



صاحب امتیاز:

انجمن علمی میکروب شناسی ایران

مدیر مسئول:

دکتر عبدالله کریمی

سر دبیر:

دکتر عبدالعزیز رستگار لاری

جانشین سر دبیر:

دکتر پرویز اولیاء

مدیر اجرایی:

دکتر محمدرضا پورمند

مدیر امور مالی:

دکتر غلامرضا ایراجیان

ویراستاران:

دکتر آذر دخت خسروی

دکتر محمد مهدی فیض آبادی

هیات تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر عبدالوهاب البرزی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دکتر پرویز اولیاء، استاد دانشگاه علوم پزشکی شاهد

دکتر محمدرضا پورشفیع، دانشیار انستیتو پاستور ایران

دکتر محمدرضا پورمند، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر محبوبه حاجی عبدالباقی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر آذر دخت خسروی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اهواز

دکتر عبدالعزیز رستگار لاری، استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر حمید عبدالهی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دکتر فاطمه فلاح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر محمد مهدی فیض آبادی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر عبدالله کریمی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر اکبر میر صالحیان، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر محمدرضا نهائی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر کیومرث قاضی سعیدی، استاد میکروب شناسی

داوران این شماره (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر گیتا اسلامی، دکتر سید سعید اشراقی، دکتر فرخ اکبری نخجوانی، دکتر پرویز اولیاء،

دکتر محمد علی بهار، دکتر محمدرضا پورشفیع، دکتر محمدرضا خرمی زاده،

دکتر آذر دخت خسروی، دکتر احمد خورشیدی مال احمدی، دکتر محمد حسین سالاری،

دکتر ملیحه طالبی، دکتر حمید عبدالهی، دکتر پریسا فرنیاء، دکتر فاطمه فلاح،

دکتر طاهره فلسفی، دکتر محمد مهدی فیض آبادی، دکتر شهلا منصوری، دکتر اکبر میر صالحیان،

دکتر محمدرضا نهائی، دکتر رسول همکار، دکتر رسول یوسفی مشعوف

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در Magiran و SID, Iran Medex, IMEMR, index Copernicus نمایه می‌گردد.

کارشناس مجله: سارا مصممی

نشانی: تهران، صندوق پستی ۷۱۵-۱۴۵۱۵

تلفکس: ۸۸۹۵۴۹۱۰

پست الکترونیک: jmicrobiology@gmail.com

آدرس سایت: www.ism.ir

طراحی و چاپ:

گروه فیروز تجارت

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

قیمت: ۲۰۰۰۰ ریال

## فهرست مندرجات

- ۱ تشخیص مولکولی جدایه های گاوی *مایکوباکتریوم بویس* از جدایه های انسانی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در ایران به روش **PCR-RFLP** و مقایسه با ۵ سویه استاندارد  
نادر مصوری، میترا صالحی، کیوان تدین، محمد محمد طاهری، کیومرث سلیمانی، رضا عارف پژوهی، سعید سپهری سرشت، مرضیه علوی\*
- ۹ کلونینگ و تعیین توالی ژن *ساکول استافیلوکوکوس اورئوس*  
شاهو منبری، محمدرضا پورمند\*، محمد حسن شیرازی، نادیا مردانی
- ۱۵ بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های *انتروکوک* مقاوم به *نکومایسین* جدا شده از نمونه های بالینی  
مهوش اسکویی\*، پریسا فرخ
- ۲۳ اثر آنتی بیوتیک های کینولونی بر بیوفیلم های تولید شده بوسیله سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری  
مینو توکلی\*، محمدرضا صعودی، فریدون ملک زاده، غزاله حاجی زرقانی
- ۳۱ ارزیابی ارتباط ژن وابسته به *سیتوتوکسین (cagA)* با اختلالات گوارشی در مبتلایان به عفونت *هلیکوباکتر پیلوری*  
معصومه دورقی، مرجان محمدی، محمد حسن شیرازی\*، مریم اسماعیلی، مریم بابابیک، سمانه صابری کاشانی، اکبر عقلائی، نازنین مهاجرانی
- ۳۷ استفاده توام فاز لیتیک و آلکالین فسفاتاز برای درمان عفونت سوختگی ناشی از اشریشیاکلی در موش آزمایشگاهی  
حسن حسین زادگان\*، محسن محمدی، ناصر پژوهی، فرزاد ابراهیم زاده
- ۴۵ تاثیر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر اتصال استرپتوکوک های دهانی در شرایط آزمایشگاه  
آرزو طهمورث پور\*، روحا کسری کرمانشاهی، رسول صالحی، عبدالرضا نبی نژاد
- ۵۳ اثر غلظت های **Sub-MIC** دو آنتی بیوتیک *سیپروفلوکساسین* و *آمپی سیلین* بر روی فعالیت همولیتیکی اشریشیاکلی  
سید اصغر هوایی\*، مرتضی ستاری، مژگان عشاقی، عبدالرزاق هاشمی شهرکی
- ۵۹ بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیماران  
شروین شکوهی\*، زهره امین زاده، کامران شرفی، مریم اشرفی
- ۶۱ فهرست موضوعی مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶
- ۶۴ فهرست نام نویسندگان مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶
- ۶۸ فهرست داوران مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶

## شرایط تهیه و ارسال مقاله

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هر سه ماه یکبار تازه ترین مطالب و نوآوری های علمی و پژوهشی اعم از علوم پایه ، بالینی، نقد علمی و گزارش موارد جالب و نادر علوم پزشکی را چاپ و منتشر میکند . پذیرش و چاپ مقالات رسیده به دفتر مجله بستگی به نظر هیأت تحریریه و قضاوت دانشمندان و متخصصین دانشگاهی داخل و خارج از کشور دارد . مسوولیت کامل منابع و مطالب مندرج در مقالات از دیدگاه علمی، اخلاقی و حقوقی بر عهده نویسندگان آنهاست . هیأت تحریریه مجله در پذیرش یا رد و ویرایش مقالات آزاد است . نقل مطالب « مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران» با ذکر مأخذ مانعی ندارد .

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران از پذیرش مقالاتی که قبلاً در نشریات فارسی زبان دیگری چاپ شده یا تحت بررسی باشند ، معذور است . نویسندگان مقالات باید در نامه خود به سر دبیر مجله به این نکته اشاره کنند که مقاله به صورت همزمان برای مجله دیگری ارسال نشده و در مجله دیگری قبلاً به چاپ نرسیده است . رعایت اخلاق در تحقیقات بالینی یا حیوانی کاملاً الزامی بوده و توجه به محرمانه بودن اطلاعات بیماران و ملحوظ نمودن شرایط تحقیق بر روی حیوانات ضروری است .

از نویسندگان مقالات خواهشمند است جهت تهیه و ارسال مقالات به موارد ذیل توجه فرمایند :

بند ( ۱ ) مقاله باید بر یک روی کاغذ با قطع ۲۹\*۲۱ سانتیمتر ( A4 ) و رعایت فاصله ۳ سانتیمتر از طرفین و فاصله سطر های متن دویل باشند و با استفاده از نرم افزار رایانه ای Word 2000 تهیه و در چهار نسخه که در یکی از آنها مشخصات کامل نویسنده یا نویسندگان درج شده باشد و سه نسخه دیگر فاقد مشخصات نویسندگان باشد همراه با دیسکت رایانه ای به دفتر مجله میکروبی شناسی ایران فرستاده شود . ( ارسال مقاله بصورت فایل word از طریق [email:jmicrobiology@gmail.com](mailto:email:jmicrobiology@gmail.com) نیز قابل قبول می باشد)

**اصل مقاله (فارسی)**  
**عنوان مقاله : یاقوت ۱۶ ( بولد )**  
**نام نویسندگان : یاقوت ۱۲**  
**چکیده : یاقوت ۱۴ ( بولد )**  
**عنوان چکیده : یاقوت ۱۱ ( بولد )**  
**متن چکیده : یاقوت ۱۱**  
**متن مقاله : لوتوس ۱۱**  
**عناوین متن مقاله : یاقوت ۱۴ ( بولد )**

بند (۲) نام و نام خانوادگی ، رتبه علمی ، نشانی کامل پستی، آدرس الکترونیکی ، شماره تلفن نویسنده یا نویسندگان مقاله و مؤلف رابط ، عنوان و تاریخ ارسال مقاله در صفحه اول قید شود .

بند (۳) در صورتی که تعداد نویسندگان بیش از یک نفر باشد ، باید قید شود که مقاله با همکاری همه مؤلفین تهیه ، خوانده و تأیید شده است . مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران از مقالات پژوهشی گروهی استقبال میکند .

بند ( ۴ ) مقالات باید شامل عنوان، چکیده، مقدمه، مواد و روش ها، یافته ها، بحث، نتیجه گیری، تقدیر و تشکر (در صورت لزوم) و فهرست مراجع (کتابنامه) باشد .

چکیده به فارسی و انگلیسی حداکثر تا ۲۵۰ کلمه و به صورت چکیده های سازمان یافته فارسی(شامل چهار بخش: زمینه و اهداف، روش بررسی، یافته ها، نتیجه گیری) و انگلیسی ( **Background and objectives, Material and Methods, Results, Conclusion** ) و ۳ الی ۵ کلمه کلیدی ( کلید واژه ها ) از واژه های فهرست MeSH در اندکس مدیکوس باشد . گزارشهای موردی شامل چکیده غیر سازمان یافته حداکثر تا ۱۰۰ کلمه ( به فارسی و انگلیسی ) ، کلید واژه ها ، مقدمه ، گزارش مورد و بحث تفصیلی و فهرست مراجع خواهد بود .

بند (۵) مراجع باید به ترتیب استفاده در متن مقاله یا جداول و نمودارها شماره گذاری ( درون پرانتز ) و با همان شماره در فهرست مراجع قید شوند . در تهیه فهرست مراجع باید موارد زیر بر اساس معاهدات داخلی و بین المللی به دقت مورد توجه قرار گیرند .

۱-۵) اگر مرجع مجله است به ترتیب باید نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان ، حرف یا حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان ( و در صورتی که نویسندگان بیش از ۶ نفر باشند از نفر ششم به بعد عبارت *et al.* و در صورت استفاده از مرجع فارسی ، عبارت و همکاران ) ، عنوان کامل مقاله ، نام اختصاری مجله ( *Italic* ) ، سال انتشار ، شماره مجله ( **Bold**)(Volume) و شماره یا شماره های مجله ( **Numbers** ) در داخل پرانتز و شماره صفحات ابتدا و انتهای مقاله نوشته شود .

مثال انگلیسی :

Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SA, Stapleton MR, *et al.* Identification of *in vivo*-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J Infect Dis* 2006; **193**(8):1098-108.

مثال فارسی :

نوری م ، افراسیابی رادع ، زهرایی م ، پزشکیان م ، محبوب س ، بغداد چی الف و همکاران . تأثیر رژیم غذایی کم کالری ، کم کلسترول با فیبر بالا و ورزش هوازی بر میزان پلاسمایی ویتامینهای E و C در بیماران مبتلا به انسداد عروقی ، مجله پزشکی علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز ۱۳۷۹ ، سال ۳۴ ، شماره ۴۶ ، صص ۵۵ تا ۶۲ .

۵-۲) سازمان به عنوان مؤلف ؛ مثال :

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; **164**: 282-4

۵-۳) چنانچه نام هیچ مؤلفی ذکر نشود ، گروه مؤلفین مد نظر است ؛ مثال :

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

۵-۵) مجله همراه با ضمیمه تکمیلی :

Shen HM, Zhang QF. Risk Assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *environ Health perspect* 1994; 102 Suppl: 275-82.

۵-۶) اگر مرجع کتاب است ، نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان کتاب ، حرف یا حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان ، عنوان کامل کتاب (*Italic*) شماره چاپ ، محل انتشار و نام ناشر ، سال انتشار و شماره صفحات مورد استفاده .

مثال فارسی :

امتیازی گ، کریمی م. مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک - چاپ چهارم، اصفهان ، انتشارات مانی، ۱۳۸۲ ، صص ، ۲۱۵ تا ۲۱۹ .

۵-۷) چنانچه مرجع بخشی از کتاب باشد ، نام خانوادگی و حرف یا حروف اول نویسنده یا نویسندگان بخش مورد استفاده ، عنوان بخش ، نام خانوادگی و حرف یا حروف اول نام مؤلف یا مؤلفین کتاب ، عنوان کامل کتاب (*Italic*) ، شماره چاپ ، محل و نام ناشر ، سال انتشار و شماره صفحات بخش مورد استفاده .

مثال انگلیسی :

Kastner DL. Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. In: Koopman W J, ed. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 13<sup>th</sup> ed. Baltimore; Williams & Wilkins. 1997; PP: 1279-1306.

مثال فارسی :

بهرامی ف ، نوحی ع . کنترل کیفیت آزمایش لیپیدهای سرم. در کتاب : تضمین کیفیت آزمایشگاهی ، مؤلفین: محمدی ح و جلیلی ح . چاپ دوم، تهران ، مرکز نشر دانشگاهی ، ۱۳۷۵ ، صص ۵۰ تا ۶۱ .

۵-۸) رفرانس الکترونیک ( مقاله ) :

Moynagh J. The evaluations of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission, [http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.html) (Accessed May 2005).

۵-۹) رفرانس الکترونیک (سازمان به عنوان مؤلف) :

Food and Drug Administration. Revised preventive measures for blood products, 2001. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3817b1.htm> (Accessed May 2002).

بند ۶) تعداد اشکال و جداول نباید جمعاً از چهار مورد تجاوز کند و باید در صفحات جداگانه در آخر مقاله آورده شود. از اشکال (منحنی ها ، نمودارها، تصاویر میکروسکوپی ، رادیوگرافی و ...) عکس برقی سیاه و سفید در اندازه (۷۳\*۱۲۷) میلی متر و حداکثر (۲۰۳\*۲۵۴) میلی متر تهیه و اصل آن ارسال گردد.

بند ۷) بدون در نظر گرفتن صفحه اول و اشکال و جداول و نمودارها ، تعداد کل صفحات مقاله نباید از ۶ صفحه تجاوز کند .

بند ۸) مجله میکروب شناسی پزشکی ایران از بازگرداندن مقالات تأیید نشده توسط هیئت تحریریه به نویسندگان آنها معذور است . در صورت درخواست کتبی نویسنده رابط ، فقط عکسها و تصاویر اصلی باز گردانده می شود .

بند ۹) مقالات رسیده در صورت تأیید داوران در اولویت چاپ قرار می گیرد و پس از چاپ مقاله، سه نسخه از شماره مجله به نویسنده رابط ارسال خواهد شد.

## تشخیص مولکولی جدایه های گاوی مایکوباکتریوم بویس از جدایه های انسانی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران به روش PCR-RFLP و مقایسه با ۵ سویه استاندارد

نادر مصوری<sup>۱</sup>، میترا صالحی<sup>۲</sup>، کیوان تدین<sup>۱</sup>، محمد محمد طاهری<sup>۱</sup>، کیومرث سلیمانی<sup>۱</sup>، رضا عارف پژوهی<sup>۱</sup>، سعید سپهری سرشت<sup>۳</sup>، مرضیه علوی<sup>۱و۲\*</sup>

(۱) بخش تولید PPD، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج  
(۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال  
(۳) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران  
نویسنده رابط: مرضیه علوی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال  
همراه: ۰۹۱۲۲۳۸۳۲۸۳ m.alavi1387@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

### چکیده:

**زمینه و اهداف:** کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مجموعه مایکوباکتریوم های با شباهت ژنتیکی زیاد تشکیل شده که با توجه به طولانی بودن زمان انکوباسیون، تعیین هویت این باکتری ها بسیار مشکل است. به دلایل بهداشتی، تمایز بین مایکوباکتریوم بویس از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس از اهمیت ویژه ای برخوردار است. هدف این تحقیق ارزیابی یک روش جهت افتراق مایکوباکتریوم بویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.

**روش بررسی:** یک قطعه از شبه ژن *oxyR* به طول ۵۴۸ جفت باز هدف آزمایش PCR-RFLP قرار گرفت. نوکلئوتید ۲۸۵ از قطعه هدف مذکور در ژنوم مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG، حاوی باز آدنین، در حالی که در تمامی دیگر اعضاء کمپلکس توبرکلوزیس حاوی باز گوانین می باشد که باعث از بین رفتن یک سایت عملکرد آنزیم *AluI* می شود. لذا در قطعه مذکور، در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG چهار سایت برش، در حالی که در سایر مایکوباکتری های کمپلکس، سه سایت برش توسط این آنزیم وجود دارد. در ۶ جدایه بالینی مایکوباکتریوم جدا شده از انسان و ۵۰ جدایه گاوی و ۵ سویه استاندارد، قطعه مورد نظر از شبه ژن *oxyR* توسط PCR تکثیر و سپس با استفاده از آنزیم *AluI* برش داده شد و الگوهای برش با یکدیگر مقایسه شد.

**یافته ها:** در تمامی موارد مربوط به مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG سه قطعه ناشی از برش، در حالی که در تمامی موارد مربوط به سایر مایکوباکتری ها، یک قطعه ناشی از برش مشاهده شد.

**نتیجه گیری:** روش PCR-RFLP بر روی شبه ژن *oxyR* روشی سریع و دقیق جهت افتراق مایکوباکتریوم بویس از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس می باشد.

**کلید واژه ها:** مایکوباکتریوم بویس، کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، شبه ژن *oxyR*، PCR-RFLP، *AluI*

**مقدمه:**

سل به عنوان بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام از گذشته های دور مورد توجه بشر قرار گرفته است که در اثر مایکوباکتریوم به وجود می آید (۱). با وجود روش های مختلف درمان، این بیماری درصد بالایی از مرگ و میر را به خود اختصاص می دهد و در برخی کشورهای پیشرفته شیوع مجدد آن مشاهده گردیده است (۲). لذا به کارگیری روش های نوین جهت تشخیص سریع و دقیق این بیماری بخصوص همزمان با گسترش بیماری ایدز و مساله مقاومت چند دارویی بسیار حائز اهمیت می باشد. مایکوباکتری های پستانداران ژنوم مشابهی دارند و تمامی موارد بیماریزای شدید، در یک گروه به نام کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قرار می گیرند (۳). در اکثر موارد، عامل بیماری سل در انسان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و در گاو مایکوباکتریوم بویس می باشد، اما مایکوباکتریوم بویس می تواند در انسان نیز ایجاد بیماری کند. از سوی دیگر، مایکوباکتریوم بویس دارای طیف میزبانی وسیع می باشد (۴)، لذا پیدا کردن سریع و به موقع منبع عفونت، در پیگیری مسیر انتقال ضروری می باشد. زیرا با وجود این که گاو میزبان اصلی این مایکوباکتریوم است، ولی در بسیاری از پستانداران دیگر نیز باقی می ماند. از آنجایی که مایکوباکتری های پاتوژن دارای دوره انکوباسیون طولانی می باشند، تشخیص آزمایشگاهی آنها با مشکلاتی مواجه می شود. به نحوی که تعیین هویت و حساسیت دارویی این باکتری ها، مستلزم گذشت مدت زمان ۲ تا ۴ ماه می باشد (۵). در حال حاضر جهت تشخیص این باکتریها، از تست های مختلف بیوشیمیایی مانند تست تجمع نیاسین، احیاء نیترات، کاتالاز و بررسی اثر تیوفن - ۲- کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) در ممانعت از رشد مایکوباکتری استفاده می شود (۶). همچنین روشهای ایمونولوژیک مانند روش آگلوتیناسیون توسط پادتن های سرم خرگوش، ایمونو فلورسانس، ایمونودیفیوژن، ایمونو الکتروفورز و نیز روش الایزا برای آنالیز پادگنی مایکوباکتری ها مورد استفاده قرار می گیرند که معمولاً وقت گیر، پرهزینه و بعضاً دارای حساسیت و ویژگی پایین می باشند (۷). لذا در بررسی سیر تکاملی گونه ای و تشخیص گونه ای مایکوباکتری ها و نیز افتراق گونه های کند رشد و تند رشد می توان از تکنیک های مولکولی جدید بهره گرفت. برای ردیابی DNA مایکوباکتری ها در نمونه های بالینی، پروب های اسید نوکلئیک مورد استفاده قرار گرفته اند، ولی به دلیل حساسیت بسیار محدود آنها، استقبال خوبی از این روش ها نشده است (۸). روش

PCR امکان تکثیر DNA را در چند ساعت فراهم می آورد. انجام چند واکنش متفاوت PCR به صورت همزمان توسط روش مالتیپلکس PCR امکان پذیر است. بنابراین می توان از این تکنیک جهت افتراق گونه های مایکوباکتریوم استفاده کرد (۹). یکی از مشکلات PCR آلودگی در حین انجام کار است که با بکارگیری تکنیک های اصلاحی، اشکالات آن مرتفع گردیده است (۱۰). هدف از این مطالعه، بکارگیری یک روش مولکولی جهت تشخیص مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس می باشد که در آن از تکنیک های PCR<sup>۱</sup> و RFLP<sup>۲</sup> به صورت همزمان استفاده شده است.

**مواد و روش ها:**

**جداسازی و تشخیص جدایه ها:** ۶ جدایه بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۵۰ جدایه بالینی مایکوباکتریوم بویس که در مناطق مختلف ایران به ترتیب از خلط انسان و عقده لنفاوی گاو جداسازی شده و به موسسه واکنش و سرم سازی رازی ارسال شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین از ۵ سویه استاندارد شامل سه سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (C, DT, PN)، یک سویه مایکوباکتریوم بویس (AN5) و یک سویه مایکوباکتریوم بویس BCG (1173P2) جهت مقایسه استفاده گردید. تمامی جدایه های بالینی و سویه های استاندارد جهت تکثیر و بررسی سرعت رشد در محیط های شیب دار لوونشتاین جانسون حاوی پیرووات (برای افتراق جدایه های مایکوباکتریوم بویس) و لوونشتاین جانسون حاوی گلیسرین (برای افتراق جدایه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) کشت داده شدند. جهت افتراق گونه ها، تست های بیوشیمیایی شامل تجمع نیاسین، احیاء نیترات، تعیین فعالیت کاتالاز در دو دمای ۲۲ و ۶۸ درجه سانتیگراد و بررسی اثر تیوکسی فن - ۲- کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) انجام گرفت (۱۰).

استخراج DNA: استخراج DNA از مایکوباکتری ها به روش معرفی شده توسط Van Soolingen انجام گرفت (۱۱). جهت بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری با روش نانودراپ استفاده گردید (۱۲).

تکثیر قطعه DNA از شبه ژن *oxyR*: شبه ژن *oxyR* یک شبه ژن مشترک در تمامی مایکوباکتری ها می باشد. یک قطعه از شبه ژن *oxyR* که واجد ۵۴۸ جفت باز می باشد، در این مطالعه مورد

الکتروفورز محصولات RFLP: جهت الکتروفورز محصولات RFLP ژل آگاروز ۱/۸٪ تهیه گردید. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۶ ولت به مدت ۵۵ دقیقه انجام گرفت. پس از الکتروفورز، ژل آگاروز در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۳٪ رنگ آمیزی و سپس برای مشاهده باندها از دستگاه ژل داگ استفاده گردید.

### یافته ها:

در این مطالعه از روش PCR-RFLP جهت افتراق گونه ها استفاده شد. ژن تکثیر یافته از طریق PCR در این تحقیق قطعه ای از شبه ژن *oxyR* بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز جداسازی شدند. در تمامی جدایه های انسانی، جدایه های گاوی و سویه های استاندارد مورد مطالعه، باند مربوط به قطعه ۵۴۸ جفت بازی مشاهده شد (شکل شماره ۱). بنابراین ثابت شد که تمامی جدایه های مورد نظر به کمپلکس توبرکلوزیس تعلق دارند. پس از تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR توسط آنزیم محدود کننده *AluI* برش داده شد. آنزیم *AluI* بر روی قطعه ۵۴۸ جفت بازی در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG واجد ۴ ناحیه برش است، بنابراین باید پس از برش ۵ قطعه با اندازه های ۲۳۸، ۱۴۸، ۷۹، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی دیده شود، اما تنها یک الگوی سه باندهای شامل قطعات ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده شد (شکل شماره ۲). در مورد سایر مایکوباکتریوم های کمپلکس توبرکلوزیس نیز قطعه ۵۴۸ جفت بازی واجد سه ناحیه برش برای آنزیم *AluI* است و باید قطعات ۲۳۶، ۲۲۷، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی دیده شود، اما تنها یک باند ۲۳۰ جفت بازی قابل رویت بود که این باند نماینده قطعات ۲۳۶ و ۲۲۷ جفت بازی بود (شکل شماره ۲). با استفاده از این روش، تمامی ایزوله های جدا شده از انسان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تمامی ایزوله های جدا شده از گاو مایکوباکتریوم بویس تشخیص داده شدند (شکل شماره ۳).

استفاده قرار گرفت. جهت تکثیر این قطعه از پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده گردید.

مخلوط واکنش در هر لوله شامل موارد ذیل بود: ۵μl از بافر PCR (10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, and 0.1% Triton X-100)، 0.2mM از هر یک از *dNTPs*، 1μM از پرایمر و 1.25U از آنزیم *Taq polymerase*. حجم نهایی واکنش 50μl بود.

دنا تورا سیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام شد، سپس تکثیر در ۳۰ سیکل به ترتیب زیر انجام گرفت: دنا تورا سیون در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ ثانیه و پلی مریزاسیون (extension) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۲ ثانیه. پلی مریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR: جهت الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۸٪ استفاده گردید. جهت تعیین وزن مولکولی از 100-1000 bp ladder (Roche, German) استفاده شد. الکتروفورز در ۸۶ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۳٪ رنگ آمیزی شد. جهت مشاهده و تصویر برداری از باندهای احتمالی، از دستگاه ژل داگ استفاده گردید.

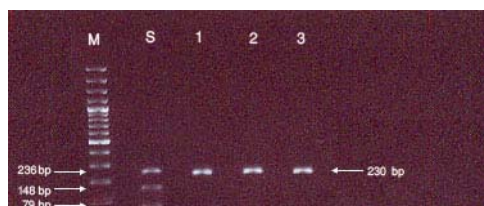
RFLP: پس از مشاهده باند مورد نظر در محصولات PCR، از آنزیم *AluI* (Roche, German) جهت برش دادن محصول PCR استفاده شد. قطعه ۵۴۸ جفت بازی شبه ژن *oxyR* در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG واجد ۴ سایت برش توسط آنزیم *AluI* است، در حالی که در سایر مایکوباکتریوم های کمپلکس توبرکلوزیس واجد ۳ سایت برش می باشد. ۵ میکروگرم از محصول PCR درون میکروتیوب تحت تاثیر ۲ میکرولیتر از آنزیم *AluI* قرار گرفت و میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه ۵۴۸ جفت بازی از شبه ژن *oxyR* در مایکوباکتری ها

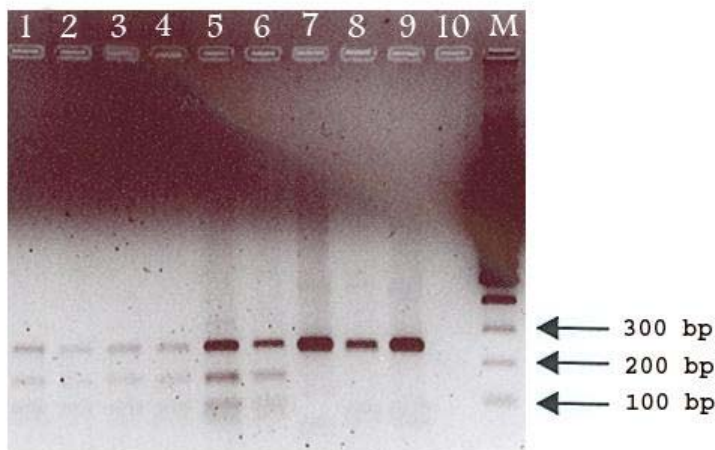
Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature	Reference
<i>oxyR</i>	F R	5'-GGTGATATATCACACCATA-3' 5'-CTATGCGATCAGGCGTACTTG-3'	548	55	Musser et al. (1996) (15)



شکل ۱: در تمامی جدایه های انسانی و سویه های استاندارد پس از تکثیر ژن *oxyR* یک باند واجد ۵۴۸ جفت باز مشاهده شد. *M*: مارکر 100-*S*: محصول تکثیر شبه ژن *oxyR* در یکی از سویه های استاندارد



شکل ۲: الکتروفورز آگاروز محصولات *PCR* شبه ژن *oxyR* پس از برش خوردن توسط آنزیم *AluI*. در جدایه های انسانی (ردیف های ۱ و ۲ و ۳) تنها یک باند ۲۳۰ جفت بازی دیده می شود، با توجه به شرایط کنترل شده الکتروفورز، این جدایه ها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. در سویه استاندارد (ردیف *S*) که مربوط به مایکوباکتریوم بویس BCG (1173P2) می باشد، سه باند ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده می شود.



شکل ۳: الکتروفورز آگاروز محصولات *PCR* شبه ژن *oxyR* پس از برش خوردن توسط آنزیم *AluI*. در جدایه های گاوی (ردیف های ۱ تا ۵) سه باند ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده می شود. در ردیف ۶ مایکوباکتریوم بویس BCG (1173P2) قرار گرفته است. در ردیفهای ۷ و ۸ دو ایزوله انسانی جهت مقایسه با ایزوله های گاوی قرار داده شده است که در آنها تنها باند ۲۳۰ جفت بازی دیده می شود. در ردیف ۹ سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و در ردیف ۱۰ کنترل منفی قرار گرفته است.

## بحث:

بکارگیری روش های مولکولی نظیر PCR-RFLP که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، افتراق سریع و دقیق بین اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را امکان پذیر می نماید. از سوی دیگر، برخی مایکوباکتری های آتیبیک نیز می توانند علائم بالینی و نشانه های پرتونگاری غیر قابل تمیز از بیماری سل را در انسان ایجاد نمایند (۱۳). استفاده از روش PCR-RFLP در این زمینه نیز می تواند مفید واقع شود. افتراق موارد فوق الذکر در راستای برنامه کنترل و ریشه کنی بیماری سل اهمیت بیشتری می یابد. محققان توانسته اند با بررسی ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مناطقی را پیدا کنند که بیشتر دچار جهش می شوند. این مناطق اکثرا مربوط به نواحی ژن های کاذب می باشد، زیرا ژن های کاذب نسبت به ژن های عملکردی بیشتر دچار تغییرات می شوند (۱۴). از جمله این مناطق می توان به منطقه ۵۴۸ جفت بازی *oxyR* اشاره کرد. در اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی، ژن *oxyR* همانند یک حسگر و یک تنظیم کننده رونویسی پروتئین های درگیر در واکنش استرس اکسیداتیو عمل می کند. این ژن در اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس درگیر جهش شده است و به احتمال زیاد *oxyR* در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک پروتئین عملکردی را بیان نمی کند، بنابراین از آن به عنوان یک ژن کاذب (pseudogene) نام برده می شود (۱۵).

در گذشته روش های متعددی جهت افتراق بین گونه های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شده است. در سال ۱۹۹۶ سرواتسان و همکاران در ایالات متحده پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن *oxyR* را جهت افتراق بین گونه ها در ۱۰۵ نمونه بالینی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که ۲۹ نمونه مایکوباکتریوم بویس و ۷۶ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده اند و بین نتایج تست های بیوشیمیایی و نتایج حاصل از مطالعه آنها هماهنگی ۱۰۰٪ وجود داشت (۱۵). از جمله ژن های دیگری که در گونه های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دچار تغییرات تک بازی شده اند، ژن پیرازینامید *pncaI69* است که مایکوباکتریوم بویس دارای گوانین در موقعیت ۱۶۹ از این ژن می باشد، در حالی که سایر مایکوباکتریوم ها واجد سیتوزین در این موقعیت هستند. در سال ۱۹۹۸ مونترئوس و همکاران از تکنیر ژن *pncaI69* با استفاده از PCR جهت افتراق بین مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند و نشان دادند که تمامی ۱۲۱ جدایه ای که قبلا به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناخته

شده اند و اکثر جدایه هایی که قبلا به عنوان مایکوباکتریوم بویس شناخته شده اند، با این روش قابل افتراق می باشند، اما جدایه های مایکوباکتریوم بویس که از بز جدا شده بودند، با این روش مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شدند (۱۶). در سال ۲۰۰۴ پرابهاکار و همکاران در ایالات متحده جهت افتراق بین مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از روش PCR برای ارزیابی وجود ژن *hupB* استفاده کردند و نشان دادند که اولاً این ژن در هیچیک از سایر مایکوباکتریوم های غیر متعلق به کمپلکس توبرکلوزیس وجود ندارد، ثانیاً به خوبی می تواند بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بویس افتراق ایجاد کند (۱۷). در سال ۲۰۰۵ چوهان و همکاران یک روش نوین *Nested PCR* را برای افتراق بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بویس ارزیابی کردند و نشان دادند که این روش می تواند حتی وجود ۵ باسیل توبرکل را در نمونه های بالینی ردیابی کند (۱۸). در سال ۲۰۰۶ ارایز و همکاران از یک روش مالتیپلکس PCR جهت افتراق مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس بهره گرفتند (۱۹).

محققان جهت طبقه بندی اعضاء کمپلکس توبرکلوزیس از نوکلئوتید چند شکلی کاتالاز (*katG463*) و ژیراز (*gyrA95*) نیز استفاده کرده اند (۲۰). تفاوت های موجود در *Direct DR* (Repeat) که در تکنیک *DNA fingerprinting* از آن استفاده می شود (۲۱)، همچنین نواحی ژنومی متغیر ژن زیرواحد بنای *RNA* پلی مرز (*rpoB*) و ناحیه بسیار متغیر از *16srRNA* و نیز نواحی حذف شده *RD5* و *RD7* با استفاده از تکنیک *Spoligo typing* نیز جهت تمایز بین اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده می شوند (۲۲). محققان با مطالعه توأم این ژنها به وجود یک طیف از مشخصات ژنوتایی - علی رغم مشخصات فنوتایی مشابه - در میان جدایه های مایکوباکتریوم بویس پی برده اند، در حالی که تحقیقات نشان می دهد که در بین جدایه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تنوع ژنتیک کم می باشد (۲۳). تحقیقی که بر این اساس توسط سیلز و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شده دلالت بر وجود یک فیلوژنی پیچیده بین جدایه های مایکوباکتریوم بویس مربوط به نمونه های با منشأ انسانی و حیوانی دارد که در مورد جدایه های این باکتری در ایران تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم می باشد (۲۴).

## نتیجه گیری:

مبتلا به سل ریوی و خارج ریوی، بخصوص بیماران دارای نقص ایمنی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۵). مایکوباکتریوم بویس را می توان از سل انسانی نیز جدا نمود، همچنین احتمال جداسازی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از موارد سل غیر انسانی وجود دارد. تعیین میزان شیوع و بروز عفونت های انسانی که توسط مایکوباکتریوم بویس ایجاد می شود، بسیار ارزشمند می باشد و به عنوان شاخص بهداشتی جامعه مطرح می باشد (۲۶). روش استفاده شده در این تحقیق مشابه روش سریواتسان و همکاران (۱۵) بود که هدف از تکرار آن بررسی کارایی این روش در افتراق ایزوله های ایران و در بهینه سازی تولید توبرکولین بود.

## تقدیر و تشکر:

جا دارد از تمامی کارکنان محترم موسسه واکسن و سرم سازی رازی بخصوص پرسنل فداکار بخش توبرکولین که در راستای تحقق اهداف این پروژه از هیچ کوششی دریغ نکردند نهایت تشکر و قدردانی به عمل آید.

گرچه یافته های این تحقیق که با استفاده از روش مولکولی *PCR-RFLP* به دست آمده نشان می دهد که می توان با دقت و سرعت بالا و بی نیاز از گذراندن دوره های انکوباسیون طولانی مایکوباکتری و انجام تست های افتراقی، مایکوباکتریوم بویس را از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داد، اما این امکان وجود دارد که آنالیز شمار بیشتری از جدایه ها باعث شناسایی ارگانسیم هایی شود که با بکارگیری روش فوق نتیجه مشابهی به دست نیاورند که علت آن را می توان به ارتباط بسیار نزدیک ژنتیک و فیلوژنی پیچیده بین اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت داد و نیاز به تحقیقات بیشتر را طلب می کند، اما می توان نتیجه گرفت که در حال حاضر روش *PCR-RFLP* مبتنی بر *oxyR* یک روش ارزشمند جهت افتراق سریع و دقیق مایکوباکتریوم بویس از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس است که این خود علاوه بر کنترل سریع بیماری در دام و انسان، در درمان به موقع بیماران

## فهرست مراجع:

1. Rastogi N, Legrand E and Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 2001; **20** (1): 21-54.
2. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, and de Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 1993; **31** (5):1143-1147.
3. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, and Niemann S. Use of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(8):3699–3703.
4. Pavlik I, Yayo Ayelle W, Havelkova M, Svejnochova M, Katalinik-Jankovic V, and Zolnir-Dovc M. *Mycobacterium bovis* in human population in four Central European countries during 1990–1999. *Vet Med – Czech* 2003; **4**: 90–98.
5. Shinnick TM, and Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**(11):884-901.
6. Kent PT, and Kubika GP. 1985; *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.
7. Miller DS, Collins MT, Smith BB, Anderson PR, Kramsky J, Wilder G, et al. Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. *J Vet Diagnos Invest* 2000; **12**(4):345-353
8. Heifets LB, and Good RC, Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington DC; American Society for Microbiology. 1994; pp.85–109.
9. Brand NJ, Vallins WJ, Yacoub M and Barton PJR, The polymerase chain reaction and its applications to basic research in molecular biology. In: Grange JM, Fox A and Morgan NL eds. *Genetic manipulation: techniques and*

- application. Oxford; Blackwell. 1991; pp.279-293.
10. Herrera EA, Perez O and Segovia M, Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by a multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1996; **80**(6):596-604.
  11. van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM, Ritacco V, et al. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994; **32**(10):2425-2433.
  12. Shanks OC, Atikovic E, Blackwood D, Lu J, Nobel RT, Domingo JS, et al. Quantitative PCR for Detection and Enumeration of Genetic Markers of Bovine Fecal Pollution. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**(3):745-752.
  13. Leite CQF, de Souza CWO, and Leite SR, Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; **93**(2):801-805.
  14. Li WH, Gojobori T, and Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature (London)* 1981; **292**(5820):237-239.
  15. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, Siddiqui S, Khalaf CA, et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1996; **34**(8):2007-2010.
  16. de los Monteros LEE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia Marin JF, Martin C, et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(1):239-242.
  17. Prabhakar S, Mishra A, Singhal A, Katoch VM, Thakral SS, Tyagi JS, et al. Use of the *hupB* encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(6):2724-2732.
  18. Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, et al. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel Nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(11):5670-5678.
  19. Arraiz N, Romay Z, Faria N and Mujica D, Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* clinical isolates by multiplex PCR assay. *Revista Cientifica-Facultad de Ciencias Veterinarias* 2006; **16**(5):622-628.
  20. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:9869-9874.
  21. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(4):907-914.
  22. Kox LFF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM and Kolk AHJ, PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(12):3225-3233.
  23. Huard RC, Fabre M, de Hass P, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* 2006; **188**(12):4271-4287.
  24. Sales MPU, Taylor GM, Hughes S, Yates M, Hewinson G, Young DB, et al. Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(12):4558-4562.
  25. Kristjansson M, Green P, Manning HL, Slutsky AM, Brecher SM, Fordham Von Reyn C, et al. Molecular confirmation of bacillus Calmette-Gue'rin as the cause of pulmonary infection following urinary tract instillation. *Clin Infect Dis* 1993; **17**(2):228-230.
  26. Blazquez J, Espinosa LE, de Los Monteros LEE, Samper L, Martin C, Guerrero A, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(6):1390-1393.



## کلونینگ و تعیین توالی ژن ساکول استافیلوکوکوس اورئوس

شاهو منبری، محمدرضا پورمند\*، محمد حسن شیرازی، نادیا مردانی

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده رابط: محمدرضا پورمند، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰ mpourmand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

### چکیده:

**زمینه و اهداف:** عفونت های طبیعی استافیلوکوکوسی و واکسن های حاوی سلول کامل باکتری توانایی کمی در برانگیختن آنتی بادی های میزبان دارند. در حالی که آنتی بادی های اختصاصی بر علیه آنتی ژن های نوترکیب استافیلوکوکوسی بسیار محافظت کننده هستند. ساکول آنتی ژنی است که به تازگی شناخته شده است و اطلاعات اندکی در مورد ویژگی های ساختاری و ایمونولوژیکی آن وجود دارد. هدف این مطالعه کلون کردن و تعیین توالی ژن ساکول استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

**روش بررسی:** پس از تهیه پرایمرهای اختصاصی قطعه ای از ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر یافت و به همراه پلاسمید با آنزیم های *XhoI* و *NdeI*، به صورت انتهای چسبان تولید گردیدند. پس از ترانسفورم *pET21asacol* به درون باکتری حد واسط اشیریشیا کلی، پلاسمید نوترکیب با روش های هضم آنزیمی و تعیین ترادف ارزیابی شد. در نهایت ژن *sacol* با استفاده از نرم افزار مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** ژن ساکول به طول ۷۲۳ جفت باز با توالی صحیح، کلون گردید. هضم آنزیمی با موفقیت انجام شد بدین ترتیب که ساکول به طور کامل از پلاسمید جدا گردید. تعیین توالی شباهت ۱۰۰ درصد را با ژن الگوی اولیه از استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. بررسی نرم افزاری حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی به وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون را کد کرده و دارای ۲۶۷ اسید آمینه می باشد که در انتهای N- ترمینال دارای یک C51 پپتیداز و در ساختار ثانویه خود دارای ۱ ماریپیچ آلفا و ۱۴ صفحه بتا می باشد.

**نتیجه گیری:** ساکول در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است و ممکن است در اکثر عفونت های استافیلوکوکوسی نقش داشته باشد. مطالعه نقش ایمونولوژیک و بررسی تنظیم بیان آن در مطالعات آتی اهمیت آن را فاش خواهد ساخت.

**کلید واژه ها:** استافیلوکوکوس اورئوس، ساکول، کلونینگ

**مقدمه:**

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی و عفونت های کسب شده از اجتماع است که می تواند عامل عفونت های مهمی همچون باکتری، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندرم شوک توکسیک و عفونت های پوستی باشد (۱). مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین و متعاقب آن به متی سیلین و ونکومايسين (۲)، زمینه ساز چاره جویی برای یافتن راه حل های دیگری جهت درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن، نظیر استفاده از آنتی بادی های اختصاصی و اکسیناسیون بوده است (۳،۴). ساخت انواع واکسن های پروتئینی، پلی ساکاریدی، DNA ویا ترکیبی از آنها می تواند نتایج ثمر بخشی در پی داشته باشد (۵). به منظور ساخت این واکسن ها پی بردن به خواص آنتی ژنیک و شیمیایی انواع آنتی ژن های بیان شده در این باکتری الزامی است (۶).

علیرغم اینکه از دهه گذشته فعالیت های چشم گیری در زمینه جستجو برای یافتن یک واکسن مناسب انجام شده است اما هنوز کلینیک فاقد یک واکسن مناسب با پتانسیل بالا می باشد. هر چند که واکسن های ساخته شده از مواد پلی ساکاریدی تقریباً می توانند از عفونت های باکتریایی پیشگیری کنند اما این واکسن ها در کل ایمنی اختصاصی سروتیپ را فعال می کنند و مربوط به سروتیپ می باشند (۵). بنابراین آنتی ژن های پروتئینی که تفاوت کمی در ترادف آنها وجود دارد و از ایزوله های کلینیکی مختلف جدا می گردند اگر به عنوان واکسن استفاده شوند می توانند ثمرات رضایت بخشی در پیشگیری از این عفونت ها به همراه داشته باشند. به منظور طراحی واکسن های زیر واحدی موثر و قابل مصرف در سراسر دنیا، لازم و ضروری است که این آنتی ژن ها شناسایی شوند و از نظر خواص آنتی ژنیک و اتصال به انواع پروتئین های پلاسما مورد ارزیابی قرار گیرند (۶).

واکنش دستگاه ایمنی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بیماری زا می تواند به صورت تولید آنتی بادی های اختصاصی باشد (۷). یکی از روش های شناسایی این آنتی بادی ها استفاده از بیان مخزن های ژنی است. مطالعات اخیر پیرامون استافیلوکوکوس اورئوس منجر به شناسایی پروتئین هایی شده است که قادر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی های اختصاصی می باشند (۸،۹). اخیراً به دنبال جستجوی آنتی ژن های عرضه شده در عفونت های انسانی به مجموعه ای از ژن ها پرداخته شده است که حداقل به عنوان راه حلی جهت کاهش ناقلین این پاتوژن

کاربرد دارد. دانشمندان متوجه شدند که ۶۰ پروتئین سطحی و ترشحی در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارند که پتانسیل تولید واکسن را دارند (۶). یکی از این آنتی ژن ها پروتئین سطحی ترشح شونده A2 می باشد. ژن بیان کننده این پروتئین ساکول بوده و متعلق به خانواده ژنی Sca می باشد که در اکثر سویه های استافیلوکوکوس حفظ شده است (۱۰). خانواده Sca حاوی ۹ پروتئین است که در بخش C- ترمینال دارای شباهت ۴۰ الی ۶۰ درصد با پروتئین اصلی این خانواده یعنی ScaB هستند. در حال حاضر اطلاعات اندکی در مورد خواص این پروتئین ها موجود می باشد (۱۰). ما در این تحقیق این هدف را دنبال می کنیم که ژن ساکول را با توالی صحیح کلون کنیم و از نظر ترادف ژنی بررسی نماییم تا بتوانیم آن را در مطالعات بعدی از نظر ساختاری، فیزیولوژیکی و ایمنی شناختی مورد بررسی قرار دهیم. اما قبل از هر کاری باید با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک سیستمی طراحی گردد که بتوان این ژن ۷۲۳ جفت بازی (بدون بخش سیگنال پپتیدی) را جداسازی و در مقیاس زیاد تولید کرد. با انجام موفقیت آمیز این همسانه سازی میتوان سیستمی را جهت ساخت پلاسمیدهای حاوی سایر ژن های این خانواده معرفی و در جهت بیان این ژن ها به کار برد.

**مواد و روش ها:****تکثیر ژن *sacol***

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در ابتدا ژنوم سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه COL با استفاده از کیت (کیژن- آلمان) استخراج و به منظور کپی برداری از ژن *sacol* با به کارگیری یک جفت آغاز گر زیر مورد استفاده قرار گرفت:

5'gcg cgc cat atg tct gag caa gat aac tac ggt t 3'

5'gcg cgc ctc gag gtg aat gaa gtt ata acc agc ag 3'

باید در نظر داشت ژن *sacol* در ابتدای 5' خود دارای یک توالی ۸۱ جفت بازی است که بیان کننده سیگنال پپتیدی است که پروتئین بیان شده را در سویه وحشی به خارج از سلول ترشح می کند. بنابراین به منظور بیان صحیح این پروتئین در سویه توانا شده و عدم ترشح آن به محیط خارج از این باکتری آغازگر جلوی پس از ۸۱ نوکلوتید ابتدایی طراحی شد. به کمک آنزیم Super Taq polymerase (ژن فن آوران) از روی ژن اصلی کپی برداری شد.

مواد مورد نیاز جهت ازدیاد ژن عبارت بودند از الگو DNA ژنومیک ۲μl، پرایمر رفت و برگشت هر کدام (10μM)

در طول شب. یکی از کلونی های رشد کرده به درون محیط آبگوشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین تلقیح شد و به مدت ۵ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دور ۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

#### تعیین توالی و بررسی هضم آنزیمی

پس از تکثیر و استخراج پلاسمید (کیت کیاژن - آلمان) برای تأیید حضور قطعه ژنی *sacol*، پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم های برش دهنده *XhoI* و *NdeI* مورد بررسی هضم آنزیمی قرار گرفت. برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید استخراج شده توسط روش سکانسینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش های تعیین توالی DNA بر اساس روش Sanger و توسط شرکت ژن فناوران انجام گرفت. در تعیین توالی DNA از کیت BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit کمپانی Applied Biosystems و دستگاه ABI Sequence Analyzer 3130xl همان کمپانی استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مربوطه و توسط نرم افزارهای Chromas (Technelysium) استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مورد بررسی دقیق قرار گرفت. بازهای سؤال برانگیز با بررسی دقیق کروماتوگرام و مقایسه با کروماتوگرام توالی رشته معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور آنالیز و مقایسه تمامی تغییرات ژنتیکی از نرم افزار Chromaspro (Technelysium) استفاده شد.

#### یافته ها:

نتایج حاصل از واکنش PCR (شکل ۱) نشان داد که این ژن پس از حذف توالی کد کننده سیگنال پپتید اولیه، ۷۲۳ جفت باز طول دارد. همچنین آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET21a*sacol* با آنزیم های *XhoI* و *NdeI* (شکل ۲) نمایان ساخت که ژن *sacol* به طور صحیح در کاست بیانی مور نظر قرار گرفته است. تعیین ترادف سکانس ژن *sacol* نمایانگر آن بود که کاست بیانی به همراه پروموتور T7، محل اتصال ریوزوم، کدون آغازی (ATG)، قطعه ژن (*sacol*)، برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس های پایانی، در ترادف مناسب و به صورت پشت سرهم قرار گرفته اند. بررسی شباهت این ژن با سایر ژن های موجود در NCBI Genbank database نشان داد که ژن *sacol* در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است. بررسی نرم افزاری حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی به وزن مولکولی ۳۲ دالتون را کد کرده و دارای ۲۶۷ اسید آمینه می باشد که در انتهای

۰.۵ μl dNTPs (10mM)، بافر ۱۰ μl، کلرید منیزیم ۳ μl، آب مقطر استریل ۷۲/۷ μl و آنزیم Super Taq (polymerase) (۰/۳ μl) [5U/μl]. تمامی مواد به کار رفته در واکنش PCR از شرکت ژن فن آوران تهیه گردیدند. انجام مراحل PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (Hot start) آغاز گردیده و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه) به اتمام رسید. ژل آگارز (ژن فن آوران) ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در الکتروفورز برای مشاهده محصول تکثیر شده کپی برداری مورد استفاده قرار گرفت.

#### آنزیم های محدودالایتر و تهیه پلاسمید نوترکیب

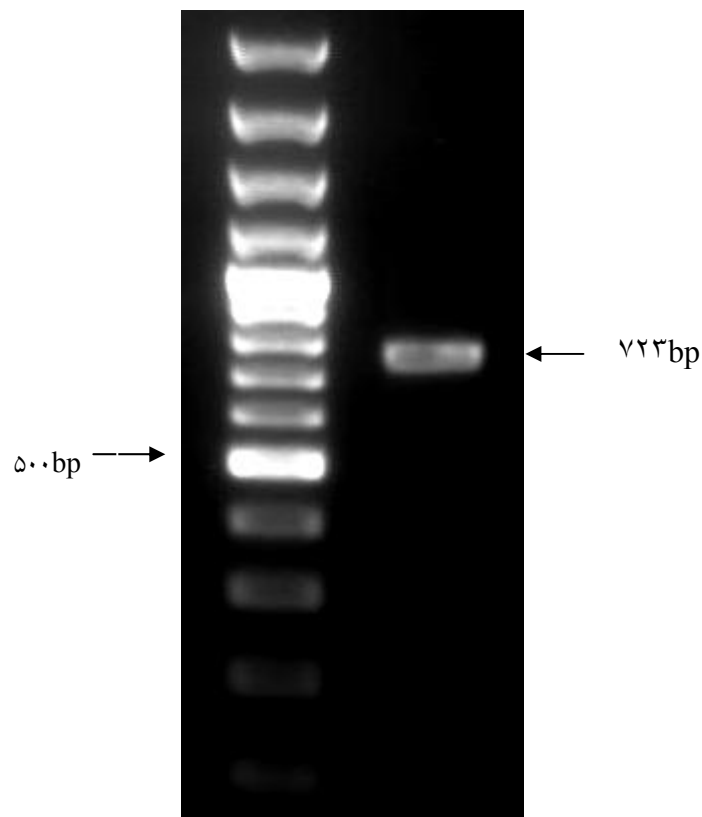
پس از شستشوی محصول کپی شده (کیت کیاژن-آلمان)، آن را به همراه پلاسمید pET21a(+) (novagen) توسط دو آنزیم برش دهنده *XhoI* و *NdeI* (ژن فن آوران-fermentase) به صورت انتهاهای چسبان به دست آورده سپس توسط آنزیم T4 (Roche) ligase به یکدیگر الحاق گردیدند. pET21a(+) دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین و پروموتور T7 می باشد. این وکتور حاوی اپرون *lac* بوده که توسط القاگر IPTG فعال می گردد. طراحی آغازگرها به گونه ای بوده است که در طرف 5' آنها سکانس های برش *XhoI* و *NdeI* قرار داشت. همچنین کدون آغازی ATG در محل *NdeI* قرار گرفت تا ژن مربوطه به طور همخوان در امتداد برچسب هیستیدینی (6XHis-tag) و سکانس پایانی (T7terminator) قرار گیرد.

#### ترانسفر ماسیون

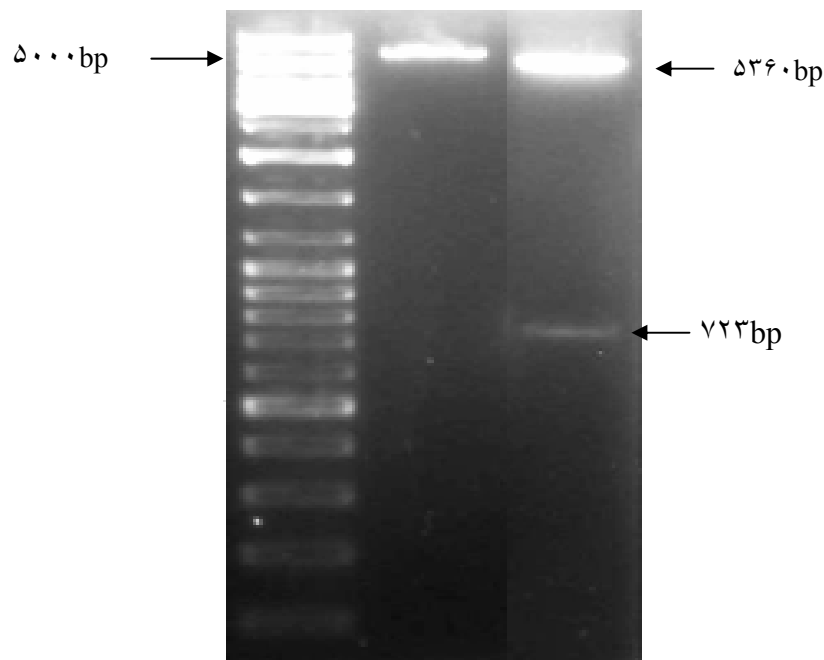
پلاسمید نوترکیب pET21a*sacol* به درون باکتری توانا شده *E. coli* TOP10 ترانسفرم شد. ترانسفر ماسیون به روش شوک حرارتی انجام گردید (۶). شرایط ترانسفر ماسیون به این ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل این باکتری، قرار دادن باکتری *E. coli* حاوی وکتور بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، اضافه کردن محیط آبگوشت LB به ویال حاوی باکتری به میزان ۹۰۰ لاند، انکوبه کردن در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت، رسوب دادن باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، کشت دادن پلت باکتری باقی مانده بر روی محیط کشت لوری-برتانی آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و انکوبه در ۳۷ درجه سانتی گراد

استافیلوکوکوس اورئوس به طور کامل حفظ شده است. در نهایت ما توانستیم برای اولین بار با استفاده از پلاسمید pET21a این ژن را با توالی صحیح کلون کنیم.

N- ترمینال دارای یک C51 پپتیداز و در ساختار ثانویه خود دارای ۱ مارپیچ آلفا و ۱۴ صفحه بتا می باشد. این پروتئین در ابتدای ۵' خود دارای یک سیگنال پپتیداز بوده و در انتهای N- ترمینال دارای یک CHAP domain بوده که در همه سویه های



شکل ۱: محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: سایز مارکر (fermentase)، ستون ۲: محصول PCR. ۷۲۳ جفت باز.



شکل ۲: بررسی نقشه آنزیمی PET21a و تایید آن توسط آنزیم های محدود کننده بر روی ژل آگارز ۱٪ ستون ۱: ساین مارکر (fermentase)، ستون ۲: پلاسمید اولیه PET21a بریده شده توسط آنزیم های *XhoI, NdeI* فاقد قطعه کلون شده، ستون ۳: وکتور *Pet21a* حاوی ژن *sacI* هضم شده با آنزیم های *XhoI, NdeI*.

## بحث:

بالایی حفظ شده است و می توانند به عنوان کاندیداهای مهمی برای ساخت واکسن مطرح شوند (۱۰). یکی از ژن هایی که هم در مقاله ETZ و هم در خانواده Sca می توان به آن اشاره کرد ژن ساکول می باشد (۶،۱۰). در اینجا بهتر است به ساختار پروتئینی این ژن توجه ویژه داشت چون کلونینگ وسیله ای برای رسیدن به پروتئین می باشد. باید دانست که اعضای خانواده Sca در استافیلوکوکوس اورئوس فاقد LPXTG در ردیف اسید آمینه ای خود می باشند، با این حال دلیل وجود پپتید سیگنال در انتهای N-ترمینال همه این خانواده ممکن است این پروتئین ها ترشحی و یا در سطح سلول باکتری عرضه شوند. شاید بتوان خانواده Sca را به عنوان زیر مجموعه ای از خانواده بزرگ پروتئین MSCRAMMS لحاظ کرد. این خانواده نقش حیاتی در کلونیزه کردن استافیلوکوکوس اورئوس روی سلول های میزبان دارد (۱۰). ما در این مطالعه با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک توانستیم یکی از ژن های این خانواده را به نام ساکول شناسایی و کلون کنیم. این مطالعه تجربی بر اساس این فرضیه استوار است که این پروتئین و سایر پروتئین های این خانواده می توانند سیستم ایمنی انسان را تحریک نموده و منجر به تولید آنتی بادی های اختصاصی شوند. به منظور بررسی خواص ایمونولوژیکی این پروتئین باید در

در سال ۲۰۰۵، Gill و همکارانش توانستند فاکتورهای ویروالانس و مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را در مقایسه با سایر سویه هایی از این باکتری ها که از پاتوژن کمتری برخوردار بودند، تعیین کنند. همچنین آن ها توانستند ژنوم کامل استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه COL را تعیین توالی نمایند (۱۲). یکی از هزاران ژن این سویه ساکول ۲۲۹۱ می باشد که در زمینه کارکرد آن در استافیلوکوکوس اورئوس تحقیقاتی صورت نگرفته است. به منظور شروعی جدی برای یافتن خواص این ژن در مرحله اول، کلونینگ آن در آزمایشگاه مولکولی گروه پاتوبیولوژی صورت گرفت. با مقایسه توالی این ژن به روش بیوانفورماتیک میتوان به برخی ویژگی های ژن پی برد ولی باید کارکرد آن را در محیط آزمایشگاه نشان داد. در سال ۲۰۰۲، Etz و همکارانش با استفاده از مخزن ژنی استافیلوکوکوس اورئوس و بیان آنتی ژن های سطحی و ترشحی و در معرض قرار دادن آنها با سرم بیماران ۶۰ آنتی ژن پروتئینی را به عنوان کاندیداهای مهم جهت استفاده در واکسن هایی که در آینده ساخته خواهند شد معرفی کردند (۶). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس خانواده پروتئینی Sca در حد

ساکول در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است و ممکن است در اکثر عفونت های استافیلوکوکوسی نقش داشته باشد. مطالعه نقش ایمونولوژیک و بررسی تنظیم بیان آن در مطالعات آتی اهمیت آن را فاش خواهد ساخت.

### تقدیر و تشکر:

این تحقیق در قالب یک طرح تحقیقاتی (۸۷-۰۱-۲۷-۶۸۲۰) در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۷ انجام شد و کلیه هزینه های بررسی حاضر، توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردیده است. ضمناً بخشی از نتایج پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد در دانشکده بهداشت می باشد.

ابتدا به صورت خالص بیان شده و در معرض فاکتورهای سرمی قرار گیرد. اولین مرحله طراحی سیستمی بود که بتوان ژن مورد نظر را در ترادف صحیح بیان و خالص سازی کرد. پروتئین بیان شده توسط این ژن دارای ۲۶۷ اسید آمینه است که با حذف سیگنال پپتید ابتدای به ۲۴۰ اسید آمینه تقلیل می یابد. در مطالعات آینده می توان با بیان این پروتئین در جهت شناخت خواص ایمونولوژیکی، فیزیولوژیکی، داشتن نقش در پاتوژنیسیته، فرایندهای سلولی و بررسی خاصیت چسبندگی به فاکتورهای سرمی نظیر لاکتوفرین، فیبرینوژن، کلاژن و... بهره ببریم.

### نتیجه گیری:

### فهرست مراجع:

- Weichhart T, Horky M. Functional Selection of Vaccine Candidate Peptides from *Staphylococcus aureus* Whole-Genome Expression Libraries In Vitro. *Infect Immun* 2003; **71**(8): 4633-4641.
- MMWR. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; **51**: 565-7
- Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* 2001; **184**: 1572-80.
- Mckenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, et al. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 1999; **284**: 1523-7.
- Foster TJ. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus* Vaccine. *Vaccine* 1991; **9**(4):221-7.
- Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Applied biological sciences* 2002; **99**(10): 6573-6578.
- Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, Yeoh H. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2002; **346**: 491-496.
- Brouillette E, Lacasse P, Shkreta L, Belanger J, Grondin G, Diarra MS, Fournier S and Talbot BG. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 2002; **20**: 2348-2357.
- Schennings T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb Pathog* 1993; **15**: 227-236.
- Pourmand MR, Foster SJ. A novel bioinformatic approach for *Staphylococcal* vaccine development. *tumj* 2006; sep: 19-27.
- Stevens DL. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**: 189-191.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol* 2005; **187**(7): 2426-2438.

## بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین

### جدا شده از نمونه های بالینی

مهوش اسکویی\*، پرینسا فرخ

بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: مهوش اسکویی، بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران | تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵ | [oskouil@yahoo.com](mailto:oskouil@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۶ | تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

#### چکیده:

**زمینه و اهداف:** انتروکوک ها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان می باشند، ولی تحت شرایطی می توانند باعث عفونت شوند و مهمتر اینکه یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی هستند. مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در انتروکوک ها، مصرف این دارو را محدود کرده است. با توجه به فراوانی فنوتیپ های *vanA* و *vanB* در میان انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین، در این مطالعه به شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی *vanA* و *vanB* در سویه های بالینی پرداخته شده است.

**روش بررسی:** ۳۲ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین، از میان ایزوله های انتروکوک جدا شده از نمونه های ادرار و یک نمونه خون مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت این سویه ها نسبت به دیسک های ونکومایسین، تیکوپلانین، تتراساکلین، جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین تعیین گردید. MIC ونکومایسین، برای تمام سویه ها با روش microdilution بدست آورده شد. بررسی وجود ژن های *vanA* و *vanB* برای ۳۱ ایزوله ای که  $MIC \geq 6 \mu g/ml$  داشتند، توسط PCR انجام شد.

**یافته ها:** بر اساس نتایج آنتی بیوگرام تیکوپلانین و MIC ونکومایسین، ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *vanA* و ۶ سویه دارای فنوتیپ *vanB* بودند. تمام سویه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و به ترتیب ۹۶/۸۷٪، ۸۱/۲۵٪ و ۷۸/۱۲٪ از سویه ها به دیسک های اریترومایسین، تتراساکلین و جنتامایسین مقاوم بودند. ژن های *vanA* و *vanB* به ترتیب در تمام ۲۵ ایزوله ای که فنوتیپ *vanA* و ۶ سویه ای که *vanB* داشتند، شناسایی شد. در ۱۳ سویه از ۲۵ سویه که دارای فنوتیپ *vanA* بودند، هر دو ژن *vanA* و *vanB* توسط PCR تکثیر شد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که از ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *vanA* ۱۲ سویه انتروکوک، فنوتیپ و ژنوتیپ *vanA* و ۱۳ ایزوله (۵۲٪) با وجود داشتن فنوتیپ *vanA*، دارای هر دو ژن *vanA* و *vanB* بودند. ۶ سویه فنوتیپ و ژنوتیپ *vanB* را دارند. با توجه به امکان ایجاد تغییر ژنوتیپی در انتروکوک ها، به نظر می رسد این ایزوله ها ژن *vanB* را از طریق انتقال پلاسمیدی بدست آورده اند.

**کلید واژه ها:** انتروکوک، ونکومایسین، *vanA*، *vanB*.

**مقدمه:**

گلیکوپپتیدها، معمولاً به راحتی می تواند از طریق انتقال پلاسمیدی (Conjugation) به انتروکوک های حساس انتقال یابد (۸ و ۷).

اخیراً نشان داده شده است که ژن های لازم برای تظاهر فنوتیپ *vanA* توسط یک ترانسپوزون به نام *Tn1546* حمل می شود. به نظر می رسد انتشار این ترانسپوزون مسئول گسترش مقاومت گلیکوپپتیدی سطح بالا بین ایزوله های بالینی انتروکوک ها است (۹ و ۸).

شرح دقیق سویه های حساس به تیکوپلانین و مقاوم در برابر ونکومایسین (*vanB*) اولین بار در آمریکا گزارش شده است. MIC این سویه ها برای ونکومایسین در محدوده ۶۴-۳۲  $\mu\text{g/ml}$  (مقاوم) و برای تیکوپلانین کمتر از ۰/۵  $\mu\text{g/ml}$  (حساس) است (۱). ژن کد کننده این فنوتیپ روی ترانسپوزون *Tn1547* حمل می شود، که ممکن است روی پلاسمیدها و یا روی کروموزوم یافت شوند (۵).

مقاومت آنتی بیوتیکی انتروکوک ها نسبت به گلیکوپپتیدها یک تهدید جهانی برای سلامت عمومی محسوب می شود. این امر به این دلیل است که آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی، مثل ونکومایسین و تیکوپلانین، داروهای انتخابی و اغلب اوقات آخرین گزینه ها برای درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از باکتری های گرم مثبت چند مقاومتی می باشند (۲ و ۱۰).

مطالعات انجام شده در ایران نیز نشان می دهد که عفونت انتروکوکی در بیمارستان های تهران حالت اندمیک دارد (۱۱) و یک عامل مهم در عفونت های بیمارستانی به حساب می آید (۱۱ و ۱۲). با توجه به این موضوع و اهمیت مقاومت انتروکوک ها به آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی و امکان انتقال ژن های مقاومت به سایر باکتری ها، و نظر به این که اطلاعات کافی در مورد میزان مقاومت سویه های انتروکوک جدا شده از نمونه های بالینی و خصوصیات ژنوتیپی آنها در ایران در دست نمی باشد، لذا در این پژوهش ما به بررسی مولکولی مقاومت *vanA* و *vanB* و اثبات وجود ژن های فوق و همچنین بررسی میزان هماهنگی بین خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی در دستجات ژنی *vanA* و *vanB* جدا شده از نمونه های بالینی که مقاوم به ونکومایسین بودند پرداختیم .

**مواد و روش ها:**

**جداسازی و شناسایی سویه ها:** در این بررسی به روش توصیفی به مطالعه ۳۲ سویه انتروکوکی مقاوم به ونکومایسین از بین سویه های انتروکوک جدا شده از دو بیمارستان (میلا و سینا) و

انتروکوک ها، کوکوس های گرم مثبتی می باشند که به عنوان پاتوژن های فرصت طلب قادرند، باعث انواع عفونت های مجاری ادراری- تناسلی، اندوکاردیت، مننژیت، عفونت های خونی و عفونت در نوزادان شوند (۱ و ۳). این میکروارگانیسم ها سومین علت معمول بیماری های باکتریایی کسب شده در بیمارستان ها می باشند. از بیست گونه انتروکوکی که تا امروز شرح داده شده اند، *Enterococcus faecium* و *Enterococcus faecalis* حدود ۹۰٪ از جدایه های بالینی را به خود اختصاص می دهند (۱ و ۳ و ۴). فشار انتخابی حاصل از استفاده بیش از اندازه آنتی بیوتیک ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوکوس ها برای کسب و انتشار عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی، از جمله عواملی هستند که باعث ایجاد مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها گردیده و ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی و اشاعه ژن های مقاومت بین این میکروارگانیسم ها و یا سایر گونه ها را موجب می شود (۵).

ونکومایسین در ترکیب با یک آمینوگلیکوزید، درمان جایگزین مؤثری را برای عفونت های شدید انتروکوکی فراهم می سازد. در بیمارانی که نمی توان آنتی بیوتیک های دسته پنی سیلین را همراه با آمینوگلیکوزیدها مورد استفاده قرار داد، گلیکوپپتیدها را می توان جایگزین نمود (۱). تاکنون شش نوع فنوتیپ مقاومت به ونکومایسین در جهان گزارش شده است (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*) (۶ و ۷). در انتروکوک ها پیش سازهای نرمال پپتیدوگلیکان دارای انتهای *D-Ala-D-Ala* هستند که تمایل زیادی در اتصال به ونکومایسین دارند، در حالیکه انتروکوکوس های مقاوم به ونکومایسین، مسیرهای بیوستز دیگری را طی می کنند که پیش سازهای انتهایی *D-Ala-D-Lac* را دارا می باشند و به طور ضعیف به ونکومایسین اتصال می یابند. ژن های *vanA* و *vanB* لیگاندهای *D-Ala-D-Lac* را کد می کنند و مسئول مقاومت متوسط تا سطح بالای اکتسابی می باشند که عمدتاً در *E. faecalis* و *E. faecium* یافت می شوند (۷).

مقاومت القایی در برابر میزان بالای ونکومایسین و تیکوپلانین فنوتیپ *vanA* را نشان می دهد که این نوع مقاومت نسبت به ونکومایسین، باعث کاهش فعالیت دیگر آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی (مثل تیکو پلانین) می گردد. مقاومت بالا به

تعیین گردید. کمترین غلظت آنتی بیوتیک که در حضور آن رشدی صورت نگرفته بود به عنوان MIC مشخص شد (۱۴ و ۱۵ و ۱۶). برای تعیین MIC از سویه های (حساس) *E. faecalis* ATCC 29212 و (مقاوم) *E. faecium* BM4147 به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد.

**استخراج و تخلیص DNA:** تمامی سویه هایی که کمترین میزان غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک و نکومایسین برای آنها  $\leq$  MIC  $\mu\text{g/ml}$  ۶ بود، برای انجام آزمون PCR در نظر گرفته شدند. برای استخراج DNA کروموزومی از کیت *mi-Bacterial Genomic DNA Isolation (metabion)* استفاده شد. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری، چند کلنی از کشت تازه باکتری به  $2\text{ ml}$  محیط BHI مایع (Brain Heart Infusion) انتقال داده شد، سپس این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت و رسوب آن طبق دستور العمل کیت مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج پلاسمید نیز توسط کیت *mi-plasmid Miniprep (metabion)* انجام شد. برای استخراج پلاسمید  $2\text{ ml}$  از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI که جذب آن در  $600\text{ nm}$ ، دو یا بیشتر باشد، رسوب تهیه شد و بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

انجام آزمون PCR جهت تعیین ژن های *vanA* و *vanB*:

به منظور تکثیر ژن *vanA* از پرایمرهای *vanA*<sub>1</sub>: ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATAC و *vanA*<sub>2</sub>: CCCCTTTAACGCTAATACGAT استفاده شد (۱۷). مخلوط واکنش بعد از بهینه سازی شامل،  $14/3\ \mu\text{l}$  آب دو بار تقطیر،  $2\ \mu\text{l}$  PCR buffer (10X)،  $2\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ،  $0/4\ \mu\text{l}$  dNTP (۱۰ mM Fermentas)،  $0/4\ \mu\text{l}$  پرایمرهای ذکر شده با غلظت  $10\ \text{pmol/ml}$ ،  $0/2\ \mu\text{l}$  Taq DNA polymerase (5u/ Fermentas)  $500\ \text{ng}$  و DNA استخراج شده بود.

ژن *vanB* نیز با استفاده از جفت پرایمر *vanB*<sub>1</sub>: CAAAGCTCCGCAGCTTGCATG و *vanB*<sub>2</sub>: TGCATCCAAGCACCCGATATAC (۱۸) با مخلوط واکنش فوق انجام گرفت.

سویه های انتروکوکی استاندارد *E. faecium* BM4147 و *E. faecalis* V583 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای PCR ژن های *vanA* و *vanB* مورد استفاده قرار گرفتند. سویه

یک مرکز آزمایشگاهی (بهار) در شهر تهران، بین سال های ۱۳۸۴-۱۳۸۶، پرداخته شد. به جز یک سویه که از خون جدا شده بود بقیه سویه ها از ادرار جدا شده بودند.

تعیین هویت هر ایزوله با مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم و بررسی ویژگی های بیوشیمیایی متداول از جمله هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا، رشد در حضور  $6/5\ \%$  NaCl، فعالیت پیرولیدونیل آریل آمیداز (PYR) انجام شد. برای تعیین گونه از آزمون تخمیر قندی (آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز و...) در لوله های حاوی محیط پایه قندی به نسبت ۱٪ از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۱۳).

انجام آنتی بیوگرام با استفاده از روش انتشار از دیسک:

آنتی بیوگرام این سویه ها به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion) با تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی در محیط Muller Hinton agar انجام شد (۱۴). دیسک های استفاده شده در این پژوهش شامل: ونکومایسین ( $30\ \mu\text{g}$ )، تتراسیکلین ( $30\ \mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10\ \mu\text{g}$ )، اریترومایسین ( $15\ \mu\text{g}$ )، سپروفلوکساسین ( $5\ \mu\text{g}$ ) و تیکوپلانین ( $30\ \mu\text{g}$ ) بودند که از شرکت MAST (انگلستان) تهیه گردید.

بررسی مقاومت به روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration):

سویه هایی که برای آنتی بیوتیک های ونکومایسین و تیکوپلانین دارای قطر هاله  $\geq 14$  میلی لیتر بودند، برای تعیین MIC انتخاب شدند. تعیین MIC به روش Micro dilution با استفاده از محیط مولر هیتون برات انجام شد. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها با غلظت نهایی  $1/5 \times 10^6\ \text{CFU/ml}$  تهیه شد و سپس این سوسپانسیون به میزان  $\frac{1}{100}$  با استفاده از محیط مولر هیتون برات رقیق گشت. استوک آنتی بیوتیک ونکومایسین با غلظت  $10\ \text{mg/ml}$ ، با استفاده از پودر خالص ونکومایسین (تهیه شده از شرکت SERVA) تهیه گردید و رقت های آنتی بیوتیکی برابر با ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۹۲، ۳۸۴، ۷۶۸، ۱۵۳۶، میکروگرم بر میلی لیتر از آن تهیه شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با رقت  $\frac{1}{100}$  به همراه غلظت های تهیه شده از استوک آنتی بیوتیک به میکروپلیت ها اضافه شد و بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، MIC سویه ها

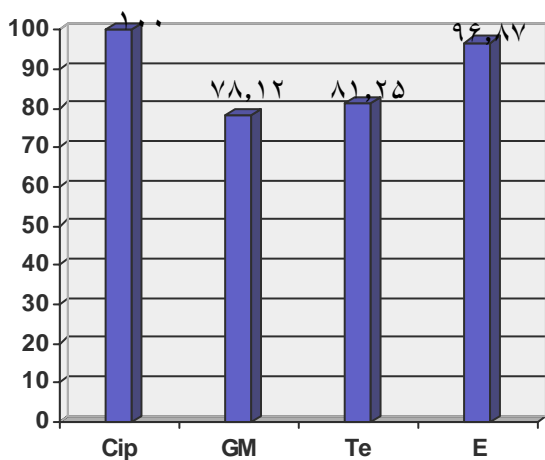
علاوه بر سویه های مذکور، در یکی از سویه های مورد بررسی (*E. faecium*) که فنوتیپ *vanA* داشت، تک کلنی هایی در هاله عدم رشد دیسک تیکوپلانتین مشاهده گردید. این سویه برای ونکومایسین  $MIC < 1536 \mu g/ml$  داشت. دو احتمال برای کلنی های رشد یافته در مرکز هاله عدم رشد دیسک های آنتی بیوتیکی وجود دارد، ممکن است آنها کلنی های جهش یافته ای باشند که به آنتی بیوتیک مقاوم شده اند و یا از ابتدا مخلوطی از دو سویه *E. faecium* متفاوت بوده اند (خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی کلنی های رشد یافته در هاله عدم رشد دیسک تیکوپلانتین با *E. faecium* مطابقت داشت). با استفاده از PFGE و Ribotyping برای کلنی های رشد یافته در مرکز هاله عدم رشد و کلنی های اطراف هاله، می توان به یکسان بودن آنها پی برد (۱۹). لذا در این مرحله این یک مورد کنار گذاشته شد و بر روی ۳۱ نمونه باقیمانده بررسی ژنوتیپی انجام شد.

در ۲۵ سویه ژن *vanA* با پرایمرهای اختصاصی این ژن توسط PCR شناسایی شدند. اندازه قطعه تکثیر شده با این پرایمرها bp ۱۰۳۰ است که معادل قطعه تکثیر شده با سویه *E. faecium* BM4147 بود. در ۶ سویه با خصوصیات فنوتیپی *vanB*، ژن *vanB* با پرایمرهای اختصاصی آن، با اندازه bp ۴۳۳ شناسایی گردید که با قطعه تکثیر شده از سویه *E. faecalis* V583 مشابه بود (شکل ۲). در ۱۳ سویه از ۲۵ ایزوله دارای فنوتیپ *vanA* هر دو ژن *vanA* و *vanB* قابل شناسایی بودند.

شکل ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوک.

Cip (سیپروفلوکسازین)، GM (جتتامایسین)، Te (تتراسکلین)، E (اریترومایسین)

درصد سویه های مقاوم



دیسک های آنتی بیوتیکی

*E. faecalis* ATCC29212 هم به عنوان کنترل منفی برای هر دو ژن استفاده شد.

PCR ژن های مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) انجام گرفت. شرایط بهینه PCR برای هر دو ژن *vanA* و *vanB* شامل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه با دمای Denaturation ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای Annealing ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای Extension ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه می باشد. مرحله Extension نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه انجام شد.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت  $0.5 \mu g/ml$  رنگ آمیزی و توسط دستگاه Gel Documentation مشاهده شد.

### یافته ها:

در میان ۳۲ سویه انتروکوک مورد بررسی در این تحقیق، با استفاده از روش های بیوشیمیایی، ۱۷ سویه *E. faecium* و ۱۵ سویه *E. faecalis* شناسایی شدند. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام و MIC به ترتیب در شکل ۱ و جدول ۱ آمده است. تمام سویه ها به دیسک سیپروفلوکسازین مقاوم بودند و به ترتیب ۹۶/۸۷٪، ۸۱/۲۵٪ و ۷۸/۱۲٪ از سویه ها به آنتی بیوتیک های اریترومایسین، تتراسکلین و جتتامایسین نیز مقاوم بودند.

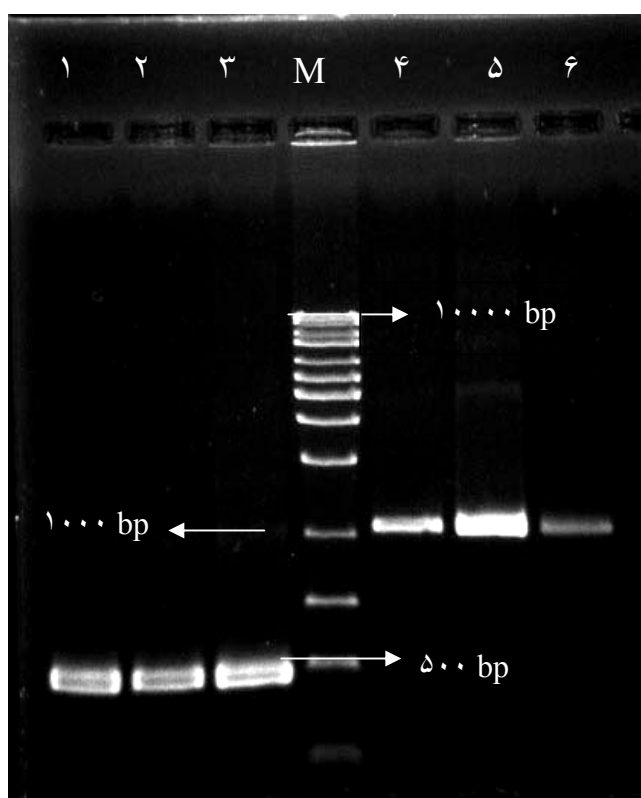
۱۶ سویه (۵۱/۶۱٪) از ایزوله های مورد بررسی، مقاومت سطح بالایی در برابر ونکومایسین داشتند ( $MIC \geq 384 \mu g/ml$ ) و به خوبی در اطراف دیسک ونکومایسین  $30 \mu g$  رشد کردند. آنها شامل ۷ سویه *E. faecalis* و ۹ سویه *E. faecium* بودند.

بر اساس نتایج بدست آمده از آنتی بیوگرام و MIC آنتی بیوتیک های تیکوپلانتین و ونکومایسین، ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *vanA* (به ونکومایسین و تیکوپلانتین مقاوم بودند) و ۶ سویه دارای فنوتیپ *vanB* (به ونکومایسین مقاوم و به تیکوپلانتین حساس می باشند) بودند.

۶ سویه انتروکوک که فنوتیپ *vanB* داشتند، دارای قطر هاله  $20 \text{ mm}$  برای دیسک  $30 \mu g$  تیکوپلانتین بودند (حساس به تیکوپلانتین) و مقادیر MIC آنها برای ونکومایسین به صورت  $12 \mu g/ml$  (۱ سویه)،  $48 \mu g/ml$  (۱ سویه)،  $192 \mu g/ml$  (۱ سویه)،  $768 \mu g/ml$  (۳ سویه) مشاهده گردید.

جدول ۱: محدوده MIC آنتی بیوتیک ونکومايسين در بين ۳۲ سويه جدا شده مقاوم به اين آنتی بیوتیک

	MIC ( minimum inhibitory concentration) $\mu\text{g/ml}$			
	۶-۲۴	۴۸-۳۸۴	۷۶۸-۱۵۳۶	>۱۵۳۶
تعداد کل (n)	۵	۱۱	۱۳	۳
<i>E.faecium</i>	۲	۶	۸	۲
<i>E.faecalis</i>	۳	۵	۵	۱
% درصد	۱۵/۶۲	۴۳/۳۷	۴۰/۶۲	۹/۳۷



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از دو ژن *vanB* (۱، ۲ و ۳) و *vanA* (ستون های ۴، ۵ و ۶). ستون ۱ و ۴ به ترتیب سويه های کنترل مثبت *E.faecalis* V583 (۴۳۳ bp) و *E.faecium* BM4147 (۱۰۳۰ bp) هستند. M: 1 kb DNA Marker

**بحث:**

شیوع وسیع انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین و یا سایر گلیکوپتید ها در نقاط مختلف جهان، مشکلات بسیاری را در جهت درمان عفونت های انتروکوکی به وجود آورده است. محدودیت انتخاب دارو در درمان این عفونت ها و از طرفی قابلیت انتقال ژن های پلاسمیدی مقاومت به ونکومایسین از انتروکوک ها به باکتری های بیماریزای مهم دیگر مثل *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pneumoniae* و یا سایر سویه های حساس انتروکوک، بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها را در آنها حائز اهمیت می سازد (۱۵).

بنابراین با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارشاتی مبنی بر ناهمگونی های فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین (۱۸)، ما به بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی ۳۲ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین که از بیماران دو بیمارستان و یک مرکز آزمایشگاهی در تهران جدا شده اند، پرداختیم.

مطالعات انجام شده در نقاط مختلف، نشان داده است که فنوتیپ *vanA* نسبت به *vanB* بسیار شایع تر می باشد (۲۰). بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز، از ۳۱ سویه مقاوم به ونکومایسین، ۲۵ سویه (۸۰/۶۴٪) دارای فنوتیپ *vanA* و ۶ ایزوله (۱۹/۳۵٪) دارای فنوتیپ *vanB* بودند. در مطالعه انجام شده روی انتروکوک های جدا شده از عفونت های بیمارستانی تهران توسط Talebi M. et al هم، ۸۴٪ سویه های مورد بررسی فنوتیپ *vanA* داشتند (۱۲). بررسی حضور ژن های مرتبط با فنوتیپ های *vanA* و *vanB* توسط PCR نشان داد که تمام ۲۵ سویه با خصوصیات *vanA* دارای ژن *vanA* بودند (۱۰۰٪). وجود ژن *vanB* نیز در ۶ ایزوله توسط PCR تأیید گردید. حائز اهمیت است که ۱۳ سویه (۵۲٪) از ۲۵ سویه دارای خصوصیات فنوتیپی *vanA*، وجود هر دو ژن *vanA* و *vanB* را نشان دادند. بنابراین ژن *vanB* در ۱۹ سویه (۶ سویه با فنوتیپ *vanB* و ۱۳ سویه با فنوتیپ *vanA*) مورد شناسایی قرار گرفت (۱۲).

طبق مطالعات انجام شده، حضور هم زمان هر دو ژن *vanA* و *vanB* در انتروکوک ها، در آمریکا، انگلستان و کره نیز گزارش گردیده است (۲۱ و ۲۳). Woo-Joo Kim, et al در بررسی انتروکوک های جدا شده از یک بیمارستان در شیکاگو بین سال های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۳ نشان دادند که ۶۹٪ از بیماران دارای عفونت با سویه های *E.faecium* با ژنوتیپ *vanB* بودند. در سال ۱۹۹۳ یک سویه *E.faecium* با Multiplex PCR وجود

هر دو ژن *vanA* و *vanB* را نشان داد و بعد از آن تا سال ۱۹۹۶

میزان ژنوتیپ *vanA* به *vanB* به نسبت  $\frac{2.2}{1}$  افزایش یافت (۲۱). مطالعات مشابهی هم در انگلستان (توسط N.Woodford, et al بین سال های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴) (۲۲) و در کره (توسط Lee W, et al بین سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹) (۲۳) بر روی سویه های انتروکوک جدا شده از بیماران انجام گرفته است. نتایج بدست آمده از هریک از این دو تحقیق نشان داد که اکثر سویه های جدا شده دارای فنوتیپ *vanB* بوده و تنها یک سویه دارای هر دو ژن *vanA* و *vanB* به طور همزمان بوده است. به نظر می رسد ایزوله هایی که هر دو ژن *vanA* و *vanB* را دارند، سویه های حد واسطی هستند که از ابتدا دارای یکی از ژن های مقاومت بوده و پلاسمید حاوی ژن دیگر را از سایر سویه های دریافت کرده و به مرور زمان، پلاسمید اولیه خود را از دست داده اند (۲۲ و ۲۳). بررسی حضور هر دو پلاسمید ۲۴ MDa و ۶۰ MDa در سویه های حد واسط، که به ترتیب حاوی ژن های *vanA* و *vanB* هستند با روش ساترن بلات و پروب های اختصاصی ژن های *vanA* و *vanB*، تأییدی بر این ادعا است (۲۲). بنابراین این ایزوله ها در تغییر فنوتیپی - ژنوتیپی سویه ها و شیوع انتروکوک هایی با ژنوتیپ جدید در بیمارستان ها بسیار مؤثر هستند (۲۱ و ۲۳).

مقاومت بالای بدست آمده در سویه های مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک های سیپرو فلوکسازین (۱۰۰٪)، اریترومایسین (۹۶/۸۷٪) و جنتامایسین (۷۸/۱۲٪) با نتایج حاصل از مطالعات قبلی بر روی نمونه های بالینی تا حدود زیادی مطابقت دارد. تنها افزایش قابل توجهی (در حدود ۴۰٪) در مقاومت به تتراساکلین در نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق، نسبت به گذشته در تهران مشاهده شده است (۱۲).

**نتیجه گیری:**

نتایج حاصل از این بررسی علاوه بر اینکه نشان می دهد در تمامی جدایه ها با فنوتیپ های *vanA* و *vanB* ژن های مورد پیش بینی وجود داشته و هماهنگی فنوتیپی و ژنوتیپی بین سویه ها موجود است. نکته مهمی را نشان می دهد و آن اینکه تعداد قابل توجهی از انتروکوک های جدا سازی شده در این مطالعه (۱۳ ایزوله)، سویه های حد واسطی هستند که حاوی هر دو ژن *vanA* و *vanB* بودند. با توجه به شیوع فنوتیپ *vanA* در سال های گذشته، به نظر می رسد که احتمالاً تعدادی از سویه های انتروکوک توانسته اند دستجات ژنی *vanB* را از طریق کنژوگاسیون بدست

گذار باشد، توجه به الگوی مقاومتی و ژنتیکی انتروکوک ها اهمیت زیادی دارد و پژوهش های دیگری که درک و دانش ما را در مورد روش ها و قابلیت انتقال ژنتیکی این مقاومت ها را افزایش دهند مورد نیاز می باشند.

بیاورند و در حال تغییر ژنوتیپ خود از *vanA* به *vanB* می باشند. تأیید این یافته به مطالعه پیوسته سویه های انتروکوکی جدا شده از بیمارستان ها، در سال های آینده نیاز دارد. از آنجایی که گسترش یک ژن مقاومت جدید، می تواند دردسرافرین بوده و روی سیاست درمانی آنتی بیوتیکی بیماران در سال های آتی تاثیر

### فهرست مراجع:

1. Donabedian, S., Ellie, H., Lee, A.T. and Chow, J.w. PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J.Bacteriol.* 2000; **50**(200):682-7.
2. Guardabassi, L. and Dalsgaard, A. Occurrence, structure, and mobility of Tn1546-like element in environmental isolates of vancomycin-resistant Enterococci. *Environ.Microbiol.* 2004; **70**(2) 984-90.
3. Biavasco F., Foglia G., Paoletti C., Zandri G., Magi G., Guaglianone E., et al. VanA-type Enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl.Environ.Microbiol.* 2007; **73**(10):3307-19.
4. Oh JY, An S, Jin JS, Lee YC, Cho DT, Lee JC. phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea. *J.Microbiol.* 2007; **45**(5):466-72.
5. Simjee, S., White, D.G., Dermott, P.F.M.C., Wagner, D.F.D. and Zerros, M.J. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated canine urinary tract infections: Evidence of gene exchange between human and animal Enterococci. *J.Clin.Microbiol.* 2003; **40**: 4659-65.
6. Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, Spicq C, Durrbach A, Nordmann P. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a vanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J.Clin.Microbiol.* 2005; **43**(8):3642-9.
7. Michel, A., Richard, Q. Regulation of *vanA*- and *vanB* type glycopeptide resistance in enterococci. *ACC.* 2001; **45** (10):375-87.
8. Daniel, F.S., Jessica, A., Kissinger, M. and Gilmore, S. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *ACC.* 1989; **33**:1588-91.
9. Huh J.Y., Lee W.G., Lee K., Shin W.S., and Yoo J.H. Distribution of insertion sequences associated with Tn1546-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in Korea. *J.Clin.Microbiol.* 2004; **42**(5):1897-902.
10. Evers, S., Courvalin, P. Regulation of *vanB*-type vancomycin resistance gene expression by the *vanS<sub>B</sub>*- *vanR<sub>B</sub>* two- component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J.Bacteriol.* 1996; **178**:1302-9.
11. Feizabadi MM., Aliahmadi A., Mobasheri F., Asgharzadeh A, Asadi S. and Etemadi G. Phenotypic characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003; **49**(4):654-9.
12. Talebi M., Eshraghi SS., Pourshafie MR., Pourmand MR. and Eshraghian MR. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Iranian J Publ Health.* 2007; **36**(4):20-5.
13. Manero A., Blanch A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl.Environ.Microbiol.* 1999; **65**(10):4425-30.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
15. Mendez, A.S., Xiomara, P. Hernandez. and C, M.F. Glycopeptide resistance in Enterococci. *Int. microbiol.* 2000 ; **3** :71-80.

16. Torres, C.V., Siodras, S.T., Gold, H.S. and Coakley, E.P.G. Restoration of vancomycin susceptibility in *Enterococcus faecalis* by antiresistance determinant gene transfer. *ACC*. 2001; **45**:973-5.
17. Miele A., Bandera M., and Goldstein B.P. Use of primers selective for vancomycin resistance genes in detection van genotype in enterococci and to study gene organization in *vanA* isolates. *ACC*. 1995; **39**(8): 1772-8.
18. Dahl K.H., Simonsen G.S., Olsvik Q. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant Enterococci. *ACC*. 1999; **43**(5): 1105-10.
19. Cereda R.F., Sader H.S., Jones R.N., Sejas L., Machado A.M., Zanatta Y.P., et al. *Enterococcus faecalis* Resistant to Vancomycin and Teicoplanin (VanA Phenotype) Isolated from a Bone Marrow Transplanted Patient in Brazil. *Braz. j. infect. dis.* 2001; **5**(1): 40-6
20. Jung W.K., Hong S.K., Lim S.K., Kwon N.H., Kim J.M., et al. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resistant Enterococci from hospitalized humans and from poultry in Korea. *FEMS Microbiol lett.* 2006; **260**(2):193-200.
21. Kim W.J., Robert A. Weinstein, and Mary K. Hayden. The changing molecular epidemiology and established of endemicity of vancomycin resistance in Enterococci at one hospital over a 6-year period. *J. Infect. Dis.* 1999; **179**:163-71.
22. Woodford N., Chadwick P.R., Morrison D., and Cookson B.D. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their *van* genotype during outbreak. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**(11):2966-8.
23. Lee W, Kim M, Huh J, Kim Y, Hyun B. The conversion pattern of epidemiology among vancomycin resistant Enterococci: a transitional strain of *enterococcus faecium* containing both *vanA* and *vanB* genes. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agent Chemother.* 2001; abstract no:C2-511.

## اثر آنتی بیوتیک های کینولونی بر بیوفیلم های تولید شده بوسیله سویه های

### استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

مینو توکلی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا صعودی<sup>۲</sup>، فریدون ملک زاده<sup>۳</sup>، غزاله حاجی زرقانی<sup>۱</sup>

(۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا

(۳) گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

نویسنده رابط: مینو توکلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات همراه: ۰۹۱۲۶۷۸۴۷۸۴ minoo\_Tavakkoli@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

#### چکیده:

**زمینه و اهداف:** سلول های باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به طور طبیعی بر روی پوست و غشاءهای مخاطی بدن انسان زندگی می کند و نیز یکی از عوامل مهم عفونت های nosocomial (عفونت های بیمارستانی) می باشد. توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانسی این باکتری دارد. کینولون ها از دسته آنتی بیوتیک هایی هستند که برای سالیان متمادی، برای درمان عفونت های ادراری ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به کار برده شده اند. با توجه به مقاومت برتر سلول های ساکن ساختارهای بیوفیلمی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مقایسه با سلول های پلانکتونیک، مطالعه مقاومت بالای سویه های بومی مولد بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس هدف این بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در این پژوهش، ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بومی از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شد و همچنین سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435 به عنوان کنترل به کار رفت. شناسایی ایزوله ها بوسیله آزمایش های مورفولوژیک و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. به دنبال آن آزمون های سنجش حساسیت باکتری علیه ۳ آنتی بیوتیک کینولونی (سیپروفلوکساسین) (CP)، افلوکساسین (OFX) و نالیدیکسیک اسید (NA) به دو روش دیسک گذاری (Kirby - Baure) و تهیه غلظت در لوله (Broth dilution test) انجام شد.

**یافته ها:** میانگین حداقل تراکم بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) این آنتی بیوتیک ها برای ۱۰ ایزوله بدست آمده به این صورت بدست آمد: سیپروفلوکساسین  $7/375 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، افلوکساسین  $11/53 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و نالیدیکسیک اسید  $259/2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . سپس مدلی تجربی برای تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد و از این ایزوله ها، بیوفیلم به دست آمد. سپس MIC این ۳ آنتی بیوتیک علیه شکل بیوفیلم ایزوله ها تعیین شد. مدل تجربی بیوفیلم افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها را نشان داد: از ۱۵ برابر افزایش مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید تا ۱۸ برابر در مقابل سیپروفلوکساسین. میانگین MIC آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نالیدیکسیک اسید علیه شکل بیوفیلم ۱۰ ایزوله به ترتیب برابر  $128/4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ،  $177/8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $3942/4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  بود.

**نتیجه گیری:** استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس افزایش مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک های کینولونی مختلف در ساختار بیوفیلم نسبت به شکل پلانکتونیک نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش بر روی سویه های بومی با نتایج حاصل از پژوهش های مشابه در دیگر سویه ها همخوانی دارد و بر مصرف دوز کافی آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های ادراری ناشی از بیوفیلم تاکید دارد.

**کلیدواژه ها:** باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیوفیلم، عفونت ادراری، کینولون

**مقدمه :**

میکروارگانسیم های تشکیل دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می کند بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است (۱۶).

با توجه به اینکه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در حالت بیوفیلیم دارای مقاومت بیشتری در مقابل آنتی‌بیوتیک ها نسبت به حالت پلانکتونیک می باشد، بررسی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنتی‌بیوتیک های کینولون (سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید) (آنتی‌بیوتیک های درمان کننده عفونت ادراری استافیلوکوکی) علیه حالت پلانکتونیک و همچنین حالت بیوفیلیم این باکتری بررسی شد تا بتوان MIC و دوز مؤثر این آنتی‌بیوتیک ها را برای از بین بردن سویه های بومی این باکتری در شکل بیوفیلیم به دست آورد. هدف از انجام این پژوهش علاوه بر کمک به معرفی دوز مؤثر آنتی بیوتیک های کینولونی، هشدار دیگری در زمینه افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های بیمارزای فرصت طلب باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بوده است. این هشدار از یک سویه باید در تعیین دوز مؤثر دارو مورد توجه قرار گیرد و از سویه دیگر بر بکارگیری روش های مؤثر بهداشتی به منظور پیشگیری از رخداد آلودگی به هنگام اعمال جراحی و یا انواع دیگر مواجهه با بیماران تاکید می نماید.

**مواد و روش ها :**

**تهیه نمونه:** در این تحقیق ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شد و همچنین سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

**تهیه آنتی بیوتیک:** آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به صورت پودر از شرکت داروسازی رازک تهیه گردید و آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید به صورت پودر از شرکت البرز دارو تهیه شد. این پودرها پس از تهیه در جای خنک، دور از نور و در مجاورت جاذب رطوبت سیلیکاژل نگهداری شدند.

**آزمون های سنجش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک:** در این تحقیق از ۲ روش استفاده شد.

**روش دیسک گذاری (Kirby –Bauer –Disk Method)** در محیط مولر هیتون آگار: در این روش ، در یک لوله استریل که حاوی ۳-۲ میلی لیتر محیط کشت MHB (مولر هیتون برات) بود، یک لوپ از کلنی های ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر سوسپانسیون و شیکر شد تا یکنواخت گردد ، به منظور استاندارد نمودن، کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با لوله شماره ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند برابر کدورت

استافیلوکوکوس ها باکتری های گرم مثبت و کروی شکل بوده که به صورت خوشه های نامنظمی قرار می گیرند (شکل a-۱). این باکتری ها در محیط های کشت تکثیر یافته و دارای فعالیت متابولیکی شدیدی هستند، کربوهیدرات ها را تخمیر کرده و پیگمان هایی به رنگ سفید تا زرد پرننگ (طلایی) تولید می کنند. جنس استافیلوکوک حدافل ۳۲ گونه را در بردارد. ۳ گونه عمده آن که در پزشکی اهمیت دارند شامل استافیلوکوکوس اورئوس (*S.aureus*) ، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S.epidermidis*) و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*S.saprophyticus*) می باشند (۱).

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جزء فلور طبیعی پوست می باشد ولی گاهی با تشکیل بیوفیلیم سبب ایجاد عفونت هایی می شود (۲). بیوفیلیم، باکتری را در برابر آنتی بیوتیک ها، آنتی بادی ها و سلول های فاگوسیتز مقاوم می کند (۳و۴). این باکتری کوآگولاز تولید نکرده، DNase منفی، ترهالوز و مانیتول منفی می باشند (۵). این باکتری به ندرت چرک تولید کرده اما گاهی ضایعات چرکی را بعد از اعمال جراحی ارتوپدی یا قلب و عروق یا بیماری های دیگری را در افراد مبتلا به نارسایی ایمنی ایجاد می کند. همچنین این باکتری باعث ایجاد عفونت در افرادی می شود که از سوند ادراری استفاده می کنند (۶و۷) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مهمترین و فراوان ترین گونه های باکتریایی جدا شده مسبب عفونت های خون بیمارستانی (nosocomial) است (۷و۸). آنتی بیوتیک ها مواد شیمیایی هستند که توسط میکروارگانسیم ها تولید می شوند و رشد سایر میکروارگانسیم ها را متوقف ساخته یا سرانجام آنها را از بین می برند (۹). کینولون ها از دسته آنتی بیوتیک هایی هستند که برای سالیان متمادی جهت درمان عفونت های دستگاه ادراری بکار برده می شوند (۹). محل اثر کینولون ها، آنزیم DNA gyrase و توپوایزومراز IV می باشد و کینولون ها با مهار DNA جیراز باعث مهار همانند سازی می شوند (۱۰و۱۱و۱۲). یکی از دلایل مقاومت استافیلوکوکوس ها در برابر کینولون ها، جهش در منطقه ژن های *gyrA* و *gla* (همه سویه ها) و ژن های *gyrB* و *griB* (استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) می باشد (۱۳). استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پلی ساکارید خارج سلولی تولید می کند که باعث تشکیل بیوفیلیم می شود و این بیوفیلیم در ایجاد عفونت های این باکتری بسیار مؤثر می باشد (۱۴و۱۵). بیوفیلیم نه تنها

MHB یا TSB آگار و روش اسپکتروفتومتری فنول سولفوریک اسید سنجیده شد.

روش برداشت نمونه از سوند: در این روش بعد از طی مدت زمان مورد نظر، سوند از فلاسک توسط یک پنس استریل بیرون آورده شد و توسط آب مقطر استریل (جهت شسته شدن باکتری های پلانکتونیک) ۳ بار شستشو داده شد سپس توسط سواب استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل روی سوند محکم اسکراب شد، سپس توسط این سواب بر روی پلیت های حاوی محیط MHA یا TSB آگار کشت صورت گرفت، بعد از ۲۴ ساعت که پلیت ها در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند، مورد بررسی قرار گرفتند. رشد بر روی محیط آگار پس از ۲۴ ساعت نشان دهنده وجود بیوفیلم بر روی سوند ادراری بود.

روش اسپکتروفتومتری فنول سولفوریک اسید: حساسیت این روش  $10^6$  -  $10^8$  گلوکز در  $10^5$  می باشد.

معرف های موجود در این روش شامل: فنول ( $\text{W/V}$ ) و اسید سولفوریک غلیظ می باشد. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، پلی ساکارید خارج سلولی تولید می کند که این پلی ساکارید باعث بهم چسبیدن باکتری ها به یکدیگر و تولید بیوفیلم می شود. پس از مدت زمان های لازم برای تولید بیوفیلم در مدل تجربی طراحی شده، سوندها از فلاسک ها خارج شده و پس از ۳ بار شستشو توسط آب مقطر استریل هر یک درون لوله ای استریل منتقل شدند مقدار  $10^8$  آب مقطر استریل به هر یک از لوله ها اضافه شد و  $10^5$  فنول ۵٪ به هر لوله اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه نمونه ها رها شدند و بعد از شیک شدید و گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه جذب رنگ زرد ایجاد شده در محلول ها، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج  $490\text{nm}$  خوانده شد. این رنگ زرد نشان دهنده تشکیل بیوفیلم است. برای سنجیدن مقدار گلوکز این جذب ها، نمودار استاندارد گلوکز بر اساس  $10^1$  -  $10^8$  میکروگرم گلوکز در  $200$  میکرولیتر تهیه شد. و مقدار تشکیل بیوفیلم نمونه ها بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص شد که شرایط بهینه تولید بیوفیلم در مدل تجربی طراحی شده ما به صورت استفاده از محیط TSB و گرما گذاری در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  بدون شیک شدن، برای مدت زمان ۷۲ ساعت می باشد. پس از بدست آوردن شرایط بهینه تولید بیوفیلم، تعداد ۱۰ سویه بیمارستانی تحت این شرایط بهینه قرار گرفتند و تولید بیوفیلم کردند.

تعیین MIC آنتی بیوتیک های کینولوی بر روی بیوفیلم باکتریها: در این مرحله غلظت های MIC آنتی بیوتیک در شکل پلانکتونیک

تعداد تقریبی  $10^6 \times 1/5$  سلول می باشد. سپس با کمک سوآب استریل از سوسپانسیون تهیه شده برداشت شد و بر روی محیط MHA (مولر هیتون آگار) بصورت متراکم کشت داده شد سپس دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط با رعایت فاصله دیسک ها از یکدیگر گذاشته شد سپس پلیت ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرما گذاری شدند. بعد از این مدت زمان قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد (۱۷).

تعیین MIC به روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test): برای تعیین MIC این آنتی بیوتیک ها از روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test) استفاده شد (۱۸). در این روش از ۱۸ لوله استفاده شد و سری رقت آنتی بیوتیکی از محلول stock آنتی بیوتیک با غلظت  $2048$  میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شد (در هر لوله ۱ میلی لیتر محلول آنتی بیوتیک وجود داشت) سپس به هر لوله ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت  $10^5 \text{CFU/ml}$  که در محیط MHB تهیه شده بود اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. نتایج پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اولین لوله رقت که شفاف مانده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تولید بیوفیلم: برای تولید بیوفیلم از قطعاتی از سوند ادراری به طول ۱ سانتی متر از جنس لاتکس استفاده شد و از سیم های آلیاژ نیکل و کروم به عنوان داربست استفاده شد و مجاور سازی باکتری در سطح بستر درون فلاسک های در پیچ دار  $250\text{CC}$  حاوی  $90\text{CC}$  محیط کشت براث در ۱۸ شرایط مختلف صورت گرفت. در این پژوهش برای بدست آوردن شرایط بهینه تولید بیوفیلم، سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435 تحت شرایط ۲ محیط کشت مختلف (TSB) Trypton soy broth و مولر هیتون براث (MHB) و در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  بدون شیکر، شیکر دار با دور  $120\text{rpm}$  و شیکردار با دور  $180\text{rpm}$  و طی مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای تولید بیوفیلم قرار گرفت مقدار تلقیح باکتری در همه شرایط ذکر شده،  $10\text{ml}$  سوسپانسیون باکتری در محیط کشت MHB یا TSB با کدورت تقریبی  $10^6 \text{CFU/ml}$  در فلاسک حاوی  $90\text{CC}$  محیط کشت MHB یا TSB بود. به این ترتیب هر فائل حاوی  $100\text{CC}$  سوسپانسیون باکتری با کدورت تقریبی  $10^6 \text{CFU/ml}$  شد. پس از گذشت مدت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، وجود و تشکیل بیوفیلم بر روی سوند ادراری توسط روش برداشت نمونه از روی سوند و کشت بر روی محیط

تولید بیوفیل‌م: با توجه به شرایط مختلفی که برای تولید بیوفیل‌م در نظر گرفته شد، مشخص شد که باکتری در محیط TSB نسبت به محیط MHB، بیوفیل‌م بیشتری تولید می‌کند. محیط TSB شامل پیتون از کازئین، پیتون از soy meal، گلوکز و کلرید سدیم می‌باشد. محیط MHB شامل عصاره گوشت، کازئین هیدرولیز شده و نشاسته است. پس باکتری با استفاده از گلوکز موجود در محیط TSB، پلی‌ساکارید خارج سلولی بیشتری تولید می‌کند. همچنین با گذشت مدت زمان بیشتر و عدم شیک شدن، باکتری قادر به تولید بیوفیل‌م بیشتری می‌باشد. مقدار تولید بیوفیل‌م توسط سویه استاندارد PTCC 1435 در شرایط مختلف در جدول ۳ و همچنین مقدار تولید بیوفیل‌م تحت شرایط بهینه توسط سویه‌های بیمارستانی در جدول ۴ ذکر شده است.

**تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی علیه شکل بیوفیل‌م باکتری:** بعد از ۲۴ ساعت مشخص شد که MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی شکل بیوفیل‌م سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد آزمایش ۱۵-۱۸ برابر و یا حتی بیشتر نسبت به MIC این آنتی‌بیوتیک‌ها علیه شکل پلانکتونیک سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود و سویه‌ها در شکل بیوفیل‌م در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت بیشتری نشان می‌دادند (جدول ۴).

جدول ۱: آنتی‌بیوگرام نمونه‌ها به روش دیسک دیفیوژن

(Kirby -Baure)

سویه‌ها	سیپروفلوکساسین	افلوکساسین	نالدیکسیک اسید
PTCC 1435	S ۲۵ mm	S ۲۰ mm	۱۲ mm *
سویه ۱	S ۲۱ mm	S ۱۷ mm	۱۰ mm *
سویه ۲	S ۲۳ mm	S ۱۹ mm	۱۲ mm *
سویه ۳	S ۱۷ mm	S ۱۴ mm	عدم‌هاله R
سویه ۴	S ۲۰ mm	S ۱۷ mm	۹ mm *
سویه ۵	S ۱۸ mm	S ۱۴ mm	عدم‌هاله R
سویه ۶	S ۱۷ mm	S ۱۵ mm	۱۱ mm *
سویه ۷	S ۱۹ mm	S ۱۶ mm	عدم‌هاله R
سویه ۸	S ۱۶ mm	S ۱۴ mm	عدم‌هاله R
سویه ۹	S ۱۴ mm	S ۱۳ mm	عدم‌هاله R
سویه ۱۰	S ۲۲ mm	S ۱۸ mm	۱۰ mm *

S: حساس \* نیمه حساس R: مقاوم

و ۱۰ غلظت بالاتر از MIC، بر روی بیوفیل‌م‌های تشکیل شده بر روی سوند ادراری آزمایش شد. در این روش برای هر سویه، ۱۱ قطعه سوند ادراری با طول ۱/۵ سانتی‌متر برداشته و تولید بیوفیل‌م تحت شرایط بهینه انجام شد. سپس ۱۱ فلاسک در پیچ‌دار برداشته شد سری رقت آنتی‌بیوتیکی تهیه شد به صورتی که هر فلاسک حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول آنتی‌بیوتیک و ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون براث بود و غلظت آنتی‌بیوتیکی در هر فلاسک نصف غلظت فلاسک قبلی بود. آخرین فلاسک حاوی غلظت MIC آنتی‌بیوتیک برای شکل پلانکتونیک باکتری بود. سپس هر قطعه از سوند پس از ۳ بار شستشو برای شسته شدن باکتری‌های پلانکتونیک به یک فلاسک منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، اولین فلاسکی که شفاف باقی مانده بود و همچنین سوند موجود در آن پس از اسکراب کردن با سواب استریل و کشت بر روی محیط آگار رشد نکرد، به عنوان MIC تعیین گردید. لازم به ذکر است که کدورت ایجاد شده در فلاسک‌ها به علت مقاومت بیوفیل‌م در برابر آنتی‌بیوتیک و کنده شدن قسمت‌هایی از بیوفیل‌م و رشد در محیط براث می‌باشد.

## یافته‌ها:

**تعیین حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون:** بعد از ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد مشخص شد که سویه‌ها حساسیت بیشتری به سیپروفلوکساسین نسبت به افلوکساسین و حساسیت بیشتری به افلوکساسین نسبت به نالدیکسیک اسید نشان دادند. اکثر سویه‌ها نسبت به نالدیکسیک اسید مقاوم بودند. همچنین سویه‌های بیمارستانی در مقایسه با سویه استاندارد PTCC 1435، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌تر بودند (جدول ۱).

**تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌های کینولون:** بعد از ۲۴ ساعت، آخرین لوله‌ای که شفاف باقی مانده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. MIC این آنتی‌بیوتیک‌ها برای سویه PTCC 1435 برابر: برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، لوله شماره ۱۵ با رقت  $0.0625 \mu\text{g/ml}$ ، برای افلوکساسین، لوله شماره ۱۴ با رقت  $0.125 \mu\text{g/ml}$  و برای نالدیکسیک اسید لوله شماره ۶ با رقت  $32 \mu\text{g/ml}$  بود. MIC سویه‌های بیمارستانی در جدول ۲ ذکر شده است که نشان دهنده مقاوم‌تر بودن این سویه‌ها نسبت به سویه استاندارد PTCC 1435 بود.

جدول ۲: MIC آنتی بیوتیک ها علیه شکل پلانکتونیک سویه ها به روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test)

سویه ها	سیروفلوکساسین	افلوکساسین	نالیدیکسیک اسید
PTCC 1435	۰/۰۶۲۵ <sup>μg</sup> /ml	۰/۱۲۵ <sup>μg</sup> /ml	۳۲ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۱	۰/۵ <sup>μg</sup> /ml	۰/۲۵ <sup>μg</sup> /ml	۶۴ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۲	۰/۲۵ <sup>μg</sup> /ml	۰/۱۲۵ <sup>μg</sup> /ml	۳۲ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۳	۸ <sup>μg</sup> /ml	۱۶ <sup>μg</sup> /ml	۱۲۸ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۴	۰/۵ <sup>μg</sup> /ml	۲ <sup>μg</sup> /ml	۱۲۸ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۵	۴ <sup>μg</sup> /ml	۸ <sup>μg</sup> /ml	۲۵۶ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۶	۸ <sup>μg</sup> /ml	۱۶ <sup>μg</sup> /ml	۶۴ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۷	۴ <sup>μg</sup> /ml	۸ <sup>μg</sup> /ml	۵۱۲ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۸	۱۶ <sup>μg</sup> /ml	۳۲ <sup>μg</sup> /ml	۲۵۶ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۹	۳۲ <sup>μg</sup> /ml	۳۲ <sup>μg</sup> /ml	۱۰۲۴ <sup>μg</sup> /ml
سویه ۱۰	۰/۵ <sup>μg</sup> /ml	۱ <sup>μg</sup> /ml	۱۲۸ <sup>μg</sup> /ml

جدول ۳: مقدار تشکیل پلی ساکارید نمونه ها (تشکیل بیوفیلم) در شرایط مختلف از سویه PTCC بر اساس نمودار استاندارد

(<sup>μg</sup> Polysaccharide / 1cm catheter)

محیط کشت	بدون شیکر	شیکر با دور ۱۲۰ rpm	شیکر با دور ۱۸۰ rpm	زمان (h)
TSB	۵۳/۷۲	۴۷/۸۴	۳۹/۱۱	۲۴h
	۷۰/۴۹	۶۳/۸۲	۵۹/۹۰	۴۸h
	۹۱/۳۷	۶۸/۹۲	۴۹/۴۱	۷۲h
MHB	۱/۶۶	۱/۱۷	۰/۹۸	۲۴h
	۳۳/۳۳	۲۱/۵۶	۱۷/۹۴	۴۸h
	۶۰/۵۸	۴۳/۵۳	۳۴/۴۱	۷۲h

جدول ۴: مقدار تولید بیوفیلم سویه ها تحت شرایط بهینه و MIC آنتی بیوتیک های کینولونی بر روی شکل بیوفیلم سویه ها به روش تهیه رقت

MIC آنتی بیوتیک های کینولونی بر روی شکل بیوفیلم سویه ها به روش تهیه رقت.			مقدار تولید پلی ساکارید تشکیل دهنده بیوفیلم تحت شرایط بهینه بر اساس منحنی استاندارد ( $\mu\text{g Polysaccharide}/1\text{cm catheter}$ )	سویه ها
سیپروفلوکساسین ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	افلوکساسین ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	نالیدیکسیک اسید ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
۵۱۲	۲	۱	۹۱/۳۷	PTCC 1435
۲۰۴۸	۸	۸	۸۷/۲۵	سویه ۱
۵۱۲	۲	۸	۷۸/۷۲	سویه ۲
۲۰۴۸	۲۵۶	۲۵۶	۹۰/۲۹	سویه ۳
۲۰۴۸	۳۲	۱۶	۶۹/۲۱	سویه ۴
۲۰۴۸	۶۴	۶۴	۸۸/۳۳	سویه ۵
۱۰۲۴	۲۵۶	۱۲۸	۷۸/۷۲	سویه ۶
۸۱۹۲	۱۲۸	۳۲	۸۶/۹۶	سویه ۷
۴۰۹۶	۵۱۲	۲۵۶	۹۰	سویه ۸
۱۶۳۸۴	۵۱۲	۵۱۲	۹۲/۱۵	سویه ۹
۱۰۲۴	۸	۴	۶۴/۸۰	سویه ۱۰

شرایط بهینه: استفاده از محیط TSB، انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و مدت زمان ۷۲ ساعت

### بحث:

با توجه به اهمیت بیوفیلم باکتریایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در ایجاد بیماری های عفونی از قبیل عفونت های ادراری، عفونت در دریچه های قلب مصنوعی، عفونت های خون بیمارستانی (nosocomial)، در این پژوهش بررسی اثر آنتی بیوتیک های کینولون بر روی شکل بیوفیلم این باکتری و مقایسه این MIC با MIC آنتی بیوتیک ها بر روی شکل پلانکتونیک این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. و همچنین شرایط بهینه تولید بیوفیلم از این باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در این مطالعه، از دو محیط MHB یا TSB و همچنین مدت زمان و وجود یا عدم وجود شیکینگ برای تولید بیوفیلم بررسی شد.

در پژوهشی که Hussain M و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام دادند اثرات متفاوت شرایط محیطی شامل تراکم گاز اکسیژن (هوا) و دی اکسید کربن و ترکیب کشت بر تولید بیوفیلم را بررسی کردند. نتایج نشان داد که مقدار لعاب (پلی ساکارید خارجی) جدا شده از یک سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس کشت داده شده در یک محیط سنتزی با ترکیب شیمیایی معین (HHW) در حضور

هوا نسبت به مقدار تولید این لعاب در هر دو محیط HHW و محیط سنتزی دیالیزی SDF (Synthetic dialysis fluid) در حضور هوا به همراه  $5\% \text{CO}_2$  ناچیز بود. وجود یک سطح فیزیولوژیکی  $\text{CO}_2$  در طی کشت در محیط TSB (Trypton soy broth)، از تشکیل لعاب جلوگیری کرد. تولید بیوفیلم در SDF و HHW ترجیح داده شد اما در TSB و مایع دیالیز شده صفاقی (Peritoneal dialysis fluid) وقتی که هوا با  $5\% \text{CO}_2$  استفاده شد، ضعیف شد (۱۶).

در پژوهشی دیگر برای تولید بیوفیلم از باکتری پseudomonas آئروجینوزا از محیط کشت TSB استفاده شد (۱۹).

اکثریت سلول ها در یک بیوفیلم به طور ضروری نسبت به کشته شدن نسبت به سلول های پلانکتونیک مقاوم نیستند و وقتی با یک آنتی بیوتیک کشنده که می تواند سلول های با رشد آهسته را بکشد تیمار شوند، به طور سریع می میرند، سلول های پایدار کننده، زنده باقی می ماند و بوسیله حضور یک آنتی بیوتیک که رشد آنها را مهار می کند، باقی می ماند (۲۰ و ۲۱).

افلوکساسین  $11/53 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و برای نالیدیکسیک اسید  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $259/2$ . میانگین MIC آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید علیه شکل بیوفیلم ۱۰ ایزوله به ترتیب برابر  $128/4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ،  $177/8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $3942/4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  بود.

همچنین شرایط بهینه تولید بیوفیلم از این باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در محیط TSB، قادر به تولید بیوفیلم بیشتری نسبت به محیط MHB بود. بعلاوه این باکتری در مدت زمان بیشتر و همچنین در انکوباتور بدون شیکر (در حالت سکون)، بیوفیلم بیشتری تولید کرد و هر چقدر که مقدار دور شیکر بالاتر بود (۱۸۰rpm نسبت به ۱۲۰rpm)، مقدار بیوفیلم کمتری به دست آمد.

در مطالعه دیگر نشان داده شده که مقاومت باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در بیوفیلم های درهم گیسخته نسبت به مقاومت آنها در بیوفیلم های سالم در غلظت های MIC آنتی بیوتیک ها برابر است. در غلظت های بالاتر، باکتری ها در بیوفیلم های درهم گیسخته به طور قابل توجه مقاومت کمتری نسبت به آنهایی که در بیوفیلم سالم هستند نشان دادند ( $P < 0/001$ ) اما نسبت به سلول های پلانکتونیک مقاوم تر بودند. Quinupristin/dalfopristin نشان دادند که بهترین فعالیت در مقابل سلول های بیوفیلم های درهم گیسخته در غلظت های بالای MICs است و وانکومايسين در ۵۰۰ و  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ ، به طور قابل توجه دارای فعالیت بیشتری در مقابل بیوفیلم های مقاوم به متی سیلین و حساس به متی سیلین استافیلوکوکوس آرنوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود (۲۲).

### نتیجه گیری:

مدل تجربی بیوفیلم، افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها را نشان داد: از ۱۵ برابر در مقابل نالیدیکسیک اسید تا ۱۸ برابر افزایش مقاومت در برابر سیپروفلوکساسین. میانگین حداقل تراکم بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) این آنتی بیوتیک ها برای ۱۰ ایزوله بدست آمده به این صورت بدست آمد: برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین  $7/375 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، برای

### فهرست مراجع:

- Jawetz M, Adelberg E. *Medical Microbiology*. 23<sup>rd</sup> Edition –Mc Graw Hill. 2004; 244-252
- Yassien M, Khardori N. Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn Microbiol and Infect Dis*. 2001; **40**: 79-89.
- Yasuda H. Bacterial biofilms and infectious diseases. *Trands Glycosci Glycotechnol*. 1996; **8**: 409-417
- Thien-Fah C, Man A, O'Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microb*. 2001; **9**(1): 34-39.
- Sjolund M, Tano E, Blaser M.J, Andersson D.I, Engstrand L. Persistence of resistant *Staphylococcus epidermidis* after single course of clarithromycin. *Emerg Infect Dis*. 2005 ; **11**(9): 1389-1392
- Vuong C, Gerke C, Somerville G.A, Fischer E.R, Otto M. Quorum – Sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*. 2003; **188**(5): 706-718.
- Raad I, Alrahwan A, Rotston k. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis*. 1998; **26**(5): 1182-1187.
- Zhang Y.Q, Ren S.X, Li H.L, Wang Y.X, Fu G, Yang J, et al. Genome –based analysis of virulence genes in a non –biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol*. 2003; **49**(6): 1577-1593.
- ملک زاده ف. مواد ضد میکروبی و مکانیسم عمل آنها. موسسه انتشارات امید. ۱۳۸۵; ۴۹۶-۴۹۴

10. Li X.Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid – mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; **25**: 435-463.
11. Dublin D. T, Fitzgibbon J.E, Nahvi M. D, John J.F. Topoisomerase sequences of coagulase – negative Staphylococcol isolates resistant to ciprofloxacin or Trofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**(7): 1631-1637.
12. Turkmani A, Psaroulaki A, Christidou A, Samoils G, Abumourad T, Tabaa D, et al. Uptake of ciprofloxacin and ofloxacin by 2 Brucella strain and their floroquinolon resistant variants under condition. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; **59**: 447-451.
13. Linde H. J, Schmidt M, Fuchs E, Reischl U, Niller H.H, Lehn N. In vitro activities of six quinolones and Mechanisms of resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase – negative Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **5**: 1553-1557.
14. Veenstra G.J, Cremers F.F, Van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 1996; **178**(2): 537-541.
15. Timmerman C.P, Fleer A, Besnier J.M, Graaf L.D, Cremers F, Verhoef J. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun*. 1991; **59**(11): 4187-4192.
16. Hussain M, Wilcox M.H, white P.J, Faulkner M.K, spencer R.C. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase –negative Staphylococci. *J Hosp infect*. 1992; **20**(3): 173-184.
17. Bauer A.W, Kirby W.M.M, Sherris J.C, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk Method. *Am J Clin Pathol*. 1996; **45**(4) 493-496.
18. Kronovall G. MIC determinstion of fusidic asid of ciprofloxacin using multidisk diffusion tests. *Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; **6**: 483-489.
19. Trachoo N. Biofilm removal techaique using sands as a research tool for accessing microbial attachment on surface. *Food Science and Technology*. 2003; **26**(1): 109-115.
20. Spoering A.L, Lewis k. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001; **183**(23): 6746 -6751.
21. Lewis k. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(4): 999-1007.
22. El-Azizi M, Rao S, kanchanapoom T, khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of Staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005; **4**: 1-2.

## ارزیابی ارتباط ژن وابسته به سیتوتوکسین (*cagA*) با اختلالات گوارشی در مبتلایان

### به عفونت هلیکوباکتر پیلوری

معصومه دورقی<sup>۱،۲</sup>، مرجان محمدی<sup>۲</sup>، محمد حسن شیرازی<sup>۱\*</sup>، مریم اسماعیلی<sup>۲</sup>، مریم بابابیک<sup>۲</sup>، سمانه صابری کاشانی<sup>۲</sup>، اکبر عقلایی<sup>۲</sup>، نازنین مهاجرانی<sup>۲</sup>

۱) بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) گروه تحقیقات هلیکوباکتر، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: محمد حسن شیرازی، بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۶۶۱۱۲۳۷۹ mhshirazi@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

#### چکیده:

**زمینه و اهداف:** هلیکوباکتر پیلوری عامل التهاب معده و زخم های گوارشی و عامل خطر ایجاد آدنوکارسینومای معده به شمار می آید. ژن وابسته به سیتوتوکسین *A cagA* یکی از مهمترین شاخص های بیماریزایی این باکتری می باشد که به دلیل تنوع ژنتیکی در نواحی جغرافیایی مختلف از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن مذکور در بیماران دچار اختلالات گوارشی و ارزیابی آن به منظور غربالگری بیماران در معرض خطر بالا می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه ۱۸۰ بیمار دچار اختلالات گوارشی مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان امیر اعلم یا انستیتو کانسر شهر تهران وارد مطالعه شدند. از میان ۱۲۰ بیماری که هلیکوباکتر پیلوری از آنها جدا شد، ۸۱ بیمار دچار سوء هاضمه بدون زخم، ۱۷ بیمار دچار زخم گوارشی و ۲۲ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند. پس از کشت، جداسازی باکتری و استخراج ژنوم جستجوی ناحیه حفاظت شده ژن وابسته به سیتوتوکسین با استفاده از PCR انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون مجذور کای انجام شد.

**یافته ها:** ۱۲۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری از ۱۸۰ بیمار مورد بررسی جدا شد. از میان ۱۲۰ سویه مورد بررسی، ۱۰۱ سویه (۸۴/۲٪) *cagA* مثبت بودند و ۱۹ سویه باقیمانده (۱۵/۸٪) منفی بودند. تمام بیماران دچار سرطان معده سویه های *cagA* مثبت را حمل می کردند و وجود این ژن با سرطان معده در مقایسه با بیماران دچار سوء هاضمه بدون زخم، ارتباط معنی داری را نشان داد. در عین حال با سایر اشکال بالینی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** به دلیل پراکندگی یکنواخت ژن *cagA* در بیماران دارای علایم بالینی متفاوت، بررسی حضور ژن *cagA* به تنهایی نمی تواند به عنوان شاخص تعیین کننده برای یک پیامد بالینی ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری باشد.

**کلید واژه ها:** ژن وابسته به سیتوتوکسین *A*، سرطان معده، زخم گوارشی

**مقدمه:**

هلیکوباکتر پیلوری *caga* مثبت با زخم دوازدهه، آتروفی مخاط معده و سرطان معده همراهی داشته باشد (۱۱-۱۳). از سوی دیگر برخی مطالعات نشان داده اند که سویه های هلیکوباکتر پیلوری *caga* مثبت با توان بیشتری در مقایسه با سویه های *caga* منفی، آپوپتوزیس را در سلول های AGS القاء می نماید (۱۴،۱۵). بنابراین به نظر می رسد حضور ژن *caga* یک عامل کلیدی در تعامل باکتری و میزبان باشد که منجر به اختلالات گوارشی گردد.

از آنجا که تمام افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری نیاز به درمان ریشه کن کننده باکتری ندارند، راهکار دقیق غربالگری به منظور شناسایی بیماران آلوده به سویه های با فاکتور خطر بالا که ممکن است باعث زخم معده یا سرطان معده شوند، ضروری است. در این مطالعه ژن *caga* سویه های جدا شده از بیماران گوارشی مختلف به منظور غربالگری بیماران در معرض خطر بالا ارزیابی می گردد.

**مواد و روش ها:**

**جمعیت مورد مطالعه:** جمعیت مورد مطالعه ۱۸۰ بیمار دچار اختلالات گوارشی مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان امیراعلم یا انستیتو کانسر شهر تهران بودند. از میان ۱۲۰ بیمار آلوده به هلیکوباکتر پیلوری ۸۱ بیمار دچار سوء هاضمه بدون زخم، ۱۷ بیمار دچار زخم گوارشی و ۲۲ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند. لازم به ذکر است که ضرورت انجام اندوسکوپی برای بیماران با تشخیص پزشک از قبل تعیین گردیده و پیش از اندوسکوپی توسط پزشک متخصص، از بیماران رضایت نامه آگاهانه مورد تأیید کمیته اخلاق پزشکی بمنظور استفاده از نمونه های بیوپسی گرفته شد.

**سویه های باکتری:** سویه های هلیکوباکتر پیلوری عمدتاً از دو بیوپسی ناحیه آنترم جدا شدند. نمونه های بیوپسی همگن گردیده و روی محیط اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری (HPSA) کشت داده شدند (۱۶) و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآنروئیل (۱۰٪ دی اکسید کربن، ۵٪ اکسیژن و ۸۵٪ نیتروژن) تا ۵ روز نگهداری شدند. تعیین هویت کلنی های بدست آمده بر اساس شکل و رنگ کلنی، رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی اوره آز و کاتالاز انجام شد. یک تک کلنی برای مطالعات بعدی تکثیر داده شد.

**استخراج DNA و PCR:** رسوب باکتری حاصل از کشت و تکثیر یک تک کلنی در محلول ۵۰ میلی مولار سود در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد، سپس در محلول ۱ مولار تریس - اسید کلریدریک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. محلول رویی حاصل، حاوی DNA ژنومی بوده که به عنوان الگو

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، میکروآنروئیل و کند رشد است که عامل اتیولوژیک گاستریت مزمن و فاکتور خطر موثر در ایجاد بیماری هایی نظیر زخم معده و دوازدهه و آدنوکارسینومای معده می باشد. بیش از نیمی از جمعیت جهان به هلیکوباکتر پیلوری آلوده می باشند و شیوع آلودگی هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه بالاتر است به طوری که بیش از ۸۰٪ جمعیت کشورهای در حال توسعه به هلیکوباکتر پیلوری آلوده می باشند (۱،۲).

مطالعات متعدد نشان داده است که شاخص های بیماریزایی باکتری، ژنتیک میزبان و عوامل محیطی در ایجاد بیماری های گوارشی نقش دارند (۳). از میان شاخص های بیماریزایی متعدد، مطالعه ژن وابسته به سیتوتوکسین A (*cytotoxin-associated gene A*) به دلیل ناهمگونی ژنتیکی در نواحی جغرافیایی مختلف از یک سو و تداخل در چرخه سلولی از سوی دیگر از اهمیت خاصی برخوردار است (۴-۶). ژن *caga* فاکتور ویروانس غیر حفاظت شده است و در ۶۰ تا ۹۰٪ سویه های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، به طوری که بنا بر برخی گزارش ها، بیش از ۹۰٪ سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از کشورهای آسیایی و ۶۰ تا ۷۰٪ سویه های کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی از نظر ژن *caga* مثبت هستند (۷،۸). ژن *caga* در ناحیه I از جزیره بیماریزایی *cag* (*cag PAI*) قرار دارد و یکی از ژن های شاخص جزیره بیماریزایی می باشد. *cag PAI* یک لوکوس ۴۰ کیلوبازی است که درصد گوانین - سیتوزین آن (۳۵٪) با دیگر نواحی ژنوم (۳۹٪) متفاوت است و طی انتقال افقی به برخی از سویه های هلیکوباکتر پیلوری منتقل شده است (۹،۱۰). این جزیره دارای ۳۱ ژن است که ۶ ژن این جزیره، سیستم ترشچی نوع چهار را رمزدهی می کنند و در تعامل باکتری- میزبان و روند بیماریزایی نقش دارند. *Caga* یکی از پروتئین های سطحی غشاء خارجی هلیکوباکتر پیلوری است که از قدرت ایمنی زایی بالایی برخوردار است و پس از ورود به سلول های اپی تلیال معده منجر به دوکی شدن سلول میزبان می شود؛ بنابراین پروتئین *Caga* می تواند به طور مستقیم پس از ورود به سلول هدف و تداخل با سیستم های پیام رسانی سلول، عامل افزایش ویروانس باکتری باشد و یا اینکه وجود آن در برخی سویه های هلیکوباکتر پیلوری بیانگر وجود جزیره بیماریزایی *cag PAI* باشد. به نظر می رسد که شدت بیماری های گوارشی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری با وجود جزیره بیماریزایی *cag* در ارتباط باشد و عفونت با سویه های

سرطانی) بیماران دچار سرطان معده سن بالای ۴۰ سال داشتند ( $P < 0.001$ ).

آلودگی بیماران به هلیکوباکتر پیلوری به روش کشت بررسی شد و ۱۲۰ سویه جدا شد. هویت تمام ۱۲۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران دچار اختلالات گوارشی مختلف به روش مولکولی تأیید شد، به طوری که تمام سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *ureC* تکثیر شده و محصول PCR به طول ۲۹۴ جفت باز تولید شد که نشان دهنده حضور هلیکوباکتر پیلوری می باشد.

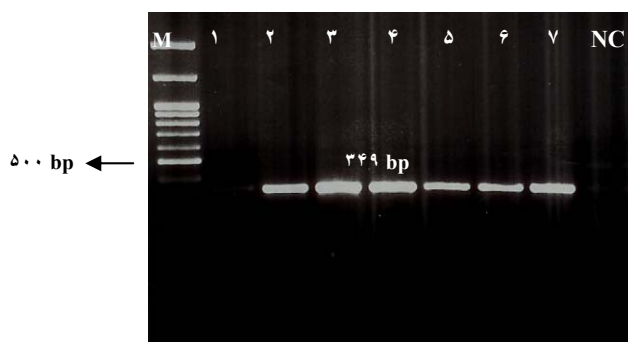
از میان ۱۲۰ سویه مورد بررسی، ۱۰۱ سویه (۸۴/۲٪) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ناحیه حفاظت شده ژن *cagA* تکثیر شده، قطعه به طول ۳۴۹ جفت باز تولید شده و *cagA* مثبت در نظر گرفته شدند (شکل ۱). ۱۹ سویه باقیمانده (۱۵/۸٪) منفی بودند (نمودار ۱). فراوانی ژن *cagA* بر حسب وضعیت بالینی بیماران در جدول ۱ آمده است. فراوانی ژن *cagA* در بیماران دچار سرطان معده (۱۰۰٪) کمی بالاتر از بیماران دچار زخم گوارشی (۹۴/۱٪) است. تمام بیماران که دچار سرطان معده بودند با سویه های *cagA* مثبت آلوده بودند. بیش از نیمی از بیماران دچار سوء هاضمه بدون زخم (۷۷/۸٪) نیز با سویه های *cagA* مثبت آلوده بودند. حضور سویه های *cagA* مثبت به طور معنی داری با سرطان معده در مقایسه با بیماران دچار سوء هاضمه بدون زخم همراهی داشت ( $P < 0.05$ ).

برای واکنش زنجیره پلی مرز مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). ابتدا با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن *ureC* هویت سویه های هلیکوباکتر پیلوری به روش مولکولی تأیید شد (۱۸). در مرحله بعد جهت تعیین حضور ناحیه حفاظت شده ژن *cagA* از پرایمرهای F1 (5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3') و B1 (5'-GCGTCAAAAATAATTCCAAGG-3') استفاده شد (۱۹). در تمام مراحل از سویه هلیکوباکتر پیلوری ۲۶۶۹۵ به عنوان سویه کنترل استفاده شد. تکثیر ژن های مورد نظر در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر، ۱/۵ میلی مولار منیزیم کلراید، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرها (۲۵ پیکومول/میکرولیتر)، ۰/۲ میلی مولار داکسی نوکلئوتید و ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور ماوراء بنفش مشاهده شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیزهای یک طرفه، تست مجذور کای و آزمون دقیق فیشر استفاده شد. P کمتر یا مساوی ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها:

در این مطالعه ۱۸۰ بیمار با میانگین سنی ۴۴ سال شامل ۶۵ مرد و ۵۵ زن بررسی شدند. میان سن بیمار و پیامد بیماری ارتباط معنی داری یافت شد، به طوری که ۹۰/۹ درصد (۲۰ بیمار از ۲۲ بیمار



شکل ۱: قطعات ۳۴۹ جفت باز محصول تکثیر ژن *cagA*، مارکر ۱۰۰ جفت باز و NC کنترل منفی

نمودار ۱: فراوانی ژن *cagA* سویه های هلیکوباکتر پیلوری



جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی ژن *cagA* بر حسب گروه بیماری

جمع	<i>cagA</i> تعداد (درصد)		ژن گروه بیماری
	منفی	مثبت	
۸۱ (۱۰۰)	۱۸ (۲۲/۲)	۶۳ (۷۷/۸)	سوء هاضمه بدون زخم
۱۷ (۱۰۰)	۱ (۵/۹)	۱۶ (۹۴/۱)	زخم گوارشی
۲۲ (۱۰۰)	۰ (۰)	۲۲ (۱۰۰)	سرطان معده
۱۲۰ (۱۰۰)	۱۹ (۱۵/۸)	۱۰۱ (۸۴/۲)	جمع
	$P = ۰/۰۱۹$		نتیجه آزمون آماری

### بحث:

هلیکوباکتر پیلوری عامل اتیولوژیک التهاب معده، زخم گوارشی و فاکتور خطر ابتلاء به سرطان معده به شمار می آید. هر یک از عوارض ناشی از عفونت با هلیکوباکتر پیلوری یک روند چند عاملی است که به ویژگی های خاص ارگانیزم، میزبان و عوامل محیطی بستگی دارد (۱-۳). به نظر می رسد تنوع ژنتیکی سویه ها یکی از عوامل کلیدی موثر در ایجاد بیماری های گوارشی مختلف باشد. علاوه بر این، تنوع جغرافیایی قابل توجهی در میان سویه های هلیکوباکتر پیلوری در سراسر جهان وجود دارد (۴۸).

جزیره بیماریزایی *cag* یکی از مهمترین شاخص های بیماریزایی هلیکوباکتر پیلوری به شمار می آید، به طوری که سویه های فاقد این جزیره، بیماریزایی کمتری دارند. ژن *cagA* بزرگترین قطعه ژنی این جزیره می باشد، بنابراین بررسی حضور ژن *cagA* می تواند دال بر حضور جزیره مذکور باشد.

این مطالعه به بررسی حضور ژن شاخص جزیره بیماریزایی *cag* پرداخته است و ارزش ردیابی این ژن را به منظور غربالگری بیماران در معرض خطر بالا تعیین نموده است. در صورت حضور ژن *cagA*، محصول PCR به طول ۳۴۹ جفت باز تکثیر می شد. بررسی حضور ژن *cagA* در بیماران مورد بررسی نشان داد که ۸۴/۲٪ از افراد دچار بیماری های گوارشی، سویه های *cagA* مثبت را حمل می کردند. مقایسه فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتر پیلوری ایرانی با کشورهای غربی نشان می دهد که فراوانی این ژن بالاتر از کشورهای غربی می باشد و فراوانی مشابهی با کشورهای آسیای جنوب شرقی از جمله کره (۹۷٪) و ژاپن (۹۵٪) دارد (۲۰، ۲۱). فراوانی ژن *cagA* در کشور برزیل نیز

بالا (۹۴٪) گزارش شده است (۲۲). تنوع فراوانی ژن *cagA* در کشورهای مختلف ممکن است بدلیل تفاوت جمعیت بیماران مورد مطالعه و تنوع ژنتیکی سویه های مورد بررسی باشد.

مطالعه انجام شده توسط دوستی و همکاران در شهرستان شهرکرد میزان فراوانی ژن *cagA* را ۸۳/۵٪ گزارش نمود (۲۳). دیگر مطالعه انجام شده توسط شکوهی زاده و همکاران در تهران، میزان پراکندگی این ژن را ۳۵/۱۸٪ گزارش نمود (۲۴). تفاوت فراوانی ژن *cagA* گزارش شده در مطالعه کنونی و مطالعه دوستی و همکاران با مطالعه شکوهی زاده عمدتاً می تواند مربوط به استفاده از پرایمرهای متفاوت به منظور جستجوی ژن مذکور می باشد؛ در حالیکه دوستی و همکاران با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه فراوانی تقریباً مشابهی را علیرغم انجام مطالعه در محل جغرافیایی متفاوت از محل مطالعه کنونی گزارش نمودند؛ بنابراین می توان تا حدودی بر اساس مطالعات انجام شده در کشور ما نتیجه گرفت که ژن *cagA* از فراوانی یکسانی در سویه های ایرانی مناطق جغرافیایی متفاوت برخوردار است.

نکته قابل ذکر این است که اگر چه صد در صد بیماران دچار سرطان معده حامل سویه های *cagA* مثبت بودند، ژن *cagA* در گروه های مختلف بیماران تقریباً فراوانی مشابهی داشت و ارزش ردیابی این ژن را به منظور غربالگری بیماران دچار اختلالات گوارشی مختلف از جمله بیماران دچار زخم گوارشی و بیمارانی که دچار سوء هاضمه می باشند را همچنان مورد سوال قرار می دهد.

### نتیجه گیری:

در این مطالعه نشان داده شده است که ژن *cagA* با سرطان معده در مقایسه با بیماران دچار سوء هاضمه بدون زخم ارتباط معنی دار

*cagA* و بیماری نیز یافت نشده است. بنابراین به نظر می رسد که غربالگری افراد در معرض خطر مستلزم یافتن و بررسی دیگر شاخص های بیماریزایی است که در ایجاد بیماری نقش داشته باشند؛ از سوی دیگر به نظر می رسد بررسی عملکرد ژن *cagA* بتواند تا حدودی در غربالگری بیماران موثر باشد.

دارد؛ اما به دلیل پراکندگی یکنواخت ژن *cagA* در دیگر گروه های بیماران، بررسی حضور ژن *cagA* به تنهایی نمی تواند به عنوان شاخص تعیین کننده برای یک پیامد بالینی ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری باشد. وضعیت مشابهی در دیگر کشورهای آسیایی که تعداد زیادی از افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری ژن *cagA* را حمل می کند وجود دارد و ارتباطی میان حضور ژن

### فهرست مراجع:

- Blaser M. *Helicobacter pylori* and pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990; **161**(4):626-33.
- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; **347**(15):1175-86.
- Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; **4** (3):185-97.
- Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M, Ito Y, Muramatsu A, et al. Distinct diversity of the *cag* Pathogenicity Island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2508-17.
- Backert S, Schwarz T, Miehle S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, et al. Functional Analysis of the *cag* Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with Gastritis, Peptic Ulcer, and Gastric Cancer. *Infect Immun* 2004; **72** (2):1043-56.
- Zhang Y, Argent RH, Letley DP, Thomas RJ, Atherton JC. Tyrosine phosphorylation of *cagA* from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelial cells. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(2):786-90.
- Yamaoka Y, Graham DY. Clarifications regarding the 3' repeat region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2001; **39** (6): 2369-70.
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997; **40** (6): 701-3.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-I specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**(25): 14648-53.
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; **28** (1): 37-53.
- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut* 1999; **45** (4): 499-502
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; **55** (10): 2111-5
- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelstein JH. Risk of gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; **40** (3): 297-301.
- Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Chou AH, Chen HT, Yang JC, et al. *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2004; **10** (16): 2334-9
- Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, et al. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002; **50** (6): 771-8
- Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various

- liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol* 2000; **30**(3):192-6.
17. Sambrook, J. and Russell, D. (2001). Molecular cloning. 3 rd ed. Cold Spring Harbor Lab Press. USA
18. Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequencing of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 1991; **173**(6):1920-31
19. Tummuru M, Cover T, Blaser M. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; **61**(5):1799-809
20. Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, et al. Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *iceA1*, and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001; **16**(5):579-84.
21. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, et al. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999; **44** (3): 336-41
22. Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmão VR, Queiroz DM, et al. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer, or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; **33** (3):173-8.
۲۳. دوستی ع ، رحیمیان ق ، نصیری ج ، یاوری فروشانی پ . بررسی میزان فراوانی ژن وابسته به سیتوتوکسین در سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه های بیوپسی معده در شهرستان شهرکرد ، مجله ارمنان دانش ۱۳۸۶ ، دوره ۱۲ ، شماره ۱ ، صص ۲۹ تا ۳۸ .
۲۴. شکوهی زاده ل ، محبتی مبارز الف ، صادقی زاده م ، امینی م . بررسی ارتباط ژن *cagA* در هلیکوباکتر پیلوری و یافته های آندوسکوپی ، مجله پزشکی کوثر ۱۳۸۵ ، دوره ۱۱ ، شماره ۳ ، صص ۲۶۱ تا ۲۶۶ .

## استفاده توام فاژ لیتیک و آکالین فسفاتاز برای درمان عفونت سوختگی ناشی از

### اشرشیاکلی در موش آزمایشگاهی

حسن حسین زادگان\*<sup>۱</sup>، محسن محمدی<sup>۱</sup>، ناصر پژوهی<sup>۲</sup>، فرزاد ابراهیم زاده<sup>۱</sup>

۱) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲) آزمایشگاه مرکز تحقیقات معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

نویسنده رابط: حسن حسین زادگان، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

تلفکس: ۰۶۶۱-۳۲۲۰۷۷۱ همراه: ۰۹۱۶۳۶۷۸۷۶۲ asadzade\_2003@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

#### چکیده:

**زمینه و اهداف:** باکتریوفاژها به اشکال مختلف از باکتری ها به عنوان میزبان برای تکثیر و بقای خود استفاده می کنند. گروهی از آنها لیتیک هستند، که پس از تکثیر در میزبان سبب لیز باکتری ها می شوند. از این نوع برای درمان عفونت های باکتریال و فاژتایپینگ استفاده می شود. که در مقایسه با آنتی بیوتیک ها دارای مزایای درمانی زیادی هستند. در این مطالعه نیز اثرات درمانی و ضد میکروبی فاژ لیتیک جداسده از منابع طبیعی بر علیه باکتری اشرشیاکلی در عفونت سوختگی ناشی از این باکتری مورد مطالعه قرار گرفته است.

**روش بررسی:** باکتریوفاژهای لیتیک با استفاده از محیط کشت لوریا برات و روش Overlay از منابع محیطی جستجو و جداسازی شدند. در مرحله بعد با استفاده از میزبان باکتریایی تکثیر و پس از فیلتراسیون و رسوب پلی ساکاریدهای موجود به عنوان استوک درمانی استفاده شدند. برای درمان از نوعی مدل سوختگی موش آزمایشگاهی و عفونت القاء شده در پشت حیوان استفاده شد. یافته ها: فاژهای لیتیک به فراوانی از مدفوع گوسفند، انسان و فاضلاب شهری جداسازی شدند. در مجموع تیتراژ جداسده از مدفوع گوسفند بسیار بالاتر از بقیه نمونه ها بود. نتایج آزمون مقایسه نسبت های کای-دو نشان می دهد، بین درصد بروز مرگ در گروه های مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد.

**نتیجه گیری:** با توجه به آنالیزهای آماری، در این مطالعه تزریق فاژهای لیتیک مانع مرگ ۸۰ درصد موش های مبتلاء به عفونت ناشی از اشرشیاکلی شد. که می تواند به عنوان ابزاری قدرتمند بر علیه عفونت های ناشی از باکتری ها از آن استفاده شود.

**کلید واژه ها:** باکتریوفاژ لیتیک، اشرشیاکلی، موش آزمایشگاهی، آکالین فسفاتاز

**مقدمه:**

رشد و تکثیر می کنند، بنابراین با مرگ تمام باکتری های حساس، فاژها نیز به سرعت از بین می روند. استفاده از باکتریوفاژها به ویژه در درمان سریع عفونت های مقاوم درمان در گروه های خاص بیماران از جمله بیماران دیابتی، افراد درگیر با عفونت های زخم بستر و سایر گروه های پر خطر و تضعیف شده ارجحیت دارد (۶). یکی دیگر از مزایای فاژها این است، که برخی از آنها دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند، که از آنها می توان به عنوان ابزار قدرتمند علیه عفونت های مختلف استفاده نمود (۷).

جداسازی فاژهای لیتیک علیه باکتری های مقاوم آنتی بیوتیک و مسئول عفونت های بیمارستانی از جمله باکتری هایی از قبیل استنوتروفوموناس مالتوفیلا و... توجه زیادی را به فاژدرمانی سوق داده است (۸). ظهور باکتری های مقاوم بیماریزا و از طرفی افزایش بیماران تصیف ایمنی شده موجب کاهش کارایی آنتی بیوتیک های رایج در درمان بیماری های عفونی باکتریایی شده است (۶). ضمن اینکه انسان به دوره پیش از آنتی بیوتیک ها به طور واقعی وارد می شود، در همین راستا تولید و گسترش آنتی میکروبیال های جدید یکی از چالش های اساسی پزشکی مدرن و بیوتکنولوژی است.

از طرفی اثرات آنزیم آلکالین فسفاتاز از چندین سال پیش در دتوکسیفای نمودن لیپوپلی ساکارید رها شده از باکتری های گرم منفی معلوم شده است. که یکی از مهمترین عوامل موثر در بروز شوک عفونی ناشی از این گروه باکتری هاست (۹، ۱۰). لذا هدف این تحقیق بررسی اثرات توام فاز لیتیک و آنزیم آلکالین فسفاتاز بر روی عفونت سوختگی ناشی از اشرشیاکلی در روی موش آزمایشگاهی است.

**مواد و روش ها:**

در این مطالعه پایه ای، آزمایش بر روی موش های نر ۴ هفته ای با وزن معادل ۲۵ گرم و سالم انجام شد.

برای تعیین حجم نمونه از فرمول زیر  $\phi 2 = \frac{D^2 n}{2\alpha\delta^2}$  استفاده شد. که در آن  $D$  معادل حداقل تفاوت بین نسبت مرگ و میر هر گروه است که به ازای مشاهده آن مقدار تفاوت، اختلاف میزان مرگ دو گروه را معنی دار تلقی می کنیم.  $n$  مساوی تعداد تکرار،  $\alpha$  معادل تعداد گروه های آزمایش (یعنی ۴)،  $\delta^2$  واریانس هر کدام از گروه های آزمایشی است، که در اینجا برابر گرفته شده اند. بر اساس رابطه ذکر شده حداقل ۹ تکرار لازم بود، که در این مطالعه از برای اطمینان بیشتر از ۱۰ موش در هر گروه استفاده شد.

استفاده از فاژها برای درمان عفونت های باکتریال قبل از کشف و استفاده از آنتی بیوتیک ها پیشنهاد شده است. فاژدرمانی با کشفیات باکتریولوژیست بریتانیایی به نام Ernest Hankin بر روی اثرات درمانی آب رودخانه گنگ و جوونا بر روی بیماری وبا در هند در ۱۸۹۶ کشف شد (۱). یکی از اولین مطالعات درمانی فاژها در حیوانات و بر علیه اشرشیاکلی بوده است (۲). در این مطالعه اثر درمانی فاژلیتیک علیه اشرشیاکلی موفقیت آمیز گزارش شده است. به دنبال آن از فاژها بر علیه عفونت های مقاوم درمان ناشی از پسدوموناس آئروژینوزا و آسیتوباکتر در موش و خوکچه هندی طراحی و با موفقیت اجرا شدند (۳، ۴، ۵). که به دنبال آن پیشنهاد شده از آنها در عفونت های پیوند پوست و سوختگی نیز استفاده شود، که همانطور که می دانیم باکتری های گرم منفی از قبیل پسدوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی از مهمترین علل عفونی مرگ در میان بیماران دچار سوختگی و بستری در بیمارستان ها هستند. فاژدرمانی یکی از روش های کم هزینه بر علیه انواع باکتری ها و به ویژه عفونت های مقاوم درمان است. فاژها در واقع موجوداتی زنده بوده و برخلاف آنتی بیوتیک ها بسیار ارزان قیمت بوده و فاقد عوارض شناخته شده هستند، بر علیه تمامی باکتری ها قابل تولید بوده و از همه روش های شناخته شده از جمله داخل عروقی، عضلانی، خوراکی، و حتی داخل مغزی ... می توان از آنها برای درمان استفاده نمود. علاوه بر این به آسانی با هزینه ای پائین از محیط زندگی انسان قابل جداسازی و تخلیص هستند. از طرفی باکتری ها توانایی مقاومت در برابر آنها را ندارند، و یا حداقل مقاومت دارویی در برابر آنها بسیار پائین است. فاژها از نظر تاثیر بر روی باکتری ها بسیار اختصاصی هستند. به این ترتیب که فقط باکتری های بیماریزا را هدف می گیرند، و حداقل برای هر باکتری بیماریزا یک و بیشتر باکتریوفاژ اختصاصی وجود دارد، که می توان از آن برای درمان استفاده نمود. در حالی که آنتی بیوتیک ها بدون استثناء تمام باکتری ها را از بین می برند. از جمله با مصرف آنتی بیوتیک ها باکتری های مفید روده ها که مزیت های زیادی برای انسان دارند، از بین رفته و باکتری های مضر شروع به تکثیر می نمایند. از دیگر مزیت های فاژها این است، که به علت تکثیر سریع در داخل باکتری ها با یک دز پائین عفونت ها را ریشه کن می کنند و به خوبی در عمق بافت ها نفوذ می کنند. در حالی که موفقیت درمان عفونت های عمقی با آنتی بیوتیک ها پائین است. در ضمن فاژها به علت این که فقط داخل میزبان های باکتریایی خود

## جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک :

ابتدا محیط کشت لوریا براث ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم و ۱ درصد مالتوز به عنوان محیط کشت Low Agar با ۱/۵ درصد آگار تهیه شد. برای جستجوی فاژ نمونه های مختلف از مدفوع انسان، مدفوع گوسفند، ورودی و خروجی رودخانه خرم رود، دریاچه کیو و فاضلاب داخل شهر برداشته شده پس از رسوب با سانتریفوژ دور ۳۰۰۰ در دقیقه مایع رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون صاف شد. رقت های ۱/۱۰۰۰۰ تا ۱/۱۰<sup>۹</sup> از آنها تهیه شده، و محیط Top Agar با مشخصات بالا (با آگار ۰/۷۵ درصد) تهیه شده و تا هنگام مصرف در ۴۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای مشاهده پلاک های فاژی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری (کشت ۴ ساعته) با ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های فیلتر شده بالا مخلوط و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد با ۵ میلی لیتر از محیط Top Agar مخلوط شده و روی محیط Low Agar به آرامی ریخته شد. بعد ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و پلاک های لیز کننده باکتری مشاهده شدند. برای پرهیز از ایجاد حباب تهیه و مخلوط نمودن محیط بایستی با آرامش انجام بگیرد (۷).

## تکثیر، تولید و استخراج فاژها:

پلاک های مشاهده شده با پیپت پاستور جداسازی شده و در داخل هاون با قیچی استریل خرد و پس از له نمودن با فیلتر ۰/۲۲ فیلتر شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با کدورت نیم مک فارلند مخلوط و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد (به دلیل نداشتن انکوباتور شیکر دار به صورت دستی و متناوب) شیک شدند. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی با سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا شده، و با فیلتر ۰/۲۲ استریل شدند. با مقدار ۱۰ درصد حجمی با اتانول در یخچال به مدت ۱۲ ساعت رسوب و پلی ساکاریدهای رها شده از باکتری با سانتریفوژ مجدد جدا شدند. در مایع استریل شده با روش ذکر شده در بالا تیتراژهای لیتیک محاسبه شده و تا مرحله بعدی در داخل محیط انفوزیون براث مغز یا نگهداری شد (۷).

## مرگ و میر حیوانی:

برای مطالعات حیوانی بخش پشتی ۴۰ موش در ۴ گروه ۱۰ تایی پس از بیهوشی با کتامین (100mg/kg/i.m) و زایلوزین (20mg/kg/i.v) و تراشیده شدن، با استفاده از پنبه الکلی هر کدام به مدت ثابت ۱۰ ثانیه از فاصله ثابت سوزانده می شدند. موش ها به مدت ۵ روز در حیوان خانه تغذیه شده و به همه آنها

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند باکتری ۴ ساعت کشت به صورت زیر جلدی در محل سوختگی تزریق شد. سپس به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان کنترل پس از دریافت سرم استریل نگهداری شدند. گروه دوم فقط ۵۰ میکرولیتر آلكالن فسفاتاز دریافت کردند. گروه سوم نیز نیم ساعت پس از تزریق باکتری مقدار ۳۰ میکرولیتر باکتریوفاژ با ۱۰<sup>۸</sup> واحد تشکیل پلاک دریافت نمودند. در گروه چهارم مشابه گروه دوم ابتدا مقدار ۳۰ میکرولیتر باکتریوفاژ با ۱۰<sup>۸</sup> واحد تشکیل پلاک دریافت و بعد ۵۰ میکرولیتر آلكالن فسفاتاز دریافت کردند. مرگ و میر موش ها تا ۲۰ روز بررسی شدند.

## یافته ها:

نمونه های مختلف از جمله مدفوع انسان، گوسفند، موش، سگ و مرغ و بخش مختلف رودخانه های اطراف شهر از جمله ورودی و خروجی و دریاچه کیو، فاضلاب داخل شهری از نظر وجود باکتریوفاژ لیتیک علیه سویه بیماریزای /اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفتند. فاژهای لیتیک به فراوانی از مدفوع گوسفند، انسان و فاضلاب شهری جداسازی شدند. در مجموع تیتراژ جدا شده از مدفوع گوسفند بسیار بالاتر از بقیه نمونه ها بود. در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون در مدت تقریبی ۱۲ ساعت پلاک های لیز باکتری میزبان به روشنی قابل مشاهده بودند، که نشان دهنده لیتیک بودن آنها بر روی باکتری بود.

## اثر باکتریوفاژ نسبی تخلیص شده در مرگ و میر موش ها:

موش های مورد مطالعه در طی دوره ۷-۵ روزه پس از سوختگی دچار تضعیف ایمنی شدید می شدند. به این دلیل تمام موش ها پس از این مدت دچار ضعف شدید بدنی از جمله کاهش وزن، عدم اشتیاق به خوردن و آشامیدن شدند. برخی از حیوانات علائم شوک عفونی از جمله پشت خمیده، پشم های ژولیده، رگ های دمی پر خون، خواب آلودگی، تجمع آگزودا در اطراف چشم بسته حیوانات را نشان داده، و برخی نیز با عفونت های فرصت طلب از بین رفتند. موش های مرده در این مرحله از مطالعه حذف شدند. البته در مرحله ای از این مطالعه بررسی اثر کشندگی باکتری جدا شده از عفونت ادراری بیمار بر روی موش های سالم و سوزانده شده نشان داد که تمام موش ها پس از ۳-۲ روز از تزریق داخل صفاقی با ۱۰<sup>۸</sup> CFU باکتری از بین رفتند.

نتایج آزمون مقایسه نسبت های کای-دو نشان می دهد، بین درصد بروز مرگ در گروه های مختلف بطور کلی اختلاف معنی داری وجود دارد. (P<0.001). لازم به ذکر است که سطح معنی داری

معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. ( $\alpha = 0.05$ ) در ضمن مقایسه دو به دوی گروه های درمانی با سطح معنی دار ۰/۵۰ به صورت زیر بوده است. نتایج آزمون دقیق فیشر نشان می دهد که از نظر درصد مرگ، تفاوتی بین گروه ۱ و ۲ وجود ندارد. ( $P=0.237$ ) در حالی که بین گروه ۱ و ۳ ( $P<0.002$ ) و گروه های ۱ و ۴ ( $P<0.001$ ) از این نظر تفاوت معنی داری وجود دارد. بر اساس نتایج آزمون فیشر بین گروه های ۲ و ۳ ( با ۹۶/۵ درصد اطمینان و  $P=0.035$ ) و گروه های ۲ و ۴ ( با ۹۸/۸ درصد اطمینان و  $P=0.012$ ) تفاوت معنی دار وجود دارد. نتیجه این آزمون برای مقایسه گروه های ۳ و ۴ معنی دار نبود. ( $P=0.500$ ) نتیجه نهایی اینکه از نظر تاثیر مرگ و میر موش ها ی مورد مطالعه گروه های ۱ و ۲ در یک دسته و گروه های ۳ و ۴ در دسته جداگانه ای قرار می گیرند.

جدول ۱: جدول توزیع فراوانی موش های آزمایشگاهی به تفکیک گروه تیمار و وضعیت مرگ

کل	پاسخ		
	تعداد مرده	تعداد زنده	
گروه ۱	۱۰ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	
گروه ۲	۸ (۸۰٪)	۲ (۲۰٪)	
گروه ۳	۳ (۳۰٪)	۷ (۷۰٪)	
گروه ۴	۲ (۲۰٪)	۸ (۸۰٪)	
مجموع	۲۳ (۵۷.۵٪)	۱۷ (۴۲.۵٪)	

### بحث:

شرشیاکلی یکی از فلور نرمال گوارشی در انسان و حیوانات خون گرم است. که در اغلب موارد به عنوان یک میکروب فرصت طلب در عفونت های مختلف بیمارستانی، سوختگی ها، و مهمتر از آنها عفونت سیستم اداری انسان نقش دارد. مطالعه نقش باکتریوفازهای لیتیک در پیشگیری یا درمان عفونت های ناشی از این باکتری و سایر باکتری ها دارای ارزش زیادی برای متخصصین عفونی و جامعه درمانی است. این زمینه از علم درمان مخصوصا در دو دهه اخیر به دلیل عدم تولید کلاس های جدید آنتی بیوتیکی و ظهور

سویه های مقاوم چند دارویی علاقمندان زیادی را به خود جذب کرده است. نکته جالب توجه تحقیق حاضر این بود، که علیرغم اغلب مطالعات در زمینه فاز درمانی که باکتری میزبان و باکتریوفاز مربوطه با فاصله کوتاهی از هم به مدل حیوانی یا انسان های داوطلب تجویز می شود، در این مطالعه باکتری و فازهای لیتیک پس از حدود ۵ روز از ایجاد سوختگی که اغلب حیوانات بد حال و نمره بهداشتی پائین داشتند، تزریق شدند. نتیجه نهایی با توجه به آنالیز های آماری پیشگیری از مرگ ۸۰ درصد موش های تیمار شده بود. پلاک های فازی علیرغم رسوب پلی ساکاریدهای موجود با کلل سرد دارای مقدار زیادی از لیپولی ساکارید باکتری میزبان بود، که یکی از عوامل موثر در کارایی درمانی آن بود. همانطور که می دانیم اندوتوکسین رها شده از باکتری های گرم منفی یکی از عوامل مهم تحریک کننده شوک عفونی و مرگ در انسان و حیوانات است. لیپولی ساکارید باکتری های گرم منفی هنگام تخلیص فاژها بایستی به طور کامل حذف شود. مطابق فارماکوپه اروپا در ۱۹۹۷ مقدار لیپولی ساکارید برای مصارف درمانی باید ۵ واحد اندوتوکسین به ازای هر کیلو وزن در ساعت یا 5 EU Kg/h باشد (۱۱). در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی و نیز هزینه بالا امکان استفاده از تست LAL وجود نداشت. عدم وجود مواد و وسایل آزمایشگاهی استاندارد و شرایط نامناسب حیوان خانه محل انجام تحقیق نیز از سایر محدودیت های این مطالعه بودند. مطالعه Smith , Huggins نشان داده است که تزریق یک دوز فاژهای مرحله رشد نمایی از تزریق مکرر ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف از قبیل تتراسیکلین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل، یا کوتریموکسازول در درمان عفونت باکتری می در موش آزمایشگاهی بهتر است (۲).

در موش آزمایشگاهی تزریق آلكالين فسفاتاز به تنهایی سبب بقای ۸۰ درصد آنها از مرگ توسط عفونت کشنده /شرشیاکلی شده است. در بچه خوک ها مقادیر ۱۰ میکروگرم در هرکیلوگرم وزن از آلكالين فسفاتاز استخراج شده از روده گاوها موجب تخفیف اثرات هماتولوژیک و پاسخ فاکتور نکروز تومور آلفا می شود. این آنزیم پس از برداشتن گروه فسفات از بخش لیپیدی ملکول لیپولی ساکارید، آن را به شکل غیر سمی و غیر تب زا تبدیل می کند (۱۲). یکی از دلایل تفاوت در عدم تاثیر آلكالين فسفاتاز و گروه توام آنزیم با فاز در این تحقیق این است، که آنزیم بایستی همراه باکتری ها تزریق می شد. در واقع پس از رها شدن اندوتوکسین، آنزیم فاقد اثر خواهد بود.

عوارض احتمالی آنها محسوب می شود. علاوه بر این، احتمالاً فاژها توسط سیستم رتیکولاندوتلیال به سرعت حذف شده و به سطح درمانی نرسند (۱۸). از طرفی تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن های فاژی به اثبات رسیده است (۱۹)، که احتمالاً در بروز ایمنی علیه آنها و خشی سازی آنها و نیز بیماری های خود ایمنی ممکن است نقش داشته باشند. از سایر معایب مطرح شده در رابطه با فاژ درمانی، موفقیت پائین درمان عفونت های داخل سلولی (مانند تیفوئید و بروسلوزیز...) و مقاومت های باکتریایی علیه آنهاست. که همگی نیازمند مطالعات گسترده و دقیق علمی است.

در مطالعه ای مقاومت ایجاد شده در باکتری کامپیلوباکتر در برابر فاژها ۴ درصد گزارش شده است. باکتری ها پس از کسب مقاومت توان کلونیزاسیون در میزبان را از دست می دهند، از طرفی پس از ورود در بدن میزبان به شکل حساس به فاژ بر می گردند (۲۰).

در هر حال در صد موفقیت جداسازی فاژهای لیتیک بر علیه باکتری ها نسبتاً کاری مشکل و زمان بر می باشد، به دلیل اینکه در این تحقیق پس از بررسی دهها نمونه محیطی و انسانی در نهایت فاژ لیتیک موثر بر *اشرشیاکلی* از نمونه مدفوع گوسفند جداسازی شد. این فاژ به دلیل محدودیت زمانی و محدودیت هزینه طرح فقط بر روی یک سویه ایزوله از عفونت ادراری انسانی آزمایش شد. در همین رابطه در مطالعه ای بر روی ۲۹ فاژ جدا شده از فاضلاب بیمارستان فقط یکی از آنها روی سودوموناس مقاوم ایمنی پنم اثر لیتیک داشته است. در این تحقیق با تزریق ۳۰ میلیون باکتری همه موش ها پس از ۲۴ ساعت از بین رفتند، و با تزریق یک دوز از فاژ لیتیک ۱۰۰ درصد موش ها زنده ماندند. با این حال موقعی که فاژها در ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه پس از تزریق باکتری به حیوانات تزریق شدند، به ترتیب ۵۰ درصد و ۲۰ درصد موش ها زنده ماندند. که نشان دهنده وابستگی اثر فاژها به زمان ورود باکتری به میزبان است (۶). در این مطالعه سطح آنتی بادی ضد فاژ در ابتدای تزریق و پس از تزریق تغییری نیافت.

به طور کلی مطالعات گسترده درمانی در اواسط دهه ۱۹۸۰ در لهستان میزان بهبودی فاژ درمانی را ۹۲ درصد گزارش نموده است (۲۱).

### نتیجه گیری:

فاژ درمانی موضوعی بسیار جذاب در بحث درمان عفونت های باکتریایی است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهد که فاژهای لیتیک ابزارهای قدرتمند بیولوژیک علیه باکتری ها هستند، که می توانند به دلیل افزایش روز افزون مقاومت دارویی و هزینه های

باکتریوفاژهای لیتیک احتمالاً به صورت هدفمند در عفونت های خاصی نیز قابل استفاده هستند. به دلیل اینکه در یک مطالعه از فاژهای ایزوله شده از فاضلاب برای جلوگیری و کنترل سپتی سمی و عفونت شبه مننژیت ناشی از *اشرشیاکلی* سویه K1 در جوجه ها و گوساله ها استفاده شده است. این باکتریوفاژ به صورت انتخابی به آنتی ژن کپسولی K1 باکتری می چسبند. یکی از مزایای فاژدرمانی در این مطالعه اثر درمانی فاژها پس از بروز علائم بیماری گزارش شده است (۱۳). باکتریوفاژهای لیتیک قدرت نفوذ بسیار بالایی نیز دارند، به طوری که در مطالعه دوبوس و همکاران نشان داده شده است، که عفونت داخل مغزی با شیگلا در موش با استفاده از فاژهای لیتیک تزریق شده از طریق داخل صفاقی قابل درمان هستند، که در واقع بیانگر ورود فاژ از سد خونی مغزی است (۱۴).

اثر درمانی فاژها و عدم سیتوتوکسیسته آنها در عفونت های ناشی از کلبسیلا در موش آزمایشگاهی بررسی شده است. در این تحقیق فاژهای لیتیک به صورت داخل بینی و داخل صفاقی و بدون عارضه استفاده شده اند (۱۵).

اثر فاژهای لیتیک در برخی عفونت های انسانی بهتر از آنتی بیوتیک ها گزارش شده است (۱۶). به طوری که در یک مطالعه اثر درمانی آنتی بیوتیک ها و فاژها در درمان عفونت چرکی استافیلوکوکوسی مقایسه شده است، که میزان بهبودی در گروه دریافت کننده فاژها ۸۲ درصد و گروه دریافت کننده آنتی بیوتیک ۶۴ درصد گزارش شده است (۱۷). در این مطالعه اثر درمانی فاژها در هنگام تزریق داخل رگی در گروهی دیگر از بیماران بالاتر از ۹۵ درصد گزارش شده است.

مصرف کلینیکی فاژها در طول صد سال گذشته به اشکال مختلف، با دوز های بالا و روش های مختلف تجویز بدون عارضه گزارش شده است (۶).

در واقع فاژها به شدت در محیط زندگی پراکنده اند. به طوری که در آب غیر آلوده به تعداد ۲۰۰ میلیون در هر میلی لیتر وجود دارند. که به طور منظم در غذاها مصرف می شوند (۶). فاژها علیرغم تاثیر ضد میکروبی محدودیت هایی نیز دارند. عدم تاثیر احتمالی بر میکروپ های داخل سلولی، عدم نفوذ مناسب در محل التهاب، و تحریک بیماری های خود ایمنی از مشکلات ناشی از فاژ درمانی هستند (۱۳). از طرفی فاژها ممکن است دارای ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن سموم مختلف، و یا ژن های عوامل ویرولانسی باکتری ها بوده، یا در ترانسداکشن عمومی نقش داشته باشند. که از

### تقدیر و تشکر:

این طرح با حمایت های بی دریغ مجموعه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان لرستان انجام شده است. که بدینوسیله از تمامی همکاران بخش های پژوهشی و مالی و مخصوصا معاونت های محترم آموزشی و پژوهشی، و مدیر پژوهشی و سایر همکاران تشکر و قدردانی می شود.

سرسام آور آنتی بیوتیک ها، به عنوان یکی از جایگزین های آنتی بیوتیک ها و دارو درمانی علیه عفونت های باکتریال استفاده شوند. لیکن مطالعات زیاد انسانی و حیوانی لازم است. ضمن اینکه بایستی عوارض ناشی از مصرف گسترده آنها در انسان با روش های علمی بررسی شود.

### فهرست مراجع:

- Hankin, EH. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur* 1896; 10:511.
- Smith H W, and Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol* 1982; **128**:307-318.
- Soothill J S, Lawrence JC, and Ayliffe G A. The efficacy of phages in the prevention of the destruction of pig skin in vitro by *Pseudomonas aeruginosa*. *Med. Sci. Res* 1988; **16**:1287-1288.
- Soothill J S. Treatment of experimental infections of mice by bacteriophage. *J. Med. Microbio.* 1992; **37**:258-261.
- Soothill JS. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns* 1994; **20**:209-211.
- Alexander S, Zemphira A, and Glenn MJ. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2001; **45**(3): 649-659.
- Ellien C J, Schrader HS, Rieland B, Thopson T L, Lee K W, Nickerson K W, And Tyler A. Kokjohn. Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol* 1998; **64**(2): 575-580.
- Chang H C, Chiy-Rong C, Gwan-Han Shen, Kai-Ming Chang, Yi-Hsiung Tseng, and Shu-Fen Weng. Isolation and Characterization of Novel Giant *Stenotrophomonas maltophilia* Phage \_SMA5 . *Appl. Environ Microbiol.* 2005; **71**(3): 1387-1393. doi:10.1128/AEM.71.3.1387-1393.2005
- Klaas P, Winston WB, Pieter AK, Jan A A, Machiel M K, and Dirk FM. Dephosphorylation of Endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *A J Pathol* 1997, **151**:1163-1169.
- Poelstra K, Bakker W W, Hardonk MJ, and Meijer D K F. Endotoxin detoxification by alkaline phosphatase in cholestatic livers. *Cells of the Hepatic Sinusoids* 1997;6: 187-189.
- Boratynski J, Syper D, Weber-Dabrowska B, Lusiak-Szelachowska M, Pozniak G, Gorski A. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9**(2):253-9.
- Chantal B, Marty W, Willem R, Dani E F, Ruud B, and Willem S. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, a Novel Therapeutic Drug for Lipopolysaccharide (LPS)-Mediated Diseases, Attenuates LPS Toxicity in Mice and Piglets. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; **307**( 2) 234-238
- Paul B, Margaret L, and Angelo B J. Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; **5**(3): 294-298.
- Dubos R J, Straus J H, and Pierce C. The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *J. Exp. Med.* 1943; **20**:161-168.
- Bogovazova G G, Voroshilova N N, and Bondarenko V M. The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol* 1991; **4**:5-8.
- Sakandelidze V M. The combined use of specific phages and antibiotics in different infectious allergoses. *Vrach. Delo* 1991; **3**:60-63.

17. Meladze G D, Mebuke M G, Chkhetia N S, Kiknadze N I, Koguashvili G G, Timoshuk II, et al. The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudn. Khir* 1982; **1**:53–56.
18. Merrill C R, Biswas B, Carlton R, Jensen N C, Creed G j, Zullo S, and Adhya S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **8**:3188–3192.
19. Kucharewicz-K, A, and Slopek S. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther.Exp* 1987; **5**:553–561.
20. Carrillo C L, Atterbury R J, El-Shibiny A, Connerton P L, Dillon E, Scott A, and Connerton I f. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens *Appl.Environ Microbiol.* 2005; **71**(11): 6554–6563. doi:10.1128/AEM.71.11.6554–6563.2005
21. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med* 2006; **17**(2):309-17



## تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر اتصال استرپتوکوک های دهانی در

### شرایط آزمایشگاه

آرزو طهمورث پور\*<sup>۱</sup>، روحا کسری کرمانشاهی<sup>۲</sup>، رسول صالحی<sup>۳</sup>، عبدالرضا نبی نژاد<sup>۴</sup>

۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان

۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا تهران

۳) گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۴) مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی

نویسنده رابط: آرزو طهمورث پور، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان

تلفن: ۰۳۱۱-۶۲۷۸۳۱۴-۰۳۱۱ همراه: ۰۹۱۳۳۱۳۰۰۵۲ atahmoures@khuisf.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۲

### چکیده:

**زمینه و اهداف:** استرپتوکوک های دهانی *بویژه استرپتوکوکوس موتانس* از عوامل موثر در ایجاد پوسیدگی دندان و بیماری های پریدونتال شناخته شده اند. با افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها، برای حذف باکتری های پاتوژن حفره دهانی یک روش جدید، از جمله استفاده از پروبیوتیک ها می تواند مورد بررسی قرار گیرد. به همین منظور در این مطالعه تأثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک بر فرایند اتصال استرپتوکوک های دهانی به سطوح، مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 به همراه ۴۰ سویه *استرپتوکوکوس موتانس* و سایر استرپتوکوک های دهانی جدا شده از نمونه های پلاک و پوسیدگی افراد داوطلب مورد بررسی قرار گرفت. قدرت تشکیل بیوفیلم در این سویه ها با روش رنگ سنجی ارزیابی گردید و قویترین سویه ها در تشکیل بیوفیلم انتخاب شد. سپس تأثیر سویه پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ATCC9338) بر اتصال استرپتوکوک ها در میکروتیتر پلیت های پلی استیرنی به طور همزمان و ۳۰ دقیقه قبل از ورود استرپتوکوک به سیستم مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** نتایج نشان دهنده کاهش اتصال استرپتوکوک ها در حضور پروبیوتیک مربوطه بود که در زمانی که سویه پروبیوتیک قبل از استرپتوکوک وارد سیستم شده بود کاهش اتصال بیشتر شد. کاهش اتصال احتمالاً به دلیل کلونیزه شدن جایگاه های اتصال با سویه پروبیوتیک قبل از ورود سویه استرپتوکوک و میانکنش بین باکتری ها می باشد.

**نتیجه گیری:** چون اتصال مهمترین و اولین فاکتور در ایجاد پوسیدگی و بیماری می باشد، کاهش اتصال می تواند راه موثری در کاهش ریسک پوسیدگی دندان باشد.

**کلید واژه ها:** استرپتوکوک، اتصال، پوسیدگی دندان، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*

**مقدمه :**

عفونت های دهان معمول ترین و گران ترین اشکال عفونت های انسانی را تشکیل می دهند. پوسیدگی های دندانی و بیماری های پریدنتال در ۹۵٪ افراد جامعه وجود دارد. گرچه فلورایدتراپی و دیگر روش های پیشگیرانه منجر به کاهش قابل توجهی در وقوع پوسیدگی های دندانی شده اند ولی هنوز عفونت به طور واقعی کنترل و محدود نشده است (۱ و ۲). در پوسیدگی دندان و بیماری های پریدنتال مهمترین عامل اتصال باکتری های دهانی به ویژه استرپتوکوک ها به سطوح مختلف دهان و دندان می باشد. تغییر اکولوژی میکروبی به عنوان یک مکانیسم برای پیشگیری از پوسیدگی دندانی یک مسئله با اهمیت است و از آنجایی که مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش است، یافتن مواد ضدمیکروبی جدیدتر و بهتر برای پیشگیری و درمان بیماری های دهان و دندان (۳ و ۴) و بررسی تاثیر این مواد بر اتصال باکتری های دهان به سطوح مختلف ضروری به نظر می رسد.

برای حذف باکتری های پاتوژن حفره دهانی یک روش جدید، از جمله استفاده از پروبیوتیک ها می تواند مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از پروبیوتیک ها یک راه امیدبخشی است که برای مبارزه با عفونت ها می توان از باکتری های بی ضرر (مفید) کمک گرفته آنها را جایگزین میکروارگانیسم های پاتوژن نمود (۱).

پروبیوتیک ها معمولاً میکروارگانیسم های غیربیماری زایی هستند که بر سلامتی و فیزیولوژی میزبان تاثیر مثبت دارند. تاکنون این باکتری ها به طور موفقیت آمیز در کنترل بیماری های معده ای روده ای مورد استفاده واقع شده اند. به همین دلیل اطلاعات بیشتری در ارتباط با کلونیزاسیون پروبیوتیک ها در دهان و اثر احتمالی آنها بر بیوفیلم های باکتریایی دندان مورد نیاز است. دلایل متعددی وجود دارد که مکانیسم های عمل پروبیوتیک ها در دهان مشابه با عمل آن در دیگر قسمت های دستگاه معده ای - روده ای باشد و به دلیل افزایش جهانی مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها ضرورت استفاده از پروبیوتیک ها معلوم شده و تحقیقات بیشتری را در این زمینه می طلبد (۵). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس فرمنتوم به عنوان یک پروبیوتیک بر فرایند اتصال استرپتوکوک های دهانی می باشد.

**مواد و روش ها:**

سویه های باکتریایی و شرایط رشد:

در این تحقیق ۴۰ سویه باکتریایی از نمونه های پوسیدگی دندان و پلاک دندان افراد داوطلب هر دو جنس با میانگین سن ۲۵ سال و

عدم مصرف هرگونه آنتی بیوتیک در یک ماه گذشته، توسط کورت استریل دندانپزشکی جداسازی گردید. سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس با (ATCC 35668) نیز برای مقایسه تهیه گردید. همه سویه ها بر محیط کشت های بلاگ آگار و میتیس سالیواریوس آگار ساخت کارخانه مرک آلمان و در اتمسفر حاوی دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت و گرمخانه گذاری شد. سپس با کمک تست های بیوشیمیایی و کیت شناسایی سریع RAP ID STR به دو گروه موتانس و سایر استرپتوکوک های دهانی تقسیم گردید.

لاکتوباسیلوس فرمنتوم با ATCC9338 و PTCC1638 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران تهیه گردید و در محیط کشت MRS آگار کشت و نگهداری گردید.

**تشکیل بیوفیلم باکتری ها به روش میکروتیتر پلیت :**

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری های جدا شده از سوپانسیون معادل با استاندارد ۵/۰ مک فارلند در محیط کشت TSB حاوی ۱ درصد سوکروز استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از این سوپانسیون به هر چاهک در میکروتیتر پلیت ۹۶ چاهکی پلی استیرن انتقال داده شد. چاهک های شاهد تنها حاوی محیط می باشند. پس از ۲۴ ساعت محتویات چاهک ها خارج و هر چاهک ۳ مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. ۲۵۰ میکرولیتر اتانل به مدت ۱۵ دقیقه برای تثبیت باکتری های متصل به دیواره و کف چاهک به کار رفت. پس از خشک شدن چاهک ها پلیت ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲ درصد رنگ آمیزی شدند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم توسط اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر چاهک و بررسی جذب نوری رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر در طول موج ۴۹۲nm توسط دستگاه ELISA READER انجام گرفت. در نهایت کلاس بندی ایزوله ها بر اساس جذب نوری (OD) به صورت زیر صورت گرفت (۶).

میانگین جذب نوری یک باکتری = OD

میانگین جذب نوری برای چاهک های شاهد = ODC

Non Adherent:  $OD \leq ODC$

Weakly adherent:  $ODc < OD \leq 2ODc$

Moderately adherent:  $2ODc < OD \leq 4ODc$

Strongly adherent:  $4ODc < OD$

سپس سویه های شدیداً چسبنده که قدرت تشکیل بیوفیلم آنها از بقیه بیشتر بود برای مرحله بعد انتخاب شدند.

### تاثیر لاکتوباسیلوس فرمتوم بر اتصال باکتری های با قدرت اتصال بالا:

در این مرحله نیز از روش میکروتیتر پلیت استفاده گردید به این ترتیب که کشت شبانه یک درصد رقیق شده از استرپتوکوک های دهانی با قدرت اتصال بالا در محیط کشت TSB کامل شده با ۱٪ سوکروز و پروبیوتیک مورد نظر (لاکتوباسیلوس فرمتوم) ۱٪ رقیق شده در محیط کشت MRS broth تهیه شد. در روش اول ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط هم حجم از دو محیط فوق به چاهک های میکروتیتر پلیت انتقال داده شد، چاهک های شاهد فقط حاوی سوسپانسیون استرپتوکوک های دهانی بودند. در روش دیگر ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک ها وارد چاهک ها شده و ۳۰ دقیقه بعد سوسپانسیون استرپتوکوک ها اضافه گردید. در چاهک های شاهد این مرحله ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر PBS و پس از ۳۰ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر استرپ اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محلول ها و مواد غذایی از چاهک ها خارج و ۳ بار شستشو با PBS انجام و با کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی انجام شد و پس از افزودن اسید استیک ۳۳٪ جذب نوری رنگ موجود در حلال رنگ بر توسط دستگاه ELISA READER خوانده شد و با مقایسه با چاهک های شاهد درصد کاهش اتصال باکتری ها از طریق کاهش میزان جذب نوری محاسبه گردید (۷).

### آنالیز های آماری:

آنالیز آماری در این تحقیق با استفاده از نرم افزار Excel انجام گردید. بر اساس روش تعیین فاصله اطمینان برآورد برای میانگین تیمارها اقدام به رسم گراف با استفاده از error bar گردید.

### یافته ها:

#### تشکیل بیوفیلم:

قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری ها با استفاده از بررسی جذب نوری توسط ELISA READER بررسی شد که یک روش رنگ سنجی می باشد. در این مرحله باکتری های دارای قدرت چسبندگی بیشتر و توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم انتخاب گردید. ۳۳ درصد از ایزوله ها شدیداً چسبنده بوده (SA) که قدرت تشکیل بیوفیلم بالایی داشتند که از این بین ۶۷ درصد استرپتوکوکوس موتانس و بقیه استرپتوکوک های غیرموتانس بودند. ۳۹ درصد قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم متوسط را نشان داده که ۵۴ درصد آن استرپتوکوک موتانس بوده و ۲۵ درصد ایزوله ها نیز قدرت چسبندگی ضعیف داشتند که فقط ۳۰ درصد آن مربوط به

استرپتوکوک های موتانس بود و ۳ درصد از باکتری های جدا شده فاقد قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم بودند که همگی گونه های دیگر استرپتوکوک بودند (نمودار ۲و). سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس با ATCC35668 نیز با شماره ۲۴ در این تحقیق بررسی گردید که بر اساس نتایج حاصله، جزء باکتری های شدیداً چسبنده قرار گرفت. آنالیز های آماری اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را بین سویه های شدیداً چسبنده و دیگر سویه ها نشان داد. بین استرپتوکوک های جداسازی شده که قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم بالایی داشتند به جز استرپتوکوکوس موتانس جدایه شماره ۲۲ با استرپتوکوک شاهد از نظر اتصال و تشکیل بیوفیلم تفاوت معنی داری دیده نشد. استرپتوکوکوس موتانس جدایه ۲۲ بالاترین قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم را داشت که از نظر آماری تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد با باکتری شاهد نشان داد.

### تاثیر لاکتوباسیلوس فرمتوم بر اتصال استرپتوکوک های با قدرت اتصال بالا:

استرپتوکوکوس های با قدرت اتصال بالا و همچنین یک استرپتوکوک با قدرت اتصال بسیار ضعیف با استفاده از نتایج مرحله قبل انتخاب گردید و تاثیر لاکتوباسیلوس فرمتوم با ۲ روش بر علیه اتصال آنها به چاهک های پلی استیرنی میکروتیتر پلیت ارزیابی گردید. در روش اول از مخلوط هم حجم لاکتوباسیل و استرپتوکوک و در روش دوم لاکتوباسیل ۳۰ دقیقه پس از به کاربردن استرپتوکوک استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون تفاوت جذب نوری چاهک های شاهد (حاوی استرپتوکوک تنها) و چاهک های مورد نظر (حاوی استرپتوکوک و لاکتوباسیل) برای محاسبه تاثیر پروبیوتیک مورد نظر بر اتصال استفاده شد. نتایج نشان دهنده کاهش اتصال در حضور پروبیوتیک مربوطه بود. اتصال استرپتوکوکوس موتانس شاهد (ATCC35668) به چاهک های پلی استیرن در روش های ۱ و ۲ در حضور پروبیوتیک به ترتیب ۲۱ درصد و ۳۳/۵ درصد کاهش داشت که از نظر آماری این تفاوت معنی دار بود. اتصال استرپتوکوکوس موتانس شماره ۲۲ که چسبنده ترین استرپتوکوک جداسازی شده، (با تفاوت معنی دار آماری در سطح ۰/۰۰۱) بود در روش اول ۱۰ و روش دوم ۱۷/۵ درصد کاهش یافت که تفاوت معنی داری از نظر کاهش اتصال بین دو روش مورد استفاده دیده نشد (نمودار ۲ الف).

در روش دوم که لاکتوباسیلوس فرمتوم ۳۰ دقیقه قبل از استرپتوکوک به کار برده شد در اکثر موارد کاهش بیشتری در اتصال

نسبت به استرپتوکوک های موتانس داشت ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری دیده نشد. (نمودار ۳ ب).

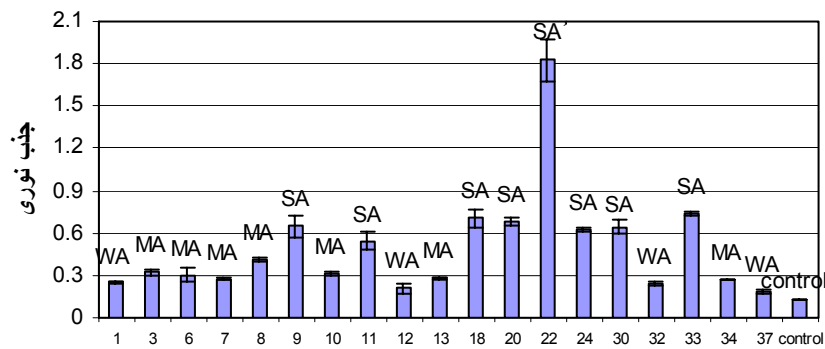
ایجاد شد که میانگین کاهش اتصال در روش های اول و دوم به ترتیب ۱۷،۲۹ و ۲۶،۲۳ درصد به دست آمد (نمودار ۳ الف). به طور کلی در هر ۲ روش مورد استفاده لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر اتصال استرپتوکوک های غیر موتانس تاثیر بیشتری

نمودار ۱: تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم الف) استرپتوکوک های موتانس ب) و دیگر استرپتوکوک های دهانی

SA: شدیداً چسبنده ، MA: نسبتاً چسبنده ، WA: چسبندگی ضعیف ، NA: بدون قدرت چسبندگی

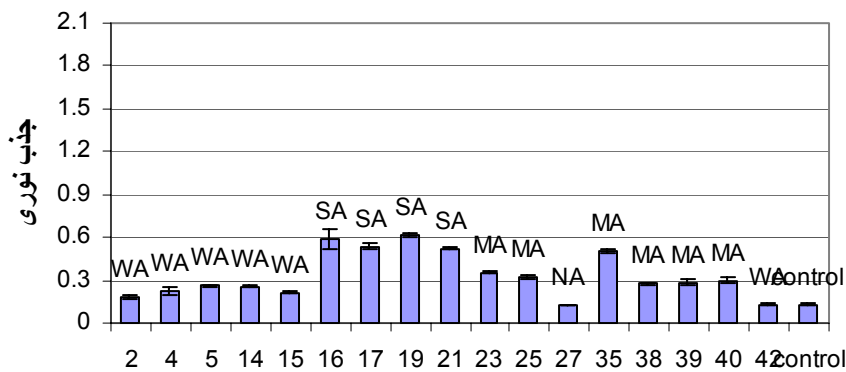
استرپتوکوکوس موتانس ۲۴ همان سویه استاندارد با ATCC35668 می باشد

### الف



سویه های استرپتوکوکوس موتانس

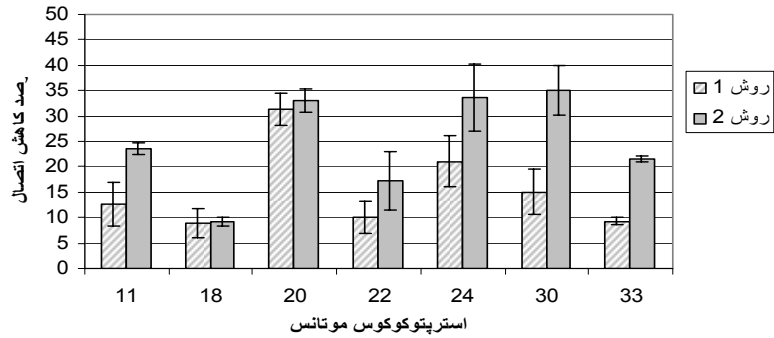
### ب



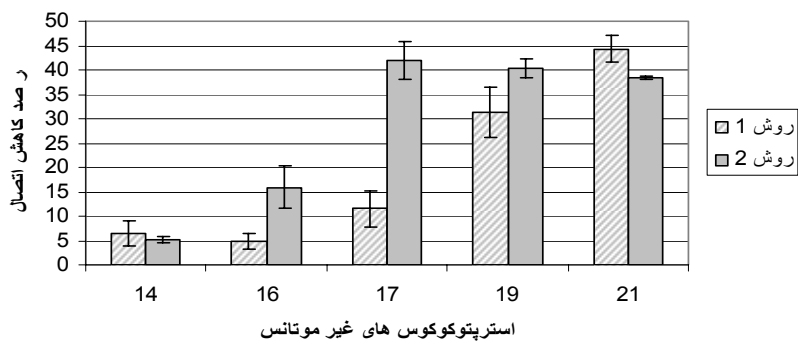
دیگر سویه های استرپتوکوک های دهانی

نمودار ۲: تاثیر لاکتوباسیلوس فرمتوم بر اتصال الف) استرپتوکوک های موتانس ب) غیرموتانس با ۲ روش مورد استفاده

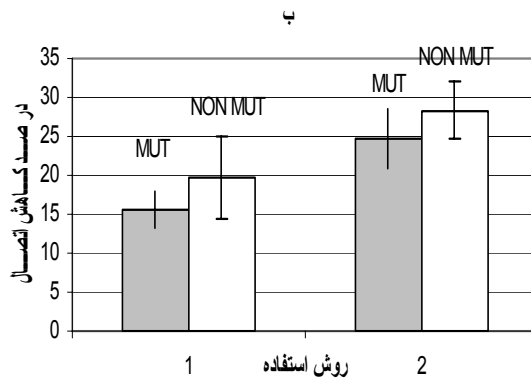
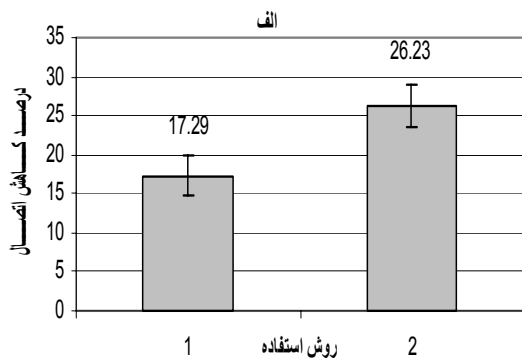
الف



ب



نمودار ۳: مقایسه کاهش اتصال ایجاد شده الف) در حضور لاکتوباسیلوس فرمتوم بین دو روش مورد استفاده ب) و بین استرپتوکوک های موتانس (MUT) و دیگر استرپتوکوک های دهانی (NON MUT) در ۲ روش مورد استفاده



**بحث :**

بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق مشخص شد که حضور *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ATCC9338 به عنوان یک باکتری پروبیوتیک می تواند باعث کاهش اتصال استرپتوکوک ها به سطوح مورد آزمایش گردد که این مطلب می تواند به میانکنش بین باکتری ها نسبت داده شود. زمانی که سویه پروبیوتیک قبل از استرپتوکوک وارد سیستم مورد آزمایش گردید کاهش اتصال بیشتر شد و از نظر آماری نیز تفاوت معنی داری با استفاده هم زمان هر دو باکتری داشت که نشان می دهد افزودن سویه پروبیوتیک قبل از سویه پوسیدگی زا (کاریوژنیک) کلونیزاسیون آن را در سطوح مورد مطالعه افزایش داده است. از طرفی تصور می شود که سویه پروبیوتیک قادر به تغییر بخشی از ساختمان یا فیزیولوژی باکتری دخیل در تشکیل بیوفیلم (استرپتوکوک های موتانس و سایر گونه های استرپتوکوک دهانی) خواهد بود که این تغییر بویژه در ارتباط با *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۲۰ و استرپتوکوک غیر موتانس جدایه ۲۱ مشخص می شود که اتصالشان به میزان بیشتری از دیگر جدایه ها تحت تاثیر پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته و کاهش یافته است. در بیشتر ایزوله ها از جمله *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۳۰ و استرپتوکوکوس غیر موتانس جدایه ۱۷ و *استرپتوکوکوس موتانس* سویه شاهد با ATCC35668 (ایزوله ۲۴) تفاوت معنی دار آماری از نظر کاهش اتصال در حضور پروبیوتیک در بین ۲ روش مورد استفاده دیده شده که مربوط به پر شدن جایگاه های اتصال توسط سویه پروبیوتیک قبل از ورود سویه کاریوژنیک می باشد. از طرفی *استرپتوکوکوس موتانس* جدایه ۲۲ که بالاترین قدرت اتصال را داشت و در نتیجه پرقدرت ترین و پاتوژن ترین باکتری مورد بررسی در نظر گرفته شد، در مقابل تاثیر پروبیوتیک تاحدی مقاومت نشان داد و کاهش اتصال کمتری یافت و تفاوت معنی داری نیز بین ۲ روش مورد استفاده این باکتری و برخی از دیگر باکتری های مورد مطالعه دیده نشد ولی در هر دو حالت اتصال این باکتری ها به سطوح پلی استیرنی میکروتیتر پلیت ها در حضور پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با ATCC9338 کاهش یافت که می تواند به میانکنش باکتریایی، رقابت در اتصال به جایگاه های اتصال و یا حتی خاصیت تولید ترکیبات با قدرت ضد اتصالی توسط سویه پروبیوتیک توجیه گردد که باید مورد توجه و بررسی بیشتر قرار گیرد.

در همین راستا کوملی و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه تاثیر سویه های باکتریایی لبنی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس*

*ترموفیلوس*) بر سلامت دهان به این نتیجه دست یافتند که تلقیح سویه های لبنی قبل از سویه های دهانی میزان کلونیزاسیون سویه لبنی را افزایش نداد مگر در برخی موارد. آنها همچنین گزارش کردند که سویه های لبنی بویژه *لاکتوکوکوس لاکتیس* قادر به تغییر بخشی از خصوصیات برخی از باکتری های دهانی به ویژه استرپتوکوک های اورالیس و سوربینوس بودند که تعداد کلونی آنها در حضور پروبیوتیک مورد استفاده به طور معنی داری کاهش نشان داده است (۷).

میلر و همکاران نیز وقتی تاثیر میانکنش میکروبی را بر تشکیل پلاک *استرپتوکوکوس موتانس* بررسی می کردند نیز به این نتیجه دست یافتند که برخی از باکتری ها از جمله *لاکتوباسیلوس کازئی* (که امروزه به عنوان سویه پروبیوتیک مطرح است) در تشکیل پلاک استرپتوکوکوس موتانس کاهش قابل توجهی ایجاد می کنند و این نتیجه را به میانکنش بین باکتری ها ارتباط داده اند (۸).

نیس و همکاران در سال ۲۰۰۲ تاثیرات مفید مصرف طولانی مدت شیر حاوی پروبیوتیک را بر پوسیدگی های دندانی کودکان ۳ تا ۴ ساله گزارش نمودند. علاوه بر این آنها گزارش کردند که یکی از سویه های *لاکتوباسیلوس رامنوزوز* (GG) می تواند به عنوان یک سویه پروبیوتیک در کاهش استرپتوکوک های موتانس و سوربینوس به کار رود (۹).

آهولا و همکاران نیز در تحقیق خود مصرف کوتاه مدت محصولات پروبیوتیک را مورد بررسی قرار دادند و در فلور پوسیدگی زا تغییر مشاهده کردند. در مطالعه آن ها تعداد استرپتوکوک های موتانس بزاقی به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود که دلیل آن را کلونیزه شدن باکتری های پروبیوتیک در حفره دهانی گزارش نمودند (۱۰).

نیکاوا و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که مصرف شیر تخمیر شده (ماست) حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* می تواند در کاهش ریسک پوسیدگی دندان موثر واقع گردد (۱۱).

مطالعات مختلف نشان داده که *لاکتوباسیل* ها با مهار استرپتوکوک های پاتوژن و کاندیدا در حفره دهان مفید واقع می شوند. *لاکتوباسیلوس رامنوزوز* و روتری با کاهش استرپتوکوکوس های موتانس عامل پوسیدگی به عنوان پروبیوتیک قادر به پیشگیری از پوسیدگی می باشند. یکی از مکانیسم های موثر پروبیوتیک ها، میانکنش آنها با باکتری های بیماری زا گزارش شده است (۱۲).

در بدن هم چنین نتایجی را به دنبال خواهد داشت ؟ به هر حال تاثیر پروبیوتیک های مختلف بر ریسک فاکتور های پوسیدگی باید مورد توجه و بررسی بیشتری قرار بگیرد. علاوه بر این تاثیر برخی از متابولیت های ثانویه پروبیوتیک ها بر فرایند تشکیل پلاک استرپتوکوک ها از اهمیت خاصی برخوردار خواهد بود که تحت بررسی است و نتایج آن در آینده انتشار خواهد یافت.

## نتیجه گیری:

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیل ها قادر به اتصال به سطوح و تعدیل نمودن جایگزینی گونه های اورال استرپتوکوک ها می باشند و با تاثیر بر فرایند اتصال استرپتوکوک های پوسیدگی زا که اولین و مهم ترین عامل در ایجاد بیماری و پوسیدگی می باشد، قادر به کاهش خطر پوسیدگی دندان و دیگر بیماری های پریدنتال خواهند بود. آیا این الگوی رفتاری

## فهرست مراجع:

1. Caglar E, Kargul B, Tanbogaet I. Bacteriotherapy and probiotics role on Oral health: *Oral Disease*. 2005; **11**:1-7.
2. Kargul B, Caglar E, Tanbogaet I. (2003). History of water fluoridation. *Journal of clinical pediatric dentistry* 2003; **27**: 213-7.
3. Cudic M. Development of novel antibacterial peptide that kill resistant isolates. *Peptides* 2002; **23**: 2071- 83.
4. Nicolas G, Auger I, Beaudoin M, Halle F, Morency H, leLa Pointe G, et al. Improved methods for mutacin detection and production. *Journal of Microbiological methods* 2004; **59**: 351-61.
5. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry. *Europian Journal of oral Science* 2005; **113**: 188-96.
6. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I., Savic B. A modified microtiter plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiology methods* 2004; **40** (2):175-9.
7. Comelli EM, Guggenheim B, Stingele F, Nesser J. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health . *Europian journal of Oral sciences* 2002; **110**: 218-24.
8. Miller CH, Kleinman JL. Effect of microbial interactions on in vitro plaque formation by *S.mutans*. *Journal of Dental Research* 1974; **53** (2): 427-34.
9. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *lactobacillus rhamnosus* GG.In milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research* 2001; **35**: 412-20.
10. Ahola AJ, Yli- Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurmanb JH, Korpelaet R. Short term Consumption of probiotic-Containing cheese and effect on dental Caries risk Factors. *Archive Oral Biology* 2002; **47**:799-804.
11. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H. Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food microbial* 2004; **95**(2):219-23.
12. Mokeem SA. (2007). The synergism of probiotics in dentistry. *Saudi Dental Journal* 2007; **19** (3):1-3.



## اثر غلظت های Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین بر

### روی فعالیت همولیتیکی اشریشیاکلی

سید اصغر هوایی\*<sup>۱</sup>، مرتضی ستاری<sup>۲</sup>، مژگان عشاقی<sup>۲</sup>، عبدالرزاق هاشمی شهرکی<sup>۱</sup>

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲) گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

نویسنده رابط: سید اصغر هوایی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

همراه: ۰۹۱۳۳۱۳۳۵۳۹      havaei@med.mui.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲      تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

#### چکیده:

**زمینه و اهداف:** غلظت های کمتر از توقف دهنده رشد (Sub-MIC) به غلظت زیر MIC گفته می شود که می تواند باعث القاء تغییرات مورفولوژیکی، تغییر در میزان بیان فاکتور های ویروانس و خصوصیات بیوشیمیایی گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین بر روی فعالیت همولیتیکی باکتری اشریشیاکلی بود.

**روش بررسی:** دو ایزوله کلینیکی باکتری اشریشیاکلی که دارای بیشترین فعالیت همولیتیکی در بین ایزوله ها بودند انتخاب شدند، سپس MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی آنها تعیین شد و سپس غلظت های MIC و Sub-MIC (۱/۸، ۱/۴، ۱/۲) دو آنتی بیوتیک فوق به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله بررسی گردید.

**یافته ها:** در مقایسه با لوله کنترل در مورد آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، مشخص شد که در غلظت های MIC و Sub-MIC (۱/۸، ۱/۴، ۱/۲) کاهش معنی داری در میزان فعالیت همولیتیکی مشاهده می شود و هرچه غلظت آنتی بیوتیک کمتر می شد، میزان فعالیت همولیتیکی بیشتر می گردید. در مقایسه با لوله کنترل در مورد آمپی سیلین، در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک تغییر محسوسی در کاهش میزان فعالیت همولیتیکی مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه مشخص گردید که غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید همولیزین را در باکتری اشریشیاکلی کاهش می دهد ولی آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله اشریشیاکلی مورد بررسی تاثیری ندارد.

**کلید واژه ها:** اشریشیاکلی، فعالیت همولیتیکی، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین، کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)،

غلظت کمتر از MIC (Sub-MIC)

**مقدمه:**

اشریشیاکلی یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است که در درون دستگاه گوارش انسان به عنوان فلور نرمال زندگی می کند. تعدادی از سویه های این گونه دارای توانایی ایجاد بیماری های روده ای مانند اسهال، دیسانتری و همچنین بیماری های خارج روده ای مثل عفونت مجرای ادراری می باشد که شایع ترین فرم عفونت های خارج روده ای این باکتری است (۱). سویه های اورپاتوژنیک اشریشیاکلی باعث تولید عفونت دستگاه ادراری سپتی سمی مننژیت و سپسیس می باشند. اغلب سویه های که ایجاد عفونت می نمایند، انواعی از فاکتورهای ویروانس را که باعث افزایش پاتوژنیسیته آنها می شود را تولید می کنند. یکی از این فاکتورهای ویروانس سم همولیزین است که با تولید سوراخ در غشاء سلول های یوکاریوتی مانند RBC و سلول های اپیتلیالی باعث مرگ این سلول ها می شود (۲). در مدل های حیوانی مختلف ثابت شده است که همولیزین باعث آسیب کلیوی شدید می شود (۳). این توکسین که دارای وزن مولکولی ۱۰۷ کیلو دالتون است در طی فاز رشد لگاریتمی باکتری تولید شده و میزان تولید آن تا اواسط فاز رشد لگاریتمی بالا می رود و در نهایت در طی فاز سکون میزان تولید آن به حداقل می رسد. اثرات درمانی یک آنتی بیوتیک هنگامی که غلظت دارو بیش از غلظت MIC آن در بین دوزهای تجویز شده باشد، بسیار چشمگیر است. منحنی های فارماکوکنتیک آنتی بیوتیک ها مشخص می کند که غلظت های بیش از غلظت MIC تنها مدت زمان کوتاهی بعد از تجویز دارو بدست می آیند و بعد غلظت دارو شروع به کاهش تدریجی می کند. به غلظت پایین تر از غلظت MIC، غلظت کمتر از توقف دهنده رشد (Sub-MIC) می گویند (۴). این غلظت برای باکتری کشنده نیست، بلکه در مطالعات *in vitro* مشخص شده است که میکروارگانیسم ها را از طرق مختلف مانند محدود کردن رشد، القاء تغییرات مورفولوژیکی، ممانعت و یا کاهش تولید آنزیم ها و توکسین های باکتریایی، محدود کردن اتصال باکتری به سلول های میزبان تحت تاثیر قرار می دهد (۵). سنتز فاکتور های ویروانس مثل پروتاز ها و آگزوتوکسین A در سودوموناس آئروژینوزا به شدت توسط سیپروفلوکساسین هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* کاهش پیدا می کند. اثرات مشابه توسط کوئینولون ها در غلظت Sub-MIC به روی فاکتور های ویروانس اشریشیاکلی گزارش شده است (۶). در یک مطالعه مشخص شد که سیپروفلوکساسین اختصاصا باعث تغییر مورفولوژی و خصوصیات

بیوشیمیایی باکتری اشریشیاکلی می شود (۷). هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی میزان فعالیت همولیتیکی اشریشیاکلی بود.

**مواد و روش ها:****تهیه سویه ها:**

در این مطالعه از بین سویه های کلینیکی دو سویه اشریشیاکلی که از عفونت های ادراری جدا شده بودند و دارای همولیز قوی بودند انتخاب شدند.

**تعیین MIC به روش رقیق سازی آگار (Agar dilution susceptibility test):**

به منظور بررسی MIC دو سویه فوق نسبت به داروی سیپروفلوکساسین (شرکت آریا) و آمپی سیلین (شرکت جابرابن حیان)، از روش رقیق سازی آگار (Agar dilution susceptibility test) بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده گردید (۸).

**بررسی فعالیت همولیتیکی سویه ها به روش کمی:**

ابتدا دو کلنی مجزا از هر سویه مورد نظر را از محیط جامد وارد ۱۰ ml از محیط TSB نموده و ۱ شبانه روز در دمای ۳۷ °C، انکوبه گردیدند. سپس ۱ ml از سوسپانسیون هر ایزوله را در ۹ ml محیط TSB جدید که حاوی کلرید سدیم ۱۰ میلی مولار و کمی گرم شده بود، وارد گردیده و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ °C، انکوبه گردیدند تا سلول های باکتری وارد فاز انتهایی رشد لگاریتمی شوند و همولیزین را در بالاترین حد تولید نمایند (۹). به دلیل اینکه توکسین به دمای بالا حساس است بقیه مراحل در دمای ۴ °C انجام شد. محیط کشت های حاوی توکسین را در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی هر محیط کشت در یک لوله مجزای استریل جمع آوری و نگهداری شدند. برای تعیین فعالیت همولیتیکی آلفا همولیزین اشریشیاکلی از خون ۱٪ یا ۲٪ گوسفند استفاده شد، به این ترتیب که در یک لوله استریل ۱ ml از مایع رویی حاوی توکسین هر ایزوله و ۱ ml سوسپانسیون خون گوسفند (۲٪) وارد شد و در بن ماری ۳۷ °C به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بعد از این زمان لوله ها از بن ماری خارج شدند و ۲ ml محلول PBS سرد به هر لوله افزوده گردید تا واکنش بین توکسین و RBC لیز نشده متوقف گردد و RBC های لیز نشده رسوب نمایند. مایع رویی هر لوله جدا شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۴۵ نانومتر آنالیز گردید. در این مطالعه لوله کنترل

انکوبه گردیدند و بقیه مراحل کار یعنی تعیین فعالیت همولیتیکی طبق قسمت اول انجام شد.

### یافته ها:

در این مطالعه سویه های مورد نظر را از بین ایزوله های بالینی انتخاب کرده و اثر Sub-MIC دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی باکتری اشیریشاکلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان می دهد که آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در غلظت های MIC<sub>1/2</sub>، MIC<sub>1/4</sub> و MIC<sub>1/8</sub> نسبت به گروه کنترل (جدول شماره ۱) از فعالیت همولیتیکی سویه های مورد آزمایش جلوگیری نمود ( $P < 0.05$ ). فعالیت همولیتیکی سویه های مورد آزمایش در مجاورت غلظت های Sub-MIC آمپی سیلین (جدول شماره ۲)، نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد ( $P < 0.05$ ).

حاوی ۱ ml سوسپانسیون ۲٪ از RBC گوسفند و ۳ ml محلول PBS بود (۱۰).

بررسی اثر MIC و Sub-MIC (۱/۸، ۱/۴، ۱/۲) آنتی بیوتیک ها به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله:

برای هر آنتی بیوتیک ابتدا ۵ ارلن کوچک انتخاب شد که در ۴ عدد از آنها ۸ ml از محیط TSB حاوی کلرید کلسیم ۱۰ میلی مولار وارد شد. بعد از استریل کردن محیط های کشت، به هر کدام از ارلن ها به ترتیب ۱ ml از غلظت های MIC و Sub-MIC (۱/۸، ۱/۴، ۱/۲) که قبلاً به دست آمده بود افزوده شد. ارلن پنجم تنها حاوی ۹ ml از محیط TSB، کلرید کلسیم ولی فاقد آنتی بیوتیک بود. در مرحله بعد، از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها در محیط TSB به میزان ۱ ml به هر کدام از ۵ ارلن اضافه شد (حجم نهایی ۱۰ ml بود). این محیط ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ °C،

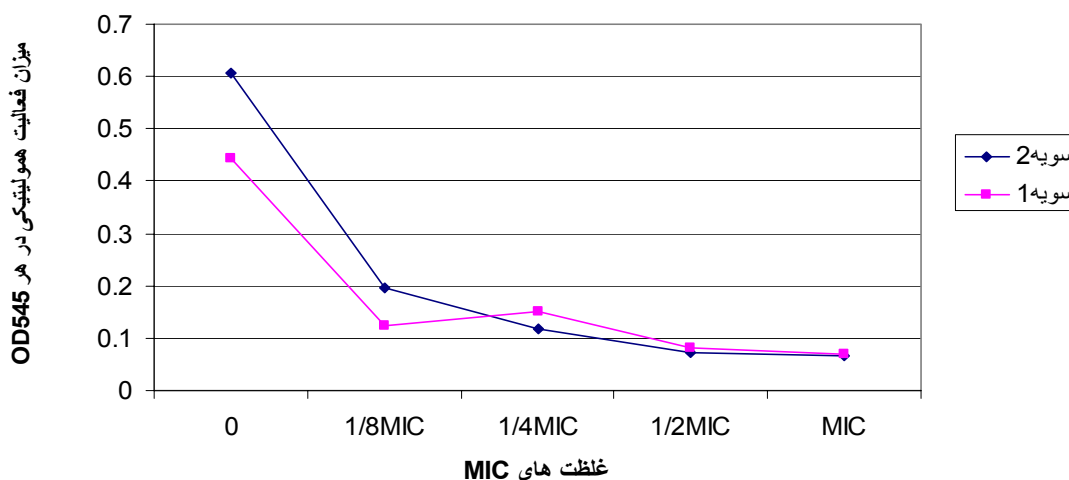
جدول ۱: اثر غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین بر فعالیت همولیتیکی سویه های مورد بررسی در OD545

MIC	۱/۲ MIC	۱/۴ MIC	۱/۸ MIC	صفر (کنترل)	غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین سویه های باکتری
۰/۰۶۶	۰/۰۷۱	۰/۱۱۷	۰/۱۹۵	۰/۶۰۶	سویه ۱
۰/۰۷۰	۰/۰۸۲	۰/۱۵۲	۰/۱۲۳	۰/۴۴۵	سویه ۲

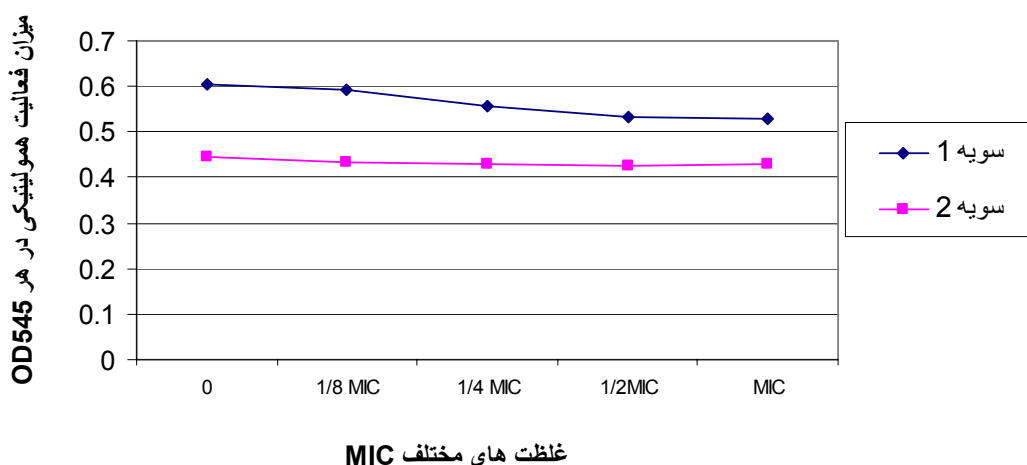
جدول ۲: اثر غلظت های مختلف آمپی سیلین بر فعالیت همولیتیکی سویه های مورد بررسی در OD545

MIC	۱/۲ MIC	۱/۴ MIC	۱/۸ MIC	صفر (کنترل)	غلظت های مختلف آمپی سیلین سویه های باکتری
۰/۵۲۹	۰/۵۳۱	۰/۵۵۸	۰/۵۹۳	۰/۶۰۶	سویه ۱
۰/۴۲۸	۰/۴۲۵	۰/۴۳۱	۰/۴۳۵	۰/۴۴۵	سویه ۲

نمودار ۱: اثر غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین بر روی فعالیت همولیتیکی سویه ها



نمودار ۲: اثر غلظت های مختلف آمپی سیلین بر روی فعالیت همولیتیکی سویه ها



## بحث:

آلفا همولیزین یک توکسین پروتئینی خارج سلولی با وزن مولکولی ۱۰۷ کیلو دالتون است که توسط سویه های پاتوژن اشیریشیاکلی که عفونت خارج روده ای مانند عفونت مجاری ادراری، پریتونیت، مننژیت و سپتی سمی ایجاد می کنند، تولید می شوند. به نظر می رسد که آلفا همولیزین، یک فاکتور ویروانس مهم برای باکتری است (۱). مطالعات نشان داده است که فعالیت همولیتیکی باکتری اشیریشیاکلی تحت تاثیر عوامل محیطی مانند ترکیب محیط کشت، pH، دما، میزان اکسیژن، غلظت کلسیم و آهن می باشد. در سال ۱۹۸۳ اثر Sub-MIC کلرامفنیکل، جنتامایسین و استرپتومایسین بر تولید همولیزین باکتری اشیریشیاکلی اوروپاتوژن بررسی شد که استرپتومایسین بدون ممانعت از رشد باکتری تولید همولیزین را ممانعت نمود (۱۱). همچنین در تحقیقی دیگر اثر غلظت های MIC

۱/۲ کوئینولون ها به روی باکتری اشیریشیاکلی باعث طولیل شدن شکل باکتری و همچنین کاهش تولید میزان همولیزین توسط باکتری گردید (۱۲). نتایج تحقیق فوق با نتایج به دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد، به این ترتیب که سیپروفلوکساسین در غلظت Sub-MIC باعث کاهش میزان تولید همولیزین گردید. در این مطالعه نیز مشخص شد که غلظت Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید همولیزین را کاهش می دهد ولی آمپی سیلین به روی فعالیت همولیتیکی دو ایزوله اشیریشیاکلی مورد بررسی تاثیری نداشت. اخیراً نیز مشخص شده است که غلظت Sub-MIC الزاماً باعث کاهش بیان توکسین های باکتریایی نمی شود، چرا که در تحقیقی مشخص شد که غلظت Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین باعث القاء تولید توکسین Cytolethal Distending Toxin در کمپیلو باکتر

آنتی بیوتیک دارای اثرات ضعیف تری برای کاهش بیان فاکتور های ویروالانس سطحی است (۱۶).

### نتیجه گیری :

همولیزین از فاکتور های مهم ویروالانس می باشد که غلظت های مختلف Sub-MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان تولید آنرا در باکتری اشیریشیاکلی کاهش می دهد لذا می تواند ویروالانس سویه های کولونیزه شده را کاهش دهد و از قدرت تهاجم آنها بکاهد. این در حالی است که آمپی سیلین روی فعالیت همولیتیکی دو سویه تاثیری نداشت . با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج تحقیقات دیگران توصیه می گردد که اثر غلظت های مختلف Sub-MIC در مورد آنتی بیوتیک های دیگر بر روی فاکتورهای ویروالانس اشیریشیاکلی مورد بررسی قرار گیرد.

ژوژنی می گردد (۱۳). در مطالعات مشابه به روی باکتری اشیریشیاکلی، اثرات Sub-MIC تعدادی از آنتی بیوتیک ها منجمله سیپروفلوکساسین روی فاکتور های ویروالانس بررسی شده است. در یک مطالعه ثابت گردید که سیپروفلوکساسین در غلظت Sub-MIC باعث ممانعت از بیان فیمبریه نوع P می گردد که این غلظت می تواند از کولونیزه شدن باکتری در دستگاه ادراری ممانعت کند (۱۴). در عین حال در مطالعه ای مشخص گردید که سیپروفلوکساسین در غلظت Sub-MIC در بعضی از سویه های اوروپاتوژن باکتری اشیریشیاکلی، باعث افزایش بیان شدن تعدادی از فاکتورهای اتصالی مانند ادهیزین های مقاوم به مانوز غیر از فیمبریه نوع P می شود که در نهایت منتهی به اتصال این سویه ها به کاتتر های موجود در مجرای ادراری می گردد (۱۵). در مطالعه ای دیگر در مورد آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در قیاس با دیگر کوئینولون ها نیز مشخص گردید که غلظت Sub-MIC این

### فهرست مراجع:

- Johnson J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4, 80-128.
- Cavaliere S.J, Bohach G.A, Synder IS. *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenesis. *Microbiol Rev* 1984; 48(4):326-43.
- Salyers A.A and Whitt D.D. Bacterial pathogenesis, A molecular approach. 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington DC. 2001; pp; 137-9.
- Wojnicz D. and Jankowski S. Effects of sub inhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 700-4.
- Dal Sasso M., Culici M., Bovio C. and Braga PC . Gemifloxacin: effects of Sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. *Int J Antimicrob Agents* 2003 ;21: 325-33.
- Burnham J.C and Senstein S.A. Anti virulence effects of lomefloxacin and other quinolones .In program and abstracts of the thirtieth interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy , Atlanta, GA ,1990, Abstract 110, p:245.American Society for Microbiology, Washington DC.
- Diver J.M and Wise R. Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18(Suppl. D):31-41.
- Villanova P.A. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Second information supplement M 100-S2 1987; .National Committee. for Clinical Laboratory Standards ,USA.
- Short E.C and Kurtz H.J. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infec Immun* 1971; 3 (5):678-89.
- Bohach G.A, Cavaliere S.J, and Snyder I.S. Purification of *Escherichia coli*  $\alpha$  hemolysin .*Methods Enzymol* 1988; 165:137-47.
- Shible A.M and Gemmerll C.G. Effect of four antibiotics on hemolysis production and adherence to human uroepithelial cells by *Escherichia coli*. *Med Microbiol* 1983; 16:341-349.
- Guan L. and Burnham J. C. Post antibiotic effect of CI-960, ciprofloxacin and enoxacin on *Escherichia coli*: effect on morphology and haemolysin activity. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:529-38.
- Ismaeel A , Senok A C , Bindayna K M , Bakhiet M, Al Mahmeed A, Yousif AQ, et al.

- Effect of antibiotic sub inhibitory concentration on cytolethal distending toxin production by *Campylobacter jejuni*. *J Infect* 2005; 51(2): 144-9
14. Vranes, J., Zagar, Z. & Kurbel, S. Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P fimbriated *Escherichia coli*. *J Chemother* 1996; 8(4): 254-60.
15. Balague C, Fernández L, Pérez J, Grau R. Effect of ciprofloxacin on adhesive properties of non-P mannose-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(2): 401-4.
16. Baskin H, Dogan Y, Bahar IH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19(1): 79-82.

## نامه به سردبیر

## بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان

شروین شکوهی\*، زهره امین زاده، کامران شرفی، مریم اشرفی

بخش عفونی بیمارستان لقمان حکیم

نویسنده رابط: شروین شکوهی بخش عفونی بیمارستان لقمان

حکیم تلفکس: ۵۵۴۱۱۷۱۷. همراه: ۰۹۱۲۱۰۳۴۸۱۱

Shsh.50@gmail.com

عفونت های بیمارستانی یکی از عوارض بستری در بیمارستان بوده و استافیلوکوکوس اورئوس یکی از میکروارگانیسم های مهم مولد عفونت بیمارستانی می باشد. تجویز نامناسب آنتی بیوتیک در ایجاد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم نقش دارد (۱و۲). قسمت قدام بینی محل اصلی کلونیزه شدن این باکتری است گرچه در نواحی دیگری نظیر پوست ناحیه آسیب دیده و زیربغل، واژن، پرینه و مخاط نازو فارنکس نیز کلونیزه می شود (۳). ۵۰-۲۵٪ افراد سالم با این ارگانیسم کلونیزه شده و شیوع کلونیزاسیون در افراد آلوده به HIV، همودیلیزی ها بیماران با صدمات پوستی، معتادین تزریقی و دیابتیک های وابسته به انسولین شایعتر است (۴). مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به کلاس های مختلف آنتی بیوتیکی گزارش شده و شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus) اکتسابی از جامعه و بیمارستان در حال افزایش می باشد (۵-۷).

۵۱۱ بیمار بستری در بیمارستان لقمان حکیم بین سال های ۱۳۸۳-۱۳۷۷ {۱۸۰ بیمار (۳۵٪) زن و ۳۳۱ بیمار (۶۵٪) مرد} که در کشت از نمونه های ارسالی ایشان نظیر خون، ادرار، ترشحات ریوی استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمد بررسی شدند. در صورتیکه کشت های مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در محیط

### فهرست مراجع:

- Lowy FD. *S. aureus* infection. *N Engl J Med* 1998; **339**:520-532.
- Ito T, Okuma K, Ma XX. Insight of antibiotic resistance of *S. aureus* from its whole genome Genomic island SCC. *Drug resist update* 2003; **6**:41-52.
- Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Varkila JV. Community acquired MRSA, Finland. *Emerging Infectious Dis* 2002; **8**; (6):602-606.
- Witte W. Glycopeptide resistant *Staphylococcus*. National reference center for *Staphylococci*, Robert Koch Institute, Ernigerode, Germany Wittewrki 2004.
- Diekema DJ, Pfaller M A, Schmitz F J, Smayevsky J, Bell J, Jones R N, Beach M and the SENTRY Participants Group. Survey of infection due to *Staphylococcus* species. *Clinical Infect Dis* 2001; **32**(2): 114-132.
- Nimmo GR, Bell JM, Mitchell D, Gosbell IB, Pearman JW, Turnidge JD, et al. Antimicrobial resistance in *S. aureus* in Australian teaching hospital, 1989-1999. *Microb Drug Resistant* 2003; **9**(2):155-160.
- GJ Moran, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA. MRSA Infections among Patients in the Emergency Department. *New Engl J Med* 2006; **355**(7):666-674.
- Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, Boye CS, Dosso M, Ndinya Achola JO, et al. Prevalence of MRSA in eight African hospitals and Malta. *Clinical Microbial Infect* 2003; **9**(2):153-156.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by a single disc method. *Am.J. Clin. Pathol* 1966; **45**(4): 493-496.
- حسیبی م، مهاجرآروانی ب، سیفی م، وهمکاران. بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیمارستان امیراعلم، مجله میکروب شناسی ایران ۱۳۸۶؛ ۱(۱): ۷۲-۷۱.
- Razavi M, Rostami Z, Zakami N, 3300 Microbial resistant samples in Emam Khomaini hospital. *Iranian J Infect Dis Tropical Med* 1996; **12**:30-35.
- شکوهی ش. نوپدیدی استافیلوکوک های مقاوم به دارو. در کتاب: نوپدیدی و بازپدیدی بیماریهای عفونی، مولف: حاتمی ح. چاپ اول، تهران، مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳۸۲، ۳۸۹-۳۹۶.
- Gouni M, Knoton C, Hudjipauayiotou and Protopapa P. Multicenter surveillance of antibiotic resistance in nosocomial *S. aureus* in Cyprus 2001; **7** (415), 744-749.
- Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) -KMTC Surveillance for MRSA in Canadian Hospitals. A report update forms the Canadian Nosocomial Infection Surveillance program 2005. **3** (3).

کشت مولر هیتون هاله کمتر از ۹ mm در اطراف دیسک متی سیلین با غلظت ۵μg تشکیل داده بود به آن (MRSA) اطلاق شد و اگر بیمار در هنگام بستری مبتلا به عفونت نبوده و یا در دوره کمون ابتلا به آن نباشد به عنوان اکتسابی از بیمارستان (HA-MRSA) در نظر گرفته شد و الگوی مقاومت نسبت به ۱۱ آنتی بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن و متد کربی بائر (۹و۸) مشخص گردید.

از ۵۱۱ نمونه، ۴۶۲ مورد (۹۰٪) مقاوم به متی سیلین بود. ۳۴۵ مورد (۷۴/۶٪) از بخش ICU مسمومین، ۳۴ مورد (۷/۳٪) از بخش جراحی بودند. از ۴۶۲ مورد مقاوم به متی سیلین ۲۹۹ مورد (۶۵٪) مربوط به جنس مذکر و ۱۶۳ مورد (۳۵٪) مربوط به جنس مونث بود. مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۱/۳٪)، پنی سیلین (۰/۲٪)، آمپی سیلین (۰/۲٪)، کلرامفنیکل (۱/۵٪)، آمیکاسین (۰/۹٪)، جنتامایسین (۱/۱٪)، اریترومایسین (۱/۳٪)، لینکومایسین (۰/۴٪)، کلیندامایسین (۰/۴٪) و کوتریموکسازول (۰/۴٪) بود.

در مطالعه حسیبی وهمکاران (۱۰) مقاومتی به ونکومایسین در MRSA اکتسابی از بیمارستان وجود نداشته شاید این تفاوت با تحقیق حاضر دلیل انجام روش MIC در بررسی مقاومت باشد. در مطالعات رضوی و شکوهی (۱۱، ۱۲)، ۳۴٪ از *S. aureus* مقاوم به کلوزاسیلین و ۱۰٪ مقاوم به پنی سیلین و آموکسی سیلین گزارش شده بدون آنکه راه اکتساب عفونت استافیلوکوک (بیمارستان یا جامعه) مشخص شود ولی در این مطالعه ۹۰٪ MRSA از بیمارستان کسب شدند. در گزارشی از قبرس (۱۳) شیوع MRSA (۳۷/۵٪) بسیار کمتر از مطالعه حاضر (۸۳/۷٪) می باشد. در مطالعه ای در کانادا (۱۴)، MRSA در جنس مذکر شایعتر (۵۷٪) بود که با تحقیق حاضر مشابه است. آمار بسیار بالای عفونت های MRSA اکتسابی از بیمارستان لقمان حکیم دقت در شروع درمان آنتی بیوتیکی تجربی مناسب رایجادآوری می نماید.

کلیدواژه ها: عفونت بیمارستانی، استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی



## فهرست موضوعی مجله میکروپ شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶

۱(۲):۴۹-۵۹	آدنوویروس
۱(۲):۱-۸	آزمون PCR
۱(۱):۱-۹	آزمون ایمنوفلوئورسانس غیر مستقیم
۱(۱):۱۱-۱۶	آمینوگلیکوزیدها
۱(۱):۳۹-۴۵	اثر ضد میکروبی
۱(۲):۴۹-۵۹	اثرات ضد ویروسی
۱(۳):۲۵-۳۱	اریترومايسين
۱(۱):۳۹-۴۵	اسانس اکالیپتوس
۱(۳):۲۵-۳۱	استافیلوکوک های کوآگولاز منفی
۱(۴):۱۳-۲۰	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
۱(۳):۲۵-۳۱ ، ۱(۱):۷۱-۷۲	استافیلوکوکوس اورئوس
۱(۲):۱-۸	استرپتوکوک گروه B
۱(۴):۳۵-۳۹ ، ۱(۳):۳۹-۴۶	اسهال
۱(۳):۳۳-۳۸	اسینتوباکتر بومانی
۱(۳):۱-۸ ، ۱(۲):۲۷-۳۴	اشريشیاکلی
۱(۳):۳۹-۴۶	اشريشیاکلی O157
۱(۳):۳۹-۴۶	اشريشیاکلی انتروهموراژیک
۱(۳):۱۷-۲۳	اصفهان
۱(۴):۱۳-۲۰	اگزاسیلین آگار اسکرینینگ
۱(۳):۹-۱۵	انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين
۱(۱):۳۳-۳۸	انتروکوکوس
۱(۱):۱۱-۱۶	انتروکوکوس فسیوم
۱(۱):۱۱-۱۶	انتروکوکوس فکالیس
۱(۳):۵۳-۵۶	ایدز
۱(۲):۹-۱۴	بابونه
۱(۴):۲۱-۲۷	بتالاکتاماز
۱(۳):۳۳-۳۸	بخش مراقبت ویژه
۱(۳):۴۷-۵۱	بروسلا
۱(۳):۴۷-۵۱	بروسلوز
۱(۱):۱-۹	بیماری مزمن انسدادی ریه
۱(۲):۹-۱۴	بیوفيلم
۱(۴):۴۱-۴۵	پرایمر فراگیر
۱(۴):۲۹-۳۴	پروپ
۱(۴):۴۷-۵۱	پروبیوتیک
۱(۲):۱۵-۲۰	پروتئین های غشاء خارجی
۱(۲):۴۳-۴۸	پریتونیت

۱(۴):۲۹-۳۴ ، ۱(۴):۲۱-۲۷ ، ۱(۲):۹-۱۴ ، ۱(۱):۲۳-۳۱	پسودوموناس آئروژینوزا
۱(۳):۲۵-۳۱	تست القاء
۱(۱):۶۱-۶۶	تشخیص سریع
۱(۱):۳۳-۳۸	چند مقاومتی
۱(۳):۹-۱۵	خصوصیات مولکولی
۱(۲):۴۳-۴۸	دیسک دیفیوژن
۱(۱):۳۹-۴۵	رسپیتول B
۱(۱):۱۷-۲۲	ریفامپین
۱(۱):۵۵-۶۰	زائترین
۱(۲):۱-۸	زنان باردار
۱(۴):۱۳-۲۰	ژن <i>mec A</i>
۱(۲):۲۱-۲۵	ژنوتایپینگ
۱(۳):۵۳-۵۶ ، ۱(۲):۳۵-۴۱	سرواپیدمیولوژی
۱(۲):۶۱-۶۶	سلول های هماتوپوئیتیک
۱(۳):۱۷-۲۳	سیتوتوکسین CDT
۱(۳):۵۳-۵۶	سیفیلیس
۱(۱):۱-۹	ضعف سیستم ایمنی
۱(۳):۱۷-۲۳	طیور
۱(۱):۷۱-۷۲	عفونت بیمارستانی
۱(۲):۶۱-۶۶	عفونت مثانه
۱(۴):۴۱-۴۵	عفونت های ادراری
۱(۲):۳۵-۴۱	عفونت های تناسلی
۱(۱):۵۵-۶۰	عفونت های تنفسی
۱(۱):۵۵-۶۰	عیار آنتی بادی
۱(۴):۳۵-۳۹	فراوانی
۱(۴):۲۹-۳۴	فلوئورسنت
۱(۳):۳۳-۳۸	کارباپنم
۱(۲):۱-۸	کشت استاندارد
۱(۱):۵۵-۶۰	کلامیدیا پنومونیه
۱(۲):۳۵-۴۱	کلامیدیا تراکوماتیس
۱(۲):۲۷-۳۴	کلبسیلا پنومونیه
۱(۳):۲۵-۳۱	کلیندامایسین
۱(۴):۳۵-۳۹ ، ۱(۳):۱۷-۲۳	کمپیلوباکتر ژژونی
۱(۳):۱۷-۲۳	کمپیلوباکتر کلی
۱(۳):۹-۱۵	کوکسی گرم مثبت هوازی
۱(۲):۴۹-۵۹	گیاهان دارویی
۱(۴):۴۷-۵۱	لایه سطحی
۱(۱):۵۵-۶۰	لژیونلا پنوموفیلا

۱(۱):۶۱-۶۶	مایع نخاع
۱(۱):۱۷-۲۲	مایکوباکتریوم توبرکلوزیس
۱(۴):۱-۱۱	مایکوباکتریوم کانزاسی
۱(۴):۱-۱۱	مایکوباکتریوم های غیرسلی
۱(۱):۴۷-۵۳	مایکوپلاسما
۱(۱):۵۵-۶۰	مایکوپلاسما پنومونیه
۱(۱):۲۳-۳۱	متالوبتالاکتاماز
۱(۴):۱۳-۲۰	متی سیلین
۱(۴):۵۳-۵۵	محلول ضد عفونی دکوسپت
۱(۴):۵۳-۵۵	محلول ضد عفونی هندسپت
۱(۴):۳۵-۳۹	مراکز بهداشتی
۱(۱):۳۳-۳۸	مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین
۱(۳):۱-۸ ، ۱(۲):۴۳-۴۸ ، ۱(۱):۷۱-۷۲ ، ۱(۱):۲۳-۳۱	مقاومت آنتی بیوتیکی
۱(۳):۳۳-۳۸ ، ۱(۱):۱۷-۲۲	مقاومت دارویی
۱(۱):۳۹-۴۵	منتوفین
۱(۱):۳۹-۴۵	منتول
۱(۱):۶۱-۶۶	منزیت باکتریایی
۱(۱):۱۷-۲۲	موتاسیون
۱(۴):۵۳-۵۵	میکروارگانسیم های گذرا
۱(۱):۴۷-۵۳	ناباروری
۱(۴):۳۵-۳۹	نمونه مدفوع
۱(۳):۹-۱۵	نمونه های بالینی
۱(۱):۱-۹	نوکار دیا استروئیدس
۱(۴):۴۱-۴۵	واکنش زنجیره ای پلیمرز
۱(۲):۱۵-۲۰	ویبریو کلرا
۱(۲):۶۱-۶۶	ویروس BK
۱(۳):۵۳-۵۶	هپاتیت B
۱(۳):۵۳-۵۶	هپاتیت C
۱(۲):۴۹-۵۹	هرپس سیمپلکس ویروس
۱(۴):۴۱-۴۵	هضم آنزیمی
۱(۲):۲۱-۲۵	هلیکوباکتر پیلوری

فهرست نام نویسندگان مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶

۱(۲):۲۱-۲۵	آقا امیری، سولماز
۱(۳):۵۳-۵۶	آقازاده سرهنگی پور، کوروس
۱(۴):۱۳-۲۰	آهنگرزاده رضایی، محمد
۱(۳):۴۷-۵۱	احمدی، حجت
۱(۲):۴۹-۵۹	ادیبی، لادن
۱(۱):۱-۹	اساسی، نازیلا
۱(۲):۱۵-۲۰	اسکندری، منیژه
۱(۳):۹-۱۵، ۱(۱):۱-۹	اشراقی، سید سعید
۱(۲):۶۷-۶۹	افشانی، محمد تقی
۱(۳):۳۹-۴۶	اکبری دیپاور، محمد
۱(۱):۳۹-۴۵	اکبری، محمد
۱(۳):۵۳-۵۶	امین زاده، زهره
۱(۲):۹-۱۴	اولیاء، پرویز
۱(۴):۳۵-۳۹	ایراجیان، غلامرضا
۱(۱):۶۱-۶۶	ایزدی، مرتضی
۱(۱):۵۵-۶۰	بازرجانی، فرزانه
۱(۲):۲۱-۲۵	باقرزاده، سحر
۱(۱):۵۵-۶۰	بامداد، کبری
۱(۲):۱-۸	بختیاری، روناک
۱(۲):۶۷-۶۹	بخشی، بی تا
۱(۴):۲۹-۳۴	بدیع، فرشته
۱(۱):۳۳-۳۸	برهانی، کتایون
۱(۴):۱-۱۱، ۱(۱):۱۷-۲۲	بهره مند، احمدرضا
۱(۴):۳۵-۳۹	بهشتی، اشرف السادات
۱(۳):۹-۱۵، ۱(۲):۶۷-۶۹، ۱(۱):۳۳-۳۸	پورشفیعی، محمد رضا
۱(۴):۴۱-۴۵، ۱(۲):۲۱-۲۵، ۱(۲):۱-۸	پورمند، محمد رضا
۱(۳):۱۷-۲۳	پیشوا، ابتهاج
۱(۳):۴۷-۵۱	تبرائی، بهمن
۱(۲):۴۳-۴۸	تسلیمی، رضا
۱(۲):۴۳-۴۸	جدی، فرهاد
۱(۴):۳۵-۳۹، ۱(۲):۶۱-۶۶	جزایری مقدس، علی
۱(۱):۷۱-۷۲	جعفری، سیروس
۱(۲):۱-۸	حاجی خانی، سارا
۱(۱):۷۱-۷۲	حسیبی، مهرداد
۱(۱):۶۱-۶۶	حسینی، محمد جواد
۱(۳):۱۷-۲۳	حق شناس، فریبرز

۱(۱):۳۹-۴۵	حقی، قاسم
۱(۴):۱-۱۱	حیدریه، پروین
۱(۴):۴۷-۵۱	خالقی، موج
۱(۳):۳۳-۳۸	خسروشاهی، نادر
۱(۲):۱۵-۲۰، ۱(۱):۲۳-۳۱، ۱(۱):۱۷-۲۲	خسروی، آذر دخت
۱(۱):۱۱-۱۶	خطیبی، سپیده
۱(۱):۱۷-۲۲	دوستدار، فرح‌نوش
۱(۲):۳۵-۴۱	راشد، طاهره
۱(۳):۱۷-۲۳	ربانی، محمد
۱(۱):۳۳-۳۸	رحیمی، فاتح
۱(۴):۵۳-۵۵، ۱(۲):۲۷-۳۴، ۱(۱):۶۷-۶۹	رستگار لاری، عبدالعزیز
۱(۴):۵۳-۵۵	رضایی، سیاوش
۱(۱):۵۵-۶۰	رضوی، سید منصور
۱(۱):۶۷-۶۹	رضوی، شبنم
۱(۱):۴۷-۵۳	رفیعی طباطبایی، صدیقه
۱(۴):۵۳-۵۵	رکوعی، فاطمه
۱(۴):۴۷-۵۱	زرکش اصفهانی، سید حمید
۱(۲):۱-۸	زعیمی یزدی، جواد
۱(۲):۲۱-۲۵	زعیمی یزدی، جواد
۱(۲):۶۷-۶۹	زهرایی، محسن
۱(۳):۲۵-۳۱	ساسان، محمد سعید
۱(۳):۹-۱۵	سالاری، محمد حسین
۱(۴):۵۳-۵۵	سدایی، نورالهدی
۱(۱):۷۱-۷۲	سعادت آملی، بزمان
۱(۱):۶۱-۶۶	سفیری، زهرا
۱(۲):۱-۸، ۱(۱):۳۳-۳۸	سلطان دلال، محمد مهدی
۱(۱):۴۷-۵۳	سلیمانی رهبر، علی اکبر
۱(۳):۴۷-۵۱	سیادت، سید داور
۱(۱):۷۱-۷۲، ۱(۱):۳۳-۳۸	سیفی، مهناز
۱(۴):۲۱-۲۷، ۱(۳):۱-۸	شاهچراغی، فرشته
۱(۴):۱۳-۲۰	شجاع، سعید
۱(۴):۱-۱۱	شجاعی، حسین
۱(۳):۳۳-۳۸	شریفی، مسعود
۱(۱):۱۱-۱۶	شکرزاده، لیلا
۱(۴):۲۱-۲۷	شورج، فهیمه
۱(۲):۲۱-۲۵	شیرازی، محمد حسن
۱(۲):۹-۱۴	صادری، حوریه
۱(۲):۲۱-۲۵	صادقی فرد، نورخدا
۱(۳):۳۹-۴۶	صادقی، جاوید

۱(۴):۳۵-۳۹	صالحیان، عالم تاج
۱(۲):۶۱-۶۶	صدیقی مقدم، بیژن
۱(۴):۴۱-۴۵	صدیقیان، هومن
۱(۱):۱-۹	صراف نژاد، عبدالفتاح
۱(۱):۱۱-۱۶	صیادی، سارا
۱(۱):۵۵-۶۰	ضیایی اردکانی، حسین
۱(۲):۴۹-۵۹	ضیایی، سید علی
۱(۲):۲۷-۳۴	طالبی، اردشیر
۱(۳):۹-۱۵	طالبی، ملیحه
۱(۳):۱۷-۲۳	طبیعیان، اکبر
۱(۲):۱۵-۲۰	عباسی، عفت
۱(۳):۴۷-۵۱	عدلی مقدم، آیدا
۱(۱):۶۱-۶۶	عطایی، رمضانعلی
۱(۱):۱۱-۱۶	غروی، سارا
۱(۴):۱۳-۲۰	فرج نیا، صفر
۱(۱):۶۷-۶۹	فرزندی، غلامحسین
۱(۳):۲۵-۳۱	فرشاد زاده، زهرا
۱(۱):۱۷-۲۲	فرنیا، پریسا
۱(۲):۱-۸	فلاح، جلیل
۱(۲):۴۳-۴۸	فلاحی، شهاب
۱(۱):۴۷-۵۳	فیاض، فریبا
۱(۴):۱-۱۱، ۱(۱):۱۱-۱۶	فیض آبادی، محمد مهدی
۱(۲):۲۱-۲۵	قاسمی، امیر
۱(۴):۳۵-۳۹	قدس، فاطمه
۱(۲):۳۵-۴۱	قزوینی، کیارش
۱(۲):۳۵-۴۱	قناعت، جواد
۱(۱):۳۹-۴۵	کاظم پور، نسترن
۱(۴):۵۳-۵۵	کرباسیان، محمد علی
۱(۱):۶۱-۶۶	کرمی، علی
۱(۱):۶۷-۶۹	کریمی، عبدالله
۱(۴):۴۷-۵۱	کسری کرمانشاهی، روحا
۱(۲):۱۵-۲۰	کمائی، فریدون
۱(۲):۶۱-۶۶	کوخابی، پرویز
۱(۲):۴۳-۴۸	کیانی، جلال
۱(۱):۴۷-۵۳	گلشنی، مریم
۱(۱):۳۹-۴۵	محبوبی، محدثه
۱(۱):۴۷-۵۳	مرادی، آرزو
۱(۱):۱-۹	مزده، شهناز
۱(۲):۲۷-۳۴	مسجدیان جزی، فرامرز

۱(۱):۶۷-۶۹	مصطفوی، سید حمید
۱(۲):۱-۸	مظفری، نور امیر
۱(۴):۳۵-۳۹	منعم، مسعود
۱(۲):۴۹-۵۹	منوری، سید حمید رضا
۱(۴):۲۹-۳۴	موسویان، سید مجتبی
۱(۱):۷۱-۷۲	مهاجر ایروانی، بابک
۱(۱):۶۱-۶۶	مهرابی توانا، علی
۱(۱):۵۵-۶۰	میرافشار، سید محمد
۱(۱):۵۵-۶۰	میرصالحیان، اکبر
۱(۲):۴۳-۴۸	میرنژاد، رضا
۱(۱):۲۳-۳۱	میهنی، فاطمه
۱(۳):۲۵-۳۱، ۱(۲):۳۵-۴۱	نادری نسب، محبوبه
۱(۲):۶۷-۶۹	ناصری، حبیب اله
۱(۳):۱۷-۲۳	نریمانی، تهینه
۱(۳):۱-۸	نصیری، سیاوش
۱(۲):۴۹-۵۹	نوروزبایی، زهرا
۱(۲):۴۹-۵۹	نوروزی، مرضیه
۱(۳):۴۷-۵۱	نوروزیان، داریوش
۱(۳):۱-۸	نویری، هانیه
۱(۴):۱۳-۲۰، ۱(۳):۳۹-۴۶	نهایی، محمد رضا
۱(۴):۲۱-۲۷	نیک بین، وجیهه سادات
۱(۴):۱۳-۲۰، ۱(۳):۳۹-۴۶	نیکوش، سولماز
۱(۲):۲۷-۳۴	والهی، فرحناز
۱(۱):۷۱-۷۲	هادی زاده نیسانقلب، محمد
۱(۲):۹-۱۴	هاشمی، سید رضا
۱(۲):۱۵-۲۰	هاشمی، عبدالرزاق
۱(۳):۴۷-۵۱	هدایتی، محمد حسین
۱(۲):۴۹-۵۹	همکار، رسول
۱(۳):۱۷-۲۳	هوائی، سید اصغر
۱(۳):۲۵-۳۱	یوسفی، فروغ

فهرست داوران مجله میکروب شناسی پزشکی ایران در سال ۱۳۸۶

دکتر مدرس گیلانی، شهرزاد  
 دکتر مصوری، نادر  
 دکتر مظفری، نور امیر  
 دکتر میرصالحیان، اکبر  
 دکتر نهائی، محمدرضا  
 دکتر نیاکان، محمد  
 دکتر همکار، رسول  
 دکتر هوائی، سید اصغر  
 دکتر یادگاری، محمد حسین  
 دکتر یوسفی مشعوف، رسول

دکتر اشراقی، سید سعید  
 دکتر اولیاء، پرویز  
 دکتر بادامی، ناصر  
 دکتر بهروزی خواه، علی محمد  
 دکتر پورشفیع، محمدرضا  
 دکتر پورمند، محمدرضا  
 دکتر پیروز، طاهره  
 دکتر توکلی، اکبر  
 دکتر جزایری، سید محمد  
 دکتر چیت ساز، محسن  
 دکتر حاجی عبدالباقی، محبوبه  
 دکتر خرمی زاده، محمدرضا  
 دکتر رسولی نژاد، مهرناز  
 دکتر رسولی، ایرج  
 دکتر رعایایی، محمد  
 دکتر زاهدپور انارکی، محمدرضا  
 دکتر زهرائی صالحی، تقی  
 دکتر زینی، فریده  
 دکتر ستاری، مرتضی  
 دکتر سلطان دلال، محمد مهدی  
 دکتر سودبخش، عبدالرضا  
 دکتر شاهچراغی، فرشته  
 دکتر شریفی، مسعود  
 دکتر شکرآبی، مهدی  
 دکتر شیرازی، محمد حسن  
 دکتر صادری، حوریه  
 دکتر علیخانی، محمد یوسف  
 دکتر فاضلی، محمدرضا  
 دکتر فتح اله زاده، بهرام  
 دکتر فلاح، فاطمه  
 دکتر فهیم زاد، علیرضا  
 دکتر فیض آبادی، محمد مهدی  
 دکتر قاضی سعیدی، کیومرث  
 دکتر مجتبی مبارز، اشرف  
 دکتر مدرس گیلانی، شهاب

## راهنمای اشتراک مجله

برای اشتراک مجله میکروب شناسی پزشکی ایران طبق موارد ذیل اقدام نمائید:

۱- پرداخت هزینه اشتراک بر اساس جدول زیر به حساب جاری شماره ۶۰۰۴۰۷۸ بانک رفاه کارگران شعبه بیمارستان

مصطفی خمینی تهران (کد ۱۶۳) به نام انجمن میکروب شناسی ایران

۲- تکمیل فرم اشتراک و ارسال آن به همراه اصل فیش بانکی به آدرس دفتر مجله (تهران- صندوق پستی ۷۱۵-۱۴۵۱۵)

با پست سفارشی

۳- اعضا انجمن میکروب شناسی می بایست کپی کارت یا شماره عضویت خود را نیز به پیوست ارسال نمایند

۴- مراکز علمی ( کتابخانه ها، مراکز تحقیقاتی ،...) وابسته به دانشگاه های علوم پزشکی کشور می توانند درخواست خود

را برای اشتراک رایگان به دفتر مجله ارائه نمایند.

### فرم اشتراک

نام: نام خانوادگی: میزان تحصیلات:

اینجانب ..... مبلغ ..... ریال، بابت هزینه اشتراک تعداد ..... جلد از مجله میکروب شناسی پزشکی ایران (از شماره ..... تا .....) به شماره حساب ۶۰۰۴۰۷۸ بانک رفاه کارگران شعبه بیمارستان مصطفی خمینی تهران (کد ۱۶۳) به نام انجمن میکروب شناسی ایران، واریز و اصل فیش پرداختی به شماره ..... را به آدرس مجله ارسال می نمایم.

آدرس کامل پستی:

کدپستی:

تلفن:

امضاء و تاریخ:

E-mail:

### نوع اشتراک:

اشتراک سالیانه ( ۴ شماره ) با احتساب هزینه پست:

اعضا انجمن میکروب شناسی ایران ۴۵۰۰۰ ریال

آزاد ۸۵۰۰۰ ریال

اشتراک تک شماره با احتساب هزینه پست:

اعضا انجمن میکروب شناسی ایران ۱۱۰۰۰ ریال

آزاد ۲۱۰۰۰ ریال



# The effect of Sub-Minimum Inhibitory Concentration (S-MIC) of ciprofloxacin & ampicillin on hemolysin activity of *Escherichia coli*

Havaei S A<sup>\*1</sup>, Satari M<sup>2</sup>, Oshaghi M<sup>2</sup>, Hashemi Shahraki A<sup>1</sup>.

- 1) Department of Microbiology , Isfahan University of Medical Sciences.
- 2) Department of Microbiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

**Corresponding author:** Havaei S A, Department of Microbiology , Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran Mobile: 09133133539 E-mail: havaei @med.mui.ac.ir

## Abstract

**Background and objectives:** Sub-minimum inhibitory concentration (S - MIC) can induce changes in morphology, virulence factors and biochemical properties of bacterial pathogens. The goal of this study is to determine the Sub-MIC effect of ciprofloxacin and ampicillin on the haemolytic activity of *E. coli*.

**Material and Methods:** Two clinical isolates of *E. coli* with high haemolytic activity was selected. Changes in haemolytic activity of the isolates was assessed after exposing them to MIC and Sub-MIC of ciprofloxacin and ampicillin.

**Results:** Ciprofloxacin decreased haemolytic activity at 1/2, 1/4 and 1/8 Sub-Mic, whereas ampicillin showed no effect on haemolytic activity .

**Conclusion:** We conclude that Sub-MIC concentrations of ciprofloxacin decreased the haemolytic activity of *E. coli*, whereas ampicillin had no such effect.

**Keywords:** *E. coli*, Haemolytic activity, Ampicillin, Ciprofloxacin,

# The effect of *Lactobacillus fermentum* ATCC9338 as a probiotic on the adhesion of oral streptococci *in vitro*

Tahmourespour A<sup>\*1</sup>, Kasra-Kermanshahi R<sup>2</sup>, Salehi R<sup>3</sup>, Nabi-nejad A<sup>4</sup>

1-Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Khorasgan, Isfahan

2-Department of Biological Science, Alzahra University, Tehran

3-Department of Biological Science, Isfahan University, Isfahan

4-Agricultural Research Center, Ministry of Jihad-Keshavarzi

**Corresponding author:** Tahmourespour A, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Khorasgan, Isfahan, Iran  
Tel: +98(311)6278314 Mobile: 09133130052 E-mail: atahmoures@khuisf.ac.ir

## Abstract:

**Background and Objectives:** Oral Streptococci especially *Streptococcus mutans* are the major cause of dental caries & periodontal diseases. Going along with the increasing antibiotic resistance of bacteria, new methods for decreasing of oral cavity pathogens must be investigated. The aim of this study was to determine the effect of *Lactobacillus fermentum* ATCC9338 as a probiotic strain on the adhesion of oral streptococci to the surfaces.

**Material and Methods:** *S. mutans* ATCC35668 with oral streptococci isolated from dental plaque & caries (40 isolates) were studied. The ability of biofilm formation was investigated using the colorimetric method. An isolates showing the strongest activity in forming biofilm were selected. Then the effect of probiotic strain on the adhesion of the selected isolate to the polystyrene microtiter plate was determined simultaneously and 30 minutes before streptococci entrance to the system.

**Results:** this study showed that in the presence of probiotic strain, the streptococcal adhesion were reduced, and this reduction was significantly stronger if the probiotic strain was inoculated to the system before the oral bacteria. Adhesion reduction is likely due to bacterial interactions and colonization of adhesion sites with probiotic strain before the presence of streptococci.

**Conclusion:** Adhesion reduction can be an effective way on decreasing cariogenic potential of oral streptococci.

**Keywords:** Biofilm, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus mutans*, Probiotics, Dental caring

# Study of lytic phage and alkaline phosphatase on treatment of burn infections caused by *Escherichia coli* in Mouse

Hosain Zadegan H\*<sup>1</sup>, Mohammadi M<sup>1</sup>, Pajohy N<sup>2</sup>, Ebrahim Zade F<sup>3</sup>

- 1) Department of Microbiology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences
- 2) Department of Physiology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences
- 3) Department of Statistics, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences

**Corresponding author:** Hosain Zadegan H, Department Of Microbiology, School Of Medicine, Lorestan University Of Medical Sciences, Khorram Abad, Iran Tel:+98(661)6200133 E-mail: asadzade\_2003@Yahoo.com

## Abstract:

**Background and objectives:** Bacteriophages are microorganisms that have been using bacterial hosts for propagation and life cycle. Some of them are called lytic bacteriophages, that lyse bacterial hosts after growth. These kinds of bacteriophages are used for treatment of bacterial infections and phage typing. lytic bacteriophages have several advantages as a treatment against infections in contrast with antibiotics. Therapeutic effects of lytic phage isolated from natural habitates were studied against burn infection of *Escherichia coli*.

**Material and Methods:** lytic bacteriophages were isolated from environmental resources using luria broth and overlay method. Then phages propagated using *Escherichia coli* as host, supernatant filtered, and after precipitation of polysaccharides used for treatment of *Escherichia coli* infections. For treatment experiments induced burn infections in laboratory mouse were used.

**Results:** lytic bacteriophages were isolated frequently from human and sheep stools, and sewage. Phage titer isolated from sheep's stool was higher than other samples. X<sup>2</sup> analyses results indicate that there was significant difference in death incidence of studied groups.

**Conclusion:** Based on statistical analysis using lytic bacteriophage for treatment of burn infection of *Escherichia coli* inhibited 80 % of mouse from death. Results emphasis the potential of bacteriophages as potent antibacterial treatments.

**Keywords:** Lytic Bacteriophage, *Escherichia coli*, Mouse, Alkaline phosphatase

# Assessment the relationship of *cagA* gene with different gastroduodenal diseases in *Helicobacter pylori* infected patients

Douraghi M<sup>1,2</sup>, Mohammadi M<sup>2</sup>, Shirazi MH\*<sup>1</sup>, Esmaili M<sup>2</sup>, Bababeik M<sup>2</sup>, Saberi Kashani S<sup>2</sup>, Oghalaie A<sup>2</sup>, Mohajerani N<sup>2</sup>

- 1) Department of Pathobiology, School of Public Health, Medical Sciences/University of Tehran
- 2) *Helicobacter pylori* Research Group, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran

**Corresponding author:** Shirazi MH, Department of Pathobiology, School of Public Health, Medical Sciences/University of Tehran, Iran Tel: +98 (21) 66112379 E-mail: mhshirazi@sina.tums.ac.ir

## Abstract

**Background and objectives:** The gastric pathogen *Helicobacter pylori* is introduced as an etiologic agent of gastritis and peptic ulcer and is associated with development of gastric adenocarcinoma. One of the most studied virulence marker of *H. pylori* is cytotoxin-associated gene A (*cagA*) with significant geographical heterogeneity around the world. This study was undertaken to assess the status of *cagA* gene of *H. pylori* strains infecting Iranian patients suffering from various gastrointestinal diseases and to evaluate the detection of this gene as a screening marker of high-risk patients.

**Material and Methods:** In this study, 180 patients (Mean age: 44 years) with upper gastrointestinal manifestations referred for endoscopy to Amir-Alam Hospital or Cancer Institute in Tehran were included. Among one hundred twenty *H. pylori* infected patients 81, 17 and 22 had non-ulcer dyspepsia (NUD), peptic ulcer disease (PUD), and gastric carcinoma (GC) respectively. Tissue samples were homogenized and incubation was performed up to 5 days. Identification was based on morphology under Gram staining and biochemical tests. The status of conserved region of *cagA* gene was determined by gene specific PCR. For statistical analysis,  $\chi^2$  test was used.

**Results:** Among the 180 of studied patients, 120 *H. pylori* strains were isolated. One hundred and one (84.2%) of the tested strains were positive for *cagA* and the remaining strains (15.8%) were negative. All of gastric cancer cases were infected with *cagA*-positive strains. The *cagA*-positive strains were significantly associated with GC as compared with NUD ( $p < 0.05$ ) but this association did not gain statistical significance for other clinical outcomes.

**Conclusion:** Although the possession of *cagA* is associated with GC when compared to NUD, due to the uniform distribution of *cagA* in all other disease categories detection of *cagA* alone can not be considered as a discriminative marker for a specific clinical outcome. Hence, the study of other virulence determinants and functional characteristics of *cagA* gene might be necessary for screening high risk patients.

**Keywords:** Cytotoxin-associated gene A, Gastric cancer, Peptic ulcer

# Effects of quinolones on biofilm formed by *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with urinary tract infection

Tavakkoli M<sup>\*1</sup>, Soudi MR<sup>2</sup>, Malekzadeh F<sup>3</sup>, Hajy Zarghany Gh<sup>1</sup>

- 1) Islamic Azad university, Institute of Science and Research, Tehran
- 2) Department of Biological Science, School of Science, Alzahra university , Tehran
- 3) Department of microbiology, School of Biology , Pardis Olum , Tehran university , Tehran

**Corresponding author:** Tavakkoli M, Islamic Azad university, Institute of Science and Research, Tehran , Iran  
Mobile: 09126784784 E-mail: minoo\_Tavakkoli@yahoo.com

## Abstract:

**Background and Objectives:** Bacterial cells of *Staphylococcus epidermidis* are naturally occurring on skin and human mucosal membranes. They also cause nosocomial infections. Capability of biofilm formation plays an important role in the bacterial virulence. Quinolones have been used to treat urinary tract infections caused by *S. epidermidis* for several years. Thus, resistance to this type of antibiotics has emerged among the strains of this organism. Since the bacterial cells residing within biofilm structures are more resistant than those in planktonic stage, we conduct this study to examine the effect of quinolones. The main goal of this study of higher resistance of native biofilm producing strains is the goal of this project.

**Material and Methods:** In this research ten native isolates of *S. epidermidis* were obtained from patients with urinary tract infection. Also standard strain of *S. epidermidis* PTCC 1435 was used as a control. Identification of strains was confirmed using morphological and biochemical tests. Challenge tests against the isolated was performed using three quinolone antibiotics including Ciproflaxacin, Ofloxacin, Nalidixic acid, with two different procedures : kirby bauer disk diffusion test, and broth dilution test.

**Results:** Average of MICs of above mentioned antibiotics against ten isolated was obtained as follow: Ciproflaxacin (7/375 µg/µl), Ofloxacin (11/53 µg/µl), Nalidixic acid (259/ 2 µg/µl). Experimental biofilm model of these bacteria showed much higher resistance to quinolone antibiotic, from 15 times in case of Nalidixic acid to 18 times greater resistance in case of Ciproflaxacin. Average of MICs among ten isolates against the three antibiotics also showed increased resistance as follow: Ciproflaxacin ( 128/4 µg/µl ), Ofloxacin (177/8 µg/µl ), Nalidixic acid (3942 /4 µg/µl ).

**Conclusion:** *S. epidermidis* showed increased resistance to different quinolone antibiotics in biofilm structure, comparing to those of planktonic form. Results obtained from this research is in agreement with those of other similar projects; and emphasize on applying of a de quate doses of antibiotics against urinary infection caused by biofilmic *Staphylococcus epidermidis*.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, urinary tract infection, quinolone.

# Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant Enterococci from clinical isolates

Oskoui M\*, Farrokh P

Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran

**Corresponding author:** Oskoui M, Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
Tel: +98(21)66405535 E-mail: oskouil@yahoo.com

## Abstract:

**Background and objectives:** Although Enterococci are part of the normal flora of the gastrointestinal tract in humans, they cause infections under certain circumstances. Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) cause serious problems resulting in limited therapeutic options in hospitalized patients. In this study we examined the VRE isolated from clinical specimens to determine the prevalence of *vanA* and *vanB* phenotypes.

**Material and Methods:** Thirty-two vancomycin resistance Enterococci isolates cultured from clinical samples were investigated. Resistance of isolates to vancomycin, teicoplanin, tetracycline, gentamicin, erythromycin and ciprofloxacin were determined by disk diffusion method. MIC of vancomycin for all strains was determined using by micro-dilution method. Existence of *vanA* and *vanB* genes was checked by PCR.

**Results:** Using microbroth dilution assay, 25 and 5 isolates appeared as *vanA* and *vanB* phenotypes respectively. All isolates were resistance to ciprofloxacin. Resistance to erythromycin, tetracycline and gentamicin were detected in 96.87%, 81.25% and 78.12% of isolates respectively. *vanA* and *vanB* genes were found in 25 and 6 isolates respectively. Co-existence of *vanA* and *vanB* were found in 13 isolates using PCR.

**Conclusion:** Our results showed that 12 and 6 of the strains are phenotypically and genotypically *vanA* and *vanB* respectively. Although 13 of 25 isolates (52%) showed *vanA* phenotype, they have both *vanA* and *vanB* genes. With the possibility of genotypically alteration in enterococci, it seems that these isolates acquired *vanB* gene through conjugation.

**Keywords:** Enterococci, Vancomycin, *vanA*, *vanB*

# Cloning and Sequencing of *sacol* a novel gene from *Staphylococcus aureus*

Menbari S, Pourmand MR\*, Shirazi MH, Mardani N

Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

**Corresponding author:** Pourmand MR, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran Tel: +98(21)88954910 E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

## Abstract

**Background & Objectives:** Natural staphylococcal infections and vaccines based whole bacteria lead to poor antibody responses, but recent research reveals that specific antibodies based on recombinant staphylococcal antigens are much more protective. Sacol is a novel antigen that its structural and immunological traits poorly characterized. This research aimed to clone of *sacol*, a novel gene from *Staphylococcus aureus*.

**Material and Methods:** The specific primers with suitable restriction sites were designed and *sacol* amplified by PCR. The *sacol* and plasmid were produced as sticky ends by restriction enzymes *NdeI* and *XhoI*. To amplify the recombinant plasmid the pET21*sacol* transferred into competent cell *E.coli*TOP10. The recombinant plasmid harvested from the host and analyzed by restriction enzymes and sequencing. Finally, *sacol* gene analyzed by bioinformatics tools.

**Results:** The *sacol* gene has 723bp which amplified, cloned and sequenced successfully. Sacol is highly conserved in *Staphylococcus aureus* strains. Moreover, software analysis shows that *sacol* encodes a protein with 32KDa molecular weight (267 amino acids) which has similarity with C51 peptidase in N-terminal with one alpha helix and 14 beta sheets.

**Conclusion:** the *sacol* gene is conserved in majority of *Staphylococcus aureus* strains and may exist and express in most of staphylococcal infections. The role and regulation of the gene is thus of great interest.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *sacol*, cloning

# Molecular differentiation between bovine *Mycobacterium bovis* isolates and human *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran through PCR-RFLP method and comparison with 5 standard strains

Mosavari N<sup>1</sup>, Salehi M<sup>2</sup>, Tadayon K<sup>1</sup>, Mohammad Taheri M<sup>1</sup>, Soaimani K<sup>1</sup>, Aref Pajouhi R<sup>1</sup>, Sepehriseresht S<sup>3</sup>, Alavi M<sup>\*1,2</sup>

- 1) PPD Production Department, Razi Institute, Karaj
- 2) Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran
- 3) Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran

**Corresponding author:** Alavi M, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
Mobile: 09122383283 E-mail: m.alavi1387@gmail.com

## Abstract

**Background and Objectives:** *Mycobacterium tuberculosis* complex is consisted of homogenous organisms. They are slowly growing mycobacteria and their isolation and identification are difficult and time consuming. Differentiation of *Mycobacterium bovis*, causative mammalian tuberculosis, from other members of *Mycobacterium tuberculosis* complex is very important in epidemiology and control of disease in humans and animals. The aim of this study was to evaluate a molecular method to differentiate *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*.

**Material and Methods:** DNA human isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (n=6) and *Mycobacterium bovis* isolates (50) were extracted and used as template in PCR. A 548bp fragment of *oxyR* pseudogene was amplified and digested with *AluI* endo nuclease. The nucleotide 285 could be adenine (*M. bovis*) or guanine (*M. tuberculosis*). Such variation produces different restriction site for *AluI*.

**Results:** There were three incisive fragments in all *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis BCG* strains and one incisive fragment in other members of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

**Conclusion:** PCR-RFLP method on 548bp fragment of *oxyR* gene is a rapid and accurate method to differentiate *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis BCG* from other members of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *oxyR* pseudogene, PCR-RFLP, *AluI*

## Table of Contents

<b>Molecular differentiation between bovine <i>Mycobacterium bovis</i> isolates and human <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates in Iran through PCR-RFLP method and comparison with 5 standard strains</b>	<b>I</b>
Mosavari N, Salehi M, Tadayon K, Mohammad Taheri M, Soaimani K, Aref Pajouhi R, Sepehriseresht S, Alavi M*	
<b>Cloning and Sequencing of <i>sacI</i> a novel gene from <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>II</b>
Menbari S, Pourmand MR*, Shirazi MH, Mardani N	
<b>Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant Enterococci from clinical isolates</b>	<b>III</b>
Oskoui M*, Farrokh P	
<b>Effects of quinolones on biofilm formed by <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolated from patients with urinary tract infection</b>	<b>IV</b>
Tavakkoli M*, Soudi MR, Malekzadeh F, Hajy Zarghany Gh	
<b>Assessment the relationship of <i>cagA</i> gene with different gastroduodenal diseases in <i>Helicobacter pylori</i> infected patients</b>	<b>V</b>
Douraghi M, Mohammadi M, Shirazi MH*, Esmaili M, Bababeik M, Saberi Kashani S, Oghalaie A, Mohajerani N	
<b>study of lytic phage and alkaline phosphatase on treatment of burn infections caused by <i>Escherichia coli</i> in Mouse</b>	<b>VI</b>
Hosain Zadegan H*, Mohammadi M, Pajohy N, Ebrahim Zade F	
<b>The effect of <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC9338 as a probiotic on the adhesion of oral streptococci <i>in vitro</i></b>	<b>VII</b>
Tahmourespour A*, Kasra-Kermanshahi R, Salehi R, Nabi-nejad A	
<b>The effect of Sub-Minimum Inhibitory Concentration (S-MIC) of ciprofloxacin &amp; ampicillin on hemolysin activity of <i>Escherichia coli</i></b>	<b>VIII</b>
Havaei SA*, Satari M, Oshaghi M, Hashemi Shahraki A	

# In the name of God

**Iranian Journal of Medical Microbiology**

The official publication of the Iranian society of microbiology

**Vol.2, No.1**  
**Spring 2008**  
**Quarterly**

\* Referencing the material of this journal  
with referring the source is authorized.



ISSN: 1735 - 8612

## **Owned and published by:**

Iranian Society of Microbiology

### **Chairman:**

Abdollah Karimi MD

### **Editor in Chief:**

Abdolaziz Rastegar Lari PhD

### **Deputy Editor in Chief:**

Parviz Owlia PhD

### **Executive Manager:**

Mohammad Reza Pourmand PhD

### **Treasurer:**

Gholamreza Irajian PhD

### **Editorial Assistants:**

#### **Persian:**

Azardokht Khosravi PhD

#### **English:**

Mohammad Mehdi Feizabadi PhD

## **Editorial Board:**

Abdollahi, Hamid PhD

Alborzi, Abdolvahhab MD

Fallah, Fatemeh PhD

Feizabadi, Mohammad Mehdi PhD

Ghazi Saeedi, Kiumars PhD

Haji Abdolbaghi, Mahboubeh MD

Karimi, Abdollah MD

Khosravi, Azardokht PhD

Mirsalehian, Akbar PhD

Nahae, Mohammad Reza PhD

Owlia, Parviz PhD

Pourmand, Mohammad Reza PhD

Pourshafie, Mohammad Reza PhD

Rastegar Lari, Abdolaziz PhD

## **Consultants of this Issue:**

Abdollahi, Hamid PhD - Akbari Nakhjavani, Farrokh PhD

Bahar, Mohammad Ali PhD - Eshraghi, Seyyed Saeed PhD

Eslami, Gita PhD - Fallah, Fatemeh PhD - Falsafi, Tahereh PhD

Farnia, Parissa PhD - Feizabadi, Mohammad Mehdi PhD

Hamkar, Rasoul PhD - Khorramizadeh, Mohammad reza PhD

Khorshidi Mal Ahmadi, Ahmad PhD - Khosravi, Azardokht PhD

Mansouri, Shahla PhD - Mirsalehian, Akbar PhD

Nahae, Mohammad Reza PhD - Owlia, Parviz PhD

Pourshafie, Mohammad reza PhD - Salari, Mohammad Hossein PhD

Talebi, malihe PhD - Yousefi Mashouf, rasoul PhD

\* This journal is indexed in: IMEMR, index Copernicus, SID, Iran Medex and Magiran

## **Communication Affairs:**

Sara Mosammami

**Address:** P.O.Box: 14515-715, Tehran, Iran

**Telfax:** +98(21)88954910

**E-mail:** [jmicrobiology@gmail.com](mailto:jmicrobiology@gmail.com)

**Website:** [www.ism.ir](http://www.ism.ir)

**Print:** Firooz Group