

## تعیین میزان آلدگی کلیفرمی و شناسایی انواع کلیفرم‌ها و سالمونلای جدا شده از آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌های نوزاد گاوداری‌های شیری مشهد

مریم عاملی<sup>۱</sup>، مسلم صادقی<sup>۱</sup>، غلامرضا محمدی<sup>۲</sup>، محمد محسن زاده<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲- استاد گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

### چکیده

این مطالعه با هدف تعیین میزان آلدگی کلیفرمی و شناسایی کلیفرم‌ها و سالمونلای جدا شده در آغوز خورانده شده به گوساله‌های شیری نوزاد در گاوداری‌های شیری مشهد انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز در زمان خوراندن اولین بار آغوز به گوساله‌ها جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های آغوز از ۴ گاوداری و طی ۵ ماه جمع‌آوری شدند. از روش‌های معمول میکروب‌شناسی برای تعیین کمی آلدگی کلیفرمی آغوز و شناسایی جدایه‌های باکتریایی آغوز استفاده گردید. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که از یکصد نمونه مورد بررسی تعداد ۵۹ نمونه آغوز (۵۹٪) آلدود به کلیفرم بودند. میزان آلدگی باکتریایی و کلیفرمی در نمونه‌های مورد بررسی به طور میانگین  $10^{0.5}$  cfu/ml و  $10^{0.5} \times 10^3$  بود. انواع باکتری‌های گرم منفی جدا شده شامل: اشربیا کلی (۳٪)، سیتروباکتر دایورسوس (۲۳٪)، سیتروباکتر فرونڈی (۱۶٪)، پروثوس وولگاریس (۱۶٪)، سراتیا مارسنس (۱۰٪)، انتروباکتر آتروجنز (۳٪)، سالمونلا انتراپتیدیس (۸٪)، سیتروباکتر دایورسوس (۹٪)، سیتروباکتر فرونڈی (۳٪)، پروثوس وولگاریس (۱۰٪)، سراتیا مارسنس (۱۶٪) و انتروباکتر آتروجنز (۲٪). همچنین میزان آلدگی کلیفرمی آغوز با گله در ارتباط بود ( $P < 0.05$ ). با توجه به اینکه آلدگی باکتریایی آغوز می‌تواند منجر به بیماری‌های گوساله بعد از تولد شود و با جذب غیرفعال آنتی‌بادی آغوز تداخل ایجاد نماید، ارزیابی کیفی و بهداشتی آن از اهمیت بسیاری برخوردار است. لذا باید همه تولید کنندگان به رعایت بهداشت توجه نمایند تا آلدگی باکتریایی آغوز در طی مراحل جمع‌آوری، ذخیره‌سازی و تغذیه به حداقل ممکن برسد.

**واژه‌های کلیدی:** آغوز-آلدگی باکتریایی- کلیفرم- سالمونلا- گوساله‌های شیری نوزاد

### مقدمه

آغوز اولین شیر ترشح شده پس از زایمان و پس از یک دوره خشکی و استراحت پستان است. مصرف آغوز دارای اهمیت فراوان می‌باشد زیرا منشأ ایمنی غیرفعال است که جهت سلامت گوساله‌ها بسیار مهم است. گوساله‌هایی که نمی‌توانند مقدار مناسب آغوز را دریافت کنند نسبت به گوساله‌هایی که مقدار کافی آغوز خورده‌اند ۶ برابر بیشتر در معرض خطر بیماری‌ها و ۳-۵ برابر بیشتر در معرض خطر مرگ قرار دارند (۵). گوساله‌ها در زمان تولد سطح ناچیزی از ایمونوگلوبولین را دارند. دلیل این امر این است که جفت نشخوار کنندگان مانع انتقال آنتی‌بادی‌های مادری به جنین در طی آبستنی می‌شود (۱). بنابراین دریافت آغوز غنی از ایمونوگلوبولین

نقش بنیادی در انتقال اینمی غیر فعال دارد. علاوه بر این‌ها آغوز نقش مهمی در تأمین مواد مغزی و سایر فاکتورهای اصلی دارد (۵). کارشناسان توصیه کردند که کلسترول تازه‌ای که به گوساله خورانده می‌شود بایستی کمتر از  $1 \times 10^5$  cfu/ml باشد کلی میکروبی و کمتر از  $1 \times 10^4$  cfu/ml کلیفرم داشته باشد (۳).

## اهداف

هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت انواع کلیفرم‌ها و سالمونلای جدا شده از آغوز خورانده شده به گوساله‌های نوزاد در گاوداری‌های شیری مشهد و همچنین بررسی ارتباط بین میزان آلودگی کلی فرمی آغوز با گله، جنس گوساله و تعداد زایش مادر و سلامت گوساله در یک هفته اول حیات گوساله بود.

## روش کار

در این بررسی تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز از گاوداری‌های اطراف مشهد به روش غیرتصادفی و مقطعی جمع‌آوری شد. در هر بار نمونه‌گیری مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آغوز از ظرف خوراندن آغوز گوساله درست پیش از خوراندن با استفاده از سرنگ استریل گرفته شده در شرایط سرما به آزمایشگاه دامپزشکی دانشکده فردوسی مشهد منتقل گردید. همچنین بعد از یکنواخت سازی نمونه‌ها از آن‌ها رقت‌های  $10^{-9}$  تا  $10^{-6}$  تهیه گردید و از هر کدام از رقت‌های تهیه شده به روش کشت مخلوط (Pour Plate) بر روی محیط آگار شمارش استاندارد (SPC<sup>۱</sup>) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. بعد از این مدت پلیت‌هایی که بین ۳۰-۳۰۰ پرگنه داشتند انتخاب شده و به روش استاندارد شمارش گردیدند. به منظور شمارش کلیفرم‌ها از رقت‌های متوالی تهیه شده از هر نمونه بطور جداگانه بر روی محیط VRBA<sup>۲</sup> بصورت کشت مخلوط کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آن‌ها کمتر از ۱۵۰ پرگنه بود مورد شمارش قرار گرفتند. برای تشخیص کلیفرم‌ها از هر یک از نمونه‌ها بر روی محیط مک‌کانکی (Mc Conkey) کشت داده شد. همچنین در این مطالعه از تست‌های بیوشیمیایی از جمله TSI (Triple Sugar Iron Agar)، Voges Proskauer (VP)، Methyl red (MR)، Sugar Iron Agar باکتری‌های جنس سالمونلا از محیط‌های کشت پیش‌غذی کننده (لاکتوزبراث)، غذی کننده (Selenite Cystein) و انتخابی (Salmonella) استفاده گردید. جهت واکاوی داده‌ها از نرم افزار SPSS-19 استفاده گردید. بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده Shigella Agar (Shigella Agar) انجام گرفت. با توجه به نرمال نبودن توزیع آلدگی کلیفرمی آغوز از آزمون (Mann-Whitney) از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای مقایسه میانگین آلدگی کلیفرمی آغوز خورانده شده به گوساله‌های نر و ماده استفاده شد. برای آنالیز ارتباط متغیرهای شکم زایش، زنده ماندن گوساله، جنس گوساله، سلامت گوساله، مدیریت دامپروری با آلدگی کلیفرمی از آزمون مربع کای استفاده گردید.

## نتایج و بحث

میزان کلی آلدگی باکتریایی در نمونه‌های مورد بررسی در دامنه‌ای کمتر از  $5 \times 10^7$  cfu/ml تا  $2 \times 10^7$  cfu/ml و به طور میانگین  $1 \times 10^5$  cfu/ml بود. با توجه به اینکه حداکثر مجاز آلدگی کلیفرمی در آغوز  $1 \times 10^4$  cfu/ml می‌باشد، در ۳۴٪ نمونه‌ها آلدگی کلیفرمی بیش از حد مجاز بود که در واکاوی آماری به عنوان آلدده در نظر گرفته شدند. حداکثر میزان آلدگی کلیفرمی در کل گله‌ها  $1 \times 10^9$  cfu/ml و میانگین

<sup>1</sup> Standard Plate Count

<sup>2</sup> Violet Red Bile Agar

۱۰۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۵۹ نمونه آغوز (۵۹٪) حاوی یکی از انواع کلیفرم‌ها و یا سالمونلا بودند و ۴۱ نمونه (۴۱٪) به هیچکدام از باکتری‌های مورد مطالعه آلوه نبودند. باکتری‌های گرم منفی جدا شده از ۱۰۰ نمونه آغوز مورد مطالعه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

**جدول ۱- باکتری‌های گرم منفی جدا شده از ۱۰۰ نمونه آغوز گرفته شده از ۴ گله گاو شیری**

Bacteria	No. (and%) of sample contaminated
E.coli	۲۸(٪۴۷,۴۵)
Citrobacter diversus	۲۳(٪۳۰,۹۸)
Citrobacter frundii	۶(٪۱۰,۱۶)
Proteus Vulgaris	۶(٪۱۰,۱۶)
Seratia Marcescens	۳(٪۵,۰۸)
Enterobacter Aerogenes	۲(٪۳,۳۸)
Salmonella	۳(٪۵,۰۸)
E.coli+ Citrobacter diversus	۴(٪۶,۷۷)
E.coli+ Citrobacter frundii	۱(٪۱,۶۹)
E.coli+ Salmonella	۲(٪۳,۳۸)
Proteus Vulgaris+ Salmonella	۱(٪۱,۶۹)

**ارتباط میزان آلوه‌گی کلیفرمی آغوز با زنده ماندن گوساله، شکم زایش مادران، گله و سلامت گوساله**  
نتایج واکاوی آماری نشان داد که ارتباط آلوه‌گی کلیفرمی آغوز با زنده ماندن گوساله‌ها و همچنین تعداد شکم زایش مادران معنی دار نیست ( $P>0.05$ ). همچنین نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بین آلوه‌گی کلیفرمی آغوز با مدیریت گله و همچنین سلامت گوساله ارتباط معنی دار وجود دارد ( $P<0.05$ ). یکی از عوامل مهم تعیین کننده کیفیت آغوز حضور باکتری‌ها می‌باشد (۳). حضور باکتری‌ها در آغوز باعث کاهش جذب ایمونو گلوبولین‌ها (۱) و افزایش خطر FPT و انتقال بیماری‌های مختلف به گوساله‌ها می‌شود (۳). آغوز علاوه بر انتقال ایمنی غیرفعال از طریق ایمونو گلوبولین‌ها و لکوسیت‌ها، نقش بیولوژیک مهمی در تأمین مواد مغذی و سایر فاکتورهای اصلی نیز دارد (۱). در مطالعه اسوان و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۱۲ گله در ایالت‌های مینیسوتا و ویسکانسین آمریکا، در ۲۰۰ نمونه آغوز مورد بررسی، میانگین تعداد کلی باکتری‌ها و تعداد کلی فرم‌ها به ترتیب ۱۶,۱ و ۲,۷ میلیون  $\text{cfu}/\text{ml}$  بودند (۶). همچنین فیکتو و همکاران (۲۰۰۲)، ۲۳۴ نمونه آغوز گرفته شده از ۶ فارم را در طی ۲۴ ماه بررسی کردند. که حداقل یک میکرووار گانیسم در ۲۲۱ نمونه آغوز (۹۴٪) کشت داده شناسایی کردند. با توجه به نقطه برش  $10^5$  باکتری در میلی لیتر، ۸۴ نمونه (٪۳۵,۹) آلوه در نظر گرفته شدند. گونه‌های استافیلوکوکوس (٪۵۷,۷)، باسیل‌های گرم منفی (٪۴۷,۹)، کلی فرم‌ها (٪۴۴) و استرپتوکوکوس یوپریس (٪۲۰,۵) در بین تکراری ترین باکتری‌های جدا شده بودند. خطر نسبی آلوه‌گی با پیش از  $10^5$  باکتری در میلی لیتر به طور چشمگیری در ماههای گرم بیشتر از ماههای سرد بود. که این یافته به دلیل تأخیر بین جمع‌آوری و خوراندن آغوز می‌باشد. که این تأخیر در خوراندن آغوز اجازه رشد باکتریایی را فراهم می‌سازد و این تأخیر در طی ماههای گرم اثر بیشتری دارد. همچنین حجم کاری در یک گاوداری در طول سال تغییر می‌کند و زمان مورد استفاده برای مراقبت از گوساله‌ها در طی ماههای گرم کمتر است. بالاتر بودن آلوه‌گی باکتریایی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه فیکتو و همکاران می‌تواند به این علت باشد که مطالعه حاضر به صورت مقطعی و در ماههای گرم سال انجام شده

ولی در مطالعه فیکتو نمونه‌ها طی ۲۴ ماه، در ماههای گرم و سرد سال جمع آوری شد و از آنجایی که در ماههای سرد آلودگی باکتریایی کمتر است، میانگین آلودگی پایین تر آمده است (۲). استوارت و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای که بر روی ۳۹ نمونه آغوز گاو به منظور شناسایی نقاط کنترلی مهم برای آلودگی باکتریایی آغوز در طی پروسه دوشش و ذخیره و خوراندن آن انجام دادند، نشان دادند که تعداد باکتری‌ها در نمونه‌هایی که به طور مستقیم از پستان جمع آوری شدند بسیار پایین تر از نمونه‌هایی بود که از سطل جمع آوری شده بودند (۷). کلیفرم‌ها باکتری‌هایی با مشناً مدفعی و یا محیطی هستند به این معنی که ممکن است مستقیماً از مدفع یا غیرمستقیم از محیط به آغوز انتقال یابند. بالاتر بودن آلودگی کلیفرمی در مطالعه حاضر می‌تواند نشان دهنده بهداشت نامناسب تهیه آغوز، محیط، بستر، دستگاه شیردوشی و ظروف جمع آوری آغوز باشد. تفاوت در سطح آلودگی کلیفرمی در بین گاوداری‌های مختلف در این مطالعه می‌تواند به علت تفاوت در رعایت سطح بهداشت محیط، دستگاه‌ها و تهیه آغوز باشد. آلودگی سالمونلایی به دنبال ذخیره ضعیف آغوز می‌تواند رخ دهد زیرا بقای سالمونلا در نمونه‌های شیر و آغوز بالا است و انتشار سریعی دارد و راههای پیشگیری مؤثر شامل رعایت کامل بهداشت در حین جمع آوری و ذخیره و خوراندن آغوز و شیر است. آلودگی در دو حالت رخ می‌دهد، ورم پستان سالمونلایی یا آلودگی با مدفع در حین دوشش. سالمونلا به خصوص در آب و هوای گرم و مرطوب نسبت به خشک شیوع بالای دارد (۴). در مطالعه فیکتو گوساله‌های نر در خطر بزرگتری از تغذیه با آغوز با شمارش باکتریایی بیشتر نسبت به گوساله‌های ماده بودند. این نشان می‌دهد که در سطح مراقبت انجام شده بسته به ارزش حیوان، تفاوت وجود دارد. شمارش عوامل باکتریایی در آغوز داده شده به گوساله‌های نر بیشتر از گوساله‌های ماده بود که می‌تواند نشان دهنده دادن شیر ورم پستانی بیشتر به گوساله‌های نر باشد (۲). این یافته در مطالعه حاضر مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). در مطالعه فیکتو و همکاران شکم زایش با شمارش کلی باکتریایی یا شمارش گروهی ارتباطی نداشت در پژوهش حاضر نیز بین شکم زایش و شمارش تام آلودگی باکتریایی ارتباطی به دست نیامد. با توجه به عدم وجود ارتباط بین شکم زایش، سن مادر و جنس گوساله‌ها با میزان آلودگی در پژوهش حاضر، نتیجه می‌گیریم که افزایش سن مادر و در معرض قرار گیری بیشتر با عوامل بیماری‌زا تاثیری بر میزان آلودگی آغوزها نداشته و همچنین تمایلی برای تغذیه گوساله‌های نر با آغوزهای آلوده و ورم پستانی وجود نداشته است. در مطالعه حاضر و سایر مطالعات صورت گرفته مشخص شده که مشکلات مدیریتی، عمدۀ ترین دلیل آلودگی باکتریایی آغوز خصوصاً آلودگی کلیفرمی آن می‌باشد. زیرا به طور کلی انتروباکتریاسه‌ها پاتوژن‌های محیطی هستند و حضور این عوامل در آغوز نشان دهنده عدم رعایت کافی بهداشت در فرایند جمع آوری و خوراندن آغوز می‌باشد. بنابراین استراتژی تولید کنندگان باید بر محور مدیریت کاهش میزان آلودگی باکتریایی آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌ها متمرکز گردد. همه تولید کنندگان باید به رعایت بهداشت در طی مراحل جمع آوری، ذخیره سازی و تغذیه توجه نمایند تا آلودگی باکتریایی آغوز به حداقل ممکن برسد.

## منابع

- Castro N, Capote J, Alvarez S, Argüello A. (2005) Effects of lyophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. Journal of Dairy Science. 1;88(10):3650-4.
- Fecteau G, Baillargeon P, Higgins R, Paré J, Fortin M. (2002) Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. The Canadian Veterinary Journal.;43(7):523.
- Godden S. (2008) Colostrum management for dairy calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 1;24(1):19-39.
- House JK. (2004) Profitable strategies to control salmonellosis in dairy cattle. MEDECIN VETERINAIRE DU QUEBEC. 34:42-3.
- Nakamura T, Kawase H, Kimura K, Watanabe Y, Ohtani M, Arai I, Urashima T. (2003) Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation. Journal of dairy science. 1;86(4):1315-20.
- Swan H, Godden S, Bey R, Wells S, Fetrow J, Chester-Jones H. (2007) Passive transfer of immunoglobulin G and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer. Journal of dairy science 1;90(8):3857-66.
- Stewart S, Godden S, Bey R, Rapnicki P, Fetrow J, Farnsworth R, Scanlon M, Arnold Y, Clow L, Mueller K, Ferrouillet C. (2005) Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. Journal of dairy science. 1;88(7):2571-8.