تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت در آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌های نوزاد گاوداری‌های شیری مشهد

منصوره امیری[۱]، مسلم صادقی[۱]، غلامرضا محمدی[۲]، محمد محسن‌زاده[۳]

۱ - دانش‌آموخته 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 خصوصیات فیزیکوشیمیایی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت 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 گوساله جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۶۲ نمونه آغوز (۶۲٪) حداقل به یک نوع باکتری آلوده بودند. میزان کلی آلودگی باکتریایی در نمونه‌های مورد بررسی به طور میانگین 10^5cfu/ml بود. انواع باکتری‌های گرم‌مثبت جداشده شامل استافیلوکوکوس اینترمدیوس ۲۱(۲۱٪)، استافیلوکوکوس هایکوس ۲۴(۲۴٪)، استافیلوکوکوس کروموژنوس ۱۰(۱۰٪)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۳(۳٪)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۳(۳٪) و استرپتوکوکوس پایوژنزیز ۱(۱٪) بودند. خطر نسبی (RR) ابتلا به بیماری در گوساله‌های تغذیه شده با آغوز آلوده ۲,۶ بیشتر از گوساله‌هایی است که با آغوز آلوده تغذیه نشده بودند. {خطر نسبی=۲,۶، فاصله‌اطمینان=۴,۱۰۶-۱,۶۴۶} همچنین میزان آلودگی باکتریایی آغوز با گله در ارتباط بود ($P<0.006$). با توجه به اینکه آلودگی باکتریایی آغوز می‌تواند منجر به بیماری‌های گوساله بعد از تولد شود و با جذب غیرفعال آنتی‌بادی‌های آغوز تداخل ایجاد نماید ارزیابی کیفی و بهداشتی آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. استراتژی تولیدکنندگان باید بر محور مدیریت کاهش میزان آلودگی باکتریایی آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌ها متمرکز گردد.

واژه‌های کلیدی: آغوز- آلودگی باکتریایی- گوساله‌های شیری نوزاد

مقدمه

آغوز مهمترین غذا در ابتدای زندگی گوساله‌ها محسوب شده و مصرف آن ضروری است زیرا منشأ ایمنی غیر فعال است که جهت سلامت گوساله 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 ۵-۳ برابر بیشتر در معرض خطر مرگ قرار دارند (۳). گوساله‌ها در زمان تولد سطح ناچیزی از ایمونوگلوبولین را دارند. دلیل این امر این است که جفت نشخوارکنندگان مانع انتقال آنتی بادی‌های مادری به جنین در طی آبستنی می‌شود (۱). بنابراین دریافت آغوز غنی از ایمنوگلوبولین نقش بنیادی در انتقال ایمنی غیر فعال دارد. علاوه بر این‌ها آغوز نقش مهمی در تأمین مواد مغزی و سایر فاکتورهای اصلی دارد (۵).

اهداف

با توجه به اینکه آلودگی باکتریایی آغوز می‌تواند منجر به بیماری‌های گوساله بعد از تولد شود و با جذب غیرفعال آنتی‌بادی‌های آغوز تداخل ایجاد نماید ارزیابی کیفی و بهداشتی آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. با توجه به اینکه تا به حال تحقیقی در رابطه با شناسایی باکتری‌های گرم مثبت موجود در آغوز مرتبط با بهداشت پستان و ظروف در گاوداری‌های شیری مشهد و حومه صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف ارزیابی سطح کیفی و بهداشتی آغوز صورت گرفت. همچنین در این تحقیق ارتباط بین آلودگی باکتری‌های گرم مثبت آغوز با گله، جنس گوساله و تعداد زایش مادر و سلامت گوساله در یک هفته اول حیات گوساله بررسی گردید.

روش کار

در این بررسی تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز از گاوداری‌های اطراف مشهد به روش غیرتصادفی ومقطعی جمع‌آوری شد. در خصوص هر نمونه اخذ شده نام گله، تاریخ تولد گوساله، جنس، هویت مادر و تعداد زایش، امکانات شیردوشی و رعایت بهداشت ثبت شد. سپس با استفاده از سرنگ استریل ۵۰ میلی‌لیتر آغوز از ظرف خوراندن آغوز گوساله درست پیش از خوراندن اولین تغذیه گوساله گرفته شده و پس از ثبت هویت گوساله و مادر برروی نمونه‌های اخذ شده، نمونه‌ها در شرایط سرما به آزمایشگاه دانشکده منتقل گردید. بعد از یکنواخت سازی هر نمونه کلیه خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن ازجمله میزان چربی، پروتئین، لاکتوز، اسیدیته، SNF[1](مواد جامد غیر چربی) توسط دستگاه لاکتواستار اندازه‌گیری می‌شد. همچنین بعد از یکنواخت سازی نمونه‌ها از آن‌ها رقت‌های 10^{-1} 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[2]) کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از این مدت پلیت‌هایی که بین ۳۰۰-۳۰ پرگنه داشتند انتخاب شده و به روش استاندارد شمارش گردیدند. در این تحقیق نمونه‌ها از نظر وجود باکتری‌های گرم مثبت با منشأ پستان و یا پوست و مخاط پستان از جمله .Staphylococcus spp، Streptococcus spp. و غیره مورد آزمایش قرار گرفتند. برای جداسازی و شناسایی انواع کوکسی‌های گرم مثبت از هر یک از نمونه‌ها روی محیط‌های کشت آگار خون‌دار و محیط کشت TSA[3] حاوی ۵٪ خون گاو کشت داده و پلیت‌های مورد نظر جهت رشد باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. سایر آزمایشات بیوشیمیایی و کاتالاز و اکسیداز در مورد هر جدایه انجام گردید. همچنین از هر یک از نمونه‌ها برروی محیط‌های بردپارکر و محیط مغذی گوشت پخته به منظور جداسازی استافیلوکوک‌ها کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت حداقل ۳۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدندو بعد از این مدت پرگنه‌های سیاه رنگ با هاله روشن و عدم هاله در اطراف آن جداسازی گردید و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله MSA، DNase ، Coagulas و VP[4]، همولیز و تشکیل رنگدانه به عنوان تشخیص تفریقی استفاده گردید. نمونه‌های کشت داده شده در مرحله قبل (محیط آگار خون دار) بر اساس خصوصیات همولیز و آزمون کاتالاز تشخیص استرپتوکوک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفریق گونه‌های مختلف جنس استرپتوکوک از آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط از جمله قندهای لاکتوز، مانیتول، رافینوز، سالیسین و سوربیتول استفاده گردید. جهت واکاوی داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-19 استفاده گردید. بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogrov-Smirnov انجام گرفت. با توجه به اینکه نمونه‌های آغوز از ۴ گله مختلف جمع‌آوری گردید برای واکاوی آماری خصوصیات فیزیکوشیمیایی آغوز از آزمون (one way anova) و Kruskal-Wallis

[1] Solids non Fat
[2] Standard Plate Count
[3] Tryptic Soy Agar
[4] Voges Proskauer Test

test استفاده شد. از آزمون بونفرونی برای تعیین اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. با توجه به نرمال نبودن توزیع آلودگی باکتریایی آغوز از آزمون (Mann-Whitney) برای مقایسه میانگین آلودگی کلی باکتریایی 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 و باکتری گرم مثبت جدا شده با آلودگی آغوز از آزمون مربع کای استفاده گردید.

نتایج و بحث

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی

جدول ۱ نتایج حاصل از واکاوی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آغوز در گله‌های مختلف و مقایسه بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. آزمون آماری نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ۴ گله مختلف می‌باشد ($P<0.05$).

جدول ۱- نتایج واکاوی فیزیکوشیمیایی ۱۰۰ نمونه آغوز اخذ شده از ٤ گله گاو شیری (Mean±SE) سطح معنی داری ($P<0.05$)

خصوصیات	گله ۱(۸)	گله ۲(۵۷)	گله ۳(۱٤)	گله ٤(۲۱)	P-value
چربی (٪)	٦/٦١±۰/۸۳	٦/٦۳±۰/۳	۹/۸٤*^{a}±۱/۲۸	۸/۷*^{b}±۰/٦۱	P=0/00
پروتئین (٪)	۸/۷۸±۰/٦۸	۷/۱۷±۰/۲۵	۸/۹٦*^{a}±۰/٦٦	۲/٤۱±۰/۵۲	P=0.015
لاکتوز (٪)	۱۲/۷۹±۰/۹۷	۱۰/۳±۰/۳۹	۱۳/۰۹*^{a}±۱	۷/۸۱±۰/۲٤	P=0.010
ماده جامد فاقد چربی (٪)(snf)	۲۳/۰۵±۱/۷۹	۱۸/۵±۰/٦۷	۲۳/٤۳*^{a}±۱/۸٦	۱۸/۲±۱/۱۷	P=0.004

*(a): اختلاف بین میانگین بین گله ۲ و ۳

*(b): اختلاف بین میانگین گله ۲ و ۴

جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های گرم مثبت

از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۶۲ نمونه آغوز (۶۲٪) حداقل به یک نوع باکتری آلوده بودند. در نتیجه کشت نمونه‌های آغوز، در مجموع ۵ گونه از جنس استافیلوکوک و یک گونه از جنس استرپتوکوک جدا گردید. جدول ۲ تعداد و درصد هر یک از گونه‌های باکتری گرم مثبت را نشان می‌دهد.

جدول ۲- باکتری‌های گرم مثبت جدا شده از ۱۰۰ نمونه آغوز گرفته شده از ٤ گله گاو شیری

Bacteria	No. (and%) of sample contaminated
Staphylococcus intermediuss	۲۱(٪۲۱)
Staphylococcus hyicus	۲٤(٪۲٤)
Staphylococcus chromogenus	۱۰(٪۱۰)
Staphylococcus epidermidis	۳(٪۳)
Staphylococcus saprophyticus	۳(٪۳)
Staphylococcus pyogenesis	۱(٪۱)
Staphylococcus pyogenesis + Staphylococcus hyicus	۱(٪۱)
Nothing	۳۸(٪۳۸)

بررسی ارتباط میزان آلودگی باکتریایی آغوز با گله، جنس گوساله و شکم زایش مادران و وضعیت سلامت گله و گوساله

در این مطالعه نتایج واکاوی آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی باکتریایی آغوز با جنسیت گوساله‌ها و همچنین شکم زایش مادران وجود ندارد (P>0.05). از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهد که ارتباط آلودگی باکتریایی آغوز با گله و وضعیت سلامت گوساله و مدیریت گله معنی‌دار است (P<0.05). آغوز یک منبع مهم از مواد مغذی، فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و ایمنی غیر فعال آنتی‌بادی‌های مادری است که برای افزایش رشد و حمایت و حفاظت گوساله‌ها در برابر بیماری‌های عفونی در هفته‌ها و ماه‌های اول زندگی مهم و حیاتی می‌باشد. متخصصان توصیه کرده‌اند که کلستروم تازه‌ای که به گوساله‌ها خورانده می‌شود بایستی شامل کمتر از 10^5cfu/ml باکتری و کمتر از 10^4cfu/ml کلی‌فرم باشد (۴). با توجه به حداکثر مجاز 10^5cfu/ml برای تعیین آلودگی باکتریایی، ۵۱٪ نمونه آغوزهای آزمایش شده در پژوهش حاضر آلوده محسوب می‌شدند که از این تعداد ۶۲٪ نمونه‌ها حاوی باکتری های گرم مثبت بودند. در مطالعه اسوان و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۱۲ گله در ایالت‌های مینوسوتا و ویسکانسین آمریکا، در ۲۰۰ نمونه آغوز مورد بررسی میانگین تعداد کلی‌باکتری‌ها و تعداد کلی‌فرم‌ها به ترتیب ۱۶,۱ و ۲,۷ میلیون cfu/ml بودند (۶). پژوهش حاضر به منظور تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت در آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌های نوزاد ۴ گله گاو شیری انجام شد. با توجه به تفاوت معنی‌دار (P<0.05) بین خصوصیات فیزیکوشیمیایی آغوزهای جمع‌آوری شده از ۴ گله مورد مطالعه این نتیجه به دست می‌آید که احتمالاً تفاوت در روش‌های مدیریتی و تغذیه گاوهای مادر موجب این تفاوت شده است. از آنجایی که عمده باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های آغوز استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی بوده‌اند، بالا بودن میزان این باکتری می تواند به دلیل آماده‌سازی نامناسب پستان‌ها و عدم رعایت بهداشت سرپستانک‌ها در گله‌های مورد مطالعه باشد. در مطالعه فیکتو و همکاران در سال ۲۰۰۲ که بر روی ۲۳۴ نمونه آغوز گرفته شده از ۶ فارم در طی ۲۴ ماه انجام شد از روش‌های باکتری شناسی معمول برای تعیین بار میکروبی آغوز، همچنین تعیین باکتری استفاده گردید. حداقل یک میکروارگانیسم در ۲۲۱ نمونه آغوز (۹۴/۴٪) کشت داده شناسایی شد. با توجه به نقطه برش 10^5 باکتری در میلی‌لیتر، ۸۴ نمونه (۳۵/۹٪) آلوده در نظر گرفته شدند. گونه‌های استافیلوکوکوس (۵۷/۷٪)، باسیل‌های گرم منفی (۴۷/۹٪)، کلی‌فرم‌ها (۴۴٪) و استرپتوکوکوس یوبریس (۲۰/۵٪) در بین تکراری‌ترین باکتری‌های جدا شده بودند. خطر نسبی آلودگی با بیش از 10^5 باکتری در میلی‌لیتر 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. 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 وهمکاران 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 پژوهش حاضر بین مصرف آغوز با آلودگی باکتری و سلامت گوساله ارتباط بالایی مشاهده گردید (P=0.00). خطر نسبی ابتلا به بیماری با مصرف آغوز آلوده ۲,۶ برابر در گوساله‌های نوزاد افزایش می‌یابد. همچنین با توجه به وجود تفاوت معنی‌دار (P<0.05) در میزان آلودگی نمونه‌ها بین ۴ گله مختلف در

این پژوهش و نیز وجود ارتباط بین آلودگی آغوزها با وضعیت سلامت، بیانگر وجود تفاوت در رعایت اصول بهداشتی در گله‌های مختلف و به دنبال آن تأثیر این مساله بر سلامت گوساله‌های نوزاد می‌باشد.

منابع

1- 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.
2- 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.
3- Godden S. (2008) Colostrum management for dairy calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 1;24(1):19-39.
4- McGuirk SM, Collins M. (2004) Managing the production, storage, and delivery of colostrum. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 1;20(3):593-603.
5- 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.
6- 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.