌صورت چمنی کشت داده شد. برای تعیین قطر هاله عدم رشد، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط اسانس بر اساس MIC به‌دست آمده بر روی دیسک خالی تلقیح شده و یک دیسک استاندارد آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل نیز به پلیت اضافه گردید. همچنین برای کنترل منفی ۱۵ میکرولیتر DMSO4% به یک دیسک خالی دیگر تلقیح شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از گذشت این مدت‌زمان هاله منطقه مهار رشد به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری شد و قطر چاهک از آن کسر شد. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و قطر هاله‌های به‌دست آمده ثبت گردید (۱۶،۱۷).

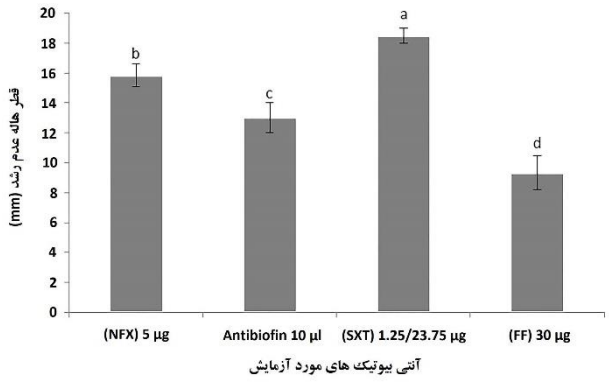
تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به نتایج مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷، از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ (mean±SD)، انجام گرفت.

نتایج

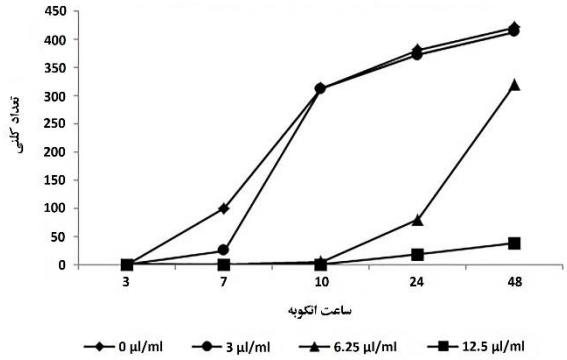
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده توسط روش میکرودایلوشن، غلظت‌های ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از این ترکیب اسانس گیاهی به ترتیب به‌عنوان MIC و MBC تعیین شدند.

نتایج حاصل از اثر ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل بر روی میانگین هاله‌های عدم رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری تریمتوپریم سولفومتوکسازول، فلورفنیکل، و انروفلوکساسین در نمودار (۱) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* مورد مطالعه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس می‌باشد ($P<۰/۰۵$) ولی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول نسبت به فلورفنیکل عملکرد بهتری داشته است ($P<۰/۰۵$) (نمودار ۱).

نتایج تعداد کلنی‌های شمارش شده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در غلظت‌های مختلف ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نمودار (۲) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده با افزایش زمان تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده افزایش یافته که بیشترین کلنی تشکیل شده مربوط به تیمار شاهد و کمترین تعداد کلنی تشکیل شده مربوط به غلظت ۱۲/۵ میکرو لیتر بر میلی لیتر می‌باشد.



نمودار ۱. مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به تفکیک آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی بیوفین ($P<۰/۰۵$). NFX: انروفلوکساسین؛ SXT: تری‌متوپریم سولفومتوکسازول؛ FF: فلورفنیکل.



نمودار ۲. نتایج تعداد کلنی‌های شمارش‌شده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در غلظت‌های مختلف.

بحث

در سال‌های اخیر، استفاده از انواع بی‌خطر محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی به دلیل مزیت‌های متعدد آن‌ها از جمله در دسترس بودن، آسیب نرساندن به محیط‌زیست، عدم تجمع در بدن، امکان تولید در مقیاس وسیع با قیمت مناسب توجهات زیادی را در سطح جهان به خود اختصاص داده است و به یکی از موضوعات مورد توجه در مطالعات علمی تبدیل شده است (۱۵).

به همین دلیل در مطالعه حاضر از ترکیب اسانس‌های گیاهی مرزنجوش و سرخارگل که در ایران در سال‌های اخیر در دسترس هستند استفاده شد.

مطالعات زیادی روی عملکرد اسانس‌ها در صنعت آبزی‌پروری صورت گرفته است بر اساس این مطالعات از اسانس‌ها می‌توان به‌عنوان محرک سیستم ایمنی (۱۸،۱۹)، باکتری‌کشی (۱۶،۲۰)، محرک رشد (۱۹،۲۱)، کاهش‌دهنده استرس اکسیداتیو (۲۲)، ممانعت‌کننده از بیان ژن (۲۳،۲۴)، کنترل‌کننده آلودگی‌های قارچی (۲۵) و به‌عنوان یک ماده ضدعفونی برای تجهیزات و استخرها (۲۶) استفاده کرد.

در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی ۶/۲۵ و حداقل غلظت کشندگی ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین نتایج آزمایش هاله عدم رشد باکتری نشان‌دهنده افزایش اثر ضد باکتریایی با افزایش دوز اسانس بود و نتایج آزمایشات MIC و MBC را تأیید کرد. Mahbobi و Feizabadi در سال ۲۰۰۹ اظهار داشتند که اثر ضد میکروبی اسانس مرزنجوش بیشتر ناشی از اجزای تیمول و کارواکرول آن است (۱۴). همچنین در مطالعه Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۵ که در زمینه تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* انجام شد غلظت ۰/۱۲ میکرولیتر به‌عنوان MIC بیان ژن‌های حاد pavA و Hly را به صورت معنی‌داری کاهش داد (۲۴).

در مورد هاله عدم رشد باکتری در مطالعه حاضر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس بود. ولی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول نسبت به فلورفنیکل عملکرد بهتری داشتند ($P<۰/۰۵$). Kav و Erganis در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که *لاکتوکوکوس گارویه* به اریترومایسین حساس است اما نسبت به کلیندامایسین، لینکومایسین و اسپیرامایسین مقاوم می‌باشد. این مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کلیندامایسین را می‌توان به‌عنوان کلید شناسایی *لاکتوکوکوس گارویه* عنوان کرد (۲۶). مغایرت نتایج حاضر را می‌توان در متفاوت بودن سویه مورد مطالعه دانست.

Saeed و Tariq در سال ۲۰۰۹ اثر ضد باکتریایی اسانس مرزنجوش را روی تعداد زیادی از سویه‌های باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه قرار دادند که در تمام موارد مورد آزمایش در این مطالعه قطر هالهٔ عدم رشد باکتری به‌طور مشخص مشاهده شد (۱۳). Sivropoulou و همکاران در سال ۱۹۹۶ در مطالعه‌ای با بیان این‌که تیمول و کارواکرول در اسانس مرزنجوش بیشترین اثرات ضد باکتریایی را دارند، بیان داشتند که این اسانس اثرات ضد باکتریایی قوی در برابر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد (۲۷).

ترکیب مرزنجوش و سرخارگل رشد باکتری را به‌طور مؤثری مهار می‌کند که میزان آن به غلظت ماده مؤثره، دما و زمان بستگی

دارد. کارواکرول که جز اصلی این ترکیب می‌باشد از طریق کاهش، سنتز ATP و افزایش هیدرولیز، غشاء را نفوذپذیرتر می‌کند همچنین سطوح بالای کارواکرول با کاهش pH داخلی باکتری، خروج پتاسیم داخل باکتری را افزایش می‌دهد که در نهایت باعث تخریب غشاء و متلاشی شدن دیواره باکتری می‌شود (۲۸). Izadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که اسانس سرخارگل دارای اثرات ضد میکروبی فراوانی بر روی ۱۳ گونه باکتری است (۷). خواص ضد میکروبی اسانس سرخارگل می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات اکیناسن، اکیناکوزید و آل کیل آمیدی باشد. Jamshidi و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای نشان دادند که اسانس و عصاره‌های اتانولی قسمت‌های مختلف گیاه سرخارگل اثر مهارکنندگی و کشندگی بر باکتری *Xanthomonas arboricola pv. juglandis* دارد (۲۹). همچنین با افزایش زمان تعداد کلنی‌های تشکیل شده افزایش یافته است که بیشترین کلنی تشکیل شده مربوط به تیمار شاهد و کمترین تعداد کلنی تشکیل شده مربوط به غلظت ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه‌ای دیگر توسط Mora-Sánchez و همکاران در سال ۲۰۲۰ تأثیر عصاره چند گونه مرکبات در مقابله با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلا را مورد ارزیابی قرار دادند و اذعان داشتند که این عصاره مقاومت ماهی را در مواجهه با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به شکل معنی‌دار افزایش می‌دهد ($P<۰/۰۰۱$) (۳۰). علاوه بر عصاره‌های گیاهی از پوست میوه‌ها نیز به دلیل خاصیت پره بیوتیکی آن‌ها می‌توان در تغذیه آبزیان و مقابله با باکتری‌های بیماریزایی مثل *لاکتوکوکوس گارویه* کمک گرفت. Zargar و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر اسانس آویشن باغی بر رشد، پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را ارزیابی کردند که نتایج بیانگر اثرات مثبت اسانس یاد شده است (۳۱). Patel و همکاران در سال ۲۰۲۰ از عصاره پوست میوه‌های پرتقال، لیمو شیرین، آناناس و انار در تغذیه تیلاپیای نیل و مواجه ساختن با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بهره جستند که نتایج این مطالعه اثربخشی عصاره‌گیری صنعتی از پوست میوه‌ها به عنوان پسماند را تأیید کرد (۳۲). عصاره شیرین بیان را Zaheri Abdevand و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده با واکسن لاکتوکوکوزیس مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ادجوانت مونتانایدو عصاره شیرین بیان متعاقب استفاده از واکسن لاکتوکوکوزیس موجب بهبود برخی از شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد (۳۳). Gholamhosseini و همکاران در سال ۲۰۲۰ عصاره ترخون را بر پاسخ ایمنی، فاکتورهای بیوشیمیایی خون و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار دادند و نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره گیاه ترخون می‌تواند علاوه بر افزایش رشد ماهی، موجب بهبود فاکتورهای ایمنی و پارامترهای خونی شود (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر Said و همکاران در سال ۲۰۲۲ خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی عصاره‌های قسمت‌های مختلف انار و کاج سیاه آناتولی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تمام میوه انار را می‌توان به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال در نظر گرفت. همچنین عصاره مخروط کاج سیاه آناتولی را می‌توان یک ترکیب آنتی باکتریال نسبت به پاتوژن‌های ماهی دانست (۳۵).

مطالعات متعددی به اثربخش بودن عصاره سرخارگل اشاره کرده است. در مطالعه‌ای دیگر Alinezhad در سال ۲۰۱۹ عصاره سه گیاه سرخارگل، بومادران و نعناع تند را در بهبود فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار داد و نتایج استخراج شده از این مطالعه، بر مؤثر بودن عصاره هر سه گیاه فوق الذکر صحه گذاشته است (۳۶). Khajehpour و Javadian در سال ۲۰۲۱ اثر عصاره سرخارگل را روی شاخص‌های رشد، هماتولوژی و ایمنی ذاتی ماهی خاویاری سیبری مورد بررسی قرار دادند و شاهد بهبود شاخص‌های ذکر شده بودند (۳۷). Akbari و Kakoolaki در سال ۲۰۱۹ گیاه سرخارگل را در ماهی کفال خاکستری مورد مصرف به صورت خوراکی قرار دادند و با باکتری *Photobacterium damselae* مواجه ساختند. نتایج نشان از تأثیر مثبت گیاه سرخارگل بر کاهش تلفات ناشی از عفونت و همچنین افزایش رشد و فاکتورهای ایمنی داشت (۳۸).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اثرات ضد باکتریایی حاصل از ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل در شرایط آزمایشگاهی بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*، به نظر می‌رسد که استفاده ترکیبی این دو اسانس باعث افزایش کارایی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. همچنین احتمالاً بتوان از ترکیب این دو اسانس به‌عنوان کاهش‌دهنده مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری و حتی برای درمان بیماری لاکتوکوکوزیس استفاده کرد. البته لازمه انجام این کار، مطالعات گسترده‌تر در شرایط مزرعه و درون‌تنی (invivo)، مشخص کردن دوز مؤثر آن، مکانیسم اثر و بررسی اثرات سوء احتمالی آن است.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری و حمایت‌های شرکت پارس ایمن دارو در اجرای مطالعه حاضر تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hatha M, Vivekanandhan A A, Joice G J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. Int J Food Microbiol. 2005; 98(2): 131-134. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.017
2. Vendrell D, Balcázar J L, Ruiz-Zarzuela I, De Blas I, Gironés O, Múzquiz J L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2006; 29(4): 177-198. doi: 10.1016/j.cimid.2006.06.003
3. Soltani M, Nikbakht G, Ebrahimzadeh Moussavi H A, Ahmadzadeh N. Epizootic outbreak of lactococcosis caused by Lactococcus garvieae in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2008; 28(5): 95-106.
4. Seyfried E E, Newton R J, Rubert K F, Pedersen J A, McMahon K D. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. Microb Ecol. 2010; 59(4): 799-807. doi: 10.1007/s00248-009-9624-7
5. Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol. 2006; *8*(7): 1137-1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
6. Syahidah A, Saad C R, Daud H M, Abdelhadi Y M. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iran J Fish Sci. 2015; 14(1): 27-44. doi: 20.1001.1.15622916.2015.14.1.3.0
7. Yavari A, Shokrpour M, Tabrizi L, Hadian J. Analysis of morphological variation and general combining ability in half sib families of *Echinacea purpurea* L. Iran J Hortic Sci. 2017; 47(4), 617-630. doi: 10.22059/IJHS.2017.119292.723
8. Linde K, Barrett B, Wolkart K, Bauer R, Melchart D. Echinacea for preventing and treating the common cold. Cochrane Database Syst Rev. 2006; Issue 1. Art. No.: CD000530. doi: 10.1002/14651858.CD000530.pub2
9. Burger R A, Torres A R, Warren R P, Caldwell V D, Hughes B G. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-379. doi: 10.1016/s0192-0561(97)00061-1
10. See D M, Broumand N, Sahl L, Tilles J G. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacology. 1997; 35(3): 229-235. doi: 10.1016/s0162-3109(96)00125-7
11. Babaalian Amiri A, Azari Takami G, Afsharnasab M, Zargar A, The effect of different levels of Mix oil on growth performance and survival rate of Oncorhynchus mykiss in challenging with Yersinia ruckeri. J Anim Environ. 2020; 12(3): 259-264. doi: 10.22034/aej.2020.117943
12. Vazirian M, Mohammadi M, Farzaei M H, Amin G, Amanzadeh Y. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare subsp. vulgare* essential oil from Iran. Res J Pharmacogn. 2015; 2(1): 41-46.
13. Saeed S, Tariq P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. Pak J Pharm Sci. 2009; 22(4): 421-424. PMID: 19783523
14. Mahboubi M, Feizabadi M. The antimicrobial activity of thyme, sweet marjoram, savory and eucalyptus oils on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. JMP. 2009; 2 (30): 137-144.
15. Stojković D, Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Ristić M, Šiljegović J, Soković M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. Arch Biol Sci. 2013; 65(2): 639-643. doi: 10.2298/ABS1302639S
16. Soltani M, Ghodratnama M, TAHERI M A, Zargar A, Rouhollahi S H. The effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout farms. J Vet Microbiol. 2013; 9(26): 1-13.
17. Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A, Taheri Mirghaed A, Yadollahi F. Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iran J Fish Sci. 2013; 12(3): 702-716.
18. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 2010; 28: 354-361. doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.013
19. Soltani M, Zarifmanesh T, Zorriehzahra S.J. Effect of *Zataria multiflora* essential oils on rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) complement component activity and lysozyme. I S Fish Sci. 2012; 4: 13-23. doi: 10.22092/ISFJ.2017.110083
20. Davood N. Antibacterial activity of some medicinal plants against fish pathogenic *Aeromonas sp*. isolated from farmed common carp (*Cyprinus carpio*). J Tishreen edu sy Biol Sci Series. 2011; 33(3): 181-193.
21. Zheng Z L, Tan J Y W, Liu H Y , Zhou X H, Xiang X, Wang K Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against Aeromonas hydrophila in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) .Aquac. 2009; 292: 214–218. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.025
22. Mahmoodi A, Roomiani L, Soltani M, AkhondzadeBasti A, Kamali A, Tehrani S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and extracts from *Rosmarinusofficinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethumgraveolens* and *Eucalyptus globulus*. Glob Vet, 2012; 9: 73-79.
23. Soltani M, Mohamadian S, Ebrahimzahe-Mousavi H A, Mirzargar S S, Taheri-Mirghaed A, Rouholahi S M, Ghodratnama M. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in *Lactococcus garvieae*, the cause of lactococcosis in farmed fish .Aquac. 2014; 433:143–147. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.024
24. Soltani M, Mohamadian S, Rouholahi S H, Soltani E, Rezvani S. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil

suppresses the expression of PavA and Hly genes in *Lactococcus garvieae*, the causative agent of lactococcosis in farmed fish. Aquac. 2015; 442: 74-77. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.001

25. Sharif Rohani M l, Dashtiannasab A, Ghaednia B, Mirbakhsh M, Yeganeh V, Vahabnezhad A. Investigation of the possibility use of *Zataria multiflora* (Avishan-e Shirazi) essence in control of fungal contamination of cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Iran J Fish Sci. 2013; 12(2): 454-464.
26. Kav K, Erganis O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout *(Oncorhyncus mykiss)* farms. Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52: 223-226.
27. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. J Agric Food Chem. 1996; 44(5): 1202-1205. doi: 10.1021/jf950540t
28. Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4): 1561-1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
29. Jamshidi S, Andargani S, Oraei M. Antibacterial effect of flower essential oils and plant organs' extracts of purple coneflower on the bacterium *Xanthomonas arboricola pv. Juglandis*, Mod. Sci Sustain Agric J. 2014; 10(2): 11-19.
30. Mora-Sánchez B, Fuertes H, Balcázar J L, Pérez-Sánchez T. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae.* Acta Vet Scand. 2020; 62: #38. doi: 10.1186/s13028-020-00536-0
31. Zargar A, Rahimi-Afzal Z, Soltani E, Taheri Mirghaed A, Ebrahimzadeh-Mousavi H A, Soltani M, Yuosefi P. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed Thymus vulgaris essential oils. Aquac Res. 2019; 50 (11): 3097-3106, doi: 10.1111/are.14243
32. Patel P, Patel B, Amarasen N, Joshi B, Shah R, Krishnamurthy R. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from the fish gut for in vitro fermentation with carbohydrates from agro-industrial waste. J Btre. 2020; 28: e00555. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00555
33. Zaheri Abdevand L, Soltani M, Shafiei S. Adjuvant effect of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on the efficacy of lactococcosis vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran J Fish Sci. 2021; 20 (3): 646-662.
34. Gholamhosseini A, Hosseinzadeh S, Soltanian S, Banaee M, Sureda A, Rakhshaninejad M, Heidari A, Anbazpour H, Effect of dietary supplements of *Artemisia dracunculus* extract on the haemato-immunological and biochemical response, and growth performance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac Res. 2021; 52: 2097-2109. doi: 10.1111/are.15062
35. Saıd O, Aksut Y, Yardımcı R E, Karataş Steınum S, Yiğit H, Tel A Z, Arda N. Antioxidant and antibacterial activities of methanol extracts from various plant parts of pomegranate and pnatolian black pine. CUPMAP. 2022; 5(1): 50-62. doi: 10.38093/cupmap.1122429.
36. Alinezhad S. Effects of diets containing dry extracts of *Achillea millefolium*, *Mentha piperita* and *Echinacea purpurea* on growth, hematological and immunological indices in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Iran J Aqua Anim Health. 2019; 5(1): 1-16.
37. khajehpour A, Javadian R. Effects of orally-administered *Echinacea purpurea* on growth indices, hematology and innate immunity in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Aqua Anim Nutr. 2020; 6(1): 13-25. doi: 10.22124/janb.2020.17007.1094
38. Akbary P, Kakoolaki S. Growth, hematological, innate immune responses of *Mugil cephalus* fed with *Echinacea purpurea*-supplemented diet against *Photobacterium damselae* infections. Int J Environ Sci Technol. 2019; 16: 325-334. doi: 10.1007/s13762-017-1578-6

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

Study of In-Vitro Antimicrobial Effects of *Origanum vulgare* and *Echinacea purpurea* Essential Oils on *Lactococcus garvieae*

Ashkan Zargar[1✉], **Mehrdad Ardeshiri**[1✉], **Alireza Khosravi**[2✉], **Ali Taheri Mirghaed**[1✉], **Hesam Akbarein**[3✉], **Mehran Ahmadpour**[4✉], **Ali Haddadi**[4✉]

[1] *Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2022.276558.2910
Received: *28 September 2022*, ***Accepted:*** *26 November 2022*

Abstract

BACKGROUND: There is growing evidence that resistance to antibiotics is increasing, and because of their wide range of negative impacts on the environment and humans, also accumulative effects in fish meat and hazards for humans, there have been numerous studies conducted using medicinal plants as a healthier alternative to antibiotics.
OBJECTIVES: This study examined the antibacterial effect of two native medicinal herbs (oregano and echinacea mixed essential oil) on *Lactococcus garvieae* compared with some commercial antibiotics used in fish farms.
METHODS: The antibacterial activities against a fish bacterial pathogen (*Lactococcus garvieae*) were tested using the disk diffusion method, followed by the determination of minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations via sequential dilution of essential oil by broth micro dilution method.
RESULTS: The results showed antimicrobial activities of mentioned mixed essential oil with MIC ≥ 6.25 μL/mL and MBC ≥ 12.5 μL/mL. Also, the measurements of the diameter of inhibitory zones are consistent with the results of MIC and MBC, indicating the positive effect of this plant mix oil *Lactococcus garvieae*. However, the *Lactococcus garvieae* was more sensitive to enrofloxacin (NFX 5), and sulfamethoxazole & trimethoprim (SXT) (P<0.05), but the combination of oregano and echinacea essential oils performed better than florfenicol (FF) despite the weaker effects against mentioned two antibiotics.
CONCLUSIONS: The results approved the antibacterial activity of the mixed essential oil of oregano and echinacea against *Lactococcus garvieae* on the laboratory scale. Using these compounds as a possible substitute for antibiotic compounds requires more clinical studies.

Keywords: *Antimicrobial Effects, Echinaceae purpurea*, MBC, MIC, *Lactococcus garvieae, Origanum vulgare*

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Ashkan Zargar, Tel/Fax: 021-61117091 / 021-66933222

How to cite this article:

Zargar A, Ardeshiri M, Khosravi A, Taheri Mirghaed A, Akbarein H, Ahmadpour M, Hadadi A. Study of In-Vitro Antimicrobial Effects of *Origanum vulgare* and *Echinacea purpurea* Essential Oils on *Lactococcus garvieae*. J Vet Res, 2023; 77(4): 213-220. doi: 10.22059/jvr.2022.276558.2910

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Disc diffusion test compares antibiotics and antibiofin sensitivity against *Lactococcus garviae* (P<0.05). NFX: *Enrofloxacin, SXT:* Sulfamethoxazole and trimethoprim, FF: florfenicol.
Graph 2. Colony count results of *Lactococcus garvieae* in different densities of antibiofin.
Figure 2. C. The phenytoin treatment group on day 14.
Figure 2. D. The control group on day 14.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۲۷-۲۲۱
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی برگ زیتون (*Olea europaea .L*) بر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی

حسین شکیبا[۱]، حمیدرضا محمدی[۲]، اشکان جبلی‌جوان[۳]، رضا نارنجی‌ثانی[۲]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۲] *گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۳] *گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، ایران*

تاریخ دریافت: ۱۸ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۰ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.335938.3218 20.1001.1.20082525.1401.77.4.3.4

چکیده

زمینهٔ مطالعه: التهاب پستان تحت بالینی نقش مهمی در زیان‌های اقتصادی مزارع گاو شیری ایفا می‌کند. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین عوامل این بیماری بوده که درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک دارای عوارضی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی است و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گیاهی می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش این عوارض جانبی باشد.

هدف: تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی به منظور دستیابی به یک درمان دارویی گیاهی.

روش‌کار: مطالعه حاضر روی ۱۷۵ راس گاو ماده نژاد هلشتاین انجام گرفت. نمونه شیر به روش استریل از گاوها اخذ گردید و با استفاده از آزمون کالیفرنیایی ۶۰ راس گاو مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی تعیین شدند. نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کشت از نمونه‌های مثبت جداسازی گردید. سپس به روش میکرودایلوشن حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون بر باکتری جدا سازی شده تعیین شد.

نتایج: از ۱۷۵ راس گاو مورد مطالعه، ۶۰ راس گاو در آزمون کالیفرنیایی التهاب پستان مثبت بودند که از ۱۴ مورد نمونه شیر موارد مثبت، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید. حداقل غلظت مهاری عصاره الکلی برگ زیتون *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۲۰۰۰ پی پی ام بود.

نتیجه‌گیری نهایی: عصاره الکلی برگ زیتون دارای اثر ضد باکتریایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد التهاب پستان است و حداقل غلظت مورد نیاز برای بروز این اثر ۱۲۰۰۰ پی پی ام می‌باشد. اما در آینده به مطالعات بیشتری در زمینه اثرات این گیاه بر سایر عوامل باکتریایی التهاب پستان تحت بالینی گاو و بررسی مواد مؤثره موجود در عصاره نیاز است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، التهاب پستان، زیتون، شیر، گاو

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: حمیدرضا محمدی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

مقدمه

التهاب پستان یکی از زیان آورترین بیماری‌های مزارع گاو شیری است و فرم تحت بالینی این بیماری به علت پنهان ماندن از چشم دامدار سبب ضررهای اقتصادی سنگینی ناشی از کاهش تولید شیر، دور ریختن شیر، مستعد شدن دام به سایر بیماری‌ها، مشکلات تولید مثلی و حذف دام می‌شود (۱). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین عوامل باکتریایی التهاب پستان تحت بالینی بوده که با داشتن آنزیم پنی‌سیلیناز به درمان با برخی از آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام مقاوم است. دامپزشکان تا به امروز کوشیده‌اند تا با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک بر ورم پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* فائق آیند (۲). با

توجه به عوارض جانبی بالا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و باقی مانده دارویی آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند به عنوان راه حل مناسبی در جهت درمان التهاب پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مطرح گردد (۳). داروهای گیاهی دارای طیف متنوعی از اثرات درمانی و حداقل اثرات جانبی بوده و علاوه بر این امر می‌توان از آنان به عنوان راهکاری مناسب در مقابله با مقاومت دارویی استفاده نمود. در ضمن با توجه به تنوع پوشش گیاهی در ایران می‌توان با استفاده از این ترکیبات در جهت حمایت از تولید ملی و کاهش واردات دارویی نیز بهره جست (۴). زیتون با نام علمی *Olea europaea* گیاهی از راسته نعناسانان است. این گیاه بومی سوریه و جنوب ترکیه بوده و امروزه در تمام نقاط دنیا که دارای آب و هوای مدیترانه‌ای هستند، مورد کشت قرار می‌گیرد (۵). در متون سنتی به خواصی همچون درمان تب ناشی از مالاریا به دنبال مصرف گیاه زیتون اشاره گردیده است (۶). طی مطالعات علمی اثرات ضدمیکروبی (۷)، ضدالتهابی (۸) و کاهندگی فشار خون (۹) برگ این گیاه به اثبات رسیده و طی مطالعاتی اثر ضدباکتریایی عصاره برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شده است (۱۰،۱۱). هدف از مطالعه حاضر تعیین حداقل غلظت مهاری یا همان MIC عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداسازی شده از گاوان مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی جهت دستیابی به داروی گیاهی مؤثر علیه التهاب پستان می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره: پس از تهیه ۲ کیلوگرم برگ زیتون در فروردین ماه سال ۱۳۹۶ از شهر سمنان، این گیاه به تأیید واحد پژوهش‌های گیاهی مؤسسه تحقیقات جهاد کشاورزی شهرستان سمنان رسید و پس از خشک شدن در سایه، گیاه مذکور به وسیله هاون به صورت پودر درآورده شد. پودر حاصل شده به مدت ۱۵ دقیقه با رعایت نسبت ۱ به ۵ در متانول ۸۰ درصد قرار گرفت و به مدت ۵ روز بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و محلول عبور کرده از صافی با دستگاه تبخیر تحت خلاء (روتاری) خشک گشت. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد (۱۲). در زمان آزمایش با مخلوط کردن ۰/۲ گرم از عصاره در ۴ میلی لیتر محیط آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO استوک اولیه با غلظت ۵۰۰۰۰ پی پی ام به دست آمد (۱۳) و با توجه به مطالعات صورت گرفته بر اثرات ضدمیکروبی عصاره الکلی برگ زیتون (۱۱)، از غلظت‌های ۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام در مطالعه حاضر استفاده گردید.

نمونه‌گیری: حجم نمونه در مطالعه حاضر بر اساس فرمول کوکران [$n= Z^2.P(1-P)/d^2$] و با توجه به مطالعه Islam و همکاران در سال ۲۰۱۱ تعیین گردید (۱۴) که مقادیر Z، P و d به ترتیب ۱/۹۶، ۰/۳ و ۵ درصد در نظر گرفته شد و با توجه به جمعیت هدف، حجم نمونه محدود محاسبه گردید که عدد به دست آمده برابر با ۳۰۱ بود. نمونه‌های شیر به صورت خوشه‌ای از گاوهای هلشتاین به ظاهر سالم از گاوداری صنعتی شهرستان سمنان تهیه شد. در هنگام نمونه هر گاو از لحاظ عدم وجود التهاب در پستان و کارتیه‌ها، عدم مشاهده لخته در شیر هر چهار کارتیه، فقدان علائم بالینی بیماری و تست کالیفرنیایی ورم پستان (CMT) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که کارتیه به صورت کامل شسته شد و با الکل ۷۰ درصد ریخته شده روی پنبه استریل ضدعفونی گردید. پس از خشک کردن کارتیه با حوله استریل یک بار مصرف، سه دوشش ابتدایی سرپستانک دور ریخته شد و ۲۰ میلی‌لیتر شیر در لوله‌های استریل جمع آوری گردید (۱۵). هر نمونه شیر اخذ شده بلافاصله با رعایت شرایط دمایی ۴- درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انتقال داده شد.

جداسازی باکتری: در آزمایشگاه هر نمونه شیر مربوط به کارتیه مثبت در CMT به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۱۰ میلی‌لیتر از آن با رعایت شرایط استریل به ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشت پپتون واتر افزوده گشت و مخلوط حاصله به مدت یک دقیقه بر روی شیکر گذاشته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها از انکوباسیون خارج شده و از آنان در محیط‌های برد پارکر آگار کشت خطی و انکوباسیون ۴۸ ساعته به عمل آمد. نمونه‌های مثبت شده در محیط مذکور که به صورت کلونی‌های سیاه کهربایی احاطه شده با حاله‌ای سفید بودند به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* احتمالی در نظر گرفته شدند و برای خالص سازی تحت کشت در محیط نوترینت آگار قرار گرفتند. کشت مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. کلنی‌های رشد کرده در این محیط با هدف تفریق باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر گونه‌های جنس استافیلوکوکوس تحت بررسی مرفولوژیک

و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز. اُکسیداز، DNase، تولید استون و تخمیر D-مانیتول قرار گرفتند. در بررسی مرفولوژیک پس از تهیه گسترش بر روی اسلاید شیشه‌ای، رنگ آمیزی گرم از وجود سلول‌های باکتریایی با ظاهر گرد، بنفش و خوشه‌ای حکایت داشت که نمایی شبیه به خوشه انگور را در ذهن بیننده تداعی می‌کرد (۱۶). جهت ذخیره سازی باکتری هر نمونه، پرگنه تأیید شده *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط BHI براث به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از آن با ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسیرین مخلوط گردید و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

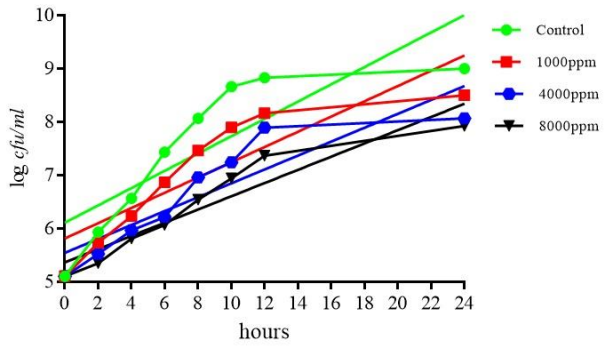
طراحی آزمایش: غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ زیتون (۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام) در محیط آزمایشگاهی برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به روش میکرودایلوشن بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره الکلی برگ زیتون بر منحنی رشد باکتری مذکور نیز بررسی شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری: جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط آبگوشت BHI برده و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا 10^{-6} تهیه شد و پس از کشت سطحی در محیط BHI آگار میزان غلظت باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هر گاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود. البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم‌زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد (۱۸).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن: در مطالعه حاضر، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت‌های متوالی از عصاره الکلی برگ زیتون (۲۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۲۰۰۰۰ پی پی ام) در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه انتقال داده شد و تا ۱۱ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت تقریبی 5×10^5 CFU باکتری در هر میلی لیتر) در هر چاهک اضافه گردید (۱۹). محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به شیکر مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در زمان صفر و با طول موج ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده گردید و با جذب نوری خوانده شده بعد از گرم‌خانه گذاری توسط Plate Reader تأیید شد. روش کار بدین صورت بود که افزایش جذب نوری به میزان بزرگ‌تر یا مساوی ۰/۱ نسبت به زمان صفر به معنی رشد باکتری و ایجاد کدورت و اولین غلظت عصاره که فاقد کدورت بود، به منزله حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شد (۲۰).

بررسی اثر عصاره الکلی برگ زیتون بر نمودار رشد باکتری: در این مرحله اثر غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره الکلی برگ زیتون بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده شامل ۱۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی پی ام بودند. بدین صورت که ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده با غلظت‌های مذکور در لوله استریل ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی 5×10^5 cfu در هر میلی لیتر به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در ساعات صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ تحت کشت سه‌تایی در محیط BHI آگار قرار گرفتند و پس از یک گرم‌خانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلونی‌ها شمارش و تعداد باکتری‌ها بر حسب cfu/ml ثبت گردید (۱۹).

تحلیل آماری: داده‌های حاصل از بررسی اثر عصاره بر نمودار رشد باکتری به روش رگرسیون خطی مدل سازی گردیدند و شیب نمودارها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.



نمودار ۱. روند رشد باکتری در طول ۲۴ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف بازدارنده رشد باکتری.

نتایج

نتایج مربوط به جداسازی باکتری: در مطالعه حاضر ۱۷۵ راس گاو مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۶۰ راس با سلامت بالینی دام، در آزمون کالیفرنیایی شیر مثبت و مشکوک به ورم پستان تحت بالینی اعلام شدند. طی بررسی آزمایشگاهی بر نمونه‌های مشکوک، از ۱۴ نمونه عامل *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید.

نتایج مربوط به تعیین MIC عصاره: در تمام نمونه‌های مثبت از لحاظ *استافیلوکوکوس اورئوس* گوده حاوی ۱۲۰۰۰ پی پی ام از عصاره برگ زیتون، اولین گوده فاقد کدورت بود. همچنین نتایج حاصل از جذب نوری توسط دستگاه پلیت خوان در طول موج ۶۰۰ نانومتر قبل و پس از انکوباسیون با نتایج مشاهده چشمی پلیت‌ها هم‌خوانی داشت.

نتایج مربوط به اثر عصاره بر روند رشد باکتری: غلظت‌های ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی پی ام نسبت به گروه کنترل سبب مهار معنی‌دار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول ۲۴ ساعت گردیدند ($P<۰/۰۵$). غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$) و فاقد اثر مهاری بر رشد باکتری در طول ۲۴ ساعت بود (نمودار ۱).

بحث

در مطالعه حاضر مشخص گردید که عصاره الکلی برگ زیتون نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا سازی از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، دارای اثر ضدباکتریایی وابسته به دز است و حداقل غلظت مورد نیاز از عصاره الکلی این برگ برای مهار رشد باکتری مذکور ۱۲۰۰۰ پی پی ام می‌باشد.

برگ زیتون سرشار از ترکیبات فنلی شامل هیدروکسی تیروزول، تیروزول،کافئیک اسید، پی-کوماریک اسید، وانیلیک اسید، وانیلین، اولئوروپین، لوتئولین، دیئوسمتین، روتین، ورباسکوزید، لوتئولین۷-گلوکوزید، آپیژنین۷-گلوکوزید و دیئوسمتین۷-گلوکوزید بوده و بیشترین سهم ترکیبات فنلی در برگ زیتون به اولئوروپین و هیدروکسی‌تیروزول تعلق دارد که هیدروکسی‌تیروزول پیش ساز اولئوروپین است (۲۱).

طی دو مطالعه Fattouch و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Estevinho و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که ترکیبات فنولی دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (۲۲،۲۳). همچنین Doman و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ترکیبات فنولی به‌وسیله اثر بر سطح غشای میکروارگانیسم‌ها اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌نمایند (۲۴). پس با توجه به مطالعات مذکور می‌توان خاصیت آنتی بیوتیکی عصاره الکلی برگ زیتون را به ترکیبات فنلی موجود در آن نسبت داد.

بر اساس مطالعه Acar و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت اثر بهتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند (۲۵). همچنین طی مطالعه Kalemba و Kunicka در سال ۲۰۰۳ مشخص گردید که سطح هیدروفیل دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی به عنوان سدی در برابر آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کند اما در باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی را تخریب می‌نمایند (۲۶). بنابراین می‌توان گفت که ممکن است عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با عوامل باکتریایی گرم منفی ورم پستان مانند *اشریشیاکلی* اثربخشی بیشتری داشته باشد.

براساس مطالعه Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که عصاره برگ زیتون دارای خاصیت ضد میکروبی است. بدین صورت که اثر ضدمیکروبی عصاره این برگ بر ۲۸ گونه میکروبی از جمله گونه‌های استافیلوکوکوس، لیستریا، لاکتوباسیلوس، سالمونلا و قارچهایی مثل کاندیدیا به روش براث میکرودایلوشن بررسی و MIC مربوط به هر کدام ارایه گردید. علاوه بر این Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که عصاره برگ زیتون اثر ضدمیکروبی قوی‌تری بر باکتری‌ها نسبت به قارچها دارد و در میان باکتری‌ها هم بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر نسبت به سایر گونه‌های باکتریایی مؤثرتر است (۲۷). طی مطالعه دیگری

Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژناس*، *کلبسیلا پنومونیه* و قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنز* و *کاندیدا نئوفورمنس* بررسی گردید و مشخص شد که برگ زیتون بر این میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی رشد دارد که این اثر در باکتری‌ها نسبت به قارچ‌ها بیشتر بود. همچنین در بین باکتری‌های تحت بررسی، باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و سودوموناس حساس‌تر بودند (۲۸). در مطالعه Rafiei و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی، استونی و آبی برگ گیاه زیتون به روش براث میکرودایلوشن بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی* مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که این گیاه ضمن داشتن اثر آنتی بیوتیکی بر این باکتری‌ها، بیشترین اثر مهاری را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است و عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی از اثربخشی بالاتری برخوردار است به طوری که حداقل غلظت بازدارندگی رشد این گیاه با عصاره الکلی نصف عصاره آبی بود (۲۹). به همین دلیل در این مطالعه از عصاره الکلی استفاده شد. در ضمن Chirinos و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که آب به‌دلیل قطبیت بالا و استون به‌دلیل غیر قطبی بودن حلال خوبی برای انحلال ترکیبات فنولی نمی‌باشند (۳۰). در مطالعه Sudjana و همکاران در سال ۲۰۰۹، MIC عصاره الکلی برگ زیتون برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۰/۸ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت بازدارندگی رشد که بر ۹۰ درصد نمونه‌ها اثر داشته است (MIC_{90}) ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد (۲۷). در مطالعه حاضر MIC عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱۲۰۰۰ پی پی ام) بود که با نتایج دو مطالعه همخوانی دارند و اختلافات اندکی که در میزان عصاره لازم برای تأثیر بر باکتری در مطالعات مختلف دیده می‌شود می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب عصاره باشد زیرا ترکیبات یک گیاه ممکن است بسته به ناحیه جغرافیایی، سن گیاه، فصل و روش استحصال عصاره دستخوش تغییر گردد (۲،۱۶). همچنین Gerrits و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که نتایج حاصل از حساسیت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی را نباید به شرایط طبیعی و درون‌تنی (in vivo) تعمیم داد زیرا ممکن است میزان حساسیت باکتری نسبت به یک آنتی‌بیوتیک در شرایط درون‌تنی متفاوت باشد (۳۱).

نتیجه‌گیری نهایی: به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۱۲۰۰۰ پی پی ام عصاره الکلی برگ زیتون بر *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجادکننده التهاب پستان تحت بالینی اثر مهاری دارد که می‌تواند به عنوان یک ترکیب دارویی ارزان و در دسترس در درمان التهاب پستان‌های ناشی از عامل *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گیرد. حال پیشنهاد می‌گردد که اثر ضدمیکروبی عصاره الکلی برگ زیتون طی یک کارآزمایی بالینی در گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گیرد و علاوه بر این اثر ضد میکروبی عصاره الکلی برگ زیتون بر سایر پاتوژن‌های مولد التهاب پستان گاو شیری، اجزاء مختلف مؤثره این گیاه نیز مورد مطالعه واقع شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه مرکزی و شیمی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان تشکر و قدردانی می شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hogeveen H, Steeneveld W, Wolf CA. Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. Annu Rev Resour Economics. 2019; 11: 289-312. doi: 10.1146/annurev-resource-100518-093954
2. Rosario I, Zunino PM, Gil AD, Laport A, Hirigoyen DJ. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. Austral J Vet Sci. 2017; 49(3): 191-194. doi: 10.4067/S0719-81322017000300191
3. Francoz D, Wellemans V, Dupré J, Roy J, Labelle F, Lacasse P. Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. J. Dairy Sci. 2017; 100(10): 7751-7770. doi: 10.3168/jds.2016-12512
4. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the

antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microb Pathog. 2019; 134: 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580 PMID: 31195112
5. Zeriouh W, Nani A, Belarbi M, Dumont A, De-Rosny C, Aboura I. Correction: Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. Sylvestris) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. PloS one. 2017; 12(4): 137-142. PMID: 28212423
6. Özcan MM, Matthäus B. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea L.*) leaves. Eur Food Res Technol. 2017; 243(1): 89-99.
7. Thielmann J, Kohnen S, Hauser C. Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. Int J Food Microbiol. 2017; 251: 48-66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.019 PMID: 28395179
8. Vezza T, Algieri F, Rodríguez- Nogales A, Garrido- Mesa J, Pilar-Utrilla M, Talhaoui N. Immunomodulatory properties of *Olea europaea* leaf extract in intestinal inflammation. Mol Nutr Food Res. 2017; 61(10): 61-67. PMID: 28731213
9. DalBó S, De-Aguiar-Amaral P. Medicinal Plants that can Cause Changes in Blood Pressure and Interactions with Antihypertensive Agents. A J Ethno. 2017; 4(1): 1-8.
10. Korukluoglu M, Sahan Y, Yigit A, Ozer, ET, Gucer S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea L.* leaf extracts. J Food Process. 2010; 34(3): 383-396.
11. Al-Quraishy S, Othman M S, Dkhil M A, Moneim A E A. Olive (Olea europaea) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. Biomed Pharmacother. 2017; 91: 338-349. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.069 PMID: 28463797
12. Gholami-Ahangaran M, Bahmani M, Zia-Jahromi N. Comparative and evaluation of anti-leech (*Limnatis nilotica*) effect of olive (*Olea europaea L.*) with levamisole and thiabendazole. Asian Pac J Trop Dis. 2012; 2: 101-103.
13. Lambert R, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 2001; 91(3): 453-462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x PMID: 11556910
14. Islam MA, Islam MZ, Islam MA, Rahman MS, Islam MT. Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. Bangladesh J Vet Med. 2011; 9(1): 73-78.
15. Godden SM, Jansen JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. Can Vet J. 2002; 43(1): 38. PMID: 11802668
16. Thaker HC, Brahmbhatt MN, Nayak JB. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand. Vet World. 2013; 6(1):10-13.
17. Sakai H, Procop G, Kobayashi N, Togawa D, Wilson D, Borden L. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5739-5744. doi: 10.1128/JCM.42.12.5739-5744.2004 PMID: 15583307
18. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004; 41(9): 4089-4094. doi: 10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003 PMID: 12958230
19. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El-Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. Int J Agric Biol. 2009; 11(2): 205-208.
20. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2007; 18(5): 414-420.
21. Benavente-Garcıa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio J. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. Food Chemistry. 2000; 68(4): 457-462.
22. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food Chem Toxicol. 2008; 46(12): 3774-3779. doi: 10.1016/j.fct.2008.09.062 PMID: 18940227
23. Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CI, Angioni A, Dessi S. Antimicrobial activity of *Tunisian quince* (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. J Agric Food Chem. 2007; 55(3): 963-969. doi: 10.1021/jf062614e PMID: 17263500
24. Duman AD, Ozgen M, Dayisoylu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules. 2009; 14(5): 1808-1817. doi: 10.3390/molecules14051808 PMID: 19471201
25. Acar G, Dogan NM, Duru ME, Kıvrak I. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of Crocus species in Anatolia. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(11): 1154-1161.
26. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-829. doi: 10.2174/0929867033457719 PMID: 12678685
27. Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(5): 461-463. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026 PMID: 19135874
28. Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules 2007; 12(5): 1153-1162. doi: 10.3390/12051153 PMID: 17873849
29. Rafiei Z, Jafari S, Alami M, Khomeiri M. Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method. IJMAPR. 2012; 28(2): 280-292. (Persian).
30. Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón) tubers. Sep Purif Technol. 2007; 55(2): 217-225.
31. Gerrits MM, Van-Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006; 6(11): 699-709. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70627-2 PMID: 17067919

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

Antibacterial Effect of Olive Leaf (*Olea europaea. L*) Alcoholic Extract on *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk Sample of Cows with Subclinical Mastitis

Hossein Shakiba[1]✉, Hamid Reza Mohammadi[2]✉, Ashkan Jebelli Javan[3]✉, Reza Narenji Sani[2]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[2] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*

10.22059/jvr.2022.335938.3218

Received: *10 October 2022,* ***Accepted:*** *11 December 2022*

Abstract

BACKGROUND: Subclinical mastitis plays an important role in the economic losses of dairy cattle farms. Staphylococcus aureus is one of the most important causes of this disease. Treatment of this disease with synthetic antibiotics has complications like antibiotic resistance. Using herbal antibiotics can be an excellent way to reduce these side effects.

OBJECTIVES: This study aimed to determine the minimum inhibitory concentration of alcoholic extract of olive leaf on *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis to achieve herbal treatment.

METHODS: This study was conducted on 175 Holstein female cattle. The milk samples of 60 cows were obtained with the sterilized method, and Subclinical mastitis-positive cases were determined using the California mastitis test. *Staphylococcus aureus* bacteria were isolated from positive samples by culture method, and the minimum inhibitory concentration of olive (*Olea europaea L.*) leaves alcoholic extract on isolated bacteria was determined by microdilution method.

RESULTS: From 175 cows under study, 60 cows had a positive California mastitis test, and *Staphylococcus aureus* separated from milk samples of 14 cows. The minimum inhibitory concentration of olive (*Olea europaea L.*) leaves extract on this bacterium was 12000 ppm.

CONCLUSIONS: Alcoholic extract of olive (*Olea europaea L.*) leaves has an antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* as a cause of mastitis. The minimum concentration required for this effect was 12000 ppm. Further studies on the impact of this plant on other bacterial causes of subclinical mammary inflammation in cows and investigation of the effective substances in the extract are needed.

Keywords: Cattle, Mastitis, Milk, Olive, *Staphylococcus aureus*

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Hamid Reza Mohammadi, Tel/Fax: 023-331532612 / 023-31532626

How to cite this article:

Shakiba H, Mohammadi H R, Jebelli Javan A, Narenji Sani R. Antibacterial Effect of Olive Leaf (*Olea europaea. L*) Alcoholic Extract on *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk Sample of Cows with Subclinical Mastitis. J Vet Res, 2023; 77(4): 221-227. doi: 10.22059/jvr.2022.335938.3218

Figure Legends and Table Captions

Diagram 1. The process of bacterial growth during 24 hours after adding different concentrations of bacterial growth inhibitor.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۳۸-۲۲۹
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

حفظ پارامترهای کیفی اسپرم خروس با افزودن ترکیبات کلسیمی به رقیق کننده لیک به مدت ۷۲ ساعت

پرند فرزام[۱]، امجد فرزین‌پور[۲]، اسعد وزیری[۲]، سینا نادری[۱]

[۱] دانش آموخته دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران
[۲] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ شهریور ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۹ آبان ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.346425.3290 20.1001.1.20082525.1401.77.4.4.5

چکیده

زمینهٔ مطالعه: ذخیره سازی منی پرندگان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش تحرک اسپرم و افت کیفیت مایع منی می‌شود.

هدف: تعیین اثر افزودن ترکیبات کلسیمی: کلسیمافور (CMP)، کلسیم گلوکونات (CG) و کلسیم کلراید ($CaCl_2$) بر میزان جنبایی و تحرک پیشرونده اسپرم منی خروس نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال بود.

روش‌کار: در مطالعه حاضر از ۵ قطعه خروس نژاد لاری ۴۵ هفته استفاده شد. ترکیبات مختلف کلسیمی در غلظت‌های ۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶ میلی مولار به رقیق کننده لیک اضافه شدند. نمونه‌های منی رقیق شده پس از تیمار بندی جهت جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی تا دمای نگهداری خنک گردید و سپس به داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. فراسنجه‌هایی که از اهمیت بیشتر برخوردار بودند مانند: جنبایی، تحرک پیش رونده به صورت چشمی با استفاده از لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری، زنده مانی با استفاده از روش رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین، درصد سلامت آکروزوم به روش فرمالین سیترات، سلامت غشاء سلولی با تست هایپواسموتیک، میزان پراکسیداسیون لیپید و واکنش اسپرم غشاء پری‌وتیلین در ۷۲ ساعت بعد از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج به‌دست آمده ترکیبات مختلف کلسیم در اکثر غلظت‌های استفاده شده بعد از ۷۲ ساعت توانست تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای زنده‌مانی، جنبایی و تحرک پیش رونده نشان دهد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری نهایی: اکثر فراسنجه‌های اسپرمی در گروه شاهد بعد از این مدت نگهداری در یخچال کاهش یافت ولی اضافه کردن کلسیم گلوکونات (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶)، کلسیمافور (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶) و کلسیم کلراید (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶) به رقیق کننده منی سبب حفظ شاخص‌های کیفی اسپرم خروس گردید.

کلمات کلیدی: اسپرم، تحرک، خروس، زنده‌مانی، کلسیم

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: امجد فرزین‌پور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی صنعت طیور کاهش باروری گله‌های مرغ مادر به دلیل انتخاب ژنتیکی انجام شده برای بهبود صفات تولیدی است که این صفات دارای رابطه منفی با باروری می‌باشند (۱). انتخاب ژنتیکی لاین‌ها در راستای تولید جوجه‌هایی با رشد سریع و وزن زیاد کشتار است که این اهداف با صفات تولید مثلی از جمله نرخ باروری در تضاد می‌باشد (۲). کاهش میزان باروری از ۴۵ هفتگی با عوامل مختلفی مانند کاهش توده بیضه، میزان تولید اسپرم و سطح تستوسترون خروس‌های گله مرغ مادر ارتباط دارد (۳). تلقیح مصنوعی به عنوان یکی از تکنیک‌های مطرح در گله‌های مرغ مادر و بوقلمون می‌تواند جایگزین مناسبی برای جفتگیری طبیعی (۴) و کاهش هزینه‌های اسپاکینگ (spiking)(۵) و همچنین انتخاب پرندگانی با صفات برتر ژنتیکی از گله‌هایی با سن بالا باشد (۶)، بنابراین استفاده از تلقیح مصنوعی در عملیات مرغداری در حال گسترش است (۷). توانایی باروری اسپرم منی

پرندگان در شرایطی که رقیق نشده باشد پس از گذشت یک ساعت به شدت کاهش می‌یابد (۸). لازم است که رقیق کننده‌های اسپرم شرایط متعادل و حفاظتی را برای سلول ایجاد نمایند (۹). مواد معدنی در باروری و فعالیت سلول اسپرم دارای نقش بسزایی هستند (۱۰). کلسیم فعالیت حرکتی اسپرم را تحریک می‌کند و در واکنش آکروزومی اسپرم با غشاء سلول تخمک نقش پایه‌ای داشته و تا حدودی می‌توان جزو مهم‌ترین جزء شروع کننده لقاح دو سلول نر و ماده باشد (۱۱). نقش کلسیم فقط به تحرک اسپرم محدود نشده و گزارش شده که کلسیم در ظرفیت پذیری اسپرم هم نقش دارد (۱۲). این فرآیند شامل فعال سازی یک شبکه سیگنالینگ درون سلولی پیچیده است (۱۳،۱۴). اگزوسیتوز آکروزومی (AE) یک رویداد اگزوسیتوز وابسته به کلسیم است (۱۵). ذکر این نکته ضروری است که باز شدن کانال‌های کلسیمی اسپرم باعث ایجاد ظرفیت و متعاقباً AE می‌شوند (۱۶). دو کانال کلسیمی باروری نرها را تنظیم می‌کند: کانال Orail، که ورود کلسیم به مخازن را تنظیم می‌کند و کانال Catsper، که گسترده‌ترین کانال‌های کلسیمی در اسپرم است و غلظت این یون را در داخل سلولی کنترل می‌کند (۱۷). کانال Catsper یک کانال اختصاصی کلسیمی در اسپرم قابل نفوذ، وابسته به pH و وابسته به ولتاژ پایین است که برای شروع فعالیت تاژک اسپرم، کموتاکسی به سمت تخمک، ظرفیت سازی و واکنش آکروزوم ضروری است، همه این رویدادهای فیزیولوژیکی نیاز به ورود کلسیم به داخل سلول‌های اسپرم می‌باشند. در بیشتر پستانداران، تحرک بیش فعال اسپرم بستگی به هجوم کلسیم به سیتوپلاسم اسپرم یا از فضای خارج سلولی یا آزاد شدن از اندامک‌های درون سلولی دارد بنابراین، کانال Catsper، حداقل، رفتار شنای اسپرم را کنترل می‌کند (۱۸).

تحرک مژه‌ها و تاژک با تغییرات کلسیم داخل فلاژل تنظیم می‌شود. با این حال، مکانیسم مولکولی که توسط آن کلسیم حرکت را کنترل می‌کند ناشناخته است.کلسیم حرکت تاژک را با کنترل لغزش میکروتوبول مبتنی بر داینین تنظیم می‌کند و جفت میکروتوبول مرکزی و بازوهای شعاعی در این تنظیم نیز نقش دارند. کالمودولین و کیناز ۲ وابسته به کالمودولین ممکن است واسطه سیگنال کلسیم باشند و این‌که دستگاه مرکزی و پره‌های شعاعی اجزای کلیدی مسیر سیگنال‌دهی کلسیم هستند (۱۹). سرعت لغزش میکروتوبول مبتنی بر داینئین در سلول‌های جهش یافته که دارای دستگاه مرکزی معیوب، نقش کلسیم را در تعدیل فعالیت داینین تأیید کرد. مطالعات نشان داده است که بافرهایی با غلظت کلسیم بالا، فعالیت داینین را به سطوح تقریباً نرمال در آکسونم‌های جهش یافته که کاملاً فاقد دستگاه مرکزی هستند بازگرداندند. علاوه بر این، فعالیت داینین به صورت خطی با افزایش غلظت کلسیم افزایش می‌یابد زیرا تغییر تصویر موج نامتقارن به متقارن ناشی از کلسیم تا حدودی ناگهانی با افزایش کلسیم اتفاق می‌افتد (۲۰). داینین‌های آکسونمال تاژک دارای زیر واحدهای Ca2+-binding هستند و احتمالاً مستقیماً توسط یون کلسیم تنظیم می‌شوند. یکی از اجزای بازوی بیرونی داینین نیز دارای محل‌های اتصال یون کلسیم است (۲۱). پروتئین دیگری به نام کالاکسین نیز در بازوی بیرونی داینین وجود دارد که یک تنظیم کننده بالقوه کلسیم است (۲۲).

اسپرم دارای چندین محل برای اتصال یون کلسیم می‌باشد که می‌تواند زنجیره‌ای از رویدادها را برای تغییر ضربان تاژک آغاز کند. کالمودولین (CaM) یک گیرنده یون کلسیم است که در قسمت اصلی تاژک قرار گرفته است (۲۳). دینامیک کلسیم نقش زیادی در شروع و حفظ تحرک بیش فعال دارد، که برای رسیدن و بارور کردن تخمک برای اسپرم پستانداران حیاتی است (۲۴).

در اسپرم دو منبع اصلی برای یون کلسیم در اسپرم وجود دارد ۱- برخی از آن‌ها در یک پمپ کلسیم واقع در سر اسپرم ذخیره می‌شوند که یک پوشش هسته‌ای اضافی در موقعیت گیرنده IP3 در ناحیه گردن که از نوع شبکه آندوپلاسمی (RNE) می‌باشد و ۲- مابقی کلسیم در میتوکندری قسمت میانی قرار دارند (۲۵). مجموعه RNE در طیف گسترده‌ای از پستانداران از جمله انسان (۲۶)، همستر (۱۳)، خفاش (۲۷)، گاو نر (۲۸) و موش (۲۹) حفظ می‌شوند. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که در پستانداران این مجموعه RNE در قاعده تاژک همانند یک مکان ذخیره کلسیم عمل می‌کند که با تحریک شدن گیرنده آن باعث آزاد سازی کلسیم از این ذخایر می‌شود. مطالعات نشان داده است که آزاد سازی کلسیم در شروع حرکت اسپرم نقش دارد (۱۶). این در حالی است که ذخایر کلسیمی شبکه آندوپلاسمی در پرندگان گزارش نشده است و میتوکندری‌ها مخزن اصلی کلسیم محسوب می‌گردند. نشان داده شده است که غلظت یون کلسیم در مایع منی در نرهای مبتلا به آستنوزواسپرمی به طور قابل توجهی کاهش یافته است. همبستگی قوی بین میزان کلسیم منی، کاهش تحرک و مورفولوژی غیر طبیعی آن‌ها وجود دارد (۳۰). براساس توضیحات فوق در مطالعه حاضر این فرضیه پیشنهاد گردید که در ترکیبات رقیق کننده‌های منی پستانداران به دلیل وجود منابع کلسیمی داخل اسپرمی نیازی به اضافه کردن ترکیبات کلسیم نیست و

پیروی محققین تلقیح مصنوعی پرندگان از اصول اصلی این فرمول‌ها سبب شده است که اضافه کردن ترکیبات کلسیم به رقیق کننده‌های منی در پرندگان مغفول بماند. همچنین این احتمال وجود دارد که کلسیم داخل مایع منی در پرندگان می‌تواند به‌عنوان مخزن و منبع کلسیم مورد نیاز برای تحرک توسط اسپرم لحاظ گردد. از آن جا که اجزای ترکیبات رقیق کننده‌های مختلف جهت نگهداری اسپرم پرندگان فاقد هرگونه ترکیبات کلسیمی می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر افزودن ترکیبات مختلف کلسیمی به رقیق کننده لیک بر حفظ پارامترهای کیفی اسپرم خروس نگهداری شده پس از ۷۲ ساعت ذخیره سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۵ خروس نژاد لاری هم سن استفاده شد که همه آن‌ها تحت رژیم نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند و در تمام طول دوره آزمایش دسترسی به آب آزاد و روزانه به ازای هر قطعه ۹۵ گرم دان در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت. خروس‌ها در یک دوره سه هفته‌ای برای اسپرم‌گیری به صورت مالش شکمی عادت دهی شده و اسپرم‌گیری دو بار در هفته انجام گرفت که هر خروس یک بار مورد مالش شکمی قرار گرفت. مایع جمع‌آوری شده در یک محفظه عایق حرارتی و در مدت کمتر از ۱۵ دقیقه به آزمایشگاه انتقال داده شد و نمونه برای ارزیابی اولیه کیفیت اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر جهت رقیق کردن نمونه منی از رقیق کننده لیک استفاده شد که ترکیبات آن در جدول ۱ آمده است. اندازه‌گیری فشار اسمزی تمام محلول‌های آزمایشی با استفاده از دستگاه اسمومتر شرکت Gonatec مدل Osmomat 030 انجام گرفت. برای تهیه تیمارهای آزمایشی، منی جمع‌آوری شده به نسبت ۱ به ۱۰ با رقیق کننده ترکیب و حجم نهایی بین ۱۰ لوله آزمایشی تقسیم و سپس تیمارها اضافه گردید. ترکیبات کلسیمی انتخاب شده جهت آزمایش شامل محلول تزریق کلسیمافور ۴۰ (شرکت داروسازی نصر فریمان ایران)، کلسیم گلوکونات (سینا دارو) و کلسیم کلراید (Merck) بود که در جدول ۲ غلظت‌های آن نمایش داده شده است.

زنده‌مانی اسپرم: بدین منظور از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای تهیه محلول رنگی ۱/۷۳۵ گرم سدیم گلوتامات ۰/۱۲۸ گرم پتاسیم سیترات، ۰/۸۵۱ گرم سدیم استات ۰/۰۶۸ گرم منیزیم کلراید به همراه ۵ گرم نگروزین و ۱ گرم ائوزین در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. ۵ میکرولیتر از محلول اسپرم رقیق شده را با ۱۰ میکرولیتر محلول رنگی روی یک لام ریخته و با هم مخلوط کرده سپس گسترشی از آن تهیه شده و اسلاید حاصل را در دمای اتاق و در یک جای عاری از گرد و خاک قرار داده تا کاملاً خشک شود. در گام بعدی توسط یک میکروسکوپ نوری (مدل Olympus.ch-2) در ۱۰ نقطه از لام با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، تعداد اسپرم‌های فاقد رنگ در هر صد سلول شمارش شدند (تصویر ۱) (۳۱).

جنبایی اسپرم: نمونه منی را به نسبت ۱:۱۰ رقیق کرده و ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را روی یک لام که دمای آن به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود قرار داده شد و یک لامل هم دما با آن را روی نمونه گذاشته و در ۱۰ میدان جنبایی به صورت چشمی توسط تکنسین ماهر ثبت شد. در تمام طول دوره آزمایش برای کاهش خطای فردی تمام مراحل توسط یک تکنیسین انجام داده شد و میانگین همه مشاهدات ثبت گردید (۳۲).

سلامت غشاء اسپرم: این پارامتر توسط تست هایپواسموتیک سنجیده شد. برای تهیه محلول هایپواسموتیک ۰/۴۵ گرم فروکتوز به همراه ۰/۲۴۵ گرم سیترات سدیم در ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم هر گروه با ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط هایپو اسمول در یک میکروتیوب مخلوط کرده و به مدت ۵۰ تا ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق بر روی یک لام قرار داده و درصد اسپرم با دم متورم و پیچ خورده در ۱۰۰ عدد محاسبه شد (تصویر ۲) (۳۳).

سلامت آکروزوم: از محلول فرمالین سیترات برای تعیین درصد سلامت آکروزوم استفاده شد. محلول استوک سدیم سیترات ۲/۹ درصد تهیه شد و سپس ۲ میلی لیتر از محلول استوک آماده شده با ۴۸ میلی‌لیتر از محلول فرمالدئید (۳۷ درصد) مخلوط شد. ۰/۵ میکرولیتر از محلول را روی یک لام ریخته و با لنز ۴۰ در ۱۰ میدان دید اسپرم‌ها با آکروزوم سالم در ۱۰۰ عدد سلول شمارش شدند و میانگین اعداد بر اساس درصد بیان گردید (تصویر ۳) (۳۴).

واکنش اسپرم غشاء پری‌وتیلین: برای تهیه غشاء پری‌وتیلن از تخم نابارور و تازه استفاده گردید. ابتدا زرده تخم مرغ بدون نطفه به طور کامل از سفیده جدا شد. زرده جدا شده در پتری‌دیش به نحوی قرار گرفت که ناحیه بلاستودیسک آن رو به

بالا باشد. سپس به‌وسیله یک پیپت و با سرم فیزیولوژی (۹ درصد) به آرامی سفیده به جا مانده روی زرده شستشو داده شد تا آلبومین باقی مانده روی زرده پاک گردد. زرده به مدت یک ساعت در محلول کلراید هیدروژن ۱۰ درصد در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، بعد از اتمام وقت مقرر زرده داخل یک پتری دیش قرار داده و با محلول نمکی ۹ درصد چندین بار شستشو داده شد، بعد از تخلیه کامل محتویات کیسه زرده غشاء پری‌وتیلن برای انجام تست باروری مورد استفاده قرار گرفت.

میزان باروری با استفاده از واکنش بین اسپرم و غشاء پری‌وتیلن تخم مرغ برآورد شد. غشاء آماده شده به همراه ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی اسپرم را به داخل یک میکروتیوب انتقال داده و به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۹ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، بعد از اتمام زمان انکوباتور غشاء با کمک سرم فیزیولوژی چندین بار شستشو داده شد تا اسپرم‌ها کامل شسته شوند، غشاء را با پنس به آرامی روی یک لام پهن کرده سپس برای تثبیت بافت ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۱۰ درصد روی آن ریخته شد و بعد از گذشت ۱ دقیقه ۱۵ میلی لیتر معرف شیف روی آن ریخته و پس از رنگ گرفتن غشاء با کمک آب مقطر چند مرتبه شستشو داده شد تا رنگ اضافی پاک شود. بعد از خشک شدن لام با کمک لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری تعداد سوراخ‌های ایجاد شده در چندین ناحیه شمارش و تعداد اسپرم‌های فعال بر اساس تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه شد (تصویر ۴) (۳۵).

پراکسیداسیون لیپید: در استرس‌های اکسیداتیو، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع سبب تولید مالون دی آلدئید می‌گردد. بنابراین با اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدهید در نمونه‌های بیولوژیک مختلف می‌توان به میزان پراکسیداسیون چربی‌ها پی برد و از آن به عنوان یک نشانگر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در یک موجود زنده استفاده کرد. به‌طور خلاصه مالون دی آلدهید با تیو باربیتیوریک اسید (TBA) در دمای بالا، واکنش داده و محصول صورتی رنگی تولید می‌کند که با روش رنگ سنجی در طول موج ۵۴۰-۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. با توجه به اهمیت مالون دی آلدهید به عنوان یک نشانگر پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین عملکرد منفی آن در برابر سلامت، نیاز به ارزیابی مالون دی آلدهید در مطالعات بیولوژی همچنان احساس می‌شود.

در مرحله نخست نمونه‌ای را که برای این آزمایش گرفته شده بود، به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد تا پلاسمای آن از اسپرم‌ها جدا شود سپس ۱ میلی‌لیتر از پلاسمای بالای لوله با ۱ میلی‌لیتر EDTA (۳/۷۲ گرم در ۲۰ میلی‌لیتر آب)، ۱ میلی‌لیتر BHT (۰/۲ گرم در ۱۰میلی‌لیتر اتانول) و ۲ میلی‌لیتر TCA (۳ گرم در ۳۰ میلی لیتر آب)، باهم مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ گرم سانتریفیوژ شد و بعد از اتمام مدت سانتریفیوژ ۱ میلی لیتر از محلول بالای لوله (پلاسما) با ۱ میلی لیتر TBA مخلوط شد و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرم شد و آن را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا سرد شود بعد از آن محلول به‌دست آمده در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و به کمک آن میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان مالون‌دی‌آلدهید از فرمول زیر به‌دست آمده است (۳۶).

$$\text{مالوندی آلدهید (میلی‌لیتر/میکرو مول)} = \frac{\text{حجم کل} \times \text{میزان جذب} \times 10^6}{\text{حجم کوئت} \times 1/56 \times 10^5}$$

جدول ۱. ترکیبات رقیق کننده لیک جهت نگهداری اسپرم خروس.

ترکیبات رقیق کننده	مقدار (گرم در لیتر)
پتاسیم منوفسفات	۰/۶۵
منیزیم کلراید+۶آبه	۰/۳۴
پتاسیم دی فسفات+۳آبه	۱۲/۷
سدیم استات+۳آبه	۴/۳۰
سدیم گلوتامات	۸/۶۷
فرکتوز	۵
تریس	۱/۹۵
اسیدیته	۷/۵
فشار اسمزی (میلی اسمل بر کیلوگرم آب)	۳۹۹-۲۸۳

جدول ۲. سطوح مختلف ترکیبات کلسیمی مورد مطالعه.

تیمار آزمایشی	گروه‌های آزمایشی	فشار اسمزی(میلی اسمل بر کیلوگرم آب)
رقیق کننده پایه (رقیق کننده لیک)	شاهد	۲۸۳
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۵۶ CMP	۳۰۵
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۰۵۶ CMP	۳۰۱
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۰۰۵۶ CMP	۲۹۹
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۰۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۰۰۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۵۶ $CaCl_2$	۳۹۹
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۰۵۶ $CaCl_2$	۳۱۱
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۰۰۵۶ $CaCl_2$	۳۰۰

جدول ۳. فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگهداری برون تنی در رقیق کننده لیک حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات حاوی کلسیم (درصد) بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد).

تیمار آزمایشی	زنده مانی (درصد)	جنبایی (درصد)	تحرک پیش رونده (درصد)	سلامت غشاء (درصد)	سلامت آکروزوم (درصد)	باروری برون تنی (درصد)
شاهد	۵۹/۷±۲/۷^{d}	۴۶/۹±۳/۴^{c}	۳۹/۴±۳/۸^{b}	۵۸/۹±۲/۲^{c}	۵۷/۸±۴/۲^{b}	۴۹/۴±۲/۳^{b}
شاهد	۷۱/۶±۳/۷^{abc}	۶۳/۳±۳/۱^{ab}	۵۴/۶±۴/۱^{a}	۷۱±۲/۹^{ab}	۶۴/۲±۴/۷^{ab}	۵۵±۴/۵^{ab}
۰/۵۶ CMP	۶۳/۳±۲^{cd}	۵۵/۳±۳/۶^{bc}	۵۰/۳±۲/۳^{a}	۵۷/۹±۲/۵^{c}	۶۳/۱±۳/۵^{ab}	۵۳/۶±۳/۱^{ab}
۰/۰۵۶ CMP	۶۴/۱±۱/۴^{cd}	۶۰/۸±۳/۸^{ab}	۵۲/۳±۴/۵^{a}	۶۳/۵±۲/۹^{bc}	۶۱/۳±۲/۶^{ab}	۶۱/۵±۲/۲^{a}
۰/۰۰۵۶ CMP	۷۹/۵±۲/۵^{a}	۶۰/۵±۳^{ab}	۴۹/۱±۵/۶^{ab}	۷۴/۹±۳^{a}	۶۸/۷±۳/۱^{a}	۵۵/۸±۳/۱^{ab}
۰/۵۶ CG	۷۷/۵±۲/۸^{ab}	۶۷/۲±۴/۱^{a}	۵۹/۵±۴/۳^{a}	۷۵/۱±۲/۹^{a}	۷۲/۹±۲/۶^{ab}	۵۸±۲/۹^{ab}
۰/۰۵۶ CG	۶۹/۷±۳^{bc}	۶۱±۴^{ab}	۵۳±۲/۷^{a}	۶۸/۷±۳/۹^{ab}	۶۳/۷±۴/۱^{ab}	۵۶/۷±۲/۳^{ab}
۰/۰۰۵۶ CG	۷۷/۴±۳/۵^{ab}	۶۷/۳±۱/۹^{a}	۴۷/۵±۲/۳^{ab}	۷۷±۲/۳^{a}	۶۸/۸±۳/۴^{ab}	۵۹/۷±۳/۹^{a}
۰/۵۶ $CaCl_2$	۶۶/۴±۲/۴^{cd}	۶۰±۵/۲^{ab}	۵۵/۱±۳/۷^{a}	۶۴±۳/۷^{bc}	۶۳/۶±۴^{ab}	۵۸/۳±۲/۸^{ab}
۰/۰۵۶ $CaCl_2$	۶۹/۶±۱/۶^{bc}	۶۱/۵±۲/۶^{ab}	۵۷/۶±۳/۷^{a}	۶۸/۵±۳/۲^{bc}	۶۳/۶±۵/۱^{ab}	۶۱/۸±۲/۲^{a}
SEM	۸/۴۲	۱۱/۳۱	۱۱/۹۹	۹/۵۳	۱۲/۰۷	۹/۶
P-value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۷۷	۰/۰۲۵۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۶۹	۰/۰۱۴۶

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

تجزیه وتحلیل‌های آماری: برای آنالیز داده‌های به دست آمده از طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت روزانه در نرم افزار EXCEL ثبت و سپس در نرم افزار SAS فراخوانی شد. برای آنالیز داده‌ها از روش GLM و مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و توکی استفاده شد.

$$Y_i=\mu+T_i+e_i$$

Y_i= پارامتر اندازه گیری شده

μ= میانگین جامعه

T_i= اثر تیمار

e_i= اثر اشتباه آزمایشی

نتایج

درصد زنده‌مانی اسپرم: نتایج حاصل از ارزیابی زنده‌مانی در جدول ۳ آمده است. درصد زنده‌مانی در تیمارهای ۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶ CMP، ۰/۵۶ CaCl2 و ۰/۵۶ CG میلی مولار بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P<۰/۰۵$). افزودن این ترکیبات، زنده‌مانی اسپرم‌های آزمایشی را افزایش داد که تیمار ۰/۵۶ CMP از بیشترین میزان زنده‌مانی (۹۷/۵ درصد) برخوردار بود ($P<۰/۰۵$).

جنبایی: در جدول ۳ نتایج آنالیز میانگین تیمارهای آزمایشی نشان داده شده است. بررسی‌ها بیانگر تأثیر تمام ترکیبات کلسیمی بر فراسنجه جنبایی بودند به گونه‌ای که بعد از ۷۲ ساعت نگهداری، تحرک تیمارهای آزمایشی بجز ۰/۰۵۶ CG به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P<۰/۰۵$).

تحرک پیش رونده: تأثیر سطوح و ترکیبات مختلف کلسیم بر پارامتر تحرک پیش رونده در جدول ۳ آورده شده است. در فراسنجه تحرک پیش رونده به‌جز تیمارهای حاوی ۰/۵۶ $CaCl_2$ و CMP سایر تیمارهای آزمایشی بعد از ۷۲ ساعت نگهداری، در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند و اضافه کردن این ترکیبات به رقیق کننده لیک سبب افزایش تحرک پیش رونده گردید (P<۰/۰۵).

سلامت غشاء: نتایج حاصل از ارزیابی سلامت غشاء در جدول ۳ نشان داده شده است. افزودن ۰/۵۶ و ۰/۰۰۵۶ میلی مولار $CaCl_2$، تمام سطوح استفاده شده CMP و همچنین غلظت ۰/۵۶ CG به رقیق کننده لیک باعث بهبود معنی‌داری در پارامتر سلامت غشاء نسبت به تیمار شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال شد (P<۰/۰۵).

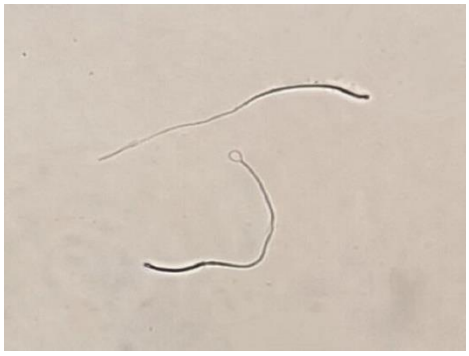
سلامت آکروزوم: مقایسه میانگین‌های فراسنجه سلامت آکروزوم در جدول ۳ آمده است. افزودن ۰/۵۶ CMP موجب بهبود سلامت آکروزوم بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵).

گزارش‌هایی مبنی بر اثر بهبود سلامت آکروزوم پس از استفاده آنتی‌اکسیدان وجود دارد (۳۷). اما به دلیل این که تا به‌حال مطالعه‌ای در مورد اثر بهبود دهندگی ترکیبات یونی بر سلامت آکروزوم منتشر نشده است اظهار نظر در مورد دلیل بهبود این فرآسنجه بعد از استفاده از این ترکیبات بسیار دشوار است اما از آن‌جایی که غشاء اکروزوم هم از جنس غشایی سلول اسپرم است می‌توان بیان نمود که نقش کلسیم در فعالیت‌های متابولیسمی دلیل حفظ یک پارچگی غشاءهای سلولی می‌شود (۳۸).

باروری برون تنی: استفاده از سطوح ۰/۰۰۵۶ CG و ۰/۵۶ و ۰/۰۰۵۶ $CaCl_2$ در رقیق کننده لیک سبب افزایش باروری برون تنی نسبت به گروه شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری شد (P<۰/۰۵).

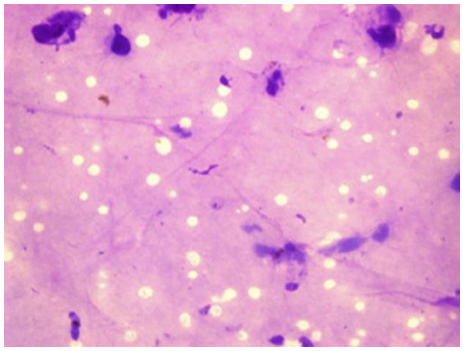
مالون‌دی‌آلدهید: نتایج حاصل از میزان مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در گروه‌های آزمایشی بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال در تصویر ۵ نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارهای آزمایشی باعث تغییر معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپید غشاءهای اسپرم نسبت به تیمار شاهد نشدند.

تصویر ۱. زنده‌مانی (1000x).

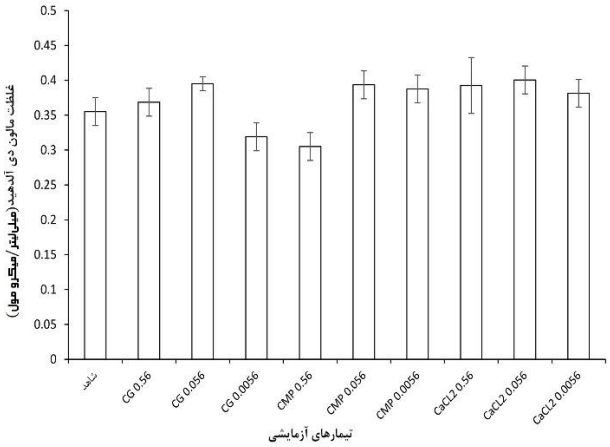


تصویر ۲. سلامت غشاء (1000x).

تصویر ۳. سلامت آکروزوم (1000x).



تصویر ۴. باروری (400x).



تصویر ۵. غلظت مالون‌دی‌آلدهید.

بحث

اختلاف آماری در بین گروه‌های آزمایشی در پارامترهای زنده‌مانی، جنبایی و تحرک پیش رونده نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت اکثر پارامترهای اسپرمی در گروه شاهد دارای روند کاهشی هستند به طوری که جنبایی اسپرم به ۴۶/۹ درصد و تحرک پیش رونده به ۳۹/۴ درصد رسید و بررسی تیمارهای آزمایشی به وضوح نشان داد که اضافه کردن هر نوع ترکیب کلسیمی (کلسیم گلوکونات، کلسیمافور و کلسیم کلراید) به نحوی سبب افزایش پارامترهای فوق گردید که این افزایش شاخص‌های کیفی می‌تواند به دلیل نقش کلیدی کلسیم در فعالیت متابولیسمی سلول‌های اسپرم باشد. گزارش‌های متعددی مبنی بر نقش کلسیم در تحرک تاژک وجود دارد (۳۸). تعدیل کانال‌های کلسیمی سبب کاهش حرکت تاژک یا دم اسپرم می‌گردد (۳۹). لازمه حرکت تاژک افزایش انتقال کلسیم به داخل سلول و اثر بخشی آن بر انقباض رشته‌های اکتین و میوزین است (۳۸). کلسیم نقش گسترده‌ای در تولید مثل نرها و رشد اسپرم دارد. کلسیم برای فیزیولوژی اسپرم از جمله تحرک، متابولیسم، واکنش آکروزوم و لقاح مهم است. نشان داده شده است که اسپرم‌ها در پاسخ به تغییر غلظت کلسیم داخل سلولی حرکت خود را تعدیل می‌کنند. تحرک همچنین به غلظت کلسیم بیرون سلول و درون سلول در قسمت اصلی تاژک بستگی دارد (۴۰). در شرایطی که زنده‌مانی تیمار شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به ۵۹/۷ درصد رسید، تیمارهایی که به آن‌ها ۰/۵۶ و ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیما فور اضافه شده بود توانستند زنده مانی خود را در سطح‌های ۷۹/۵ و ۷۷/۵ حفظ کنند که دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد بود. رقیق‌کننده لیک بدون در نظر گرفتن نژاد مرغ مناسب‌ترین محلول جهت نگهداری اسپرم بود زیرا در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌های مورد مطالعه پس از نگهداری دارای تعداد اسپرم‌های زنده بیشتری داشت (۴۱). بالا رفتن میزان کلسیم داخل سلولی باعث افزایش موقت سیکل آدنوزین مونو فسفات و نیز سبب تحریک آنزیم آدنیلات سیکلاز داخل سلولی می‌شود که این امر موجب تحریک آنزیم پروتئین کیناز A شده که در نتیجه فعالیت آن پروتئین آکسونم فسفریله می‌شود و دم اسپرم شروع به حرکت می‌کند، نوسانات کلسیم حرکت تاژک اسپرم را تغییر می‌دهد (۴۲). با توجه به داده‌های به‌دست آمده باروری گروه شاهد بعد از ۷۲ ساعت به ۴۹/۴ رسید که با اختلاف معنی‌داری پایین‌تر از سطح ۰/۰۰۵۶ استفاده شده کلسیم گلوکونات و غلظت ۰/۵۶ و همچنین ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلراید کلسیم بوده است. به دلیل نقش تاژک در فرآیند تحرک و باروری می‌توان گفت که تغییرات غلظت کلسیم نقش مهمی در جنبایی و باروری اسپرم دارد (۴۳). اصلاح محلول‌های فعال‌سازی اسپرم با کمک هر یک از یون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم و میزان اسیدیته می‌تواند راندمان تولیدمثلی را افزایش دهد (۴۱). علاوه بر این، کلسیم ظاهراً بیش فعالی را تغییر می‌دهد، یک الگوی شنا با ضرب و شتم تاژک نامتقارن و ایجاد امواج تاژک با دامنه بالا که برای لقاح ضروری است کلسیم هم در واکنش آکروزوم و هم در کموتاکسی اسپرم نقش اصلی را بازی می‌کند (۴۲). در حالی که اسپرم در صورت عدم وجود کلسیم خارج سلولی قادر به انجام هیچ یک از این عملکردهای مهم نیست، کموتاکسی اسپرم نسبت به تخمک‌ها یک پدیده گسترده است که در بیشتر اشکال زندگی از گیاهان پایین‌تر تا پستانداران رخ می‌دهد و نقش مهمی در اطمینان از لقاح بازی می‌کند (۴۱). هجوم کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم غشاء پلاسمایی اسپرم برای واکنش آکروزوم در مجاورت تخمک و نقش اساسی در واسطه بودن باروری اسپرم دارد. رابطه کمی بین سطح کلسیم داخل سلول اسپرم و تحرک اسپرم هنوز بحث برانگیز است (۴۴). بر اساس مشاهدات مندرج در تصویر ۵ میزان مالون‌دی‌آلدهید تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد از نظر عددی بیشتر است که این هم با توجه به افزایش تحرک امری دور از انتظار نبود ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که این امر خود نگرانی ناشی از بالا رفتن میزان رادیکال‌های آزاد را به دلیل افزایش فعالیت بر طرف می‌کند.

نتیجه گیری نهایی: به‌نظر می‌رسد همانند آنچه در ابتدای انجام مطالعه حاضر انتظار می‌رفت یکی از دلایل کاهش تحرک اسپرم در شرایطی که سایر مواد مورد نیاز برای حفظ پایداری

اسپرم فراهم باشد یون‌ها و ترکیبات دخیل در انجام حرکت و ادامه‌دار بودن آن است (۱۰). که در این میان براساس مطالعات صورت گرفته بر روی مکانیسم عمل حرکت که در آن پروتئین‌های حرکتی لازم برای انجام حرکات انقباضی مشخص شد که یون کلسیم یکی از مهم‌ترین کاتیون‌های مورد نیاز می‌باشد و اهمیت وجود آن را می‌توان بر این اساس بیان کرد که در غشاء اسپرم کانال‌های مخصوص برای عبور کلسیم وجود دارد (۱۸). آنچه از مطالعه حاضر استنباط می‌شود اثر بهبود دهندگی ترکیبات کلسیمی بر جنبایی است که تمام تیمارها به‌جز سطح ۰/۵۶ کلسیمافور باعث افزایش معنی‌دار این فراسنجه نسبت به تیمار شاهد شد. پس می‌توان گفت که بخشی از کاهش کیفیت اسپرم در رقیق کننده‌های مورد استفاده به دلیل کم شدن بعضی از یون‌های مورد نیاز برای فعالیت اسپرم ایجاد می‌شود.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر نتیجه انجام پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان می‌باشد که بودجه آن از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه کردستان تأمین شده است. نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کردستان، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Sharideh H, Zhandi M, Zenioaldini S, Zaghari M, Sadeghi M. The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. Theriogenology. 2019; 129: 103-9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.028 PMID: 30831340
2. Kranis A, Gheyas AA, Boschiero C, Turner F, Yu L, Smith S, Talbot R, Pirani A, Brew F, Kaiser P, Hocking PM. Development of a high density 600K SNP genotyping array for chicken. BMC genomics. 2013; 14: 1-3. doi: 10.1186/1471-2164-14-59 PMID: 23356797
3. Vizcarra JA, Kirby JD, Kreider DL. Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. Poult Sci. 2010; 89: 328-34. doi: 10.3382/ps.2009-00286 PMID: 20075286
4. Boz MA, Baş H, Sarica M, Erensoy K. The effects of natural mating and artificial insemination on reproductive traits of 1- and 2-year-old domestic Turkish geese. Vet Res Commun. 2021; 45: 211-21. doi: 10.1007/s11259-021-09802-6 PMID: 34089129
5. Mphepya LC, van Rensburg WJ, Mpofu TJ, Mtileni BJ, Nephawe KA. Influence of male–male competition on reproductive performance and mortality of broiler breeders following intra-spiking. Poult Sci. 2019; 98: 4549-54. doi: 10.3382/ps/pez273 PMID: 31111931
6. Akhtar MF, Shafiq M, Ali I. Improving gander reproductive efficacy in the context of globally sustainable goose production. Animals. 2021; 12: 44. doi: 10.3390/ani12010044 PMID: 35011150
7. Vasicek J, Kuzelova L, Kulikova B, Chrenek P. Effect of diluent and storage time on sperm characteristics of rooster insemination doses. Avian Biol Res. 2015; 8: 41-6. doi: 10.3184/175815515X14232453836759
8. Feyzi S, Sharafi M, Rahimi S. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. Poult Sci. 2018 1; 97(7): 2582-90. doi: 10.3382/ps/pey067 PMID: 29584912
9. Sun L, He M, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. Beneficial influence of soybean lecithin nanoparticles on rooster frozen–thawed semen quality and fertility. Animals. 2021; 11(6): 1769. doi: 10.3390/ani11061769 PMID: 34199159
10. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovasc Res. 2007; 73: 341-7. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.004 PMID: 17141749
11. Visconti PE, Krapf D, De La Vega-beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. Asian J Androl. 2011; 13: 395. doi: 10.1038/aja.2010.69 PMID: 21540868
12. Alonso CA, Osycka-Salut CE, Castellano L, Cesari A, Di Siervi N, Mutto A, Johannisson A, Morrell JM, Davio C, Perez-Martinez S. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovines. MHR: Mol Hum Reprod. 2017; 23: 521-34. doi: 10.1093/molehr/gax030 PMID: 28521061
13. Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. Anim Reprod Sci. 2005; 89: 47-56. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.017 PMID: 16054782
14. Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? Biol Reprod. 2011; 85: 4-5. doi: 10.1095/biolreprod.111.092601 PMID: 21490244
15. Ruiz-Díaz S, Grande-Pérez S, Arce-López S, Tamargo C, Olegario Hidalgo C, Pérez-Cerezales S. Changes in the cellular distribution of tyrosine phosphorylation and its relationship with the acrosomal exocytosis and plasma membrane integrity during in vitro capacitation of frozen/thawed bull spermatozoa. Int J Mol Sci. 2020; 21: 2725. doi: 10.3390/ijms21082725 PMID: 32326382
16. Sangani AK, Masoudi AA, Torshizi RV. Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow-and fast-growing roosters. Poult Sci. 2017; 96: 211-9. doi: 10.3382/ps/pew273 PMID: 27591282
17. Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. Annu Rev Physiol. 2012; 74: 453. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153258 PMID: 22017176

18. Quill TA, Wang D, Garbers DL. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. Mol Cell Endocrinol. 2006; 250: 84-92. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.031 PMID: 16413670
19. Smith EF. Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. Mol Biol Cell. 2002; 13: 3303-13. doi: 10.1091/mbc.e02-04-0185 PMID: 12221134
20. Brokaw CJ, Luck DJ. Bending patterns of Chlamydomonas flagella: III. A radial spoke head deficient mutant and a central pair deficient mutant. Cell Motil. 1985; 5: 195-208. doi: 10.1002/cm.970050303 PMID: 4005942
21. Yang P, Diener DR, Yang C, Kohno T, Pazour GJ, Dienes JM, Agrin NS, King SM, Sale WS, Kamiya R, Rosenbaum JL. Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella. J Cell Sci. 2006; 119: 1165-74. doi: 10.1242/jcs.02811 PMID: 16507594
22. . Mizuno K, Padma P, Konno A, Satouh Y, Ogawa K, Inaba K. A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca2+-dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. Biol Cell. 2009; 101: 91-103. doi: 10.1042/BC20080032 PMID: 18620543
23. Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: Evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. J Androl. 2007; 28: 706-16. doi: 10.2164/jandrol.106.001669 PMID: 17460096
24. . Olson SD, Fauci LJ, Suarez SS. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. Mol Hum Reprod. 2011; 17: 500-10. doi: 10.1093/molehr/gar040 PMID: 21606121
25. . Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. Ca2+-stores in sperm: their identities and functions. Reproduction. 2009; 138: 425. doi: 10.1530/REP-09-0134 PMID: 19542252
26. . Bajpai M, Doncel GF. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. Reproduction. 2003 1; 126(2): 183-95. doi: 10.1530/rep.0.1260183 PMID: 12887275
27. Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. Cryobiology. 2015; 70: 211-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.03.008 PMID: 25828199
28. Colás C, Grasa P, Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Changes in calmodulin immunocytochemical localization associated with capacitation and acrosomal exocytosis of ram spermatozoa. Theriogenology. 2009; 71(5): 789-800. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.003 PMID: 19081128
29. Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Cesari A, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. Theriogenology. 2020 15; 145: 100-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.046 PMID: 32007635
30. Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. J Assist Reprod Genet. 2004; 21(12): 445-51. doi: 10.1007/s10815-004-8761-7 PMID: 15704520
31. Łukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A, Siudzińska A. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Res Vet Sci. 2008; 85(3): 583-8. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.03.010 PMID: 18486956
32. Masoudi R, Sharafi M, Pourazadi L. Improvement of rooster semen quality using coenzyme Q10 during cooling storage in the Lake extender. Cryobiology. 2019 1; 88: 87-91. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.03.003 PMID: 30857955
33. Ortatatli M, Ciftci MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. Res Vet Sci. 2002; 72(1): 29-36. doi: 10.1053/rvsc.2001.0516 PMID: 12002635
34. Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng CJ, Meng Q, Han H, Zhou G. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences. Antioxidants. 2019; 8(8): 268. doi: 10.3390/antiox8080268 PMID: 31382427
35. Croyle KE, Durrant BS, Jensen T. Detection of oocyte perivitelline membrane-bound sperm: a tool for avian collection management. Conserv Physiol. 2015; 3(1): cou060. doi:10.1093/conphys/cou060 PMID: 27293681
36. Bramwell RK, Marks HL, Howarth B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. Poult Sci. 1995; 74(11): 1875-83. doi: 10.3382/ps.0741875 PMID: 8614695
37. Ammar O, Houas Z, Mehdi M. The association between iron, calcium, and oxidative stress in seminal plasma and sperm quality. Environ Sci Pollut Res Int. 2019; 26(14): 14097-105. doi: 10.1007/s11356-019-04575-7 PMID: 30852746
38. Benko F, Ďuračka M, Kováč J, Lukáč N, Tvrdá E. Comparative analysis of the effects of curcumin and epicatechin on the vitality of rooster spermatozoa. Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2021 1; 10(6): e3078-. doi: 10.15414/jmbfs.3078
39. Asaduzzaman M, Saha A, Akter S, Biswas S, Alam MG, Bari FY. Quality changes in spermatozoa of exotic muzaffarnagari cross-breed ram semen during the stages of frozen production. Online J Anim Feed Res. 2021; 11(6): 206-12. doi: 10.51227/OJAFR.2021.30
40. Jueraitetibaike K, Ding Z, Wang DD, Peng LP, Jing J, Chen L, Ge X, Qiu XH, Yao B. The effect of vitamin D on sperm motility and the underlying mechanism. Asian J Androl. 2019; 21(4): 400. doi: 10.4103/aja.aja_105_18. PMID: 30618415
41. Nguyen TM, Duittoz A, Praud C, Combarnous Y, Blesbois E. Calcium channels in chicken sperm regulate motility and the acrosome reaction. FEBS J. 2016; 283(10): 1902-20. doi: 10.1111/febs.13710 PMID: 26990886
42. Espinal-Enríquez J, Priego-Espinosa DA, Darszon A, Beltrán C, Martínez-Mekler G. Network model predicts that CatSper is the main Ca2+ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. Sci Rep. 2017; 26; 7(1): 1-4. doi: 10.1038/s41598-017-03857-9 PMID: 28652586
43. Siudzińska A, Łukaszewicz E. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. J Appl Poult Res. 2008; 17(1): 101-8. doi: 10.3382/japr.2007-00048
44. Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. Molecular basis of human sperm capacitation. Front Cell Dev Biol. 2018; 6: 72. doi: 10.3389/fcell.2018.00072 PMID: 30105226

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

Supplementation of Lake Extender with Calcium Compounds to Maintain the Quality Parameters of Rooster Sperm for 72 Hours

Parand Farzam[1]✉, Amjad Farzinpour[2]✉, Asad Vaziri[2]✉, Sina Naderi[1]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran*
[2] *Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran*

10.22059/jvr.2022.346425.3290

Received: *21 September 2022,* ***Accepted:*** *20 November 2022*

Abstract

BACKGROUND: Storing semen at a temperature of 4 degrees Celsius reduces its motility and quality.
OBJECTIVES: This study aimed to determine the effect of adding calcium compounds, including calcimaphor (CMP), calcium gluconate (CG), and calcium chloride ($CaCl_2$), on the motility and progressive motility of rooster sperm kept at refrigerator temperature.
METHODS: This research used five pieces of 45-week-old Lari breed roosters. The liquid diluent added different calcium compounds at 0.56, 0.056, and 0.0056 mM concentrations. After treatment, the diluted seminal samples were cooled at the storage temperature to avoid thermal doubt and then transferred to the refrigerator at 4 degrees Celsius. Parametric factors that were more important such as the percentage of laterality and progressive mobility, were measured visually using the lens of a 40-light microscope, survival was checked using the eosin-nigrosin staining method, acrosome health percentage by formalin citrate method, cell membrane health with hypoosmotic test, lipid peroxidation level, fertility was evaluated using perivitelline membrane sperm reaction 72 hours after storing at 4 degrees Celsius.
RESULTS: Based on the results, different calcium compounds in most concentrations could significantly affect the parameters of survival, mobility, and progressive mobility (P<0.05).
CONCLUSIONS: Most of the sperm-related parameters in the control group decreased after this period of storage in the refrigerator, but the addition of calcium gluconate (0.56, 0.056, and 0.0056), Calcimaphor (0.56, 0.056, and 0.0056) and calcium chloride (0.56, 0.056 and 0.0056) to the semen thinner maintained the quality indicators of rooster sperm.
Keywords: Calcium, Motility, Rooster, Sperm, Viability

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Amjad Farzinpour, Tel/Fax: 087-33627723

How to cite this article:

Farzam P, Farzinpour A, Vaziry A, Naderi S. Supplementation of Lake Extender with Calcium Compounds to Maintain the Quality Parameters of Rooster Sperm for 72 Hours. J Vet Res, 2023; 77(4): 229-238.
doi: 10.22059/jvr.2022.346425.3290

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Leakage of diluting compounds to preserve rooster sperm.
Table 2. Different levels of studied calcium compounds.
Table 3. Qualitative parameters of rooster sperm during in-vitro storage in milk diluent containing different concentrations of calcium-containing compounds (percentage) after 72 hours of storage at refrigerator temperature (4°C). The means of each column with non-common letters have a significant difference (P<0.05).
Figure 1. Viability (1000x).
Figure 2. Membrane integrity (1000x).
Figure 3. Acrosome health (1000x).
Figure 4. Fertility (400x).
Figure 5. The concentration of malondialdehyde.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۴۶-۲۳۹
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

مطالعه استریولوژیکی حجم اووسیت و فولیکول تخمدانی موالید بالغ رت‌ها در دوره‌های مختلف پیرا زایشی و شیرواری در شرایط مسمومیت با سرب

ساره نجف‌اسعدی[۱]، حسن مروتی[۲]، جواد صادقی‌نژاد[۲]، احسان رومیانی[۱]

[۱] دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۲ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.336856.3226 20.1001.1.20082525.1401.77.4.5.6

چکیده

زمینهٔ مطالعه: آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین در پی افزایش تولیدات صنعتی مشکلاتی را در زندگی موجودات زنده ایجاد کرده است. سرب قادر به نفوذ در اندام‌های نرم بدن می‌باشد و با رسوب در آن‌ها می‌تواند در عملکردشان اختلالاتی ایجاد کند. همچنین سرب با عبور از سد خونی–جفتی وارد بدن جنین شده و یا از طریق شیر مادر به نوزاد منتقل می‌شود.

هدف: مطالعه حاضر جهت بررسی اثر آلودگی سرب با دوز پایین در مادر، بر حجم متوسط اووسیت فولیکول و حجم متوسط فولیکول موالید بالغ با استفاده از تکنیک استریولوژی در مدل حیوانی رت انجام شد.

روش‌کار: موش‌های صحرایی، نژاد ویستار، به صورت تصادفی به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند که شامل یک گروه کنترل و چهار گروه تجربی پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری بود. گروه کنترل آب آشامیدنی به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال را در دسترس داشتند. گروه‌های تجربی استات سرب به میزان ۰/۲ درصد به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال را از طریق آب آشامیدنی، در دوره‌های مختلف (گروه پیش‌آبستنی ۳۰ روز قبل از جفت‌گیری، گروه آبستنی ۲۱ روز دوره آبستنی، گروه شیرواری طی ۲۱ روز دوره شیردهی و گروه پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری از ۳۰ روز قبل از جفت‌گیری تا انتهای دوره شیرواری) دریافت کردند. در روز ۶۵ام بعد از تولد، تمام موالید در آزمایشگاه آسان‌کشی و تخمدان چپ آن‌ها جهت مطالعات استریولوژی جمع‌آوری شد.

نتایج: حجم متوسط اووسیت در فولیکول‌های مقدماتی، اولیه تک‌لایه، اولیه چندلایه و آنترال در گروه شیرواری نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تجربی افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). همچنین حجم متوسط فولیکول مقدماتی و اولیه تک‌لایه در گروه شیرواری نسبت به گروه‌های کنترل و تجربی افزایش یافت ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاکی از آن بود که مواجهه مادر با سرب با دوز پایین در دوره شیرواری موجب افزایش حجم متوسط اووسیت فولیکول و حجم متوسط فولیکول‌های در حال رشد می‌شود.

کلمات کلیدی: استریولوژی، سرب، حجم اووسیت، حجم فولیکول، موش صحرایی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: حسن مروتی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

فلزات سنگین عوارض متعددی را در ارگان‌های مختلف بدن پستانداران ایجاد می‌کنند. رشد جمعیت، افزایش صنعتی شدن جوامع و تردد وسایل نقلیه موتوری را می‌توان از جمله عوامل انتشار فلزات سنگین در محیط زیست دانست. سرب یک فلز بسیار سمی است که در محیط زیست به وفور یافت می‌شود و در دوزهای بسیار پایین نیز می‌تواند اختلالاتی در ارگان‌ها و اندام‌های بدن ایجاد کند (۱). از جمله کاربردهای سرب در صنایع امروزی می‌توان به اتومبیل‌سازی، نظامی، تولید ضدزنگ، تهیه باطری، بنزین‌های حاوی سرب و ... اشاره کرد که موجب می‌شود افراد بویژه کارگران در مواجهه مستقیم و یا غیرمستقیم

با سرب قرار گیرند (۲). Garu و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Rafati Rahimzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که فلزات سنگین قادر هستند از غشاء سلول عبور کنند و با تجمع در بافت‌های نرم از جمله تخمدان، موجب اختلال در عملکرد فیزیولوژی، تغییرات بافتی، تغییر در رشد فولیکول‌ها و کم و زیاد شدن دوره تخمک‌گذاری آن‌ها شوند (۳،۴). ساختمان کروی یا بیضی شکل تخمدان‌ها از دو ناحیه قشری و مرکزی تشکیل شده است. ناحیه مرکزی شامل بافت همبند فیبروزی متراکم و عروق خونی است در حالی‌که ناحیه قشری دارای انواع فولیکول‌های در حال رشد، جسم زرد، بافت بینابینی و عروق خونی می‌باشد. فولیکول‌ها در بخش قشری تخمدان قرار گرفته و هسته اووسیت‌ها دارای کروماتین و یک هستک مشخص می‌باشد. زونا پلوسیدا در اطراف اووسیت حضور داشته و توسط لایه گرانولوزا احاطه شده است. لایه‌های تک داخلی و خارجی نیز لایه گرانولوزا را احاطه می‌کنند (۵). Waseem و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که مواجهه با استات سرب سبب کاهش مقدار فولیکول‌های تخمدانی اولیه و بالغ در موش‌های نژاد Balbc شد (۶). Patriarca و همکاران در سال ۲۰۰۰، Antonio-Garcia و Masso-Gonzalez در سال ۲۰۰۸، Dumitrescu و همکاران در سال ۲۰۱۵، نشان دادند که سرب توانایی عبور از سد خونی- جفتی را دارد و بدین طریق سبب تأخیر در تکوین جنین می‌شود و اثرات تراتوژنیک در آن ایجاد می‌کند. آن‌ها در ادامه بیان کردند که تجمعات سرب در بافت‌های تخمدان، لوله‌های رحمی و رحم موجب تغییرات بافتی، تغییر مراحل تکوین فولیکول و ناباروری می‌شود؛ همچنین آلودگی مادر به سرب از طریق شیر به نوزادان قابل انتقال است (۹-۷).

Bassit و همکاران در سال ۲۰۲۰، با مطالعه اثر سمیت سرب با دوز ۶۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تکامل تخمدان، از روز ۱۰ام آبستنی تا ۲۱ روز بعد از تولد، بیان کردند که سرب سبب کاهش اندازه تخمدان، بی‌نظمی در بافت پوششی، آسیب انواع فولیکول‌ها، تخریب سلول‌های گرانولوزا و کوچک شدن هسته تخمک می‌شود (۱۰). Sodani در سال ۲۰۱۷ اثرات مضر استات سرب بر بافت تخمدان موش‌های آلبینو به روش استریولوژی را بررسی و نشان داد که مصرف استات سرب با دوز پایین سبب تغییرات هیستوپاتولوژیک از قبیل دژنره شدن اووسیت، ناحیه شفاف، تغییرات دژنراتیو سلول‌های تاجی و افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک می‌شود اما تغییر معنی‌داری در تعداد فولیکول‌ها ایجاد نمی‌کند (۱۱).

با توجه به گسترش روزافزون آلودگی با سرب در جامعه کنونی تلاش‌های بسیاری برای کاهش آلودگی مادران، زنان باردار و کودکان صورت گرفته است، اما اجتناب از در معرض قرار گرفتن سرب تقریباً غیرممکن می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آلودگی سرب با دوز پایین در مادر بر روی تکوین تخمدان موالید با استفاده از تکنیک استریولوژی در مدل حیوانی رت می‌باشد که براساس مطالعات حاضر تاکنون انجام نشده است. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در ارزیابی کمی تغییرات بافت تخمدان متعاقب مسمومیت با سرب و اتخاذ روش‌های مناسب جهت محافظت مادران از مسمومیت با سرب و اثرات آن بر تخمدان موالید مفید باشد.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر، رت‌های نر و ماده بالغ نژاد ویستار از انیستیتو پاستور خریداری شدند و در آزمایشگاه جنین‌شناسی و بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با حفظ شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۶-۲۰ درجه سانتی‌گراد و آب و غذای کافی) نگهداری شدند. جهت از بین رفتن استرس احتمالی ناشی از تغییر محل زندگی، رت‌ها به مدت یک هفته با شرایط مذکور نگهداری شدند تا به محیط جدید عادت کنند. در تمام مراحل مطالعه موازین اخلاقی نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. انجام این طرح با شماره ثبت ۳۰۰۲۹/۶/۱۷ مورد تأیید قرار گرفت. برای جفت‌گیری، در هر قفس به‌ازای هر حیوان نر، دو حیوان ماده در نظر گرفته شد و پس از گذشت ۱۲ ساعت از جفت‌گیری، پلاک واژنی (Vaginal plaque) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از واژن رت‌های ماده به‌وسیله سوآپ اسمیر تهیه و سپس با ائوزین رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ بررسی شد تا در صورت مشاهده اسپرم، آن روز به عنوان روز صفر آبستنی در نظر گرفته شود (P=۰). پس از جداسازی رت‌های بارور، آن‌ها به صورت تصادفی در پنج گروه مختلف قرار گرفتند. مادران تمام موالید گروه‌های تجربی، استات سرب را به صورت ۰/۲ درصد در آب آشامیدنی دریافت کردند. جهت جلوگیری از رسوب استات سرب از اسیداستیک گلاسیال استفاده شد (۱۴-۱۲). گروه‌ها شامل گروه کنترل: رت مادر به آب آشامیدنی

نرمال (۱ لیتر آب + ۰/۵ میلی‌لیتر/ لیتر اسیداستیک گلاسیال) در دوران قبل آبستنی، آبستنی و شیرواری دسترسی داشت. تعداد رت‌های موالید گروه کنترل ۵ عدد بود.

۱- رت مادر با استات سرب ۰/۲ درصد یا ۲ گرم + ۱ لیتر آب آشامیدنی+ ۰/۵ میلی‌لیتر/ لیتر اسیداستیک گلاسیال به مدت ۳۰ روز قبل از جفت‌گیری تیمار شد. تعداد رت‌های موالید گروه پیش‌آبستنی ۳ عدد بود.

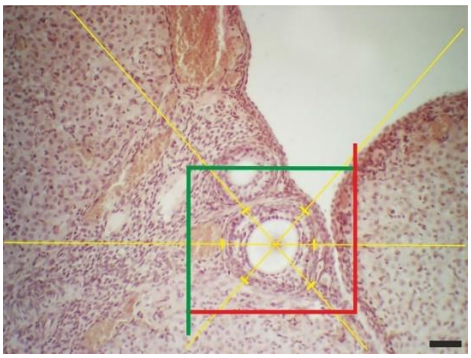
۲- گروه آبستنی: رت مادر در طول دوره ۲۱ روز با استات سرب ۰/۲ درصد یا ۲ گرم+ ۱ لیتر آب آشامیدنی+ ۰/۵ میلی‌لیتر/ لیتر اسیداستیک گلاسیال تیمار شد. تعداد رت‌های موالید این گروه ۴ عدد بود.

۳- گروه شیرواری: رت مادر در طی ۲۱ روز دوره شیرواری با استات سرب ۰/۲ درصد یا ۲ گرم+ ۱ لیتر آب آشامیدنی+ ۰/۵ میلی‌لیتر/لیتر اسیداستیک گلاسیال تیمار شد. تعداد موالید این گروه ۴ عدد بود.

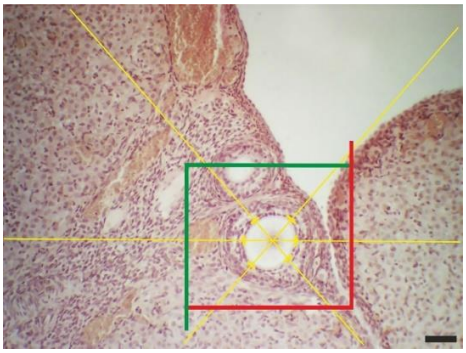
۴- گروه پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری: رت مادر ۳۰ روز قبل از آبستنی تا انتهای دوره شیرواری (به مدت ۷۲ روز) با استات سرب ۰/۲ درصد یا ۲ گرم+ ۱ لیتر آب آشامیدنی+ ۰/۵ میلی‌لیتر/ لیتر اسیداستیک گلاسیال تیمار شد. تعداد موالید این گروه ۵ عدد بود.

پس از پایان دوره شیرواری یعنی ۲۱ روز بعد از تولد، موالید از رت‌های مادر جدا و جنس‌های نر و ماده نیز از هم جدا شدند. رت‌های ماده جهت رسیدن به بلوغ تا پایان روز ۶۵ام نگهداری شدند. سپس رت‌های موالید ماده با استفاده از ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بر وزن بدن کتامین ۱۰ درصد (شرکت آلفاسان هلند) و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بر وزن بدن زایلازین (شرکت آلفاسان هلند) آسان‌کشی شدند (۹). جهت انجام مراحل استریولوژی، نرمال‌سالین و متعاقب آن پرفیوژن پارافرمالدهید ۴ درصد از بطن چپ قلب تزریق شد. تخمدان‌های چپ و راست خارج و در پارافرمالدهید ۴ درصد غوطه‌ور شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت جهت تثبیت بهتر فرمالین‌ها تعویض شدند. وزن تخمدان‌های چپ با ترازوی دیجیتال ثبت و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی با تکنیک ارینتیتور (Oriantator) و با دستگاه تیشوپروسسور (Tissue processor DS2080/H) قالب‌گیری شدند. از قالب‌های پارافینی با استفاده از روش نمونه‌برداری تصادفی یکنواخت سیستماتیک (Random Sampling Systematic Uniform) برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. از برش‌های بافتی تهیه شده به منظور انجام استریولوژی، تصاویری با میکروسکوپ نوری مدل Jenamed2 تهیه شد. تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Axiovision مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (تصویر ۱،۲). حجم متوسط فولیکول‌های آنترال و پره‌آنترال و حجم متوسط اووسیت‌های آن‌ها با استفاده از روش‌های نوکلئاتور و فرمول ۱ محاسبه شدند. در این فرمول I بیانگر متوسط شعاع‌های فولیکول و اووسیت از مرکز هسته و V نشان‌دهنده حجم متوسط فولیکول و اووسیت می‌باشد (۱۵). آنالیز نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۲۴ انجام شد. برای آنالیز آماری از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف استفاده شد. در صورت توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون‌های آماری پارامتری آنووا یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی و در صورت توزیع غیرنرمال داده‌ها از آزمون‌های آماری غیرپارامتری کروسکال والیس و من‌ویتنی برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده و مقدار $P<۰/۰۵$ به عنوان معیار معنی‌داری در نظر گرفته شد.

فرمول ۱ $V=4/3\pi l^3$



تصویر ۱. محاسبه حجم متوسط فولیکول در فولیکول اولیه چندلایه با استفاده از روش نوکلئاتور (مقیاس: ۵۰ میکرو متر).

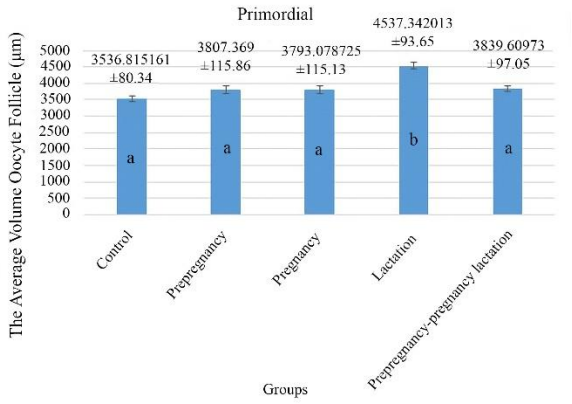


تصویر ۲. محاسبه حجم متوسط اووسیت در فولیکول اولیه چندلایه با استفاده از روش نوکلئاتور (مقیاس: ۵۰ میکرو متر).

نتایج

حجم اووسیت: بررسی نتایج حجم اووسیت در فولیکول‌های مقدماتی در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۳)، نشان داد که گروه شیرواری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۰$).

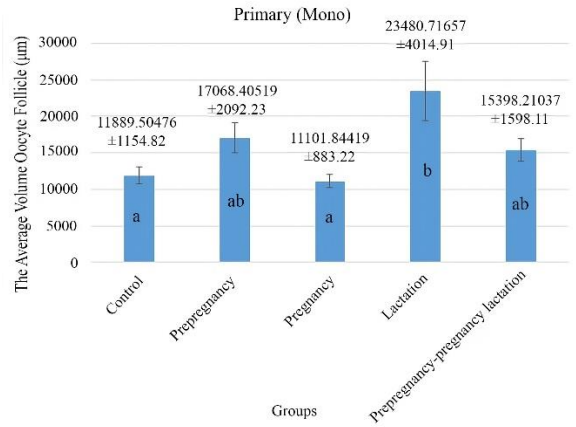
بررسی نتایج حجم اووسیت در فولیکول‌های اولیه تک‌لایه در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۴)، نشان داد که گروه شیرواری نسبت به گروه کنترل ($P<۰/۰۰$) و گروه آبستنی ($P<۰/۰۱$) افزایش معنی‌دار داشت.



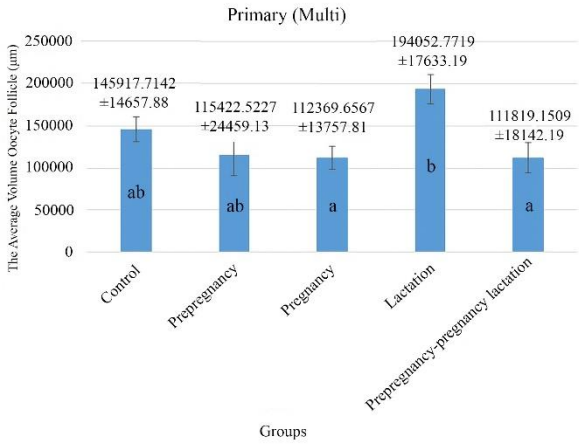
تصویر ۳. حجم متوسط اووسیت در فولیکول مقدماتی بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _ آبستنی _ شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.

بررسی نتایج حجم اووسیت در فولیکول‌های اولیه چندلایه در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۵)، نشان داد که گروه شیرواری نسبت به گروه‌های آبستنی ($P<۰/۰۰۴$) و گروه پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری ($P<۰/۰۰۷$) افزایش معنی‌دار داشت اما نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود.

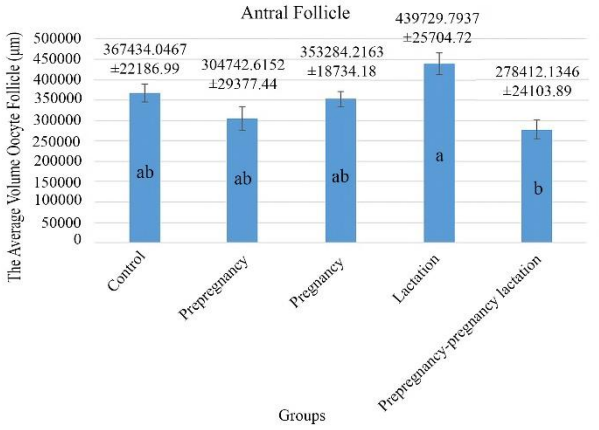
بررسی نتایج حجم اووسیت در فولیکول‌های آنترال در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۶)، نشان داد که مقادیر در گروه شیرواری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت اما تنها با گروه پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری این اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۳۶$).



تصویر ۴. حجم متوسط اووسیت در فولیکول اولیه تک‌لایه بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _ آبستنی _ شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.



تصویر ۵. حجم متوسط اووسیت در فولیکول اولیه چندلایه بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _آبستنی _شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.

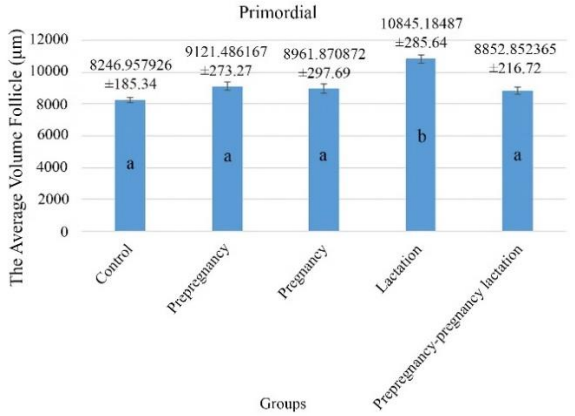


تصویر ۶. حجم متوسط اووسیت در فولیکول آنترال بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _آبستنی _شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.

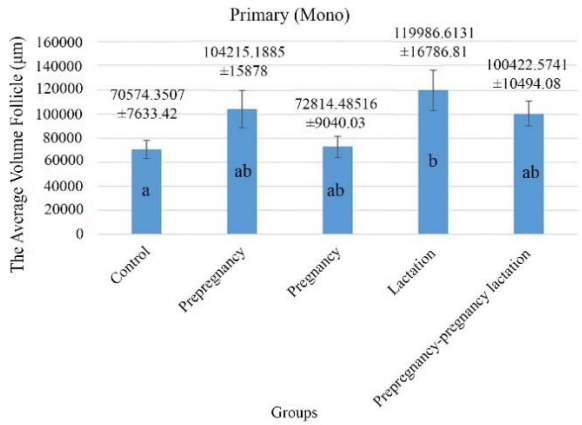
حجم فولیکول: بررسی نتایج حجم فولیکول‌های مقدماتی در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری، و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۷)، نشان داد که گروه شیرواری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۰$).

بررسی نتایج حجم فولیکول‌های اولیه تک‌لایه در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری (تصویر ۸)، نشان داد که مقادیر گروه شیرواری نسبت به گروه‌های دیگر افزایش داشت که اختلاف آن تنها با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$).

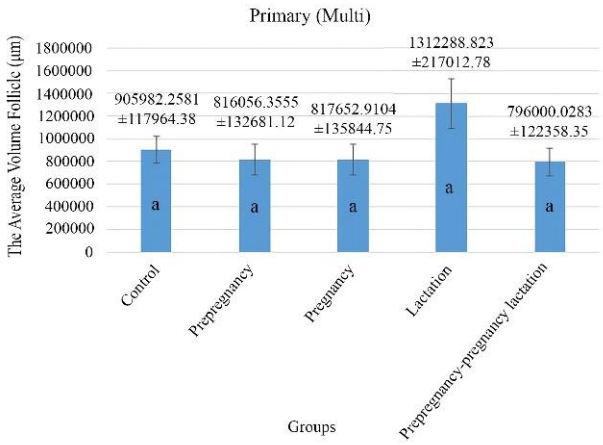
بررسی نتایج حجم فولیکول‌های اولیه چندلایه (تصویر ۹) و حجم فولیکول‌های آنترال (تصویر ۱۰)، در گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد.



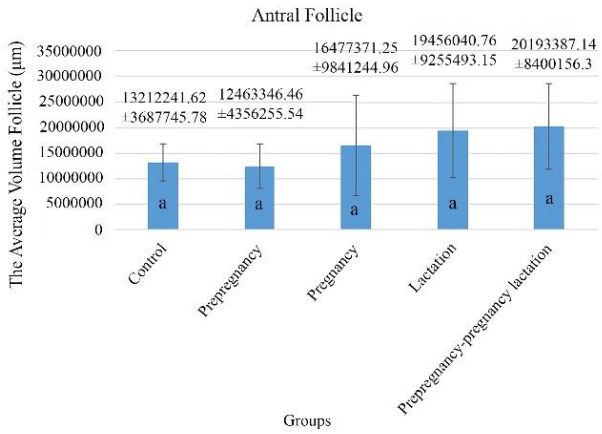
تصویر ۷. حجم متوسط فولیکول مقدماتی بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _آبستنی _شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.



تصویر ۸. حجم متوسط فولیکول اولیه تک‌لایه بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _آبستنی _شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.



تصویر ۹. حجم متوسط فولیکول اولیه چندلایه بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _ آبستنی _ شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.



تصویر ۱۰. حجم متوسط فولیکول آنترال بین گروه‌های کنترل، پیش‌آبستنی، آبستنی، شیرواری و پیش‌آبستنی _ آبستنی _ شیرواری. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌ها می‌باشد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حجم متوسط اووسیت فولیکول‌های مقدماتی، اولیه تک‌لایه و اولیه چند لایه در گروه شیرواری نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تجربی افزایش داشت. حجم متوسط اووسیت فولیکول آنترال در گروه شیرواری نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تجربی افزایش داشت که اختلاف آن فقط با گروه پیش‌آبستنی-آبستنی-شیرواری معنی‌دار بود. مقایسه حجم متوسط فولیکول‌های مقدماتی و اولیه تک‌لایه در گروه شیرواری نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تجربی افزایش معنی‌دار داشت اما در حجم متوسط فولیکول اولیه چندلایه و آنترال اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. براساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر اثر سرب در گروه‌های شیرواری بیشتر از سایر گروه‌های مورد مطالعه مشهود بود. به عبارتی سرب به دلیل انتقال از طریق شیر به نوزادان، می‌تواند در بافت نرم تخمدان رسوب کرده و رشد فولیکول‌ها را تحت‌تأثیر قرار دهد. همچنین سرب توانایی عبور از غشاء سلول‌ها را داشته و می‌تواند با ورود به فولیکول‌ها و اووسیت آن‌ها، تغییراتی در سلول‌های گرانولوزا ایجاد کند و رشد فولیکول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و در نهایت موجب تغییر در حجم فولیکول‌ها و حجم اووسیت شود. Nampoothiri و Gupta در سال۲۰۰۶، مطالعه‌ای جهت ارزیابی اثر همزمان سرب و کادمیوم انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد سلول‌های گرانولوزا در گروه دریافت‌کننده سرب کاهش یافته که می‌تواند سبب کاهش حجم فولیکول شود (۱۶). Sharma و Bhattacharya در سال ۲۰۱۴، کاهش قطر فولیکول‌ها را متعاقب مصرف استات سرب (با دوز ۱/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز)، گزارش کردند (۱۷). مطالعات گسترده‌ای که اثرات استات سرب را با دوزهای مختلف بر حجم متوسط فولیکول‌ها و حجم متوسط اووسیت‌ها نشان دهد، صورت نگرفته است؛ اما مطالعات دیگری وجود دارد که تأثیر دارو یا مواد دیگری را بر حجم متوسط فولیکول و حجم متوسط اووسیت نشان می‌دهد که از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه Soleimani Mehranjani و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره کرد. در این مطالعه اثرات ویتامین E بر روی بافت تخمدان رت به دنبال مهار با پارانویل فنول به روش استریولوژی ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در اثر مواجهه با پارانویل فنول، حجم اووسیت و فولیکول‌ها کاهش می‌یابد (۱۸). Shariatzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر سدیم آرسنیت را بر بافت تخمدان به شیوه استریولوژی بررسی کردند. نتایج بیانگر این بود که حجم متوسط اووسیت در فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آنترال و گراف کاهش می‌یابد (۱۹). Soleimani Mehranjani و Mansoori در سال ۲۰۱۶، اثرات مهاری ویتامین C روی تأثیرات مضر بیس‌فنول A بر تخمدان رت را به روش استریولوژیکی مطالعه کردند و نشان دادند که حجم اووسیت و فولیکول‌های آن در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت (۲۰). Dahmardeh و همکاران در سال ۲۰۲۰، مورفومتری تخمدان موالید موش‌های سوری تحت‌تیمار با اگزالی‌پلاتین را در دو دوره ۳۰ و ۶۰ روزه بررسی کردند. مشاهدات نشان داد که در موالید ۳۰ روزه، حجم متوسط اووسیت در فولیکول‌های آنترال و پره‌آنترال و حجم متوسط فولیکول‌های آنترال در گروه‌های تجربی پیش‌آبستنی، آبستنی و شیرواری در مقایسه با گروه کنترل، کاهش داشت. همچنین آن‌ها بیان کردند که در موالید ۶۰ روزه، حجم متوسط فولیکول‌های آنترال و حجم متوسط اووسیت فولیکول‌های آنترال در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (۲۱). نتایج داده‌های مربوط به حجم اووسیت و حجم فولیکول‌ها در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات گذشته همسو نبود. البته لازم به یادآوری است که در مطالعات پیشین سرب مورد استفاده با دوز بالا بود. در صورتی‌که در مطالعه حاضر رت‌های مادر با استات سرب با دوز پایین مواجهه بودند. لذا پیشنهاد می‌شود که در آینده مطالعاتی در مورد مکانیسم فیزیولوژیک و پاتولوژیک رت‌های مادر و موالید مواجهه شده با استات سرب صورت گیرد.

نتیجه‌گیری نهایی: در مطالعه حاضر حجم متوسط اووسیت فولیکول و حجم فولیکول‌ها با تکنیک استریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به توانایی عبور سرب از غشاء سلول و تجمع آن در فولیکول‌های موجود که سبب افزایش حجم اووسیت و فولیکول می‌شود؛ می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که بیشترین اثرات منفی سرب بر حجم فولیکول‌های تخمدانی مربوط به دوره شیرواری می‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل نتایج پایان‌نامه دکتری تخصصی بافت‌شناسی می‌باشد و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت مالی و پژوهشی معاونت محترم پژوهشـــی و بخش بافت‌شناسی و آناتومی دانشکده دامپزشکی سپاسگزاری نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Al-Juboori B, Hamdan F, Al-Salihi B. Paternal exposure to low-dose lead acetate: effect on implantation rate, pregnancy outcome, and sex ratio in mice. Turk J Med Sci. 2016; 46: 936-941. doi: 10.3906/sag-1412-62 PMID: 27513276
2. Sayehmiri K, Bigdeli Shamloo M, Khataee M, Rabiei Fakhr F, Azami M. Occupational exposure and biological evaluation of lead in Iranian workers-a systematic review and meta-analysis. J H S W. 2016; 6(3): 1-14. (in Persian)
3. Garu U, Sharma R, Barber I. Effect of lead toxicity on developing testis of mice. Int J Pham Sci Res. 2011; 2(9): 2403.
4. Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. An update on lead poisoning. JBUMS. 2015; 17(3): 35-50. (in Persian)
5. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas. 2ed ed. Elsevier (Academic Press). London. UK; 2018.
6. Waseem N, Hamid S, Butt SA. Effect of lead acetate on follicular count of mice ovary and the protective role of garlic extract. Pak Armed Forces Med J. 2014; 64(1): 61-5.
7. Patriarca M, Menditto A, Rossi B, Lyon TD, Fell GS. Environmental exposure to metals of newborns, infants and young children. Microchem J. 2000; 67(1-3): 351-61. doi: 10.1016/S0026-265X(00)00088-6
8. Antonio-García MT, Massó-Gonzalez EL. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. Food and chem toxicol. 2008; 46(6): 2089-95. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.053 PMID: 18417264
9. Dumitrescu E, Chiurciu V, Muselin F, Popescu R, Brezovan D, Cristina RT. Effects of long-term exposure of female rats to low levels of lead: ovary and uterus histological architecture changes. Turk J Biol. 2015; 39(2): 284-9. doi: 10.3906/biy-1407-6
10. Bassit AS, Ouies SM, Roshdy S. Effect of administration of lead acetate on the post-natal development of ovary in albino rats. Sohag Medical Journal. 2020; 24(3): 48-5. doi: 10.21608/SMJ.2020.25756.1117
11. Sodani IJ. Study the adverse effects of exposure to lead acetate on mice ovarian. Int J Adv Res. 2017; 5(5): 727-35. doi: 10.21474/IJAR01/4171
12. Jaako-Movits K, Zharkovsky T, Romantchik O, Jurgenson M, Merisalu E, Heidmets LT, Zharkovsky A. Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. Int. J. Dev. Neurosci. 2005; 23(7): 627-35. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2005.07.005 PMID: 16150564
13. Heidmets LT, Zharkovsky T, Jurgenson M, Jaako-Movits K, Zharkovsky A. Early post-natal, low-level lead exposure increases the number of PSA-NCAM expressing cells in the dentate gyrus of adult rat hippocampus. Neurotoxicology. 2006; 27(1): 39-43. doi: 10.1016/j.neuro.2005.05.015 PMID: 16169083
14. Barkur RR, Bairy LK. Histological study on hippocampus, amygdala and cerebellum following low lead exposure during prenatal and postnatal brain development in rats. Toxicol Ind Health. 2016; 32(6): 1052-63. doi: 10.1177/0748233714545624 PMID: 25147304
15. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo LX, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. Apmis. 1988; 96(7-12): 857-81. doi: 10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x PMID: 3056461
16. Nampoothiri LP, Gupta S. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. Repro Toxicol. 2006; 1;21(2): 179-85. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.07.010 PMID: 16159707
17. Sharma, DN & Bhattacharya, L. Role of Vitamin E on Antifolliculogenesis of Lead Acetate on diameter of Follicles containing Ovarian Tissue of Swiss Albino Mice. G J B A H S. 2014; 3(1): 322-325.
18. Soleymani Mehranjani M, Nourafshan A, Hamta A, Moumeni HR, Abnousi M, Mahmoudi M, Anvari M, Hazaveh M. Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: A stereological study. Iran J Reprod Med. 2010; 8(1): 1- 9.
19. Shariatzadeh SMA, Soleimani mehranjani M, Hamta A, Ghandizadehdezfuli M. The stereological study of the effect of vitamin E on the structure of ovary and its number of follicles during ovary development in rats treated with sodium arsenite. AMUJ. 2012; 15(61): 54-64. (In Persian)
20. Soleimani Mehranjani M, Mansoori T. Stereological study on the effect of vitamin C in preventing the adverse effects of bisphenol A on rat ovary. Int J Reprod Biomed. 2016; 14(6): 403- 410. PMID: 27525324
21. Dahmardeh M, Sadeghinezhad J, Tootian Z. Morphometric analysis of offspring ovary in mice following oxaliplatin treatment during perinatal period using stereology technique. JAUMS. 2020; 20(1): 32-48. (In Persian) doi: 10.29252/jarums.20.1.32

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

Stereological Study of Oocyte Volume and Ovarian Follicles of Adult Rats During Prenatal and Lactation Periods under Conditions of Lead Poisoning

Sareh Najaf Asaadi[1]✉, Hassan Morovvati[2]✉, Javad Sadeghinezhad[2]✉, Ehsan Rumiani[1]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2022.336856.3226

Received: *1 October 2022,* ***Accepted:*** *3 December 2022*

Abstract

BACKGROUND: The pollution of environment with heavy metals following the increase in the industrial production has created problems in the lives of living organisms. Lead can penetrate the soft organs of body, and by depositing in them can cause disorders their function. Lead can cross the blood-placental barrier and transfer to the fetus. It is also possible to pass lead through milk to the newborn.

OBJECTIVES: The stereology approach was used in rats as animal models to examine the impact of low dosage lead contamination in the mother on the average volume of follicular oocytes and the average volume of mature follicles.

METHODS: Wistar rats were randomly divided into five groups, which included a control group and four experimental groups of pre-pregnancy, pregnancy, lactation and pre-pregnancy-pregnancy-lactation. The control group had access to drinking water with 0.5 ml of glacial acetic acid. Experimental groups administered lead acetate at a rate of 0.2 percentage + 0.5 ml of glacial acetic acid through drinking water in different periods (pre-pregnancy group 30 days before mating, pregnancy group 21 days of pregnancy, lactation group. They received 21 days of lactation and the pre-pregnancy-pregnancy-lactation group 30 days before mating until the end of lactation). On the 65th day after birth, all infants were killed in the laboratory and left ovary specimens were collected for stereological studies.

RESULTS: The results showed that the average volume of oocytes in the primordial, monolayer primary, multilayer primary, and antral follicles increased in the lactation group compared to the control group and other experimental groups (P<0.05). Furthermore, the mean volume of primordial and monolayer primary follicles in lactation group increased compared to the control and experimental groups (P<0.05).

CONCLUSIONS: This study's results showed that maternal exposure to low doses of lead during lactation increases the average volume of oocytes and increases the average volume of growing follicles.

Keywords: Follicle volume, Lead, Oocyte volume, Rat, Stereology

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Hassan Morovvati, Tel/Fax: 021-61117117 / 021-66933222

How to cite this article:

Najaf Asaadi S, Morovvati H, Sadeghinezhad J, Rumiani E. Stereological Study of Oocyte Volume and Ovarian Follicles of Adult Rats During Prenatal and Lactation Periods under Conditions of Lead Poisoning. J Vet Res, 2023; 77(4): 239-246. doi: 10.22059/jvr.2022.336856.3226

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The calculation of average follicle volume in primary multilayer follicles using nucleator method (Scale bar: 50 µm).
Figure 2. Calculation of mean oocyte volume in primary multilayer follicle using the nucleator method (Scale bar: 50 µm).
Figure 3. Mean oocyte volume in the primordial follicle among control, pre-pregnancy, pregnancy, lactation, and pre-pregnancy-pregnancy-lactation groups. Mismatched letters indicate a significant difference (P<0.05) among groups.
Figure 4. Mean oocyte volume in primary monolayer follicle.
Figure 5. Mean oocyte volume in primary multilayer follicle.
Figure 6. Mean volume of oocytes in antral follicle.
Figure 7. Mean volume of primordial follicle.
Figure 8. Mean volume of primary monolayer follicle.
Figure 9. Mean volume of primary multilayer follicle.
Figure 10. Mean volume of antral follicle.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۵۴-۲۴۷
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

جستجوی هرپس ویروس یک گاوی در اسپرم‌های منجمد تولید ایران

فاطمه عرب‌خالقی[۱]، پژمان میرشکرایی[۲،۳]، حسام الدین سیفی[۲،۳]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۳] قطب علمی سقط جنین و مرگ و میر نوزادان نشخوارکنندگان، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۸ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.345709.3284 20.1001.1.20082525.1401.77.4.6.7

چکیده

زمینهٔ مطالعه: ویروس عامل بیماری IBR (Infectious bovine rhinotracheitis) متعلق به خانواده هرپس و زیر خانواده آلفا هرپس می‌باشد (Bovine herpes virus). BHV1 عامل بیماری راینوتراکییت و سقط عفونی در گاوها است. IPV (Infectious pustular vulvovaginitis) فرم تناسلی بیماری و عفونت واژینال است که به‌وسیله پاستول و ترشحات مخاطی چرکی مشخص می‌شود. IPV متعاقب برخورد ویروس به مخاط دستگاه تناسلی توسط جفت‌گیری طبیعی یا تلقیح مصنوعی اتفاق می‌افتد و از جمله بیماری‌هایی که طی تلقیح مصنوعی می‌تواند توسط اسپرم منجمد به دام سالم منتقل شود.

هدف: آلودگی منی به ویروس یکی از راه‌های گسترش بیماری در بین گاوهای شیری است. از این رو در مطالعه حاضر سعی شد حضور ویروس در پایت‌های اسپرم تولید داخل و مصرفی گاوداری‌های صنعتی مورد ارزیابی قرار داده شد.

روش‌کار: در مطالعه حاضر ۱۴۰ عدد پایت اسپرم منجمد گاو از مراکز مربوطه خریداری شد. پس از ذوب، استخراج با استفاده از کیت استخراج ژنومی انجام گرفت. برای اطمینان از درستی روند استخراج ابتدا PCR با پرایمر ژن PRM1 انجام شد و ردیابی ژنوم ویروس نیز با استفاده از PCR انجام شد.

نتایج: در مجموع یک نمونه از ۱۴۰ نمونه پایت اسپرم مورد بررسی آلودگی به ویروس را نشان داد که پس از چند بار تکرار همگی مراحل از دو پایت مختلف و تعیین سکانس ژن، آلودگی به ویروس IBR تأیید شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به وجود حتی یک مورد آلودگی در این جامعه ۱۴۰تایی و اهمیت بالای بیماری نیاز به بررسی‌ها و پایش‌های بیشتر در ارتباط با انتقال آلودگی از طریق اسپرم‌های منجمد وجود دارد.

کلمات کلیدی: اسپرم، پی سی آر، گاو، ویروس، هرپس ۱

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: پژمان میرشکرایی، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ قطب علمی سقط جنین و مرگ و میر نوزادان نشخوارکنندگان، مشهد، ایران

مقدمه

در کشور ایران تولیدات دامی نقش مهمی در چرخه کشاورزی دارند. ۸۰ درصد از تولید لبنیات و گوشت گاو جهان در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کشورها تنها ۲۱ درصد از میزان شیر و ۳۴ درصد از گوشت جهان را تولید می‌کنند؛ بنابراین افزایش تولیدات دامی در این کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کارشناسان روش‌های متنوعی از جمله تلقیح مصنوعی را برای افزایش فرآورده‌های دامی ارائه کرده‌اند. یکی از سریع‌ترین و ساده‌ترین راه‌ها برای افزایش تولید در دام تلقیح مصنوعی است. تلقیح مصنوعی به‌عنوان یک تکنیک در اصلاح نژاد دام و برای پیشگیری از انتقال و انتشار بیماری‌ها و همچنین به لحاظ بالا بودن ارزش اقتصادی و سهولت در انجام آن در سطح وسیعی در دنیای امروز مورد استفاده قرار می‌گیرد. علی‌رغم این که تلقیح مصنوعی به‌عنوان عامل پیشگیری و کنترل از بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود ولی خود بالقوه می‌تواند در

صورت عدم رعایت ضوابط بهداشتی سبب انتشار بیماری‌ها در سطح گسترده در مقایسه با جفت‌گیری طبیعی شود.

از جمله بیماری‌هایی که طی تلقیح مصنوعی می‌تواند منتقل شود بیماری IBR است (۱). بیماری IBR یک بیماری مهم برای همه گاوداران محسوب می‌شود زیرا میزان بیماریزایی آن بالا است و می‌تواند یک مانع مهم برای تجارت بین‌المللی باشد. عامل بیماری تورم عفونی بینی و نای گاو، Bovine Herpes Virus-1، یک آلفا هرپس ویروس است. هرپس ویروس عامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی بوده لذا زمینه را برای ایجاد عفونت‌های ثانویه فراهم می‌کند و یکی از رایج‌ترین پاتوژن‌های موجود در مایع منی گاو است (۲). گاوهای نر نقش مهمی در انتشار فرم تناسلی دارند زیرا ویروس در هر دو فاز حاد و نهفته عفونت از منی دفع می‌شود. شناسایی علائم بیماری مهم است و ممکن است همیشه در هنگام شیوع BHV1 در گاوهای نر علائم عفونت مشاهده نشود (۳). در کشورهایی با تولید لبنیات بالا و شرکت‌های تولیدی گوشت، شیوع بیماری در سطح گله‌ها ۷۰ تا ۸۵ درصد به ثبت رسیده است. BHV1 یک عفونت اندمیک در گله محسوب می‌شود که وقوع آن غیر قابل پیش‌بینی است (۴). سقط‌جنین، ناباروری در گاو، کاهش تولید، مرگ ناشی از فرم تنفسی بیماری در تمام سنین، مرگ ناشی از فرم بسیار کشنده بیماری در گوساله‌های جوان، هزینه درمان به علت عفونت‌های ثانویه باکتریایی دستگاه تنفسی، عفونت پنهان در دام‌های مولد از اثرات زیان‌بار بیماری در دام‌های آلوده است که موجب بروز مشکلات و محدودیت در تجارت ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی دام و اسپرم و ورود دام مولد به مراکز تلقیح مصنوعی می‌شود؛ بنابراین هر برنامه سلامت گاو باید دارای یک استراتژی کنترل باشد (۵). آلودگی منی به ویروس یکی از راه‌های گسترش بیماری در بین گاوهای شیری است، ازاین‌رو در طی مطالعه حاضر سعی شده است تا حضور ویروس را در اسپرم‌های منجمد تولید داخل، مصرفی گاوداری‌های صنعتی مورد بررسی قرار داده شود.

مواد و روش کار

مشخصات توصیفی نمونه‌ها: در مطالعه حاضر تعداد نمونه مورد نیاز بر پایه confidence level ۹۵ درصد، دقت ۵ درصد، جمعیت ۲۵۰ رأس و شیوع ۵۰ درصد حدود ۱۴۰ نمونه محاسبه شد. نمونه‌ها از ۴ مرکز فروش اسپرم گاو در سطح شهرستان مشهد خریداری شد که از بین آن‌ها تعداد ۳ نمونه از نژاد جرزی، ۲ نمونه نژاد براون سوئیس، ۶ نمونه مون بیلیار و بقیه هولشتاین بود. نمونه‌ها پس از خریداری درون تانک ازت قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شد. پایت‌ها در آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد ذوب و به درون میکروتیوب تخلیه شدند. مطابق مطالب درج شده دفترچه راهنمای کیت (Exgene Genomic GeneAll.DNA Micro ساخت Germany)، از روش اتصال سیلیکا برای خالص‌سازی DNA استفاده شد. DNA استخراج شده از مایع منی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری وارد و در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نحوه ارزیابی مولکولی: برای ارزیابی کیفیت نمونه ۵۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده را درون کوت مخصوص دستگاه قرار داده و جذب نوری نمونه در دستگاه بایوفتومتر اپندورف در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ خوانده شد.

نمونه‌های DNA که نسبت A260 / A280 ۱/۷ تا ۲ و نسبت A260 / A230 بیشتر از ۱/۵ و مقدار A260 باید بین ۰/۱ تا ۱ بود به عنوان نمونه با کیفیت وارد روند PCR شد در غیر این صورت مراحل استخراج مجدد تکرار گردید.

برای اطمینان از درستی روند استخراج ابتدا آزمایش PCR با پرایمر PRM1 به‌عنوان House keeping gene انجام شد تا صحت استخراج DNA محرز شود. PRM1 ژنی است که در همه اسپرم‌ها وجود دارد. اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز باند مورد انتظار در جدول ۱ و برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر در جدول ۲ آورده شده است. جهت کنترل مثبت از نمونه‌های DNA استخراج شده از جنین‌های مثبت استفاده شد. در این نمونه همگی مواد و محلول‌های مورد استفاده درون لوله ریخته شد و فقط به‌جای DNA نمونه مورد بررسی، از یک نمونه مثبت استفاده شد. برای هر بار PCR علاوه بر نمونه کنترل مثبت نمونه کنترل منفی که فاقد DNA مورد آزمایش فوق بوده اما همگی شرایط آن با بقیه نمونه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکسان بود، قرار داده شد. اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز باند مورد انتظار PCR مربوط به IBR در جدول ۱ و برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر در جدول ۳ آورده شده است. بعد از انجام PCR، برای آشکارسازی و مشاهده محصول و نتیجه واکنش از روش الکتروفورز افقی استفاده شد.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرها.

نام پرایمر	طول باند	توالی	Acc. No. (Gene)
PRM1	۲۷۴	رفت (۵ به ۳) CGA AGA AGA TGT CGC AGA CG	NM_174156.2 Protamine 1 (PRM1)
		برگشت (۳ به ۵) TTC AAG ATG TGG CAA GAG GGT	
IBR	۲۰۲	رفت (۵ به ۳) GCG GGC CTG GTT GCG TAC TAC	D00438 (BoHV-1 *tk* gene)
		برگشت (۳ به ۵) AGC AGA TCT TCC GCG TTG ATC	

جدول ۲. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر ژن PRM1.

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۵	دناتوراسیون
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۵	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲	پیشروی
۱	۷ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی

آنالیز آماری: نمونه مثبت مورد آزمایش همراه نمونه‌ای که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد جهت تعیین توالی دوطرفه به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد. خوانش دوطرفه نمونه کنترل مثبت و نمونه تحت آزمایش هر یک به طور جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت توالی به دست آمده از هر دو نمونه توسط نرم‌افزار EMBOSS Needle-Alignment باهم دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزار nucleotide Blast با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شد.

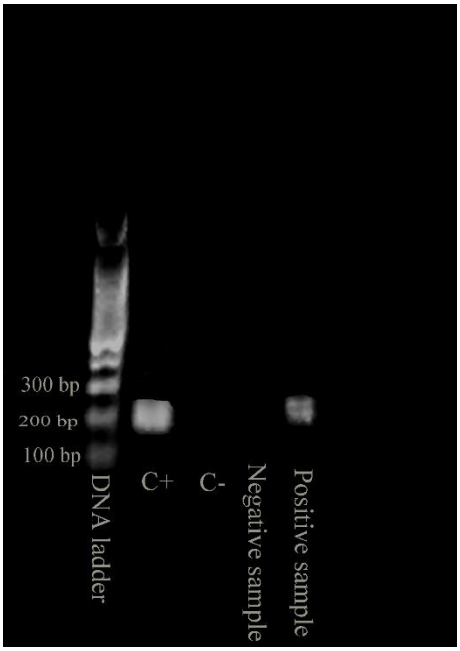
نتایج

در مطالعه حاضر ۱۴۰ نمونه پایت اسپرم منجمد در سطح شهرستان مشهد جمع‌آوری شد و اطلاعات مربوط به هر پایت و شماره آن‌ها ثبت شد. توزیع نژادی نمونه‌ها شامل ۳ نمونه از نژاد جرزی، ۲ نمونه نژاد براون سوئیس، ۶ نمونه مون بیلیار و بقیه هولشتاین بودند، پس از انجام تست کمیت و کیفیت DNA توسط بایوفوتومتر برای انجام PCR استفاده شد.

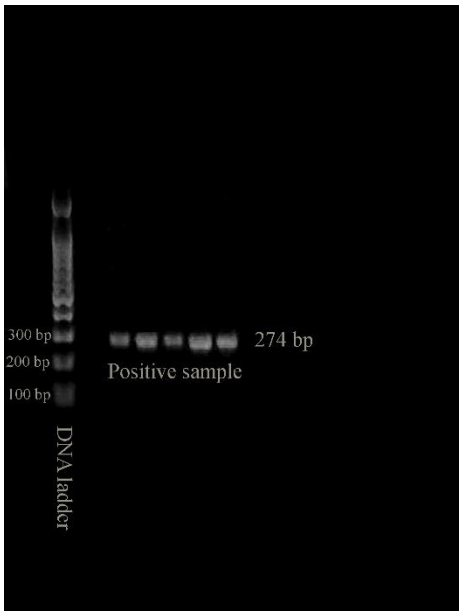
نتیجه آزمایش PCR با پرایمر PRM1 روی ژن Protamine 1 به‌عنوان house keeping gene برای هر کدام از نمونه‌ها انجام شد (تصویر ۱). برای نمونه‌هایی که فاقد باند بودند دو مرتبه از مقدار نمونه اولیه که باقی مانده بود، استخراج گذاشته شد و سپس مجدداً آزمایش PCR انجام شد. در PCR با پرایمر IBR روی ژن BoHV-1 *tk* *(thymidine kinase)* به‌عنوان نمونه کنترل مثبت از بافت کبد سقط‌جنینی که قبلاً IBR آن مثبت اعلام شده بود به همراه نمونه‌ها در شرایط یکسان DNA استخراج شد و PCR آن به همراه نمونه‌ها گذاشته شد. نمونه کنترل مثبت در محدوده ۲۰۲ bp باند ایجاد کرد. لدر مورد استفاده ۱۰۰ bp است. از بین ۱۴۰ نمونه یک نمونه از نژاد هولشتاین مطابق تصویر ۲ در محدوده ۲۰۲ bp باند داد و مثبت در نظر گرفته شد. روی DNA استخراج شده نمونه مثبت مجدد PCR صورت گرفت و همچنین استخراج مجدد از الباقی محتویات پایت انجام شد که در همگی موارد آلوده به ژنوم ویروس تشخیص داده شد. برای اطمینان بیشتر از پایت دوم همین اسپرم روند استخراج و PCR انجام شد که آن نمونه هم آلوده به ژنوم ویروس تشخیص داده شد. برای اطمینان از روند کار از ابتدا تعداد ۳ نمونه به شکل تکراری مورد ارزیابی قرار گرفتند که در همگی موارد نتایج یکسان بود. توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزار nucleotide Blast با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه مقایسه با بانک جهانی ژن شباهت ۱۰۰ درصد با میزان هم‌پوشانی ۱۰۰ درصد با جدایه‌های مختلف آلفا هرپس ویروس گاوی I بود. برخی از این جدایه‌ها شامل آلفا هرپس ویروس گاوی I جدایه لوس‌آنجلس (MF421714)، تگزاس (KM258882)، نیویورک (KM258880)، آمریکا (MG407775- MG407792)، هند (KY215944) است. همچنین با جدایه‌های استرالیا (KM258881) و چین (JN787955) دارای ۹۹ درصد شباهت هستند.

جدول ۳. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر جهت تشخیص IBR.

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی گراد)	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	دناتوراسیون اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۴	دناتوراسیون
۴۲	۳۰ ثانیه	۵۶	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲	پیشروی
۱	۷ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی



تصویر ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن PRM1.



تصویر ۲. نتایج الکتروفورز محصول PCR هرپس ویروس تیپ ۱.

بحث

تولیدمثل از فاکتورهای اصلی رونق اقتصادی صنعت گاوداری است. هر عاملی که به این فاکتور لطمه وارد نماید موجب اختلال در صنعت پرورش گاو شیری شده و به‌تبع آن به اقتصاد کشور صدمه وارد می‌آورد. سقط جنین در گاوهای شیری عموماً به از بین رفتن جنین در بین روزهای ۴۲ تا ۲۶۰ آبستنی اطلاق می‌شود. علاوه بر این، ناباروری ناشی از سقط و افزایش فاصله تا آبستنی بعدی از دیگر زیان‌هایی هستند که به گله‌های مبتلا به سقط وارد می‌آیند (۶). بر پایه گزارش‌های موجود میزان شیوع سقط در گله‌های گاو شیری کمتر از ۲/۹ درصد است که عامل بروز سقط تنها در ۴۵/۸ درصد این موارد، تشخیص داده شده است (۷). ۵۰ تا ۶۵ درصد سقط‌ها عامل باکتریایی، ۲۰ تا ۲۵ درصد عامل قارچی و ۱۵ تا ۲۵ درصد علت ویروسی دارند (۸).

ویروس عامل رینوتراکئیت عفونی گاو، آلفا هرپس ویروس گاوی تیپ I است که در سراسر جهان وجود داشته و باعث بیماری تنفسی حاد به همراه تورم ملتحمه چشم می‌شود، همچنین باعث بیماری در ارگان‌های تناسلی از جمله ناباروری و سقط در تلیسه‌ها و گاوها می‌شود (۶). نظرات متفاوتی درباره نقش ویروس IBR در ناباروری وجود دارد. در مطالعات اولیه Parsonson و Helling در سال ۱۹۶۵ اظهار داشتند که ویروس در ناباروری تأثیری ندارد. در حالی که Kendrick و Mcentee در سال ۱۹۶۷ دریافتند که اگر منی آلوده به ویروس برای تلقیح مصنوعی استفاده شود، میزان آبستنی کاهش می‌یابد. به طور تجربی وقتی منی آلوده به ویروس به داخل رحم تلقیح می‌شود، باعث نکروز شدید و اندومتریت می‌شود اما جراحات در محل سایت ویروس باقی می‌ماند و طی ۱ تا ۲ هفته از بین می‌رود (۹). Hens khars و همکاران در سال ۱۹۸۶ اظهار کردند که تلقیح ویروس IBR به داخل رحم باعث اندومتریت می‌شود و به احتمال زیاد باعث ناباروری نیز می‌شود بنابراین تلقیح مصنوعی با منی آلوده مسلماً با مرگ رویانی در ارتباط است. عفونت ویروسی می‌تواند باعث یک نکروز دوطرفه تخمدانی شود و به نظر می‌رسد جسم زرد به عفونت حساس‌تر است، به خصوص در چند روز اول پس از تخمک‌گذاری این حساسیت بیشتر می‌شود، این آسیب ممکن است به طور مستقیم روی عملکرد جسم زرد تأثیر بگذارد و باعث کاهش تولید پروژسترن شود و در نتیجه بقای

جنین به خطر افتد. ویروس همچنین می‌تواند به وسیله تهاجم مستقیم به سلول‌ها باعث مرگ رویان شود (۵). Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی مطالعه خود ژنوم BHV-1 و BHV-5 را از نمونه‌های منی گاو به‌وسیله تکنیک species-specific nested polymerase chain reactions (nPCRs) شناسایی کردند. در آن مطالعه از ۵۳ نمونه منی تازه و ۲۳ نمونه منی منجمد گاوهای پرواری استفاده شد که در همه ۷۶ نمونه مایع منی DNA ویروس شناسایی شد. همه نمونه‌ها از نظر BHV-5 و ۳۴ مورد از نظر BHV-1 مثبت بودند (۱). Deka و همکاران در سال ۲۰۰۵، در ۲۴ نمونه منی ۱۲ گاو سرم منفی و ۱۲ گاو سرم مثبت حضور ویروس BHV1 مورد مطالعه قرار دادند. برای شناسایی DNA ویروس BHV1 از روش PCR و پرایمر ژن gI استفاده کردند. در گاوهای سرم مثبت ۵۰ درصد و در گاوهای سرم منفی ۶۶/۶۷ درصد نمونه‌ها مثبت شدند (۱۱).

Nandi و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۰۳۸ نمونه منی گاو را از مزارع مختلف هند جمع‌آوری کردند و با استفاده از PCR و پرایمر اختصاصی ژن gI ویروس BHV1 را مورد مطالعه قرار دادند؛ که از این تعداد تنها ۳۰ نمونه برای ژنوم BHV1 مثبت شد. در این مطالعه مشخص شد که تکنیک PCR برخلاف روش جداسازی که حساسیت کمتر و زمان بیشتری نیاز دارد، بسیار حساس و سریع عمل می‌کند (۱۲).

در مطالعه Masri و همکاران در سال۱۹۹۶ تست PCR برای شناسایی ژنوم BHV-1 در مایع منی گاو با ایزولاسیون ویروس مقایسه شد. این روش‌ها برای شناسایی BHV1 در مایع منی ۴ گاوی که به‌صورت تجربی با ویروس آلوده شده بودند، به‌کاربرده شد. در همه گاوهای آلوده، التهاب سر قضیب در روز سوم و balanoposthitis شدید در روز چهارم پس از آلودگی مشاهده شد. ویروس در منی تازه با روش PCR و جداسازی ویروس در دومین روز از آلودگی قبل از رخداد بالینی، شناسایی شد. در روش جداسازی، تا روز ۷ پس از آلودگی در دو گاو و روز ۹ و ۱۱ در دو گاو دیگر، ویروس قابل شناسایی بود. در مقابل روش PCR توانست تا روز ۱۸-۱۴ پس از تلقیح آلودگی ژنوم ویروس را شناسایی کند. برای تشخیص انفرادی PCR، ویروس را حداقل ۱۰-۱ روز دیرتر از روش جداسازی، شناسایی می‌کند (۱).

با توجه به نتایج این مطالعات حضور ویروس و متعاقب آن شناسایی ژنوم آن توسط PCR به صورت مستمر نیست و به شکل متناوب اتفاق می‌افتد، پس امکان آلودگی ۱۳۹ نمونه دیگر در مطالعه حاضر منتفی نمی‌شود و با عنایت به مشاهده یک نمونه مثبت نیاز به بررسی‌های بیشتر روی خود گاوهای نر است.

در مطالعه انجام شده توسط Morán1 و همکاران در سال ۲۰۱۳ حضور ژنوم ویروس BHV-4, BHV-5, BHV-1 در مایع منی گاوها از مبدأ آرژانتین و مراکز بین‌المللی توسط تست PCR بررسی شد. مهم‌ترین یافته این مطالعه شناسایی ژنوم BHV-1 در مایع منی ۶ گاو از ۷۰ گاو (۸/۶ درصد) نگهداری شده در مراکز تلقیح مصنوعی بود (۲). نتایج این مطالعه نسبت به مطالعه حاضر آلودگی بیشتری را شناسایی نموده که علت آن می‌تواند بررسی بر روی انزال تازه گاوها باشد.

Isakov و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۴۵۰ نمونه اسپرم منجمد را در مناطق مختلف اوکراین برای یک دوره بین سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۶ از نظر حضور گونه‌های پاتوژن کلامیدیا، مایکوپلاسما و BHV1 مورد مطالعه قرار دادند. نمونه‌ها از ۱۰ مزرعه در سراسر اوکراین جمع‌آوری شده و توسط تست PCR تشخیصی با پروتکل استاندارد NSC (national scientific center) مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به آنالیز محصولات حاصل از PCR ۲ مورد از بین ۵۸ نمونه (۳/۵ درصد) از منطقه Poltava از نظر BHV1 مثبت شدند و با توجه به نتایج به دست آمده، تست PCR دائم و منظم روی اسپرم گاوهای نر را ضروری دانستند (۱۵). در مطالعه حاضر نیز میزان آلودگی ۰/۷۱ درصد بود که بسیار پایین‌تر از نتایج مطالعه فوق است. Vanessa Lopes و همکاران در سال ۲۰۲۰، به منظور ردیابی BHV1، ۶۰ نمونه خون و ارگان‌های تناسلی از ۶۰ گاو نر که واکسینه نشده بودند را مورد ارزیابی قرار دادند. قطعاتی از بیضه و اپی دیدیم به روش nested PCR و ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. BHV1 در روش ایمونوفلورسانس در ۹۵/۹ درصد بافت بیضه و ۱۰۰ درصد بافت اپی دیدیم مشاهده شد. در روش nested PCR، نوکلییک اسید ویروس در ۵۹/۲ درصد بافت بیضه و ۷۵/۵ در اپی دیدیم شناسایی شد. بر اساس این تشخیص BHV1 در بیضه‌ها و اپی دیدم گاوهای نر آلوده نشان دهنده منابع عفونت ویروسی برای مایع منی می‌باشند (۱۶).

Henzel و همکاران در سال ۲۰۱۹ با هدف مطالعه و بررسی آنتی بادی‌های خنثی کننده BHV1-5 در نمونه‌های سرم و شناسایی DNA ویروس در مایع منی گاوهای نر در مزارع، ۳۷۲ نمونه سرم و منی را از ۱۸ مزرعه جمع آوری کردند. نمونه‌های سرم به روش VN (virus neutralization) و نمونه‌های منی با روش PCR بررسی شدند. در روش VN آنتی بادی BHV1-5 در ۶۶/۷ درصد گاوهای نر شناسایی شد. ۲۷۸ گاو برای BHV1 و ۲۳۴ گاو برای BHV5 مثبت شدند. ۴۳ گاو نر واکسینه شده ۷۲/۱ درصد از نظر سرولوژی منفی

بودند. BHV1 DNA در منی ۳ گاو نر تشخیص داده شد. تمام موارد مثبت حیواناتی بودند که هنگام نمونه‌گیری التهاب بیضه و سایر ضایعات تناسلی را نشان دادند. در حضور ضایعات بالینی مشهود در دستگاه تناسلی هر دو ویروس ممکن است در مایعات منی یافت شود. بر اساس نتایج شیوع بالای آنتی بادی‌های ویروس در گاو نر در مزارع در حال گردش می‌باشد (۱۷).

Rania و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای بررسی تأثیر عفونت ویروسی بر کیفیت مایع منی در گاوهای نر آلوده، مایع منی ۴۰ گاو نر را به منظور جداسازی BHV1 و BVDV جمع آوری و با روش فلورسنت آنتی بادی و real time PCR مورد ارزیابی قرار دادند و ۸ نمونه مثبت برای BHV1 ثبت شد. تحلیل آماری پارامترهای ارزیابی منی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه آلوده به ویروس و گروه شاهد وجود دارد که نشان دهنده افزایش ناهنجاری‌های اسپرم و کاهش تحرک و قابلیت زنده‌مانی و غلظت اسپرم است. با توجه به این مطالعه گاوهای نر آلوده کیفیت مایع منی بسیار پایینی دارند و روش PCR یک روش آزمایشگاهی ایده‌ال برای تشخیص هر دو ویروس در مایع منی است (۱۸).

Hammad Rehman و همکاران در سال ۲۰۲۰ نمونه‌های خون گاوهای نر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف لاهور در پاکستان را مورد ارزیابی قرار دادند. از بین ۱۰۰ نمونه خون، در ۶۹ نمونه با استفاده از روش الایزا مثبت تشخیص داده شد. همچنین ژن گلیکو پروتئین g B با استفاده از روش PCR شناسایی شد. بر این اساس می‌توان گفت که BHV1 در پاکستان به شکل فعال وجود دارد (۱۹).

نتیجه گیری نهایی: با توجه به نتایج مطالعه حاضر وجود یک نمونه مثبت در بین ۱۴۰ مورد زنگ خطری برای گسترش بیماری از این طریق است و در بین ۱۳۹ نمونه دیگر نیز با توجه به ورود دوره‌ای ویروس به منی باید بررسی‌های دقیق‌تری انجام شود. بهتر است از گاوهای سرم منفی در مراکز تلقیح مصنوعی استفاده شود و به منظور تست‌های سرولوژیکی بیشتر از گاوها خون گرفته شود و به توصیه OIE ۲۱ روز بعد مایع منی جمع‌آوری شود. مطالعه حاضر نشان داد وجود یک آزمایشگاه مرجع برای کنترل و پایش مداوم اسپرم‌های منجمد تولید داخل و وارداتی و بررسی گاوهای تولید کننده اسپرم در ایران بسیار حائز اهمیت می‌باشد تا از گسترش بیماری‌ها به این طریق جلوگیری شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تأمین بودجه انجام این طرح با کد ۳/۴۳۱۸۷ قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Tri Untari YPK, Asmarani K. Detection of bovine herpesvirus 1 from semen by real-time pcr to prevent the spread of infectious bovine rhinotracheitis infection. World Vet J. 2021; 4: 709-12. doi: 10.54203/scil.2021.wvj89
2. Yu Z, Zhao Z, Chen L, Yan H, Cui Q, Ju X, et al. Development of a droplet digital PCR assay to detect bovine alphaherpesvirus 1 in bovine semen. BMC Vet Res. 2022; 18: 1-10. doi: 10.1186/s12917-022-03235-2
3. Waldeck HF, van Duijn L, Mars MH, Santman-Berends IM, Biesheuvel MM, van Schaik G. Risk factors for introduction of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) into cattle herds: A systematic european literature review. Front Vet Sci. 2021; 8: 1-10. doi: 10.3389/fvets.2021.688935 PMID: 34778424
4. Graham DA. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle–a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. Ir Vet J. 2013; 66(1): 1-12. doi: 10.1186%2F2046-0481-66-15 PMID: 23916092
5. Nettleton P, Russell G. Update on infectious bovine rhinotracheitis. In Practice. 2017; 39(6): 255-72. doi: 10.1136/inp.j2226
6. Nadri S, Zamani P, Sadeghi-Sefidmazgi A, Abdoli R, Ghazi Khani Shad A. Genetic predisposition to abortions is increasing in Iranian holstein cows. Iran J Appl Anim Sci. 2021; 11(1): 79-85. doi: 20.1001.1.2251628.2021.11.1.9.1
7. Yaeger Mj, Holler Ld. Bacterial causes of bovine infertility and abortion. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2nd ed. Elsevier Colombia, USA; 2007; p. 389-399.
8. Escamilla HP, Martínez MJJ, Medina CM, Morales SE. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. Can J Vet Res. 2007; 71(4): 314-317. PMID: 17955907
9. Noakes D, Parkinson T, England G. Veterinary Reproduction and Obstetrics. 10th ed. Saunders Ltd. Philadelphia, USA; 2018; p. 457-460.
10. Oliveira M, Campos F, Dias M, Velho F, Freneau G, Brito W, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. Theriogenology. 2011; 75(6): 1139-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.025 PMID: 21247624
11. Deka D, Maiti N, Oberoi M. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. Rev Sci Tech. 2005; 24: 1085-94. 10.20506/RST.24.3.1637 PMID: 16642777
12. Nandi S, Manohar M, Pandey A, Chauhan R. Sensitive detection of genomic DNA of BHV-1 in semen samples of

bulls by polymerase chain reaction. J Immunol Immunopathol. 2008; 10(2): 132-6.
13. Masri S, Olson W, Nguyen P, Prins S, Deregt D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. Can J Vet Res. 1996; 60(2): 100. PMID: 8785714
14. Morán P, Favier P, Lomónaco M, Catena M, Chiapparrone ML, Odeon AC, et al. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. Open Vet J. 2013; 3(2): 126-30. PMID: 26623325
15. Isakov MM, Solodiankin OS, Bolotin VI, Gerilovych AP, Potkonjak A. PCR detection of genital infections in bull semen from different regions of ukraine, 2013-2016. Arch Vet Sci. 2016; 9(2): 63-70. doi: 10.46784/e-avm.v9i2.90
16. Queiroz-Castro VLD, Santos MR, de Azevedo-Júnior MA, da Costa EP, Alves SVP, Silva LMN, et al. Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) infection in testes and epididymis from bulls from a slaughterhouse. Theriogenology. 2021; 159: 1-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.001
17. Henzel A, Salla P, Mascitti A, Demoliner M, Solyman M, Lunge V, et al. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2019; 71: 197-203. doi: 10.1590/1678-4162-10310
18. El-Mohamady RS, Behour TS, Rawash Z. Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. Int J Vet Sci Med. 2020; 8(1): 106-14. doi: 10.1080/23144599.2020.1850197 PMID: 33426047
19. Rehman HU, Rabbani M, Ghafoor A, Riaz A, Awan FN, Raza S. First isolation and genetic characterization of bovine herpesvirus 1 from cattle in Pakistan. Pak Vet J. 2021; 41: 163-5. doi: 10.29261/pakvetj/2020.092

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
University of Tehran Press
Original Article

Search for Bovine Herpes Virus I in Iranian Frozen Semen

Fateme Arabkhaleghi[1]✉, Pezhman Mirshokraei[2,3]✉, Hesamoddin Seifi[2,3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[2] *Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[3] *Center of Excellence in Ruminant Abortion and Neonatal Mortality, Mashhad, Iran*

10.22059/jvr.2022.345709.3284
Received: *17 October 2022,* ***Accepted:*** *19 December 2022*

Abstract

BACKGROUND: *Bovine Herpes Virus*-1 (BHV-1) belongs to the Alpha herpesviral family. The virus is the cause of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Bovine Abortion. In the initial infection, the virus proliferates excessively. Moreover, shedding the virus leads to conditions in the latent phase of the disease. Infectious Bovine Vulvovaginit (IPV) is the genital form of the disease that represents a genital infection and transmits via pustules and mucopurulent secretions. Exposure to the virus in genital mucosa leads to IPV infection through mating or artificial insemination and the diseases that can be transmitted to healthy livestock by frozen sperm during artificial insemination.

OBJECTIVES: Viral contamination of the semen is one of the routes to spread the disease among dairy cattle. Therefore, we investigated the presence of the virus in domestic and frozen imported semen consumed in industrial dairy cattle farms.

METHODS: In the present study, 140 frozen straws were collected. After melting each straw, 200 µl of obtained semen was used for DNA extraction, which was done directly on the semen samples and via a Genome Extraction Kit. Subsequently, to ensure the accuracy of the extraction, the PCR technique was done using PRM-1 gene primer. Tracking the viral genome was done using the PCR technique and known primers.

RESULTS: In total, one out of 140 samples was found to be virally contaminated, and IBR contamination was confirmed by repeating all the steps and determining the gene sequence.

CONCLUSIONS: It is necessary to further investigate the possibility that contamination can be transmitted via frozen semen, given that even one out of 140 samples is contaminated, and the importance of the disease.

Keywords: Bovine, Herpes 1, PCR, Sperm, Virus

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Pezhman Mirshokraei, Tel/Fax: 051-38803777

How to cite this article:

Arabkhalegh F, Mirshokraei P, Seifi H. Search for Bovine Herpes Virus I in Iranian Frozen Semen. J Vet Res, 2023; 77(4): 247-254. doi: 10.22059/jvr.2022.345709.3284

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Information about primers.
Figure 1. Electrophoresis of PRM1 gene PCR product.
Figure 2. Electrophoresis of the PCR product of herpes virus type 1.

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۵۹-۲۵۵
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی کوتاه

شیوع عارضه مادرزادی تنگی بینی و مل‌اکلوژن و همبستگی بین دو عارضه در نژادهای براکیوسفال گربه‌های ارجاعی به چند کلینیک خصوصی دامپزشکی شهر تهران

سینا صبور رازلیقی[۱]، سینا جهان[۲]، شهرام جمشیدی[۳]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد گرمسار، سمنان، ایران
[۲] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶ مهر ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۱ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.336053.3219 20.1001.1.20082525.1401.77.4.7.8

چکیده

زمینهٔ مطالعه: تنگی بینی و مل‌اکلوژن دو عارضه شایع مادرزادی در گربه‌های نژاد خالص براکیوسفال می‌باشند که به ترتیب سبب مشکلات تنفسی و دهانی در این نژادها می‌شوند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع عارضه مادرزادی تنگی بینی و مل‌اکلوژن و همبستگی بین دو عارضه در گربه‌های نژاد خالص براکیوسفال ارجاعی به چند کلینیک خصوصی دامپزشکی شهر تهران انجام شد.

روش‌کار: ۹۰ گربه نژاد خالص براکیوسفال از نظر مل‌اکلوژن و تنگی بینی مورد ارزیابی قرار گرفتند و با کمک داده‌های آماری درصد شیوع و ارتباط بین مل‌اکلوژن و تنگی بینی در گربه‌های براکیوسفال ارجاعی به چند کلینیک و بیمارستان شهر تهران مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: در ۹۰ قلاده گربه براکیوسفال، فراوانی اختلال عدم همترازی فک و دندان و تنگی بینی به ترتیب در ۳۵ گربه (۳۸/۹ درصد) فقط مل‌اکلوژن، ۳۱ گربه (۳۴/۴ درصد) فقط تنگی بینی و ۱۷ گربه (۱۸/۹ درصد) هر دو عارضه با هم مشاهده شد و همچنین بخت و رخداد یکی از این دو عارضه در صورت وجود عارضه دیگر ۲/۷۶ برابر تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: شیوع تنگی بینی و مل‌اکلوژن در گربه‌های براکیوسفال بالا می‌باشد و ارتباط معنی‌داری بین این دو عارضه وجود دارد، از این جهت کلینیسن‌ها در معاینه بالینی این نژادها باید دقت کافی به این دو عارضه داشته باشند.

کلمات کلیدی: براکیوسفال، تنگی بینی، گربه، مادرزادی، مل‌اکلوژن

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: شهرام جمشیدی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

سندروم براکیوسفال (Brachycephalic Airway Syndrome) درگربه‌های پوزه کوتاه یک عارضه مادرزادی است که شامل مواردی نظیر تنگی سوراخ‌های بینی، بلند بودن کام نرم و نای هایپوپلاستیک می‌شود. همچنین می‌تواند بر روی زبان، چشم‌ها و دندان‌ها نیز تأثیر بگذارد (۱،۲). نژادهای پوزه کوتاه مانند پرشین و هیمالین از نژادهای مستعد به این عارضه هستند (۳،۴). تنگی سوراخ‌های بینی یکی از شایع‌ترین اختلالات در سندروم براکیوسفال گربه‌ها می‌باشد. در این اختلال منخرین گربه در زمان بازدم حداقل فضا را برای خروج هوا دارد و در زمان دم منخرین تقریباً بسته می‌شود. بسته به شدت ناهنجاری، علائمی مانند تنفس با دهان باز، ریزش اشک (Epiphora)، عدم تحمل ورزش و سختی در تنفس مشاهده می‌شود (۵-۲). به عدم همترازی فک‌ها و دندان‌ها مل‌اکلوژن گفته

می‌شود که به دو نوع مل‌اکلوژن‌های اسلکتی و دندانی تقسیم می‌شود. مل‌اکلوژن‌های اسکلتی به علت اختلاف طول فک بالا و پایین و مل‌اکلوژن‌های دندانی به علت وضعیت بد قرارگیری دندان‌ها رخ می‌دهد. این اختلال در گربه‌ها می‌تواند سبب تروما، بی‌اشتهایی ناشی از درد و بیماری‌های پریودنتال شود. ژنتیک، تغذیه نادرست، تروما، کاهش رشد استخوان فک به علت عفونت از عوامل اصلی ایجاد مل‌اکلوژن می‌باشند (۳،۶).

تنگی بینی و مل‌اکلوژن در گربه‌های براکیوسفال از موارد شایع در کلینیک‌ها و بیمارستان‌های شهر تهران می‌باشند که مهم‌ترین عامل ایجاد آن علل ژنتیکی می‌باشد (۶،۷). در ایران علاوه بر مسائل ژنتیکی، به علت پرورش غیر اصولی گربه‌های نژاد خالص این عارضه‌ها بیشتر به چشم می‌خورند. این‌گونه به نظر می‌رسد که این دو عارضه به خصوص در نژادهای براکیوسفال می‌تواند به صورت همزمان مشاهده شود. در مطالعه حاضر میزان شیوع تنگی بینی و مل‌اکلوژن و همبستگی آن‌ها در گربه‌های نژاد خالص براکیوسفال ارزیابی می‌شود تا با توصیه به انجام اصلاحات جراحی در سنین پایین از پیشرفت و رنج کشیدن گربه‌های مبتلا جلوگیری شود.

مواد و روش کار

۹۰ قلاده گربه نژاد خالص براکیوسفال در یک بازه زمانی ۶ ماه مورد مطالعه قرار گرفتند. تمام گربه‌های براکیوسفال ارجایی به کلینیک‌ها و بیمارستان‌های خصوصی دامپزشکی شهر تهران مورد معاینه بالینی قرار گرفتند و طبق شاخص‌های مد نظر و پرسشنامه‌ای که از قبل تهیه شده بود، اطلاعات مورد نظر و تاریخچه آن‌ها ثبت شد. نژادهای براکیوسفال اسکاتیش فولد، بریتیش مو بلند، بریتیش مو کوتاه، هیمالین و پرشین که به این دو عارضه مستعد هستند، مد نظر مطالعه حاضر می‌باشند. سپس بر اساس طبقه‌بندی که از مطالعه Schlueter و همکاران در سال ۲۰۰۹ استخراج شده بود نوع درجه براکیوسفالی گربه ارجاعی در پرسشنامه یاداشت شد (۲). در ادامه طبق طبقه‌بندی کتاب Bellows در سال ۲۰۰۴ تمام گربه‌ها از نظر اکلوژن معاینه شدند (تصویر ۱) (۶). سپس منخرین گربه‌ها از نظر تنگ بودن یا نبودن به صورت صفر و یک مورد بررسی قرار گرفتند که این تنگی می‌تواند یک طرفه یا دو طرفه باشد (تصویر ۲). ارزیابی تنگی بینی بر طبق اثر بخار تنفسی بر روی لام میکروسکوپی انجام شد همچنین در صورت مثبت بودن تنگی بینی علائم بالینی که می‌تواند در پی تنگی بینی ایجاد شود یاداشت شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات و ثبت در فرم پرسشنامه، اطلاعات و داده‌های آماری در نرم افزار اکسل طبقه‌بندی شد و آنالیز داده‌ها با نرم افزار SSPS_Ver24 مورد ارزیابی قرار گرفت و مقادیر کمتر از $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز و ارتباط سنجی بین دو صفت در یک جمعیت و به‌دست آوردن بخت تنگی بینی و مل‌اکلوژن از آزمون مربع کای استفاده شد.

نتایج

از مجموع ۹۰ گربه نژاد خالص براکیوسفال (۵۷ گربه پرشین،۲۰ گربه اسکاتیش فولد،۶ گربه هیمالین،۴ گربه بریتیش مو بلند و ۳ گربه بریتیش مو کوتاه)، ۳۱ گربه (۳۴/۴ درصد) مبتلا به تنگی بینی بودند که ۱۱ مورد آن به شکل یک طرفه ارزیابی شدند. همچنین در ۳۵ گربه (۳۸/۹ درصد) مل‌اکلوژن تشخیص داده شد که به تفکیک در ۱۵ گربه مل‌اکلوژن کلاس ۱، در ۴ گربه مل‌اکلوژن کلاس ۲ و در ۱۳ گربه مل‌اکلوژن کلاس ۳ گزارش شد. در نهایت ۱۷ گربه (۱۸/۹ درصد) همزمان به هر دو بیماری تنگی بینی و مل‌اکلوژن مبتلا بودند. بر اساس آنالیزها، میزان بخت به‌دست آمده از آزمون مربع کای دو بیماری ۲/۷ برابر می‌باشد.

تصویر ۱. انحراف نیش فک بالا در یک قلاده گربه پرشین.

تصویر ۲. گربه بریتیش مو کوتاه با تنگی بینی شدید در یک قلاده از گربه‌های مورد بررسی.

بحث

تنگی بینی از علائم شایع سندرم براکیوسفال مجاری هوایی می‌باشد که در سگ‌ها و گربه‌های براکیوسفال بروز می‌کند که گاهی با بیماری مل‌اکلوژن همراه می‌شود. تنگی بینی می‌تواند عوارض تنفسی مانند دیس پنه و تنفس با دهان باز در حیوان ایجاد کند که با انجام اصلاحات جراحی و برداشتن قسمتی از بافت منخرین می‌توان تا حدود زیادی علائم مربوط به آن را کم کرد (۵). در سگ‌ها مطالعات زیادی در خصوص سندروم براکیوسفالی انجام شده است (۸) همچنین در سطح جهانی از نظر میزان فراوانی تنگی بینی در گربه‌های براکیوسفال طبق مطالعه Henderson و همکاران در سال ۲۰۰۳ از ۴ گربه پرشین مورد مطالعه تنها ۲ گربه مبتلا به تنگی بینی بودند (۵). ولی در داخل ایران اطلاعات دقیقی مبنی بر شیوع میزان تنگی بینی و مل‌اکلوژن در نژادهای براکیوسفال گربه تا این لحظه وجود ندارد. در مطالعه حاضر ۳۱ گربه مبتلا به تنگی بینی بودند که نشان می‌دهد این عارضه در گربه‌های براکیوسفال نسبت به گربه‌های مزوسفال بیشتر می‌باشد. همچنین یک طرفه یا دو طرفه بودن آن در شدت علائم نقش مهمی دارد (۴). در مطالعه حاضر، ۱۱ گربه مبتلا به تنگی بینی یک طرفه و ۲۰ گربه مبتلا به تنگی بینی دو طرفه بودند. با توجه به مطالعه حاضر نژاد پرشین با ۲۳ مورد، مستعدترین نژاد مبتلا به تنگی بینی می‌باشد. همچنین این عارضه در ماده‌ها به مقدار کمی بیشتر از نرها دیده شد و در نهایت با افزایش درجه براکیوسفالی احتمال وجود تنگی بینی به مقدار کمی افزایش یافت. مل‌اکلوژن می‌تواند سبب بی‌اشتهایی ناشی درد، تروما در لب و دندان و بیماری‌های پریودنتال شود (۹،۱۰). جهت رفع موارد شدید مل‌اکلوژن می‌توان از اقدامات ارتودنسی استفاده نمود. در این روش ابتدا با استفاده از مقید سازی شیمیایی حیوان را بیهوش و سپس به وسیله خمیرهای مخصوص دندانپزشکی از دندان‌ها غالب گیری می‌شود. در نهایت یک مدل از دندان‌ها به‌دست می‌آید که با توجه به مدل و زوایه‌های دندانی، رهیافت مناسب مشخص می‌شود (۶). از نظر میزان فراوانی مل‌اکلوژن در سطح جهانی در مطالعه‌ای که Mestrinho و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، از ۵۰ گربه مورد مطالعه (۴۲ قلاده گربه پرشین و ۸ قلاده گربه اگزوتیک)، در ۷۲ درصد از آن‌ها وجود مل‌اکلوژن تأیید شد (۸). در مطالعه حاضر ۳۵ گربه مبتلا به مل‌اکلوژن بودند. در موارد خفیف مل‌اکلوژن، اختلال زیادی در دهان ایجاد نمی‌شود ولی روند ایجاد بیماری‌های پریودنتال را سرعت می‌بخشد که می‌تواند باعث از دست دادن دندان‌ها و مشکلات سیستمیک شود (۹). در موارد شدید مل‌اکلوژن بی‌اشتهایی، درد و خونریزی دهان در گربه‌ها دیده می‌شود (۱۰). با توجه به این مطالعه این‌گونه به نظر می‌رسد که نژاد پرشین با ۲۹ مورد، مستعدترین نژاد در ابتلا به مل‌اکلوژن باشد.

تا این لحظه در مطالعات جهانی در زمینه همبستگی عارضه مادرزادی تنگی‌بینی و مل‌اکلوژن مطالعه‌ای انجام نشده است. در مطالعه حاضر ۱۷ گربه (۱۸/۹ درصد) به هر دو بیماری تنگی بینی و مل‌اکلوژن مبتلا بودند که نژاد پرشین با ۱۵ مورد، مستعدترین نژاد در تظاهر هر دو بیماری به صورت همزمان بود. بخت به‌دست آمده از آزمون مربع کای این دو بیماری ۲/۷ برابر محاسبه شد. یعنی احتمال (بخت) وجود مل‌اکلوژن در گربه‌های براکیوسفالی که مبتلا به تنگی بینی هستند ۲/۷ برابر گربه‌های براکیوسفالی است که به تنگی بینی مبتلا نیستند و برعکس. این نشانه ارتباط معنی‌دار بین این دو عارضه می‌باشد.

نتیجه گیری نهایی: به دامپزشک‌ها توصیه می‌شود در معاینه بالینی این نژادها به این دو بیماری دقت کافی داشته باشند. با انجام اصلاحات جراحی و ارتودنسی در سنین پایین می‌توان کیفیت زندگی گربه مبتلا را بالا برد (۹) تا از عواقب احتمالی این دو بیماری در آینده جلوگیری شود. همچنین به پرورش دهندگان گربه توصیه می‌شود گربه‌های مبتلا به درجات شدید این دو بیماری را از چرخه تولید مثلی خود خارج کنند.

سپاسگزاری

با تشکر از حمایت‌های کلینیک دامپزشکی سیاره حیوانات و کلینیک دامپزشکی پناه.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Farnworth MJ, Chen R, Packer RMA, Caney SMA, Gunn-Moore DA. Flat Feline Faces: Is Brachycephaly Associated with Respiratory Abnormalities in the Domestic Cat (Felis catus)?. PLoS One. 2016; 11(8): e0161777. doi: 10.1371/journal.pone.0161777 PMID: 27574987
2. Schlueter C, Budras KD, Ludewing E, Mayrhofer E, Koenig HE, Walter A, Oechtering GU. Brachycephalic feline noses: CT and anatomical study of the relationship between head conformation and the nasolacrimal drainage system. J Feline Med Surg. 2009; 11(11): 891-900. doi: 10.1016/j.jfms.2009.09.010 PMID: 19857852
3. Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 8th ed. Elsevier Saunders. Missouri, USA; 2017. p. 1070-1077.
4. Nelson RS, Couto CG. Small Animal Internal Medicine. 6th ed. Elsevier Saunders. Missouri, USA; 2020. p. 279-280.
5. Henderson SM, Bradley K, Day MJ, Tasker S, Caney SMA, Moore AH, Gruffydd-Jones TJ. Investigation of nasal disease in the cat--a retrospective study of 77 cases. J Feline Med Surg. 2004; 6(4): 245-57. doi: 10.1016/j.jfms.2003.08.005 PMID: 15265480
6. Bellows J. Small Animal Dental Equipment, Materials and Techniques. 1st ed. Blackwell. Oxford, UK; 2004. p. 264-268.
7. Milella L. (2015). Occlusion And Malocclusion In The Cat: what's normal, what's not and when's the best time to intervene?. J Feline Med Surg. 2015; 17(1): 5-20. doi: 10.1177/1098612x14560095 PMID: 25527490
8. Mestrinho LA, Louro JM, Gordo IS, Niza MMRE, Requicha JF, Force JG, Gawor JP. Oral and dental anomalies in purebred, brachycephalic Persian and Exotic cats. J Am Vet Med Assoc. 2018; 253(1): 66-72. doi: 10.2460/javma.253.1.66 PMID: 29911947
9. Emily P. Feline Malocclusion. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1992; 22(6): 1453-60. doi: 10.1016/s0195-5616(92)50137-1 PMID: 1455582
10. Lothamer CW, Soukup JW. Treatment of Bignathic Malocclusions With Multistage Active Force Orthodontic Movements in a Cat. J Vet Dent. 2016; 33(1): 7-17. doi: 10.1177/0898756416639192 PMID: 27487651

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Short Original Article

Prevalence of Congenital Disorders, Stenotic Nares and Malocclusion and the Correlation Between Two Disorders in Brachycephalic Breeds of Cats Referred to Several Private Veterinary Clinics in Tehran

Sina Sabour Razlighi[1]✉, Sina Jahan[2]✉, Shahram Jamshidi[3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Azad University of Garmsar, Semnan, Iran*
[2] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2022.336053.3219

Received: *8 October 2022,* ***Accepted:*** *12 December 2022*

Abstract

BACKGROUND: Stenotic nares and malocclusion are common congenital disorders in the brachycephalic breeds of cats which cause respiratory and oral problems in these breeds, respectively.

OBJECTIVES: In this study, the prevalence of two congenital disorders, stenotic nares, and malocclusion, the correlation among them in brachycephalic breeds of cats referred to several private veterinary clinics in Tehran were evaluated.

METHODS: 90 brachycephalic cats were evaluated for stenotic nares, and malocclusion and indices was checked, then determined the prevalence percentage and correlation with the statistical data between stenotic nares and malocclusion in brachycephalic breeds of cats were referred to several private veterinary clinics in Tehran.

RESULTS: Malocclusion was diagnosed in 35 cats (38.9 %), stenotic nares were detected in 31 cats (34.4 %), and two diseases were diagnosed in 17 cats (18.9 %) concurrently in 90 brachycephalic cats. According to a statistical test, the probabilities of identifying the second disease are 2.7 times higher if one of the two disorders is identified.

CONCLUSIONS: The prevalence of stenotic nares and malocclusion in brachycephalic cats is very high and there is a significant correlation between two disorders so clinicians should have great attention in their clinical examination of these two disorders in these breeds.

Keywords: Brachycephalic, Cat, Congenital, Malocclusion, Stenotic nares

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Shahram Jamshidi, Tel/Fax: 021-61117122 / 021-66933222

How to cite this article:

Sabour Razlighi S, Jahan S, Jamshidi S. Prevalence of Congenital Disorders, Stenotic Nares and Malocclusion and the Correlation Between Two Disorders in Brachycephalic Breeds of Cats Referred to Several Private Veterinary Clinics in Tehran. J Vet Res, 2023; 77(4): 255-259. doi: 10.22059/jvr.2022.336053.3219

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Mesioverted maxillary canine in Persian cat.
Figure 2. British shorthair cat with severely stenotic nares in one of the studied cats.