بررسی اثر باکتری کشی سرم گاو میش

سعید هاشمی[1*] ، مسعود قربانپور نجف آبادی[2]

(تاریخ دریافت: 91/2/8؛ تاریخ پذیرش: 91/4/10)

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری کشی سرم فعال گاومیش بر روی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در فاصله زمانی آبان ماه 1380 تا اردیبهشت 1381، تعداد78 نمونه خون گاومیش تحت کشتار از کشتارگاه صنعتی دام شهر اهواز جمع آوری گردید. از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس، رقت های مختلف بر اساس روش مک فارلند تهیه شد و با حجم های مساوی ازسرم حرارت دیده ی غیر فعال و سرم تازه ی گاومیشهای تحت مطالعه به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد مجاور گردید و سپس تعداد باکتری های موجود به روش شمارش کلنی در پلیت , شمارش گردید. نتایج نشان داد که با آزمون مربع کای و دقت P<0/05 اختلاف آماری معنی داری بین اثر باکتری کشی سرم فعال و حرارت دیده وجود دارد ولی اختلاف آماری معنی داری بین گروه های گاومیش برحسب سن و جنس دیده نشد.

کلمات کلیدی: گاومیش، سرم فعال ، سرم غیرفعال ، استافیلوکوکوس ارئوس

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

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

*:مسئول مکاتبات:saeedhashemi2000@yahoo.com

مقدمه

فعالیت باکتری کشی غیر اختصاصی سرم 1834 توسط پفیفر شناخته شد(2).امروزه میدانیم این عمدتا توسط سیستم کمپلمان صورت می گیرد (5).علاوه بر آن سرم خون واجد ترکیباتی نظیر لیزوزیم و لاکتوفرین و املاح و پروتئین های دیگری است که اثرات باکتری کشی دارند . لیزوزیم در تمام ترشحات و بافتهای بدن بجز مایع مغزی نخاعی وجود دارد.این آنزیم ، اسیل آمینو پلی ساکاریهای موجود در کپسول برخی از باکتریهای گرم مثبت را تجزیه کرده و با مشارکت کمپلمان برخی از باکتریهای گرم منفی را از بین می برد (3) . لاکتوفرین هم در در تمام ترشحات سطوح مخاطی دیده می شود و اثرات ضد ویروس و باکتری دارد. مهمترین نقش لاکتوفرین مهار آهن است و بسیاری از باکتریهای پاتوژن برای رشد و تکثیر نیازمند آهن می باشند(13) .گاومیش اهلی داری ویژگیهای خوبی برای پرورش است از جمله با مصرف علوفه با کیفیت پایین، رشد خوبی دارد لذا در صنعت تولید گوشت قرمز توجه به این دام حائز اهمیت است .از آنجا که در مورد سیستم ایمنی گاومیش مطالعات چندانی صورت نگرفته در مطالعه حاضر تاثیر سرم خون این دام بر رشد و تکثیر باکتری استافیلوکوکوس ارئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

در فاصله آبان ماه 1380 تا اردیبهشت 1381مجموعا 78 نمونه خون گاومیش از کشتار گاه صنعتی اهواز با روش سیستماتیک جمع آوری شد. هر بار که به کشتار گاه مراجعه می شد حدود 20نمونه خون از طریق ورید جاگولار و قبل از کشتار دام گرفته شده و بلافاصله به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل می گردید . باکتری استاف ارئوس را در محیط آگار مغذی کشت خالص داده و با سرم فیزیولوژیک استریل یک سوسپانسیون غلیظی از آن تهیه نمودیم که تا پایان آزمایشاتاز آن استفاده می کردیم.

مراحل آزمایش

قبل از نمونه گیری تعداد 80 میکروتیوب و 25 لوله آزمایش برای تهیه نمونه خون و تهیه رقتهای مختلف از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در اتوکلاو قرار گرفته و استریل می شد.

یک روز قبل از نمونه گیری رقتهای $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس تهیه می کردیم به این صورت که ابتدا از سوسپانسیون غلیظ باکتری که از قبل تهیه شده بود رقتی برابر رقت 1 مک فارلند تهیه می شد سپس در 4 لوله آزمایش استریل به ترتیب در لوله اول 4/9 میلی لیتر و در بقیه لوله ها 4/5 میلی متر سرم فیزیولوژی ریخته می شد آنگاه با سمپلر 100 میکرولیتر و سرسمپلر استریل در مجاورت شعله 100 میکرولیتر از سوپانسیون با رقت 1 مک فارلند به لوله اول اضافه شده و با همزن کاملا" مخلوط می شد. سپس توسط پی پت مدرج استریل 0/5 میلی متر از لوله اول برداشته به لوله دوم افزوده می شد و این روند تا لوله آخر ادامه می یافت بدین ترتیب رقتهای $\frac{1}{50}$،$\frac{1}{500}$، $\frac{1}{5000}$، $\frac{1}{50000}$ تهیه می شد. چون در رقتهای $\frac{1}{50}$ و $\frac{1}{500}$ تعداد باکتریها زیاد و امکان شمارش آنها مشکل بود برای آزمایشات رقتهای $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ استفاده شد.

هر بار 20 نمونه خون از کشتارگاه تهیه و در آزمایشگاه سرم آنها با سانتریفوژ دور 1500 به مدت 5دقیقه جدا می شد ونمونه ها بر حسب سن و جنس در چهار گروه قرار می گرفت . 3میلی لیتر از هر سرم را با قرار دادن در دمای 56 درجه به مدت نیم ساعت غیر فعال می کردیم. قبل از انجام

آزمایش ، برای هر نمونه سرم تست آگلوتیناسیون در روی لام انجام می شد. بدین صورت که یک قطره از سرم و یک قطره از سوسپانسیون استاف ارئوس در روی یک لام با هم مخلوط می شد و چنانچه آگلوتینه می شد نمونه سرم حذف می شد و سپس 80 میکروتیوب در 4 ردیف 20 تایی ، A، B، C و D قرار داده می شد و از 1 تا 20 شماره گذاری می گردید . سپس مطابق شماره لوله آزمایش در هر ردیف در دو میکروتیوب سرم فعال و در دو میکروتیوب سرم غیر فعال ریخته می شد به نحوی که فرضا" از سرم شماره 1، 100 میکرولیتر سرم فعال در میکروتیوب A_1 و 100 میکرولیتر سرم فعال در میکروتیوب B_1 ، 100 میکرولیتر سرم غیر فعال در میکروتیوب C_1 و 100میکرولیتر سرم غیر فعال در میکروتیوب D_1 قرار داده می شد سپس به ردیف های C، A به هر میکروتیوب 100 میکرولیتر از سوسپانسیون استاف ارئوس با رقت $\frac{1}{5000}$ و به ردیفهای D،B نیز 100میکرولیتر از سوپانسیون $\frac{1}{50000}$ اضافه می گردید بعد درب میکروتیوبها بسته شده و کاملا" به هم زده می شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار می گرفتند.

مرحله کشت در پلیت آگار مغذی :

هر پلیت به دو قسمت $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{50000}$ تقسیم می شد و بنابراین برای گروه سرم فعال 20 پلیت و برای گروه سرم غیر فعال نیز 20 پلیت استفاده می شد. میکروتیوبها از انکوباتور خارج می شد و از آنها در مجاورت شعله کشت داده می شد به طوری که مطابق شماره فرضا" میکروتیوب A_1 با رقت $\frac{1}{5000}$ و B_1 با رقت $\frac{1}{50000}$ که مربوط به سرم شماره 1 فعال بود در یک پلیت که به دو قسمت تقسیم می شد کشت می گردید . در پلیت دیگری هم از میکروتیوبهای C_1 و D_1 که مربوط به سرم شماره 1 غیر فعال بود کشت می گردید و میکروتیوبها به مدت 24 تا 48 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده می شد و سپس کلنی های موجود در سطح پلیتها با دستگاه کلنی شمار ، شمارش می گردید و نتایج در جدولی که از قبل تهیه شده بود ثبت می گردید و در نهایت نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار می گرفتند و میانگین کاهش رشد باکتریها در سرم فعال و غیر فعال در هر گروه سنی مورد آزمایش محاسبه می شد .

جدول 1: گروه های گاومیش تحت مطالعه بر حسب سن و جنس

شماره گروه	سن	جنس	گونه دام	تعداد
1	>2/5	ماده	گاومیش	24
2	>2/5	نر	گاومیش	17
3	<2/5	ماده	گاومیش	20
4	<2/5	نر	گاومیش	17

نتایج

در تمامی آزمایشات تعداد باکتری های (کلنی ها) استافیلوکوکوس ارئوس در پلیت های مربوط به سرم فعال کمتر از سرم غیر فعال بود . میانگین کاهش تعداد باکتری ها (کلنی ها) در نمونه های مختلف مربوط به گروههای مختلف در جدول شماره 2 آورده شده است . همانطوری که در این جدول دیده می شود ، به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین کاهش تعداد باکتری مربوط به گروههای شماره 4 و 3 با میانگین 37/41 و 22/4

می باشد یعنی از نظر فعالیت باکتری کشی ، گوساله گاومیش نر فعالیت ترین سرم را دارد و سرم گوساله گاومیش ماده کمترین اثر را دارد که با سطح اطمینان 95% هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروههای مختلف مربوط به گاومیش دیده نشد ($p < /05$) .

جدول 2 : میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم فعال گروههای گاو میش تحت مطالعه

انحراف معیار	میانگین کاهش تعداد باکتری	تعداد نمونه ها	شماره گروه
23	25/37	24	1
21/27	23/58	17	2
19/47	22/4	20	3
16/59	37/41	17	4

میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم های فعال گاومیش های هم جنس در جدول شماره 3 مورد مقایسه قرار گرفته اند که فعال ترین سرم مربوط به جنس نر گاومیش با میانگین کاهش تعداد باکتری 30/50 می باشد و کمترین فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به سرم جنس های ماده گاومیش با میانگین کاهش تعداد باکتری 24/2 می باشد ولی با سطح اطمینان 95% هیچ گونه اختلاف معنی داری بین این گروهها برحسب جنس دیده نشد ($P < /05$).

جدول 3 : مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم فعال گاومیش بر حسب جنس

انحراف معیار	میانگین کاهش تعداد باکتری	تعداد نمونه ها	شماره گروه
21/28	24/2	44	1و3
20/05	30/50	34	2و4

میانگین کاهش تعداد باکتری در سرم فعال گاومیش های هم سن در جدول شماره 4 مورد مقایسه قرار گرفته اند که مطابق این جدول فعال ترین سرم مربوط به گاومیش های جوان (سن کمتر از 2/5 سال) با میانگین کاهش تعداد باکتری 29/29 می باشد و کمترین فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به سرم گاومیشهای مسن (سن بالای 2/5سال) با میانگین کاهش تعداد باکتری 24/63 می باشد که البته تحلیل آماری معنی دار بودن آن را به اثبات نرسانده است ($P < /05$).

جدول 4: مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم فعال گاومیش با حسب سن

انحراف معیار	میانگین کاهش تعداد باکتری	تعداد نمونه	شماره گروه
22/04	24/63	41	1و2
19/49	29/29	37	3و4

بحث

این مطالعه به این منظور انجام گرفت که مشخص شود آیا تفاوتی بین فعالیت باکتری کشی سرم فعال و غیر فعال گاو میش بر حسب سن و جنس وجود دارد یا خیر؟ که البته بر اساس نتایج ،اختلاف آماری معنی داری بین گاومیش های نر و

ماده ، گاومیش های بالغ و نابالغ و نیز گاومیش های هم سن و هم جنس مشاهده نگردید . اما با سطح اطمینان 95% و دقت 0/05 اختلاف آماری معنی بین فعالیت باکتری کشی سرم فعال و غیر فعال (حرارت دیده) مشاهده شد که بررسیهای متعددی این خاصیت را به اثبات رسانده اند و برخی از ترکیباتی که باعث این خاصیت می گردند نیز شناسایی شده اند. از آنجایی که تمامی سرمهای مورد استفاده قرار گرفته در این مطالعه قبل از آزمایش از نظر وجود پادتن ضد استافیلوکوکوس ارئوس بررسی شده بودند و سرم های واجد پادتن حذف گردیدند ، فعالیت باکتری کشی مشاهده شده را به وجود پادتن (ایمنی اختصاصی) یا دستگاه مکمل نمی توان نسبت داد.
هان وتوله (1981) به مقایسه فعالیت باکتری کشی سرم و نوتروفیل های انسان و گاو پرداخته اند و به این نتیجه رسیده اند که سرم و نوتروفیل های گاو بهتر از سرم و نوتروفیل های انسان استرپتوکوکوس آگالاکتیه را می کشند(9) .

کارول (1979) به اندازه گیری میزان لیزوزیم 206 نمونه سرم گاو پرداخته است و مشاهده کرده است که در 96 نمونه سرم ، میزان لیزوزیم به حدی کم است که قابل تعیین نیست . در 79 نمونه سرم میزان لیزوزیم کمتر از 2 میکروگرم در میلی لیتر بوده و در 25 نمونه سرم نیز میزان لیزوزیم بین 25-2 میکروگرم در میلی لیتر و در 6 نمونه سرم نیز میزان لیزوزیم بیش از 25 میکروگرم بوده است (6). لذا با توجه به این مهم که بخش عمده ای از فعالیت باکتری کشی سرم مربوط به لیزوزیم است می توان وجود تنوع زیاد در فعالیت باکتری کشی سرم که در این مطالعه دیده شده را به آن نسبت داد . البته از این نکته نیز نباید غافل بود که احتمال دارد سرم هایی که فعالیت باکتری کشی زیادتری داشته اند ، مربوط به دام های کشتار شده ای باشد که قبل از کشتار ، آنتی بیوتیک های موثر بر استافیلوکوکوس ارئوس مصرف کرده باشند که عملا" امکان تشخیص و حذف آنها از جمعیت تحت مطالعه وجود نداشت.
نیکول و همکاران (1974) در طی مطالعه ای به این نتیجه رسیده اند که گوساله های هم سن نژاد آبردین آنگوس در مقایسه با نژاد بلک پید مقاومت بیشتری نسبت به باکتری ها دارند که این تفاوت ممکن است ناشی از اثرات متفاوت باکتری کشی سرم این دونژاد باشد (11).
کوربیل و همکاران (1988) و ایزن شنک و همکاران (1995) به بررسی فعالیت اثر باکتری کشی سرم گاوهای غیر ایمن بر روی بروسلاآبورتوس پرداخته اند و نتیجه گرفته اند که سرم های گاوهای غیر ایمن می تواند این باکتری را بکشد (7و8) . ذکر این نکته ضروری است که در مورد باکتریهای گرم منفی مثل بروسلاآبورتوس از بین رفتن باکتری در اثر سرم فعال ممکن است ناشی از فعال شدن مسیر فرعی دستگاه مکمل باشد که در هر حال جزء ایمنی غیر اختصاصی است. در این مطالعه فعالیت باکتری کش سرم با استفاده از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس مورد ارزیابی قرار گرفت که چون گرم مثبت است در صورتی که در اثر سرم از بین برود مربوط به فعال شدن دستگاه مکمل نیست و سایر اجزاء باکتری کش سرم در این امر دخیل خواهند بود.بهیمانی و همکاران (1999) به ارزیابی اثر لاکتوفرین گاوی بر روی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس پرداخته اند و نتایج مطالعه آنها نشان می دهد که اگر چه این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی اثر باکتری کش ضعیفی دارد ولی در بدن اثر قوی دارد زیرا در مقایسه با گروههای شاهد ،تجویز خوراکی و وریدی آن ،عفونتهای کلیوی تجربی ناشی از این باکتری را 60-30 درصد و تعداد کلنی های بدست آمده از کشت کلیه ها را 12-5 برابر کاهش داده است (4)

گرچه در مطالعه حاضر کاهش تعداد کلنی ها در حضور سرم فعال معنی دار بود ولی این کاهش حدود 20تا30 درصد (کمتر از 0/5 برابر) بود که در مقایسه با تحقیق مذکور که 12تا5 برابر کاهش تعداد کلنی مشاهده شده ،ناچیز است . اما بدین نکته نیز باید توجه داشت که این محققین نیز ذکر نموده اند که در شرایط آزمایشگاهی اثر باکتری کشی لاکتوفرین گاوی ناچیز بوده است. به هر حال جهت بررسی بهتر فعالیت باکتری کشی سرم گاومیش می توان اثر آن را در جلوگیری از عفونتهای تجربی در موش مورد توجه قرار داد .

در مطالعه ایکدا و سوجی یاما(1998) و همچنین سوارت و کوپرز (1998) ، اثر ضد ویروسی لاکتوفرین بر روی ویروس هپاتیت C انسان و ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان نیز به اثبات رسیده است (10 و12)

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

بواسحاقی و همکاران (1379) نیز در مطالعه ای به بررسی نوتروفیل های گاو و گاومیش از نظر تکنیک احیاء نیتروبلوتترازولیوم پرداخته اند و بدین نتیجه رسیده اند که از این نظر تفاوتی بین این دو دام و نیز دام های هم جنس و هم سن وجود ندارد (1) .

منابع

1- بواسحاقی ، ح و قربانپور ،م .1379 . مقایسه فعالیت نوتروفیلهای گاو و گاومیش .پایان نامه شماره 377جهت اخذ دکترای عمومی دامپزشکی ،دانشگاه شهید چمران . صفحات 6-1 .

2- تاج بخش ،ح. 1370 . ایمنی شناسی بنیادی . چاپ پنجم ، انتشارات دانشگاه تهران . صفحات 37-36 و215-213.

3- شیمی ، ا .1380 . اصول ایمنی دامپزشکی تألیف ایان تیزارد . چاپ اول ، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور صفحات 44-34.

4- Bhimani, R.S .,Vendrov ,Y., Furmanski ,P.J., 1999.Influence of Lactoferrin Feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice .Journal of Applied Microbiology .86(1): 135-144

5- Carroll,E .J ., Jasper, D.E., 1977.Bacericidal activity of standard Bovine serum against coliform bacteria isolated from udders and the environment of dairy cows .American Journal of Veterinary Research.38(12):2019-2022

6- carroll, E.J., 1979.The role of lysozyme in killing and lysis of coliform bacteria in the bovine animal Serum and milk concentrations of lysozyme. Microbiology .87(1): 235-244

7- Corbeil, L.B., Blau, K., Inzana ,T.J.,Nielsen, K.H.,Jacob, ,R.H., et al.,1988.Killing of Brucella abortus by bovine serum. Infection and Immunity .56(12):3251-3261

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