

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



سال تحصیلی: ۸۱-۸۲

شماره پایان نامه:

بررسی تأثیر ساکارومايسز بولاردی در پیشگیری از عفونت تجربی ناشی از  
سالمونلا تیفی موریوم در رت به عنوان مدل تجربی

۱۳۸۲ / ۱ / ۳۰

پایان نامه برای دریافت دکترای عمومی دامپزشکی

مرکز اطلاعات مدرک علمی ایران  
تهیه مدرک

رضا مرجانیان

استاد راهنما

دکتر محمدرضا محزونیه

سه


۴۵۵۱۹



پایان نامه برای دریافت دکترای عمومی

رضا مرجانیان

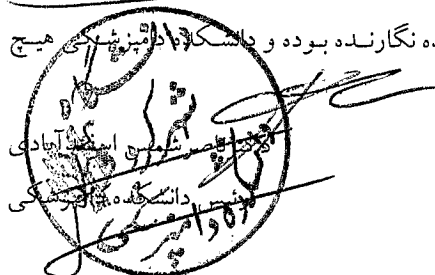
ارزیابی میزان تأثیر ساکارومایسز بولاردی در پیشگیری از عفونت تجربی  
ناشی از سالمونلا تیفی موریوم در رت به عنوان مدل تجربی

در تاریخ ۱۳۸۱/۱۲/۱۴ توسط کمیته تخصصی زیر بررسی و با رتبه  مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

استاد راهنما و رئیس هیئت داوران (استادیار)  
داور پایان نامه (استاد یار)  
داور پایان نامه (تجربی)

۱- دکتر محمد رضا محزونیه  
۲- دکتر ایرج کریمی  
۳- دکتر عزیز الله ابراهیمی

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ گونه مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.



## تقدیر و تشکر از :

شمائیکه مایه وجودتان را برای خدمت به جامعه تان و برای آموختن به شاگردانتان گذاشتید، شما که واژه واژه به من علم و سطر سطر به من زندگی آموختید: شما :  
استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد رضا محزونیه که نه تنها یک استاد در زمینه علم و دانش که استاد اخلاق و معرفت و یک دوست بی نظیر برایم بودید. فاطرات شیرین شاگردی شما همیشه در ذهنم فواید ماند و همیشه سپاسگزار زحمات بی دریغ شما فوادم بود:

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر ایرج کریمی و استاد ارجمندم جناب آقای دکتر عزیز الله ابراهیمی که از راهنماییهای فردمندانم خود مرا بهره مند ساختند و در به انتها رساندن این راه مرا یاری کردند:  
جناب آقای مهندس کریمی که در به سرانجام رساندن این مجموعه زحمات بسیار زیادی را متحمل شدند :

دوستان عزیزم محمد علی مجاهدفر، حمیدرضا (نگرز)، سعید نیک پور، سید منصور موسوی نسب و مومن عبدالوند، مجید جدیدی ارسلان فروغی، عبدالرضا رنجبر، علی رضا عربیان، رضی الله جعفری جوزانی، سید مرتضی مسینی، وسید مهدی موسوی پور دوستان بی ریا و صمیمیم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات ،  
ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع  
این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهر کرد است.

## تقدیم بہ:

ستارہ عالی فروزان زندگی، دریامای بیگران مصر و مدیت، آنما کہ تمام سختیما و مشقات  
زندگی را بخاطر پیشرفت و اعتلای من بہ جان خریدند:

### پدرم و مادرم:

آنما کہ قدمشان سرور مصر و صفا ست و عطر قدمشان حیاتبخش این تن خاکھی و خاکه  
قدمشان سرمد چشم، دستمای گرم و پیر از مصرتان را می بوسه،  
امیدوارم کہ میوه ای سالو از درخت معرفتی باشم کہ شما کاشتید و بہ پای آن رنگ چشیدید،  
توفیقی باشد تا حاصل یکے عمر گذشتہ و فداکاریتان را جبران نمایم،

## خواهران مهربانم و همسرانشان

### برادر عزیزم:

علی

سرزاد طاعات و درک علمی ازین  
تمتہ بدرک

میلاذ و مولود عزیز

و تقدیم بہ تمام کسانیکہ فویشتن را فدای بشریت کردند

۱	مقدمه.....	فصل اول
۴	کلیات.....	فصل دوم
۴	خانواده انتروباکتریاسه.....	
۵	ساختار پادگنی خانواده انتروباکتریاسه.....	
۵	پادگن پیکری.....	
۶	پادگن تاژکی.....	
۷	پادگن کپسولی.....	
		فصل سوم
۸	سالمونلا.....	
۸	تاریخچه.....	
۹	خواص کشت.....	
۱۰	خواص ظاهری.....	
۱۰	عوامل مورد نیاز جهت رشد.....	
۱۱	خواص بیوشیمیایی.....	
۱۲	محیط های غنی کننده.....	
۱۴	محیط های انتخابی و تفریقی.....	
۱۹	طبقه بندی سالمونلا ها.....	
		فصل چهارم
۲۱	ساختار پادگنی سالمونلا ها.....	
۲۱	پادگن پیکری.....	
۲۳	پادگن تاژکی.....	
۲۴	پادگن کپسولی.....	
۲۵	پادگن های فیسبریه ای.....	
۲۶	تغییرات پادگنی سالمونلا ها.....	
۲۶	تغییر پادگن پیکری.....	

۲۹	تغییر پادگن تاژکی
۳۱	مکانیسم ژنتیکی تغییر دو مرحله ای
	• فصل پنجم
۳۲	اپیدمیولوژی
۳۵	انواع حاملین باکتری
۳۶	نقش جوندگان در اپیزوتیولوژی
۳۶	پراکندگی سالمونلا
۳۶	بقای سالمونلا در طبیعت
۳۷	مقاومت سالمونلا به عوامل فیزیکی و شیمیایی
۳۷	روش های مورد استفاده در مطالعات همه گیر شناسی
	• فصل ششم
۴۰	بیماریزایی
۴۱	روند بیماریزایی آنتریت سالمونلایی
۴۳	عوامل حدت سالمونلا و نقش آنها در بیماریزایی
۴۹	بقاء سالمونلا در یاخته های ییگانه خوار
	• فصل هفتم
۵۱	ایمنی در سالمونلوز
۵۱	ایمنی با واسطه یاخته ای
۵۳	ایمنی هومورال
	• فصل هشتم
۵۴	بیماری سالمونلوز
۵۴	سالمونلوز انسان
۵۵	سالمونلوز حیوانات
۵۶	سالمونلوز گاو
۵۸	سالمونلوز گوسفند و بز
۵۸	سالمونلوز اسب
۶۰	سالمونلوز خوک
۶۱	سالمونلوز سگ و گربه
۶۲	سالمونلوز طیور



۶۳	..... سالمونلا تیفی موریوم در موش
	• فصل نهم
۶۵	..... تشخیص، درمان و پیشگیری
۶۵	..... آزمایش های میکروبیولوژی
۶۷	..... آزمایش های سرولوژی
۶۹	..... آزمایش ازدیاد حساسیت تأخیری
۷۰	..... درمان
۷۰	..... رژیمهای درمانی انسان
۷۱	..... رژیمهای درمانی حیوانات
۷۵	..... پیشگیری
۷۵	..... واکسن های سالمونلا
	• فصل دهم
۷۸	..... پروبیوتیک ها
۷۸	..... مقدمه
۷۹	..... تاریخچه
۷۹	..... تعریف پروبیوتیک ها
۸۱	..... نحوه تأثیر گذاری پروبیوتیک ها
۸۲	..... مخمرها
۸۳	..... ساکارومایسز بولاردی
۸۳	..... فارماکوکینتیک ساکارومایسز بولاردی
۸۴	..... اثرات جانبی ساکارومایسز بولاردی
۸۵	..... نحوه تأثیر ساکارومایسز بولاردی
	• فصل یازدهم
۸۷	..... کارهای عملی
۷۸	..... مواد و روش کار
۷۸	..... محیط های کشت
۸۹	..... تهیه باکتری
۸۹	..... تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
۹۱	..... مخمر ساکارومایسز بولاردی

۹۲	..... روش تهیه آنتی ژن O جهت آگلوتیناسیون
۹۲	..... رت ها
۹۳	..... قفس ها
۹۳	..... جیره غذایی
۹۳	..... آماده سازی محل نگهداری
۹۴	..... روش تهیه رقت و کشت مدفوع
۹۴	..... روش انجام تست ویدال
۹۵	..... روش انجام تحقیق
	• فصل دوازدهم
۹۸	..... نتایج
	• فصل سیزدهم
۱۱۶	..... بحث

بسم الله الرحمن الرحيم

## ارزیابی میزان تاثیر ساکارومایسز بولاردی (*Saccharomyces boulardii*) در پیشگیری از عفونت تجربی ناشی از سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella typhimurium*) در رت به عنوان مدل تجربی

سالمونلا تیفی موریوم یکی از سروتیپ های شایع جنس سالمونلاست که در انسان و حیوانات ایجاد عفونت های مختلف می نماید. این ارگانیزم به خصوص در ابتدای زندگی حیوانات و انسان همیشه مساله ساز بوده و زیانهای زیادی را به بار می آورد. از آنجا که این باکتری در حیوانات مختلف نیز شایع است باکتری از طریق مواد غذایی آلوده باعث عفونت در انسان می شود. از اینرو انسان همیشه در تلاش برای پیشگیری و درمان سالمونلوز در حیوانات بوده و راههای گوناگونی را امتحان نموده ولی به دلایلی از نتایج آنها راضی نبوده است. واکسن ها ایمنی کامل ایجاد نمی نمایند و از طرفی عوارضی نیز دارند، همچنین مصرف آنتی بیوتیکها دارای محدودیتهایی است از آن جمله ایجاد مقاومت های دارویی و باقی مانده دارویی. که بر سلامت انسان تاثیر سوء دارد.

به همین دلیل توجه ها به استفاده از پروبیوتیک ها (Probiotics) جلب شد. یکی از این مواد، مخمر ساکارومایسز بولاردی می باشد. این مخمر در فاز دو فارماکولوژی کشور آمریکا است و مراحل آزمون و مطالعات تجربی را می گذراند ولی در برخی از کشور ها به شکل تجارتي وارد بازار شده است. این مخمر نخستین بار از درخت LYCHEE جدا شد، و برای پیشگیری از اسهال های حاد عفونی، اسهال های ناشی از مصرف زیاد آنتی بیوتیک ها به کار گرفته شد.

از آنجا که در مرور مقالات از میزان تاثیر این مخمر در پیشگیری و درمان سالمونلوز گزارشی در دست نبود و به لحاظ اهمیت سالمونلا ها در کشور ما، تحقیقی پایه نهاده شد که بررسی تاثیر ساکارومایسز بولاردی در پیشگیری از عفونت تجربی ناشی از سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گیرد.

در این تحقیق تعداد ۶۰ عدد موش رت نر که از نظر سن و وزن مشابه بودند را در چهار گروه ۱۵ تایی مجزا A, B, C, D تقسیم نمودیم. به موش های گروه های A, B, C به ترتیب  $10^6$ ،  $10^7$  و  $10^8$  مخمر ساکارومایسز بولاردی و به موش های گروه D به عنوان شاهد به مدت پنج روز ۱CC سرم فیزیولوژی با پیت داده شد. همه موشها در روز پنجم ۱CC سرم فیزیولوژی با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکربی حاوی  $10^7$  باکتری سالمونلا تیفی موریوم مواجه شدند.

برای تعیین میزان تاثیر مخمر در پیشگیری از عفونت، از روش شمارش باکتری در مدفوع استفاده گردید. برای این کار یک گرم مدفوع هر یک از موشها را در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ بعد از خوردن باکتری در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط و از آن رقت های ۱۰ برابر تهیه نمودیم. از هر رقت ۰/۱ میلی لیتر برداشته و روی محیط مک کانکی کشت داه شد. کلونی های سالمونلا در پلیت های کشت داده شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتن در انکوباتور ۳۷ درجه شمارش می شد. با ضرب تعداد کلونی در عکس رقت تعداد باکتری موجود در ۱ گرم مدفوع بدست آمد. میانگین تعداد باکتری در هر گروه تعیین و با روش آماری T-Student مورد آنالیز قرار گرفت. در ضمن نمونه خون در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ پس از چالنج، برای انجام آزمایش ویدال و تعیین عیار سرمی آنتی بادی ضد سالمونلا اخذ شد.

نتایج نشان داد اختلاف معنی داری در تعداد سالمونلاهای مدفوع گروه های A, B, C با گروه D وجود دارد، به این معنی که این باکتری می تواند باعث کاهش تعداد شود. همچنین تیر آنتی بادی در گروه های A, B, C بسیار بالاتر از گروه D بود.

## فصل اول

### ۱ - ۱ - مقدمه :

از زمانهای قدیم انسان به بیماریهای واگیر پی برده و خردمندان دوران به حد دانش زمان در تکاپوی شناخت علل بیماری ها بودند تا از گزند آنها درامان باشند. اما در اوایل جز تسلیم شدن یا فرار از آنها چاره ای نداشتند و بیماریها را ارواح خبیثه مینامیدند ولی کم کم اندیشه ها شکوفا شد، و در آن تاریکی ذهن نخستین فردی که نظریه شبه میکروبی را بیان نمود کسی جز دانشمند بزرگ ایرانی محمد بن زکریای رازی نبود و بعد کم کم این علم پیشرفت نمود تا جایی که لویی پاستور رابطه بین بیماری و باکتری را بیان نمود. پس از آن هم بیماریهای جدید و راه مبارزه با آنها شناخته شد ولی آیا کار در همین جا خاتمه یافته بود؟

هرگز، بلکه عوامل بیماریزا هم به مقابله با راه کارهای انسان پرداخته و سویه های مقاوم و در نتیجه چهره های جدید بیماری به وجود آمد، بیماریهای واگیر هنوز هم خسارات زیادی وارد کرده و قربانی می گیرند.

گویی جدال بین بشر و بیماری جزئی از خلقت بشر است، یکی از این بیماریهای واگیر سالمونلوز می باشد.

سالمونلاها از دو جهت برای انسان مسئله ساز هستند :

۱- سالمونلاها از جمله بیماریهای مشترک بین انسان و دام بوده و مستقیماً انسان را متضرر می سازند.

۲- انسان همیشه در تلاش برای کسب منفعت بیشتر سعی در افزایش تولیدات دامی و افزایش راندمان غذایی دام دارد، ولی سالمونلوز با به تأخیر انداختن رشد و نمو و افزایش راندمان تبدیل غذایی همیشه مانعی بر سر راه بوده است .

بر همین اصل بود که انسان با تجویز آنتی بیوتیک به مبارزه با سالمونلا پرداخت ولی همیشه موفق نبود، زیرا:

← مقاومت های آنتی بیوتیکی مطرح شد.

← مهمتر از همه پس از درمان بیماری، حالت حامل موقت و حامل پایدار به وجود آمده و این مسائل

باعث می گردد گله و انسانهای مرتبط با دام همیشه در معرض خطر ابتلا به بیماری قرار گیرند.

« مسئله بعد اینکه همیشه پس از درمان احتمال تهاجم باکتری و عود مجدد بیماری وجود دارد.

با این مشکلات که در بالا ذکر شد بحث پیشگیری از سالمونلوز مطرح شد و شیوه های متعددی هم مورد تحقیق قرار گرفت از آن جمله :

« مؤثرترین راه رعایت بهداشت کامل می باشد ولی در مورد حیوانات در اکثر موارد امکان پذیر نمی باشد و حتی گاهی در مورد انسانها هم به طور کامل اجرا نمی گردد .

راه بعدی واکسیناسیون می باشد، استفاده از واکسن ها هم با مشکلاتی همراه است که می توان تعدادی از آنها را به شرح زیر بیان نمود:

الف- واکسن ها عوارضی نظیر درد، تورم موضعی و تب همراه دارند.

ب- استرس ناشی از واکسیناسیون سبب افت تولید و کاهش پیک تولید می گردد .

ج- واکسیناسیون ایمنی کامل ایجاد نمی کند و طبق تحقیقات تنها ۸۰٪ ایمنی می دهد.

د- و از همه مهتر هزینه ای است که بابت واکسیناسیون به دامدار تحمیل می شود.

مجموعه عوامل بالا سبب شده تا همیشه به دنبال راهی جدید برای کنترل و پیشگیری از سالمونلوز باشند یکی از راه های جدید استفاده از پروبیوتیکها<sup>۱</sup> است.

پروبیوتیک در معنای لغوی به معنای حمایت از حیات می باشد و اگر بخواهیم تعریفی از آن داشته باشیم می توان گفت :

پروبیوتیکها ارگانسمهای زنده (باکتری و مخمر) غیر بیماریزا می باشند که از طریق خوراکی مصرف شده و سبب تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش می گردد.

امروزه از مخمرهای خانواده ساکارومایسز<sup>۲</sup> خصوصاً ساکارومایسز سرویسیه<sup>۳</sup> استفاده شده و به خوبی پاسخ داده و اخیراً توجه ها به ساکارومایسز بولاردی<sup>۴</sup> جلب شده، که ساکارومایسز بولاردی هم اکنون در فاز دو تحقیقات فارماکولوژیک ایالت متحده به سر می برد.

باتوجه به این که در کشور ما سالمونلوز یکی از مشکلات دامداران می باشد خصوصاً در بدو تولد و زمان رشد، خسارات زیادی را وارد می سازد لذا به پیشنهاد و راهنمایی دکتر محمد رضا محزونیه تحقیقی طراحی گردید که پیشگیری از سالمونلاتیفی موریوم توسط ساکارومایسز بولاردی را مورد بررسی قرار داده تا اولاً خواص و توانایی ساکارومایسز بولاردی در پیشگیری از سالمونلاتیفی موریوم مشخص گردد که

1-probiotics

2-Saccharomyces

3-Saccharomyces cerevisiae

4-saccharomyces boularii

در صورت موفقیت آمیز بودن، راهی برای جلوگیری از خسارات پیشنهاد شود، شاید گامی در جهت آشنایی بیشتر با کاربرد پروبیوتیکها برداشته شود.

رضا مرجانیان دی ماه ۱۳۸۱

## فصل دوم

### کلیات

#### ۱-۲- خانواده انتروباکتریاسه<sup>۱</sup>:

خانواده انتروباکتریاسه از تعداد زیادی باکتریهای گرم منفی تشکیل شده که از آن جمله می توان به این موارد اشاره نمود:

سالمونلا<sup>۲</sup>، شیگلا<sup>۳</sup> و یرسینیا<sup>۴</sup> که بیماریزا می باشند و یا سویه هایی نظیر اشرشیا کلی<sup>۵</sup>، کلبسیلا<sup>۶</sup> و پروتئوس<sup>۷</sup> که فرصت طلب بوده و در حقیقت جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات می باشند (۱۶۹،۱۵۹،۱۴۶،۱۲۶،۱۱۷،۷۴،۴۱).

خانواده انتروباکتریاسه را براساس تخمیر قند لاکتوز به دو گروه تقسیم می کنند:

- < تخمیر کنندگان لاکتوز<sup>۸</sup> که از این گروه می توان به اشرشیا کلی، کلبسیلا و آنتروباکتر اشاره نمود.
- < غیر تخمیر کنندگان لاکتوز<sup>۹</sup> که شامل اشرشیا کلی، کلبسیلا و آنتروباکتر می باشد (۱۲۶،۱۱۷،۷۴،۴۱،۳۵).

همه اعضای خانواده انتروباکتریاسه هوازی و بی هوازی اختیاری بوده، و تماماً به جز کلبسیلا و شیگلا متحرک هستند، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت می باشند (۱۶۹،۱۴۶،۱۲۶،۱۱۷،۱۰۸،۷۴،۶۷،۴۱،۳۵).

1-Enterobacteriaceae  
2-Sallmonella  
3-Shigella

4-Yersinia  
5-Escherchia coli  
6-Klebsiella

7-Proteus  
8-lacotse fermenters  
9-Non-lactose fermenters