

جداسازی و شناسایی فلور قارچی ملتحمه چشم در گاوهای هلشتاین سالم منطقه ارومیه

میلاذ سودی^۱، عبدالله عراقی سوره^{۲*}

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: a.araghi@iaurmia.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۶/۵/۴)

چکیده

قارچ‌ها از ساکنین طبیعی سطح چشم حیوانات سالم به شمار می‌روند، اما تحت شرایط خاص مانند ضربات چشمی قادر به ایجاد بیماری می‌گردند. مطالعه حاضر با هدف شناسایی عوامل قارچی جدا شده از چشم سالم گاوهای هلشتاین در منطقه ارومیه انجام شد. سواب‌ها از ملتحمه هر دو چشم ۴۰ رأس گاو هلشتاین سالم اخذ شد و در محیط‌های سابرو دکستروز آگار و عصاره مالت کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. تأثیر سن و جنس میزبان بر فراوانی جدایه‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون‌های دقیق فیشر و من ویتنی مورد تحلیل آماری قرار گرفت. در کل تعداد ۳۴ قارچ رشته‌ای از ۲۴ رأس گاو (۶۰ درصد) و از ۲۷ چشم (۳۳/۷۵ درصد) جدا گردید. جدایه‌ها به ترتیب فراوانی شامل جنس‌های آسپرژیلوس (۴۴/۱۲ درصد)، کورولاریا (۲۰/۵۹ درصد)، پنی‌سیلیوم (۱۴/۷ درصد)، پزودآلشریا (۱۴/۷ درصد)، فوزاریوم (۲/۹۴ درصد) و اسکوپولاریوپسیس (۲/۹۴ درصد) بودند. میزان جداسازی قارچ‌ها در گاوهای مسن تر ($p=0/04$) و گاوهای نر ($p=0/032$) از فراوانی معنی‌داری برخوردار بود. مطالعه حاضر اولین گزارش از ارزیابی فلور قارچی چشم سالم گاوهای هلشتاین ایرانی است.

کلیدواژه‌ها: فلور قارچی، چشم، گاو، هلشتاین، آسپرژیلوس.

مقدمه

قارچ‌های مستقر در سطح چشم دام‌های سالم نقش با اهمیتی در ایجاد کراتومایکوز داشته و حضور آنها تحت تاثیر عوامل متعددی مثل فصل سال، جغرافیا، بستر، جایگاه و مدیریت پرورش قرار دارد (Davidson, 1991). کراتومایکوز در حیوانات اهلی به فراوانی در اسب‌ها (Andrew et al., 1998; Brooks et al., 1998) و به‌ندرت در گاوها (Ledbetter et al., 2007; Reed et al., 2013; Elligott et al., 2006; Voelter- (Ratson et al., 2013) گزارش شده است. تضعیف مکانیسم‌های دفاعی سطح چشم و به‌خصوص تخریب اپی‌تلیوم قرنیه به‌عنوان موثرترین سازوکار دفاعی، موجب هجوم قارچ‌های سطحی به‌درون استرومای قرنیه و ایجاد عفونت می‌گردد (Galera and brooks, 2012). در اسب استفاده موضعی از کورتیکواستروئیدها و آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های گوناگون خارجی چشم و ضعف ذاتی مکانیسم‌های دفاعی سطح چشم، از عوامل مهم فراوانی کراتومایکوز در این گونه دامی است. محیط اطراف اسب‌ها نیز نقش به‌سزایی در این خصوص ایفا می‌کند. وقوع آسیب‌های ضربه‌ای قرنیه و تماس آن با خاک‌های آلوده و مواد گیاهی (به‌عنوان منبعی از هاگ‌های قارچی) در اسب معمول می‌باشد (Davidson, 1991). اگرچه فلور قارچی ملتحمه چشم در بسیاری از حیوانات اهلی (Samuelson et al., 2007; Nardoni et al., 1984) و وحشی (Dupont et al., 2002; Petruzzi et al., 1994) مورد بررسی قرار گرفته، اما در نشخوارکنندگان و به‌خصوص در گاو این مطالعه در مقایسه با اسب از تعداد کمتری برخوردار می‌باشد. شکی نیست که شناخت گونه‌های قارچی

موجود در سطح چشم دام‌های سالم، می‌تواند در انتخاب داروهای ضد قارچی مناسب برای درمان آغازین کراتومایکوز مفید واقع شود. در معدود مطالعات انجام شده در گاو، کلادوسپوریوم و پنی‌سیلیوم از گونه‌های بسیار شایع در سطح چشم گاوهای سالم بوده و از دیگر قارچ‌های جدا شده می‌توان به اسکوپولاریوپسیس، آسپرژیلوس، هلمیتوسپوریوم، آلترناریا، کورولاریا، موکور، فوزاریوم و کاندیدا اشاره نمود (Samuelson et al., 1984; Sgorbini et al., 2010).

با توجه به مرور مقالات قابل دسترس مشخص می‌گردد که تاکنون گزارش منتشر شده‌ای از ارزیابی فلور قارچی ملتحمه گاوهای هلشتاین سالم در ایران وجود ندارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی فلور قارچی سطح چشم گاوهای هلشتاین و تعیین تاثیر سن و جنس گاوها روی فراوانی جدایه‌های قارچی در شرایط آب و هوایی معتدل شمال غرب ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- دام‌ها و نمونه‌برداری: پژوهش حاضر در تابستان ۱۳۹۲ روی ۴۰ رأس گاو هلشتاین ارجاعی به کشتارگاه شهرستان ارومیه انجام گرفت. گاوها از دو جنس نر ۲۴ رأس و جنس ماده ۱۶ رأس و در گروه‌های سنی زیر دو سال و بالای دو سال (هر کدام ۲۰ رأس) مورد مطالعه پیش از کشتار قرار گرفتند. قبل از نمونه‌برداری، چشم گاوهای مورد نظر به دقت مشاهده و معاینه شده و در صورت وجود نشانه‌ای از عفونت چشم مانند ریزش اشک، سرخی ملتحمه، کدورت و زخم قرنیه، دام از دور مطالعه خارج می‌گردید. با فشار انگشت بر کره چشم از

هر دو چشم، در ۱۳ رأس (۳۲/۵ درصد) برای چشم راست و در ۸ رأس (۲۰ درصد) برای چشم چپ مثبت بود. در ۱۶ رأس (۴۰ درصد) نیز کشت نمونه‌ها منجر به رشد قارچ نگردید.

در کل از ۲۷ چشم واجد قارچ (۳۳/۷۵ درصد)، تعداد ۳۴ جدایه قارچی (۶ جنس و ۸ گونه) مورد شناسایی قرار گرفت. از ۲۰ چشم (۲۵ درصد) یک گونه قارچی و از ۷ چشم (۸/۷۵ درصد) دو گونه قارچی جدا گردید. کشت ۵۳ چشم (۶۶/۲۵ درصد) نیز منفی ارزیابی شد.

جنس اسپریلوس با ۱۵ مورد (۴۴/۱۲ درصد) از کل جدایه‌ها) فراوان‌ترین جدایه بود. دیگر جدایه‌ها شامل جنس‌های کورولاریا ۷ مورد (۲۰/۵۹ درصد)، پنی‌سیلیوم ۵ مورد (۱۴/۷ درصد)، پزودآلشیریا ۵ مورد (۱۴/۷ درصد)، فوزاریوم یک مورد (۲/۹۴ درصد) و اسکویولاریوپسیس یک مورد (۲/۹۴ درصد) بودند. مخمرها از هیچ‌یک از موارد جدا نگردید. گونه‌های اسپریلوس شامل اسپریلوس فومیگاتوس ۸ مورد (۲۳/۵۳ درصد)، اسپریلوس فلاوس ۵ مورد (۱۴/۷ درصد) و اسپریلوس نایجر ۲ مورد (۵/۸۹ درصد) بود. بر اساس تحلیل آماری انجام گرفته، قارچ‌های اسپریلوس فومیگاتوس ($p=0/022$) و اسپریلوس فلاوس ($p=0/024$) در گاوهای بالای دو سال سن و قارچ پزودآلشیریا ($p=0/049$) در گاوهای نر فراوانی معنی‌داری را نشان دادند. در بررسی مجموع جدایه‌ها، فراوانی جدایه‌های قارچی در گاوهای مسن‌تر ($p=0/04$) و گاوهای نر ($p=0/032$) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۱).

روی پلک بالا و پس از ظاهر شدن پلک سوم، با استفاده از سواب خشک و استریل از سطح داخلی پلک سوم نمونه‌برداری انجام می‌گرفت. بدیهی است که در این زمان دقت کافی در عدم برخورد سواب با مژه‌ها و پوست پلک‌ها به‌عمل می‌آمد. سواب‌های اخذ شده درون لوله‌های استریل واجد نرمال سالین در دمای ۴ درجه سلسیوس هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل می‌گردید.

- مایکولوژی: در آزمایشگاه سواب‌ها در محیط سابرو دکستروز آگار کلرامفنیکل‌دار (HiMedia, India) و محیط عصاره مالت (Quelab, Canada) کشت گردیده و پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ هفته نگهداری می‌شدند. طی این مدت نحوه رشد و رنگ پرگنه‌های قارچی ثبت می‌گردید. شناسایی نهایی با تهیه لام لاکتوفنل کاتن بلو و اسلاید کالچر انجام می‌گرفت. شناسایی اسپریلوس تا حد گونه انجام شد (Quinn et al., 1994).

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۲ مورد واکاوی آماری قرار گرفت. برای تعیین تفاوت در تعداد جدایه‌ها در بین گروه‌های سنی و دو جنس از آزمون من ویتنی و در مواردی که تعداد جدایه‌ها کم بود از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید. ارزش p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی انجام شده روی چشم ۴۰ گاو هلشتاین، در کل ۲۴ رأس (۶۰ درصد) از نظر نتیجه کشت قارچی مثبت بودند. نتایج کشت در ۳ رأس (۷/۵ درصد) برای

جدول ۱- فراوانی جدایه‌های قارچی از ملتحمه گاوهای هلشتاین و آنالیز فراوانی بر حسب جنس و گروه سنی

ارزش P	فراوانی جدایه		ارزش P	جنس		قارچ
	گروه سنی			نر (n=24) ماده (n=16)		
	< دو سال (n=20)	> دو سال (n=20)		ماده (n=16)	نر (n=24)	
۰/۰۲۲	۷	۱	۰/۴۳۶	۴	۴	آسپرژیلوس فومیگاتوس
۰/۵۰	۳	۴	۰/۲۷۳	۴	۳	کورولاریا
۰/۱۷۱	۴	۱	۰/۳۲۳	۱	۴	پنسیلیوم
۰/۰۲۴	۵	-	۰/۶۹۲	۲	۳	آسپرژیلوس فلاوس
۰/۵۰	۳	۲	۰/۰۴۹	-	۵	پزودالشریا
۰/۷۵۶	۱	۱	۰/۶۴۶	۱	۱	آسپرژیلوس نایجر
۰/۲۴۴	-	۱	۰/۴۰	۱	-	فوزاریوم
۰/۵۰	-	۱	۰/۶۰	-	۱	اسکوپولاریوپسیس
۰/۰۴	۲۳	۱۱	۰/۰۳۲	۱۳	۲۱	مجموع

بحث و نتیجه‌گیری

است که در مقایسه با سطح داخلی پلک سوم احتمالاً بیشتر در معرض آلودگی با قارچ‌های محیطی قرار دارد. در بررسی حاضر تمامی جدایه‌های چشم از قارچ‌های رشته‌ای بوده و هیچ مخمری از چشم گاوها جدا نگردید. در مطالعات انجام گرفته روی چشم دام‌های مختلف معمولاً مخمرها با فراوانی بسیار کمتر از کپک‌ها جدا شده‌اند. میزان جداسازی مخمرها از چشم گاو همیشه ۷/۳۲ درصد (Araghi-Sooreh and Mohammadi, 2013)، سگ ۸ درصد (Samuelson et al., 1984)، اسب ۹ درصد (Rosa et al., 2003)، الاغ ۱۱ درصد (Nardoni et al., 2007) و گاو ۱۲ درصد (Samuelson et al., 1984) از کل جدایه‌ها گزارش گردیده است. در بررسی انجام شده روی اسب‌های عرب ایرانی، میزان جداسازی مخمرها ۲۷/۳۷ درصد بوده است (Araghi-Sooreh et al., 2003).

قارچ‌های جدا شده در مطالعه حاضر قابل مقایسه با قارچ‌های به دست آمده از چشم گاوهای دیگر کشورها

در مطالعه حاضر در چشم ۶۰ درصد از گاوهای تحت مطالعه قارچ یافت گردید. در مطالعه ساموئلسون و همکاران در سال 1984، روی گاوها این میزان ۱۰۰ درصد گزارش شده است (Samuelson et al., 1984). در مطالعات انجام شده روی دیگر دام‌های بزرگ نیز نتایج مشابه با مطالعه ساموئلسون و همکاران به دست آمده است، به طوری که در گاو همیشه ۱۰۰ درصد (Araghi-Sooreh and Mohammadi, 2013)، در اسب ۹۵ درصد (Samuelson et al., 1984)، در قاطر ۸۴ درصد (Araghi-Sooreh, 2013) و در الاغ ۷۹/۴ درصد (Nardoni et al., 2007) از چشم‌ها از نظر وجود قارچ مثبت اعلام گردیدند. علت پائین بودن آلودگی قارچی چشم گاوهای این مطالعه در مقایسه با تحقیقات مشابه را شاید بتوان در تفاوت روش نمونه‌برداری جستجو کرد. برخلاف مطالعه حاضر در تمامی مطالعات قبلی نمونه‌برداری از کیسه پایینی ملتحمه چشم انجام گرفته

ترکیب و فراوانی فلور میکروبی ملتحمه دام‌های مختلف به‌دست آمده است. در فلوریدای آمریکا (Andrew *et al.*, 2003)، جداسازی قارچ‌ها از چشم اسب‌های جوان‌تر بیشتر صورت گرفته است. در بز وجود قارچ در چشم دام‌های نر به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (Araghi-Sooreh *et al.*, 2013a). در اسب‌های عرب (Araghi-Sooreh *et al.*, 2013b)، بزودآلش‌ریا و کلادوسپوریوم در نرها و در گوسفندان (Araghi-Sooreh and Hassanpour, 2015) کلادوسپوریوم در ماده‌ها از فراوانی بیشتری برخوردار بوده‌اند. دانش چگونگی تاثیر جنسیت و سن دام بر فراوانی جدایه‌های میکروبی سطح چشم نیاز به مطالعات بیشتر و جداگانه دارد. در عین حال با توجه به فراوانی بیشتر و معنی‌دار قارچ‌ها در چشم گاوهای مسن‌تر و نر، به نظر می‌رسد در صورت وجود شرایط مستعد، امکان وقوع کراتومایکوز در این گروه از گاوها بیشتر باشد. به‌طور کلی در این بررسی قارچ‌های شناسایی شده، قابل مقایسه با گونه‌های گزارش‌گرفته برای گاوهای دیگر نقاط دنیا می‌باشد. در عین حال، در مطالعه حاضر جدایه اسپرژیلوس از فراوانی بیشتری برخوردار بود. با توجه به حضور فراوانتر اسپرژیلوس در سطح چشم گاوهای تحت مطالعه، توصیه می‌شود در درمان آغازین کراتومایکوز گاو توجه ویژه‌ای به این قارچ توکسیژنیک (toxigenic mold) معطوف گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر صادقی، آقای مهندس دلشاد و دیگر پرسنل محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه جهت

فراوان‌ترین قارچ‌های جدا شده از چشم گاوها در آمریکا کلادوسپوریوم و پنی‌سیلیوم (Samuelson *et al.*, 1984) و در ایتالیا پنی‌سیلیوم و کلادوسپوریوم بوده است (Sgorbini *et al.*, 2010). اما در بررسی حاضر، اسپرژیلوس جدایه غالب چشم گاوها بود. در مطالعات انجام شده روی دیگر دام‌های بزرگ (گاو، میش، اسب و قاطر) در منطقه ارومیه نیز قارچ اسپرژیلوس به عنوان فراوان‌ترین جدایه چشم گزارش گردیده است (Araghi-Sooreh, 2013; Araghi-Sooreh and Mohammadi, 2013). بنابراین به نظر می‌رسد که شرایط جغرافیایی، بیشتر از گونه دام در ترکیب و فراوانی فلور قارچی سطح چشم دام‌ها موثر بوده باشد. قابل توجه آن که اسپرژیلوس در گاو (Elligott *et al.*, 2006)، اسب (Andrew *et al.*, 1998; Galera and Brook, 2012) و گربه (Smith and Hoffman, 2010) مهم‌ترین عامل عفونت‌های قارچی قرنیه به حساب می‌آید. علاوه بر اسپرژیلوس، دیگر قارچ‌ها نظیر فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، رایزوپوس و تریکوسپورون، سیلیندروکارپون، اسکیتالیدیوم و مخمرهای کاندیدا، رودوتورلا و تورولوپسیس نیز از کراتومایکوز حیوانات مختلف جدا شده‌اند (Brooks, 1998; Andrew *et al.*, 2013; Ledbetter *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 1998). به نظر می‌رسد تمامی قارچ‌های ساپروفیت جدا شده در مطالعه حاضر به ویژه اسپرژیلوس قادر باشند که به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب در ایجاد کراتومایکوز گاوی مطرح گردند.

در مطالعه حاضر تاثیر مثبت سن و جنس روی فراوانی جدایه‌های قارچی چشم گاوها به اثبات رسید. نتایج مشابه در پژوهش‌های متعدد انجام‌شده روی

تضاد منافع

کمک در کشت نمونه‌ها و شناسایی جدایه‌های قارچی

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منفعی

تشکر و قدردانی می‌گردد.

ندارند.

منابع

- Araghi-Sooreh, A., Mokhber-Dezfuli, M.R. and Mohammadi-Chorsi, M. (2013a). Identification of fungal isolates from conjunctival sac in healthy goats. *Journal of Veterinary Research*, 68(4): 327-332. [In Persian]
- Araghi-Sooreh, A., Ebrahimi-Hamed, M., Mohammadpour, D. and Sadeghi-Zali, M.H. (2013b). Isolation and identification of normal conjunctival fungal flora in the Persian Arab horse. *Journal of Comparative Pathology*, 9(4): 811-816. [In Persian]
- Araghi-Sooreh, A. (2013). Identification of conjunctival fornix mycoflora of Equidae (horse and mule) in Urmia district. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 7(1): 1736-1742. [In Persian]
- Araghi-Sooreh, A. and Hassanpour, V. (2015). Prevalence of fungi in the conjunctival sac of clinically normal sheep. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21(3): 425-427.
- Araghi-Sooreh, A. and Mohammadi, N. (2013). Colonization of the normal conjunctiva in Iranian river buffalo by fungi. In proceeding of the 2nd International Congress of Large Animal Practitioners, Tehran, Iran, pp: 98.
- Andrew, S.E., Nguyen, A., Jones, G.L. and Brooks, D.E. (2003). Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*, 6(1): 45-50.
- Andrew, S.E., Brooks, D.E., Smith, P.J., Gelatt, K.N., Chmielewski, N.T. and Whittaker, C.J.G. (1998). Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). *Equine Veterinary Journal*, 30(2): 109-116.
- Brooks, B.E., Andrew, S.E., Andrew, S.E., Dillavou, C.L., Ellis, G. and Kubilis, P.S. (1998). Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis. *American Journal of Veterinary Research*, 59(2): 138-142.
- Dupont, C., Carrier, M. and Higgins, R. (1994). Bacterial and fungal flora in healthy eyes of birds of prey. *Canadian Veterinary Journal*, 35(11): 699-671.
- Davidson, M.G. (1991). *Equine ophthalmology*. In: *Veterinary Ophthalmology*. Gelatt, K.N. editor. 2nd ed., Philadelphia: Lea and Febiger, pp: 576-610.
- Elligott, C.R., Wilkie, D.A., Kuonen, V.J., Bras, I.D. and Neihaus, A. (2006). Primary *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis in a Holstein cow. *Veterinary Ophthalmology*, 9(3): 175-178.
- Galera, P.D. and Brook, D.E. (2012). Optimal management of equine keratomycosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 3(1): 7-17.
- Ledbetter, E.C., Patten, V.H., Scarlett, J.A. and Vermeylen, F.M. (2007). In vitro susceptibility patterns of fungi associated with keratomycosis in horses of the northeastern United States: 68 cases (1987-2006). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 231(7): 1086-1091.
- Nardoni, S., Sgorbini, M., Barsotti, G., Corazza, M. and Mancianti, F. (2007). Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. *Veterinary Ophthalmology*, 10(4): 207-210.

- Petruzzi, V., Schirru, F., Puddu, G., Incardona, A. and Di Pietro, S. (2002). Tamponi congiuntivali nel muflone (*Ovis musimon*): assetto micotico e batterico. In proceeding of the 10th International Fe Me Sprum Congress, pp: 48-49.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, pp: 367-421.
- Reed, Z., Thomasy, S.M., Good, K.L., Maggs, D.J., Magdesian, K.G., Pusterla, N. and Hollingsworth, S.R. (2013). Equine keratomycosis in California from 1987 to 2010 (47 cases). *Equine Veterinary Research*, 45(3): 361-366.
- Rosa, M., Cardozo, L.M., Pereira, J.S., Brooks, D.E., Martins, A.L.B., Florido, P.S.S., *et al.* (2003). Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Ophthalmology*, 6(1): 51-55.
- Samuelson, D.A., Andresen, T.L. and Gwin, R.M. (1984). Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. *American Veterinary Medical Association*, 184(10): 1240-1242.
- Smith, L.N. and Hoffman, S.B. (2010). A case series of unilateral orbital Aspergillosis in three cats and treatment with voriconazole. *Veterinary Ophthalmology*, 13(4): 227-234.
- Sgorbini, M., Barsotti, G., Nardoni, S., Brombin, M., Sbrana, A., Mancianti, F., *et al.* (2010). Seasonal prevalence of fungi in the conjunctival fornix of healthy cows during a 2-year study. *Veterinary Ophthalmology*, 13(4): 227-234.
- Voelter-Ratson, K., Monod, M., Braun, U. and Spiess, B.M. (2013). Ulcerative fungal keratitis in a Brown Swiss cow. *Veterinary Ophthalmology*, 16(6): 464-466.