بسم الله الرحمن الرحیم


# مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

فصلنامه :
سال ۳، شماره ۱ بهار ۱۳۸۸

ISSN: 1735 - 8612

دارای رتبه علمی - پژوهشی از
کمسیون نشریات علوم پزشکی کشور

* مجوز انتشار از وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی:
شماره: ۱۲۴/۲۰۵۰ مورخ: ۱۳۸۵/۴/۲۷



* استفاده از مطالب این نشریه با ذکر منبع بلامانع است



**صاحب امتیاز :**
انجمن علمی میکروب شناسی پزشکی ایران

**مدیر مسئول :**
دکتر غلامرضا ایراجیان

**سردبیر :**
دکتر مسعود شریفی

**مدیر اجرایی :**
دکتر رضا رنجبر

**مدیر امورمالی :**
دکتر محمد نیاکان

**ویراستار :**
دکتر آذردخت خسروی

**شورای نویسندگان (به ترتیب حروف الفبا) :**
دکتر نور امیر مظفری، دانشگاه علوم پزشکی ایران-دکتر غلامرضا ایراجیان، دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکتر عبدالوهاب البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز-دکتر بهمن تبرائی، انستیتو پاستور ایران
دکتر رضا رنجبر، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله-دکتر محمد رهبر، آزمایشگاه مرجع سلامت
دکتر مسعود شریفی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین-دکتر مروت طاهری کلانی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
دکتر حمید عبدالهی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان-دکتر رمضانعلی عطائی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله
دکتر علی مهرابی توانا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله-دکتر محمد نیاکان، دانشگاه شاهد

**داوران این شماره (به ترتیب حروف الفبا) :**
دکتر گیتا اسلامی ، دکتر غلامرضا ایراجیان
دکتر بهمن تبرائی ، دکتر کیوان تدین
دکتر محمد رضا حق شناس ، دکتر آذر دخت خسروی
دکتر محمد باقر خلیلی ،دکتر رضا رنجبر
دکتر محمد رهبر، دکتر تقی زهرایی صالحی
دکتر محمد حسین سالاری ، دکتر محمد مهدی سلطان دلال
دکتر مسعود شریفی ، دکتر بهرام فتح ا.. زاده
دکتر شهره فرشاد، دکتر عزت ا... قائمی
دکتر علی مجتهدی ، دکتر شهاب مدرس
دکتر محمد رضا نهایی



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

**طراح و گرافیست :** مینا آرین
**نشانی :** تهران،صندوق پستی ۷۱۵-۱۴۵۱۵
**تلفکس :** ۸۸۰۲۰۹۱۶
**پست الکترونیک :** jmicrobiology@gmail.com
**آدرس سایت :** www.ism.ir

**طراحی جلد و چاپ :**
گروه فیروز تجارت
**شمارگان :** ۱۰۰۰ نسخه
**قیمت :** ۲۰۰۰۰ ریال

## فهرست مندرجات

# باکتری شناسی


**تشخیص ملکولی ژن‌های بتالاکتاماز $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ در ایزوله‌های اسینتو باکتر ، جدا شده از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های منتخب تهران** ۱

فرشته شاهچراغی، نیکو اکبری شهمیرزادی، مریم عباس علی پور بشاش، حسین جباری ، نور امیر مظفری

**تشخیص سریع اسپور عامل سیاه زخم به روش مولکولی** ۱۰

شهرام پروین، علی احمدی، فاطمه پورعلی، علی کرمی

**حساسیت دارویی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نسبت به داروهای رده اول و جایگزین در شهرستان تبریز** ۱۸

مهدی رشدی ملکی ، سید رضا مؤدب

**ارزیابی نقش موتاسیون ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت نسبت به مترونیدازول در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*** ۲۵

محمد کارگر، مریم باقرنژاد ، عباس دوستی

**بررسی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* نزد مردان نابارور در مقایسه با گروه کنترل** ۳۱

محمد نیاکان ، باقر مرادی ، شهرام راغب


# میکروب شناسی مواد غذائی


**ارزیابی کیفیت میکروبی کره‌های عرضه شده در تهران در سال ۱۳۸۶** ۳۶

فرشته تفنگ سازان ، مرتضی خمیری ، گیتی کریم ، سعید حسنی ، سعیده سیف هاشمی


# ویروس شناسی


**بررسی فراوانی اپشتین بار ویروس (EBV) دربلوک‌های نمونه بیوپسی سرطان مری دراستان‌های مازندران و گلستان در سال ۱۳۸۷** ۴۳

محمدرضا حق‌شناس ، علیرضا رفیعی ، فروه ذبیحیان ، فرشاد نقشوار

**بررسی شیوع هپاتیت B و مقایسه آن با نتایج آزمایشات مواد مخدر و سفلیس در ۱۰۰۰ مرد داوطلب ازدواج مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی شهید هاشمی نژاد-۱۳۸۸** ۴۹

احترام ملکیان نایینی ، محمد رضا متولی باشی

# مقاله کوتاه

**گزارشی از اپیدمیولوژی سل خارج ریوی در شهرستان شهریار در سال ۱۳۸۷** ۵۵
صمد ولی زاده ، مجتبی معماریانی ، رضا بیگ وردی ، حامد معماریانی

# نامه به سردبیر

۵۹

# شرایط تهیه و ارسال مقاله

مجله میکروب 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 میکروب شناسی پزشکی ایران» با ذکر مأخذ مانعی ندارد .

مجله میکروب 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 دوبل 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 میکروب شناسی ایران فرستاده شود . ( ارسال مقاله بصورت فایل word از طریق **email:jmicrobiology@gmail.com** نیز قابل قبول می باشد)

| *اصل مقاله (فارسی)* | *ABSTRACT (English)* |
|---|---|
| عنوان مقاله : یاقوت ١٦ ( بولد ) | **Title : Times New Roman 14 (Bold)** |
| نام نویسندگان : یاقوت ١٢ | **Author: Times New Roman 10 (Bold)** |
| چکیده : یاقوت ١٤ ( بولد ) | |
| عنوان چکیده : یاقوت ١١ ( بولد ) | **Address: Times New Roman 10 (Bold)** |
| متن چکیده : یاقوت ١١ | Text: Times New Roman 11 |
| متن مقاله : لوتوس ١١ | |
| عناوین متن مقاله : یاقوت ١٤ ( 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 میکروب شناسی پزشکی ایران از مقالات پژوهشی گروهی استقبال میکند .

**بند ٤ )** مقالات باید شامل **عنوان، چکیده، مقدمه، مواد و 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 ٦ 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 (Volume)**(Bold)** 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 راد ع ، 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 ۳٤ ، شماره **٤٦** ، صص ٥٥ تا ٦٢ .

**۲-۵)** سازمان به عنوان مؤلف **;** مثال :

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

**۳-۵)** 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.

**٦-۵)** 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.

**۷-۵)** 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*. 13th 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 ٥٠ تا ٦١ .

**۸-۵)**رفرانس الکترونیک ( مقاله ) :

Moynagh J.The evaluations of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commisson, htttp://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.html(Accessed May 2005).

۹-۵)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 ٦)** 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 میکروسکپی ، رادیوگرافی و ...) عکس برقی سیاه و سفید در اندازه( ۷۳ *۱۲۷) میلی متر و حداکثر (۲٥٤*۲۰۳ ) 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 ٦ 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 تائید داوران در اولویت چاپ قرار می گیرد و پس از چاپ مقاله، سه نسخه از شماره مجله به نویسنده رابط ارسال خواهد شد.

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۹- ۱**

# تشخیص ملکولی ژن‌های بتالاکتاماز $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ در ایزوله‌های اسینتو باکتر، جدا شده از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های منتخب تهران

فرشته شاهچراغی[1*]، نیکو اکبری شهمیرزادی[1]، مریم عباس علی پور بشاش[1]،
حسین جباری[2]، نور امیر مظفری [3]

۱) بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲) مراکز تحقیقاتی ایدز ایران، بیماری‌های گوارش و کبد و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
نویسنده رابط: فرشته شاهچراغی، بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
همراه : ۰۹۱۲۲۹۷۲۲۳۲ shahcheraghifereshteh@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۵/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۲۸

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBL) در عفونت‌های بیمارستانی، از اهمیت ویژه برخوردار است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های اسینتوباکتر نسبت به آنتی *بیوتیک‌های* بتالاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های بتالاکتاماز $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ در ایزوله‌های جدا شده در بیمارستان‌های منتخب تهران صورت گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی ۹۵ ایزوله اسینتوباکتر از نمونه بیماران بیمارستان‌های منتخب تهران در سال ۱۳۸۷ جمع آوری شد. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش‌های انتشار از دیسک (disk diffusion) و حداقل غلظت بازدارنده سفتازیدیم به روش Microbroth Dilution بر اساس دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین شد. تولید ESBL با تست فنوتیپی تاییدی (Phenotypic Confirmatory Tests) تعیین گردید. ژن‌های $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ در ایزوله‌ها با روش Multiplex PCR شناسایی شدند.برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون T-test استفاده شد.

**یافته ها:** بیشترین و کمترین مقاومت در بین ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفکسیم (۹۵ ایزوله، ٪۱۰۰) و کلیستین ((۴ ایزوله، ٪۴/۲) مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارنده نسبت به سفتازیدیم در ۷۹ (٪83/1 )ایزوله $\geq 64\mu g/ml$ بود و ۱۸ (٪۱۸/۹) ایزوله مولد ESBL بودند. ژن‌های $bla_{TEM}$ و $bla_{CTX}$ به ترتیب در۱۱ (٪۱۲/۸) و ۱ (٪۱/۲) ایزوله یافت شد .

**نتیجه گیری:** حداقل غلظت بازدارنده ایزوله‌ها در مقابل سفتازیدیم بالا است و حضور ژن $bla_{TEM}$ در آنها بسیار قابل توجه می‌باشد. با توجه به اینکه در مطالعه‌ی حاضر کمتر از یک پنجم ایزوله‌ها مولد ESBL هستند، لذا علاوه بر بتالاکتامازها، مکانیزم‌هایی از قبیل پمپ‌های تراوشی و پورین‌ها از علل دیگر مقاومت در این باکتری‌ها می‌باشد .از آنجاییکه عوامل مقاومت برروی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند، شناسایی سریع و ردیابی این سویه‌ها می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از گسترش آنها داشته باشد.

**کلید واژه ها:** اسینتوباکتر ، مقاومت آنتی بیوتیکی، ESBL ، $bla_{CTX}$، $bla_{TEM}$

## مقدمه:

اسینتوباکتر،کوکوباسیل گرم منفی است که از بسیاری از منابع انسانی و محیطی جدا می‌شود (۱). این باکتری به پاتوژن مناطق گرمسیری و مرطوب معروف بوده است. شیوع عفونت‌های ناشی از آن در فصل تابستان بیشتر از فصول دیگر می‌باشد (۳،۲). طی دههٔ گذشته شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری در حال افزایش بوده است. این موضوع به‌ویژه در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه، سوختگی و جراحی اهمیت بیشتری دارد.اولین بار در سال ۱۹۹۱، گزارش مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتر به کرباپنم‌ها درایالات متحده، موجب نگرانی همگان شد(۴).

با وجود اینکه این باکتری معمولاً از ویرولانس پایینی برخوردار است، امّا از طریق تجهیزات مرتبط با دستگاه تنفسی و کاتترهای آلوده موجب طیف وسیعی از عفونت‌ها می‌گردد(۱). اسینتوباکتر تا مدتها می‌تواند در محیط بیمارستان باقی مانده و بین بیماران انتقال یابد(۵). مشکل عمده در عفونت‌های ناشی از آن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. همانطور که نتایج تحقیقات نشان می‌دهد مقاومت نسبت به کرباپنم‌ها که از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند روز به روز در حال افزایش است.به عنوان مثال، مرکزمدیریت بیماری‌های آمریکا (CDC ) اعلام نموده میزان مقاومت ٪۹ در بین نمونه‌های جدا شده در سال ۱۹۹۵ افزایش چشمگیر به میزان ٪۳۱ پیدا کرده که در سال ۲۰۰۴ به ٪۴۰ رسیده است (۸-۶). مکانیسم‌های مقاومت در گونه‌های مختلف اسینتوباکتر به صور مختلفی بروز می‌کنند. این مکانیسم‌ها شامل کانال‌های دیوارهٔ سلولی (پورین‌ها)، سیستم‌های تراوشی (efflux pumps) و ترشح بتالاکتامازها می‌باشند(۹).یکی از این مکانیسم‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آنها می‌شوند. بتالاکتامازها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های نوع SHV، PER ، CTX و TEM اشاره نمود. ژن‌های کد کنندهٔ این آنزیم‌ها معمولاً جزو ژن‌هایی هستند که بر روی پلاسمید قرار گرفته‌اند. با مصرف گسترده و روز افزون آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌ها، دسته دیگری از بتالاکتامازها بوجود آمدند که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه طیف فعالیت گسترده‌تری داشتند(ESBLs). این آنزیم‌ها قادراند آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و نیز آزترئونام را هیدرولیز نمایند. ژن‌های $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ رمز کننده این دسته از آنزیم‌های وسیع الطیف هستند. البته $bla_{TEM-1}$ و $bla_{TEM-2}$ و $bla_{TEM-13}$ به‌طور استثناء طیف محدود(Narrow spectrum )دارند (۱۱،۱۰). گونه‌های اسینتوباکتر رفتار مشابهی در رابطه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان نمی‌دهند. کمپلکس *اسینتوباکتر بومانی* که از *A. baumannii* و *A. calcoaceticus* تشکیل شده است از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک می‌باشند. به‌طوریکه در جنس اسینتوباکتر، این کمپلکس بیشترین عامل ایجاد عفونت‌های ناشی از این جنس است. در ضمن این کمپلکس بیشترین مقاومت دارویی چند گانه (Multiple drug resistance = MDR) را دارد(۱۲).

مشکلات درمانی ناشی از این باکتری و امکان انتقال بین موجودات زنده و غیر زنده و همچنین ماندگاری طولانی مدت در محیط بیمارستان باعث افزایش ظهور این باکتری در محیط‌های بیمارستانی و عفونت روزافزون ناشی آن شده‌است(۱۳). یکی از مواقعی که عفونت ناشی از اسینتوباکتر ایجاد مشکل می‌کند جنگ و وقوع بلایای طبیعی است. در جنگ آمریکا با عراق و افغانستان و همچنین جنگ ویتنام این عفونت‌ها سربازان را دچار مشکل کرد (۱۴).اولین سابقه حضور اسینتوباکتر در جنگ، به جنگ کره بر می‌گردد (در آن دوره Achromobacter نامیده می‌شد) که از کشت خون مجروحان جنگ جدا شد. در سال ۱۹۷۲ Tong بیشترین عفونت اسینتوباکتر در جنگ را گزارش کرد، که در آن ۳۰ نفر دریانورد جنگ ویتنام دارای ۶۳ زخم با عفونت شدید ناشی از اسینتو باکتر بودند(۱۵).ژن‌های مقاومت بتالاکتام‌ها در این باکتری معمولا بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند و در نتیجه به راحتی بین سویه‌ها انتقال می‌یابند. لذا، شناسایی سریع و ردیابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آنها و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم بشمار رود. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه تعیین مقاومت و حساسیت ایزوله‌های اسینتوباکتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله سفالوسپورین‌های نسل‌سوم ، تعیین MIC سفتازیدیم و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ بود.

## مواد و روش ها:

در فاصله ماه‌های فروردین تا بهمن سال ۱۳۸۷ تعداد ۹۵ ایزوله مربوط به نمونه ترشحات تنفسی، ادرار، زخم و خون بیماران

بستری و سرپایی بیمارستان‌های شریعتی ، بقیه الله ، امام خمینی ، مصطفی خمینی تهران جمع آوری گردید. به منظور حصول اطمینان از صحت انتخاب کلونی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز،OF هوازی ،OF بی هوازی، TSI ، اندول(SIM)، حرکت (SIM)، سیمون سیترات، MR ،VP ، مک کانکی، لاکتوز)انجام شد. به این ترتیب، ۹۵ ایزوله اسینتو باکتر شناسائی و تائید شدند(۱۶). سپس ایزوله‌ها در محیط حاوی گلیسیرین ۱۸- ۱۵٪ در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله روش دیسک دیفیوژن (Baur- Kirby) صورت گرفت (۱۷). دیسک‌هامحصول شرکت MAST (کشور انگلستان) و به شرح زیر بودند: سفوتاکسیم (۳۰ µg)، پیپراسیلین (۱۰۰µg )، پیپراسیلن/ تازوباکتام (۱۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، سپیروفلوکساسین (۵ µg) و سفتریاکسون (۳۰ µg) سفکسیم (۵ µg)، ازترونام (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg) و کلیستین (۱۰ µg) . تعیین حداقل غلظت بازدارنده ( MIC ) سفتازیدیم به روش Microbroth dilution و مطابق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گردید (۱۸).

**آزمایش تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده(ESBLs ) :**

برای این منظور از تست فنوتیپی تاییدی ( Phenotypic Confirmatory Tests) استفاده شد. دیسک‌های مورد آزمایش شامل سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید ( $\frac{CAZ:30\mu g}{CA:10\mu g}$)، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید ( $\frac{CAZ:30\mu g}{CA:10\mu g}$)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم بود (محصول شرکت Mast). بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاوونیک اسید و یا سفوتاکسیم-کلاوولانیک اسید مشخص گشت (۲۰،۱۹).

**تعیین حداقل غلظت بازدارنده آنتی بیوتیک( Minimum Inhibitory Concentration):**

ایزوله‌هایی برای تعیین MIC سفتازیدیم انتخاب شدند که قطر ناحیه عدم رشد در آنها حداکثر تا اندازه ۲۰ میلی‌متر بود. برای تعیین MIC ایزوله‌ها از روش Micro-broth dilution استفاده شد. جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و MIC از سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853استفاده شد.

**DNA: و انجام استخراج PCR:**

برای انجام PCR و شناسائی ژن‌های $bla_{TEM}$ و $bla_{CTX}$ ایزوله‌هایی با MIC≥ 16 µ g/ml ،انتخاب شدند. به منظور استخراج DNAی ایزوله‌ها، سوسپانسیون غلیظی از آنها در آب مقطر حاوی (20 µg/ml) RNase تهیه شد. سپس DNAی هر یک از ایزوله‌ها به روش جوشانیدن(boiling) استخراج گردید(۲۱).

تست PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز $bla_{CTX}$ (550bp) و (800bp) $bla_{TEM}$ تحت شرایط مندرج در جدول ۱ انجام شد(۲۲).

مشخصات پرایمرهای مورد استفاده ، به شرح جدول ۲ می‌باشد. لازم به ذکر است که کلبسیلا پنومونیه ۷۸۸۱ حاوی ژن‌هایCTX و TEM (اهدائی پروفوسور Patrice Nordmann از کشور فرانسه) به عنوان سویه استاندارد استفاده شد. همچنین ژل آگاروز ۱٪ برای الکتروفورز محصولات PCR و نیز مارکر 100bp Ladder Fermentase (محصول لیتوانی)، مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری به کمک نرم افزار spss و رابطه‌ی بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های $bla_{CTX}$ و $bla_{TEM}$ باآزمون آماریT-test بررسی گردید.

جدول ۱ : شرایط انجام PCR

| No. | Factor / Gene / Step | Temp. (°C) | Time |
|---|---|---|---|
| | | CTX/ TEM | CTX/ TEM |
| 1 | Initial denaturation | 94/ 94 | 3/ 3 min |
| 2 | Denaturation | 94/ 94 | 30/ 30 s |
| 3 | Annealing | 63/ 45 | 1/ 1 min |
| 4 | Extension | 72/ 72 | 1/ 1 min |
| 5 | Final extension | 72/ 72 | 10/ 10 min |
| 6 | Cycle number | 35 | |

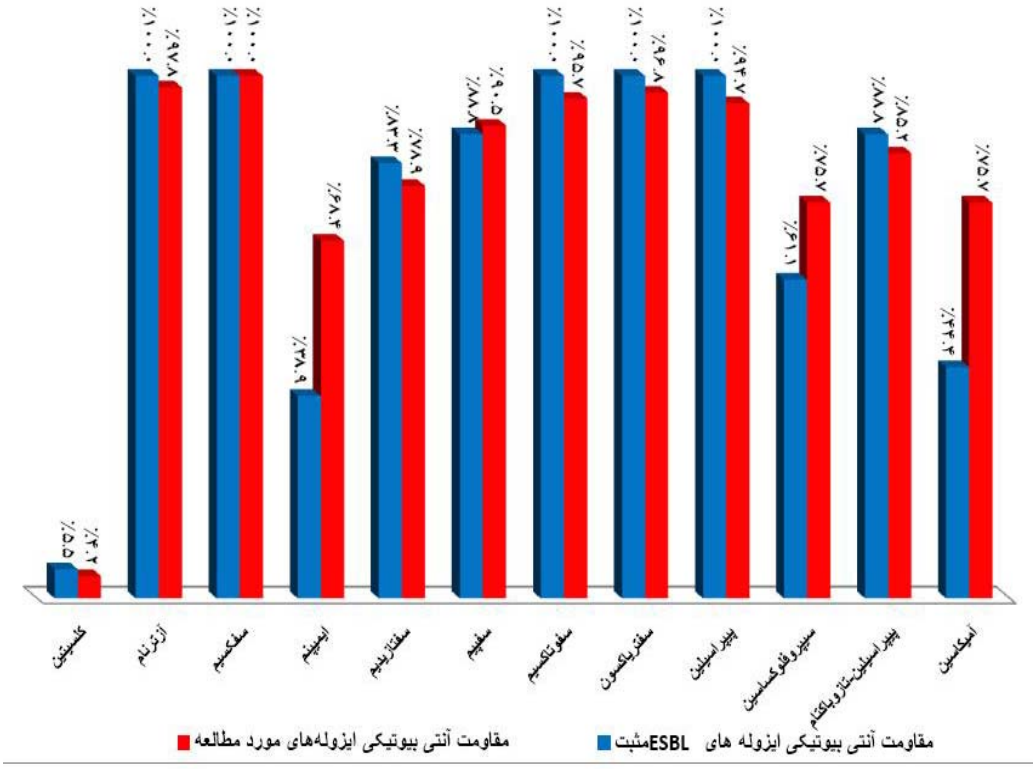
**جدول ۲:** مشخصات پرایمرهاي مورد استفاده در PCR

| نام ژن شناسایی شده | توالی نوکلئوتیدی | مشخصات / نام پرایمر |
|---|---|---|
| CTX-A | 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' | $bla_{CTX}$ |
| CTX-B | 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' | $bla_{CTX}$ |
| TEM-A | 5´- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC -3´ | $bla_{TEM}$ |
| TEM-B | 5´- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC -3´ | $bla_{TEM}$ |

## یافته ها:

از ۹۵ ایزوله اسینتوباکتر جمع آوری و تایید شده به روش‌های بیوشیمیایی ،۴۳(۴۵/۳٪) ایزوله مربوط به نمونه‌های تنفس (خلط و تراشه)، ۴(۴/۲٪)ایزوله مربوط به زخم،۱۱(۱۱/۶٪) ایزوله مربوط به ادرار، ۳۷(۳۸/۹٪) ایزوله مربوط به خون بود. بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به کلیستین(۴ ایزوله ۴/۲٪) و سفکسیم (۹۵ ایزوله ۱۰۰٪) بود. مقاومت به سفتازیدیم نیز در۷۵(۷۸/۹٪) ایزوله مشاهده شد.

میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها به شرح ذیل بود: آمیکاسین در ۷۲ ایزوله (۷۵/۷٪)، پیپراسیلین- تازوباکتام در۸۱ ایزوله (۸۵/۲٪)،سیپروفلوکساسین در ۷۲ ایزوله (۷۵/۷٪)، پیپراسیلین در ۹۰ ایزوله (۹۴/۷٪)،سفتریاکسون در ۹۲ ایزوله (۹۶/۸٪)، سفوتاکسیم در ۹۱ ایزوله (۹۵/۷٪)، سفپیم در ۸۶ ایزوله (۹۰/۵٪)، ایمیپنم در ۶۵ ایزوله (۶۸/۴٪)، و آزترنام در ۹۲ ایزوله (۹۶/۸٪). (نمودار ۱)




نمودار ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کلیه ایزوله‌ها و ایزوله‌های ESBL مثبت

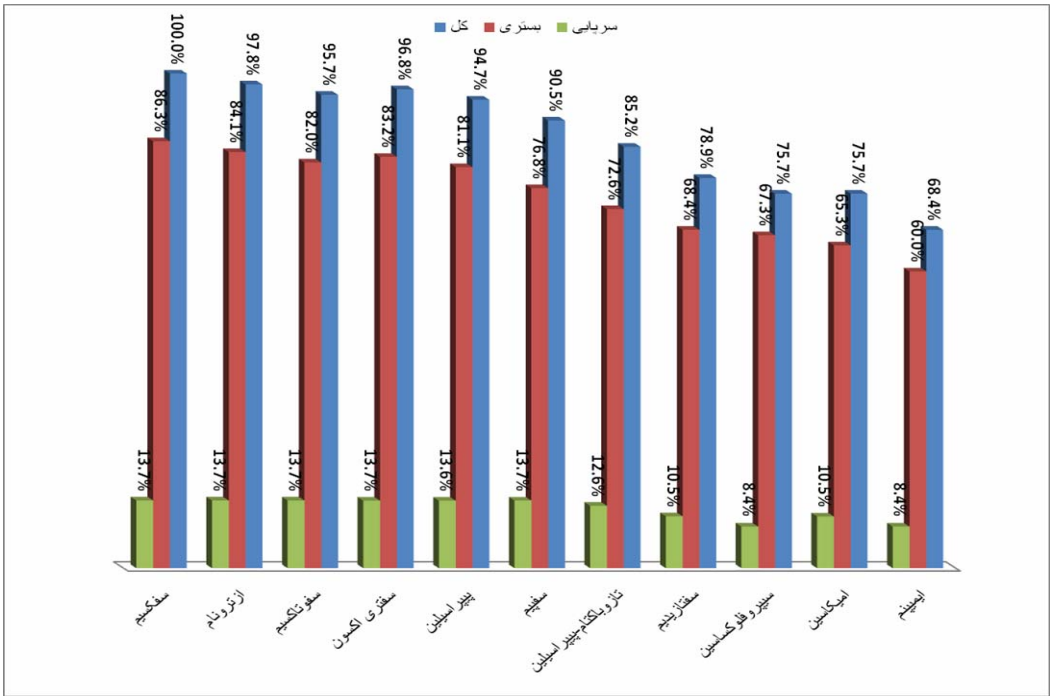
از مجموع ایزوله‌های مورد مطالعه ۸۴ ایزوله(٪۸۸/۴) با روش انتشار در آگار نسبت‌به سفتازیدیم غیرحساس(مقاوم وحد واسط) بودند. از این میان ۷۹ ایزوله(٪۸۳/۲) MIC≥ 64 µg/ml به این آنتی‌بیوتیک نشان دادند. از این تعداد ۵ (٪۵/۱) ایزوله تنفسی و ۳ (٪۳/۸ ) ایزوله از عفونت‌های زخم، ۱۱(٪۱۳/۹ ) ایزوله از ادرار و۶۰ (٪۷۵/۹) ایزوله از خون جدا شده بود.

همچنین ۱۸ (٪۱۸/۹) ایزوله به روش PCT مولد ESBL بودند. میزان مقاومت این ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به قرار ذیل بود: آمیکاسین: ۸ (٪۴۴/۴)، پیپراسیلین-تازوباکتام : ۱۶( ٪۸۸/۸)، سیپروفلوکساسین: ۱۱(٪۶۱/۱)، پیپراسیلین: ۱۸(٪۱۰۰) ، سفتریاکسون: ۱۸( ٪۱۰۰) ، سفوتاکسیم: ۱۸( ٪۱۰۰) ، سفپیم: ۱۶ ( ٪۸۸/۸)، سفتازیدیم: ۱۵(٪۸۳/۳)،- ایمیپنم: ۷ ( ٪۳۸/۹) ، سفکسیم: ۱۸(٪۱۰۰)، کلیستین: ۱(٪۵/۵) و آزترنام: ۱۸ (٪۱۰۰).

از کل ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم (n=۶۵)، بیشترین ایزوله (n =۳۷ یا ٪۵۶/۹) از خون جدا شده بود. بیشترین تعداد ایزوله مورد مطالعه در این گزارش از بیمارستان شریعتی جدا شده بود و بیشترین و کمترین میزان مقاومت در ایزوله‌های این بیمارستان نیز همانند کل ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب متعلق به سفکسیم ۹۵(٪۱۰۰) و کلیستین۴ (٪۴/۲) بود.

همانطور که در نمودار ۲ مشخص است، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی است.

جهت انجام PCR ژن‌های $bla_{TEM}$ و $bla_{CTX}$ از ۸۶ ایزوله‌ای استفاده شد که MICcaz ≥ ۱۶ µg/ml داشتند. از بین تعداد ٪۱۲/۸ (۱۱ ایزوله) دارای ژن $bla_{TEM}$ ، ٪۱/۲ (۱ ایزوله) دارای ژن $bla_{CTX}$ بودند. بین مقاومت به سفوتاکسیم و فراوانی ژن $bla_{TEM}$ رابطه‌معنی دار ( P= 0.042) وجود داشت.




**نمودار ۲: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های مربوط به بیماران بستری و سرپائی**

## بحث:

اسینتوباکتر از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. نتایج نشان داد سویه‌های اسینتوباکتر دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه و همچنین MIC بسیار بالایی نسبت به سفتازیدیم دارند. نتیجه حاصل از مقایسه حساسیت آنتی بیوتیکی پیپرا سیلین به تنهایی و همراه با تازوباکتام تفاوت چندانی نشان نداد ( مقاومت از ۹٤/۷ درصد به ۸۵/۲ درصد رسید). این تفاوت جزئی نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک پیپرا سیلین- تازوباکتام هم داروی مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری نمی‌باشد.

در حال حاضر از ایمی‌پنم برای سویه‌هایی که به اکثر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، از جمله سفالوسپورین‌های نسل سوم، مقاوم بودند،استفاده می شود. اما، نتایج مطالعات دیگر (۲۳)و نیز نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیانگر مقاومت ۶۸/۴ درصد نسبت به ایمی‌پنم است. در این مطالعه بیشترین تعداد (۵۵/۳ درصد ) ایزوله‌های مقاوم به ایمی‌پنم از خون جدا شده بود.

به علت افراط در مصرف سفالوسپورین‌های نسل سوم و عدم رعایت اصول بهداشتی در سطح جامعه، همانطور که در نتایج این مطالعه مشخص است، مقاومت قابل ملاحظه‌ای در این نسل از سفالسپورین‌ها به‌وجود آمده‌است. مقاومت ۹۶/۸ درصد در سفتریاکسون، ۹۵/۷ درصد در سفوتاکسیم، ۷۸/۹ درصد در سفتازیدیم و در نهایت مقاومت ۱۰۰ درصد در سفکسیم نشان می‌دهد که سفالوسپورین‌های نسل سوم داروی مناسبی برای درمان این نوع عفونت‌ها نمی‌باشند. یکی از راهکارهای مبارزه با گسترش مقاومت در این نوع عفونت‌ها، در صورت مشاهده مقاومت در سویه عامل عفونت به یکی از آنتی بیوتیک‌های این گروه از سفالوسپورین‌ها ، می‌تواند عدم تجویز مجدد سفالوسپورین‌های نسل سوم باشد. مقایسه نشان داد میزان مقاومت به طور چشمگیری در کلیستین پایین تر از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها است. بدین ترتیب، کلیستین برای درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بسیار مناسب به نظر می‌رسد . دلیل احتمالی پایین بودن مقاومت به این آنتی بیوتیک، تجویز کم آن در دوره اخیر بوده است.

نظر به اینکه در این مطالعه بیشترین تعداد نمونه از خلط و تراشه جدا شده است، لذا به‌نظر می‌رسد بیشترین قسمت درگیر در عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر ، دستگاه تنفسی باشد. بنا براین، گند زدایی و سترون‌سازی تجهیزات و دستگاه‌های تنفسی مثل کاتترهای تنفسی یکی از راه‌های جلو گیری از انتشار این عفونت می‌باشد. گزارشات متعددی از سراسر دنیا بروز عفونت‌های حاد و یا کلونیزاسیون افراد به وسیله اسینتوباکترهای مولد ESBL را

تایید می‌کنند (۲۴و ۲۵). طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ در هندوستان انجام شده است ۲۸ درصد از نمونه های مورد مطالعه ESBL مثبت بوده است در حالی که این میزان در مطالعه حاضر ۱۸/۹ درصد است که به این ترتیب نسبت به هندوستان ۹/۱ درصد کمتر است(۵). با توجه به اینکه ایزوله‌های تولید کننده بتالاکتاماز درصد پایین تری را در مقایسه با ایزوله‌های مقاوم نسبت به بتا لاکتام‌ها دارند، بنا براین، به نظر می‌رسد که علاوه بر تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وجود Efflux pump و کانال‌های دیواره سلولی (پورین‌ها) نیز در ایجاد مقاومت دخیل باشند. همچنین انجام تست‌های فنوتیپی به تنهایی قادر به تعیین سویه‌های مولد انواع آنزیم‌های ESBL نمی‌باشد. لذا، بایستی آزمایشات مولکولی نیز بر روی این سویه‌ها، جهت بررسی وجود آنزیم‌های ESBL ،انجام شود.

مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران بستری و سرپایی هم مقایسه شد. میزان مقاومت در بیماران بستری بیشتر بوده است. مقاومت بالا در بیماران بستری به دلیل احتمال انتقال ژن‌های مقاومت از طریق عناصر ژنتیکی متحرک در بین ایزوله‌ها و همچنین احتمال انتشار کلونال ایزوله‌های مقاوم در بین بیماران بستری است. همچنین مقایسه در بیماران سرپایی و بستری نشان داد بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیت مربوط به سفپیم و سیپروفلوکساسین است. این موضوع بیانگر احتمال مصرف بیشتر آنتی بیوتیک سفپیم در بیماران سرپایی است.

ایزوله‌های مولد ESBL معمولا نسبت به آزترونام حساس می‌باشند. با این وجود همانطور که از نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی بر می آید میزان مقاومت به آزترونام در نمونه‌های مولد ESBL، ۱۰۰ درصد گزارش شد. میزان مقاومت بالا نسبت به این آنتی‌بیوتیک، همانطور که قبلا هم اشاره شد، بیانگر دو موضوع است:اول اینکه روش PCT روش مناسبی برای شناسایی تمامی ایزوله‌های مولد ESBL در این باکتری نمی‌باشد، دوم اینکه مکانیسم‌های دیگری از جمله Efflux pumpو پورین ها(منافذ غشا) در ایجاد این مقاومت دخیل می‌باشند. یکی از راه‌های اصلاح روش PCT،استفاده همزمان از سه دیسک است و دیگری استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی ژن‌های ESBL می‌باشد.

در مطالعه دیگری (۲۰۰۴-۲۰۰۲) مقاومت اسینتوباکتر جداشده از سربازان جنگ عراق و افغانستان بررسی گردید(۱۴). ۶۵ درصد از نمونه‌ها نسبت به ایمی‌پنم مقاوم بودند که در مقایسه با ۶۸/۴ درصد مقاومت در مطالعه ما ، اختلاف قابل ملاحظه ای وجود ندارد. طی تحقیقی که در سال ۱۳۸۳ در دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد، مقاومت نسبت به آمیکاسین ۹۵/۵ درصد تعیین شد(۲۶). درحالیکه در مطالعه حاضر آمیکاسین با ۷۵/۷ درصد مقاومت بعد ازکلیستین و ایمی‌پنم کمترین مقاومت را نسبت به اسینتوباکتر دارد. به نظر می‌رسد که این کاهش مقاومت به دلیل مصرف محدودتر این آنتی بیوتیک در بیمارستان‌ها باشد.

در مطالعه حاضر، مقاومت در سویه‌های مولد ESBL نیز به صورت جداگانه بررسی گردید. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های ESBL مثبت بیشتر شده است، البته به استثناء سه آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم،آمیکاسین و سیپرو فلوکساسین. این سه آنتی‌بیوتیک به ترتیب متعلق به گروه‌های کرباپنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوئوروکینولون‌ها می‌باشند که مکانیسم های دیگری در ایجاد مقاومت به آنها دخیل هستند. این افزایش مقاومت در ایزوله‌های مولد ESBL می‌تواند بیانگر دخیل بودن آنزیم‌های ESBL در ایجاد مقاومت باشد.

در مطالعه Hujer و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی نمونه‌هایی که از بیمارستانی در آمریکا بر روی سربازان عراقی و افقانستانی انجام شده بود ۴۰ درصد از نمونه‌ها حاوی ژن$bla_{TEM}$ بودند. میزان ایزوله‌های TEM مثبت در این مطالعه پایین‌تر(۱۲/۸ درصد) بود(۲۷).

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط JIN Hui و همکاران در چین انجام شد ، میزان نمونه‌های TEM مثبت در بین ایزوله‌های مقاوم ۸۱/۵ درصد گزارش شد که در مقایسه با مطالعه ما بسیار بالاتر است(۲۸).

بررسی Giuseppe Celenza و همکارانش در آمریکای جنوبی در سال ۲۰۰۶ نشان داد ، میزانTEMمثبت و CTXمثبت به ترتیب ۲۶/۱و ۳۰/۴ درصد بوده است. همچنین در بررسی دیگری که در سال ۲۰۰۶ در چین انجام شد تعداد نمونه‌های TEM مثبت ۲۶/۱ درصد گزارش شد. در حالیکه در مطالعه ما این مقادیر به ترتیب۱۲/۸و۱/۲ درصد است(۲۶،۲۷).

## نتیجه گیری:

با توجه به اینکه اکثریت ایزوله‌های مورد مطالعه مقاوم به بتالاکتام‌ها می‌باشند برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از

این باکتری استفاده از بتالاکتام‌ها توصیه نمی‌شود. حضور ژن‌های $bla_{TEM}$ و $bla_{CTX}$ در این ایزوله‌ها بسیار قابل توجه است. همانند دیگر کشورها، سویه‌های مولد ESBL اسینتوباکتر در ایران نیز در حال گسترش است. ژن‌های مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی قابل انتقال قرار دارند که می‌توانند از یک سویه مقاوم به دیگر سویه‌ها انتقال یابند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌های درمانی منتشر نمایند. لذا، مدیریت صحیح مصرف آنتی بیوتیک‌ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای مراقبت‌های بهداشتی می‌تواند باعث جلوگیری از گسترش مقاومت به دیگر بیماران بستری و یا وسایل بیمارستانی شود. همچنین شناسایی سریع و رد یابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آنها و جلوگیری از گسترش آنها باشد.

تقدیر و تشکر:

از زحمات خانم وجیهه نیک بین و خانم فهیمه شورج که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند تشکر می شود. همچنین تشکر ویژه خود را از زحمات مسئولین و کارکنان آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های شریعتی ، بقیه الله ، امام خمینی ،و مصطفی خمینی تهران اعلام می‌داریم.

## فهرست مراجع:

1.Babay H , Kambal A, Al-Anazy A, Saidu A, Aziz Sh. *Acinetobacter* Blood Stream Infection in a Teaching Hospital - Riyadh,Saudi Arabia. *Kuwait Med J* 2003; **35** (3): 196-2011

2. Smith PW. Seasonal incidence of Acinetobacter infection. *J Infect Dis* 1979;**140**:275-6.

3. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of Acinetobacter infections: *Clin Infect Dis* 1987-1996. 1999;**29**:1133-7.

4.Hsueh P, Teng L, Chen CH , Chen W, Yu Ch, Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2002; **8** (8).:827-831

5. Sinha M , H. Srinivasa & R. Macaden. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. *Indian J Med Res* 2007; **126**: 63-67

6. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K**.** VEB-1 Extended-Spectrum β-Lactamase–producing *Acinetobacter baumannii*, France1. *Emerg Infec Dis*. t 2006; **12** ( 8) P: 1214-1220

7. Schreckenberger PC, Daneshvar MI,Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter,Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella,*and other nonfermentative gramnegative rods. In: Murray PR, Baron EJ,Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds.Manual of clinical microbiology. 9th ed.Washington, DC: ASM Press, 2007; pp:770-802.

8. Carey RB, Banerjee SN, Srinivasan A. Multidrug-resistant Acinetobacter infections, 1995-2004. Presented at the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco,September. 2006;pp: 27–30.

9. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;**43**: 2:49-56.

10. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM**,** Sommers HM. *Diagnostic Microbiology*, 3rd ed, Philadelphia; Lippincott, 1990; pp:90-102 , 473-484.

11. Singh S. Extended-Spectrum beta-Lactamases: An overview, *Diagnostic Laboratory Services*. ,Hawaii ,INC.1999 ;pp:.1-3

12. Bergogne-Berezin E, Fridman H ,Bendinelli M , Acinetobacter biology and pathogenesis, New York , Springer, 2008 ; pp 1,14,120-124

13. Gerner-Smidt P. Acinetobacter: epidemiological and taxonomic aspects. *APMIS* 1994; **102** (Suppl 47) : 1-42.

14. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, . *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;**53**:1063-6.

15. Tong MJ. Septic complications of war wounds. *JAMA*1972; **219**:1044–7.

16. Washington W, Elmer K, Stephen A, William J, Gary P, Paul S *et.al* . Organisms that are nonmotile and oxidase negative , genus: Acinetobacter ,in : *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th ed, illustrated, United States of America ,Lippincott Williams & Wilkins. 2005; pp: 353-359

17. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,15th informational supplement (M100-s15). National Committee For Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2005.

18. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial

susceptibility testing for bacteria that grow aerobically, 2000; M7-A5, ed.NCCLS, Villanova, Pa.

19. Paterson DL, and Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases:a clinical update. *Clin Microbiol Rev* ,2005; **18** (4): 657-86.
20. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards Extended-Spectrum beta-Lactamase detection Methods, *J Clin Microbiology*, 2001; **39**:(8): 2864-2872
21. Yu Y,Yang Q, Xu X, Kong H, Xu G and Zhong B**,** Typing and characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus –baumannii* complex in a Chinese hospital, *J Med Microbiol* 2004; **53**: 653–656
22. Pagani L, Amico E, Migliavacca R, D'Andrea M, Giacobone E, Amicosante G*, et al*. Multiple CTX-Mtype extended-spectrum _-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol*. 2003; **41:**4264–4269.
23. Lee.S, Joong Kim.N, Choi. S, Kim. T, Chung. J, Ryu. W, *et al*. Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: a Case-Control Study, *Antimicrob Agents Chemother*,2004; **48**(1):224-228
24. Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, *et al.* Extended-spectrum -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. J Antimicrob Chemother 1999; **43**: 157–165
25. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R, Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species*, Indian J Med Res* 2007; 126: 63-67

۲۶. سعادتیان فریور آرزو،نوروزی جمیله،امامی . میزان فراوانی اسینتوباکتر در بخش مراقبت‌های ویژه جراحی مجتمع رسول اکرم ،*مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*.جلد چهارم ،شماره چهار- ب، زمستان ۸۴، صص ۳۴۲-۳۴۷

27. Hujer K , Hujer A , Hulten E, Bajaksouzian S , Adams J, Donskey C, *et al*. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center, *Antimicrob Agents Chemother*. 2006, **50**, No. 12, p. 4114–4123
28. JIN Hui, XU Xiao-min, MI Zu-huang, MOU Yi . LIU Pei, Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings**,** *Chinese Medl J* 2009;**122**(3):301-306
29. Celenza . G, Pellegrini. C, Caccamo. M, Segatore. B, Amicosante. G and Perilli. M, Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals *J Antimicrob Chemother,* 2006; **57**: 975–978
30. chen. Ch , Young. T, Huang . Ch,Predictive biomarkers for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with $bla_{TEM-1}$ Amp C –type bla and integrase 1 genotypes, *J Microbiol Immunol Infect*,2006;**39**:372-379

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۱۷-۱۰**

# تشخیص سریع اسپور عامل سیاه زخم به روش مولکولی

شهرام پروین، علی احمدی، فاطمه پورعلی، علی کرمی*

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج).
نویسنده رابط: علی کرمی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) ،
تلفن: ۸۸۰۴۰۰۶۰ Karami@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله :۸۸/۱۰/۱۰

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** *باسیلوس آنتراسیس* باکتری اسپور دار، گرم مثبت، هوازی و عامل بیماری سیاه زخم است. در سال‌های اخیر از این باکتری در حملات بیوتروریستی استفاده شده است. اسپور *باسیلوس آنتراسیس* نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی بسیار مقاوم می‌باشد. برای تشخیص سریع اسپور این باکتری به روش‌های مولکولی، به استخراج ژنوم با شکستن اسپور نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه تشخیص سریع مولکولیDNA *باسیلوس آنتراسیس* به روشMultiplex PCR با شکستن سریع اسپور به روش فیزیکی در زمان بسیار کوتاه و بدون استخراج ژنوم است.

**روش بررسی:** اسپورباکتری غیر بیماریزای سیاه زخم یا سویه استرن (سویه واکسن *باسیلوس آنتراسیس*) توسط سیستم Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, In. ) با استفاده از بید های ۰/۱ میلی متری در ۵۰۰۰ دور در دقیقه شکسته و استخراج شد. تشخیص به روش Multiplex PCR با استفاده از ۳ جفت پرایمر صورت گرفت. PCR سه قطعه DNA با اندازه‌های مورد انتظار را تولید نمود که در ژل آگاروز الکتروفورز آنالیز شد. جهت تعیین حد تشخیص و اختصاصیت از رقت‌های مختلف اسپور به روش CFU/ml و باکتری‌های دیگر همین جنس نیز استفاده گردید.

**یافته‌ها:** اسپورهای *باسیلوس آنتراسیس* در عرض سه دقیقه شکست شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و Multiplex PCR، محصولات به دست آمده شامل سه قطعه (۱۰۸۳ bp، ۳۸۵ bp ، ۱۶۴ bp ) در ژل آگارز ۲ درصد آنالیز شد. با استفاده از آنزیم برش دهنده Hind III محصول (1083bp) تائید گردید. حد تشخیص بر اساس روشCFU/ml، رقت ۱/۵۱۲ از سوسپانسیون با 7680/ml یا ۷ اسپور در میلی لیتر اسپور معین شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization از سرعت لازم برخوردار می‌باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراجDNA نیست. با این روش، ما توانستیم به طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور باکتری باسیلوس آنتراسیس را در نمونه‌ها تشخیص دهیم.

**کلید واژه ها:** تشخیص، *باسیلوس آنتراسیس*، اسپور، Multiplex PCR

**مقدمه:**

*باسیلوس آنتراسیس*، باکتری اسپوردار گرم مثبت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و عامل بیماری سیاه زخم است (۱). ژنوم عامل سیاه زخم از DNA حلقوی به اندازه ۵/۴ میلیون جفت باز تشکیل شده است. دو پلاسمید اساسی در این باکتری وجود دارد که واجد ژن‌های ویرولانس و کپسول است : پلاسمید pXoI به اندازه ۱۸۱kbp واجد ژن‌های pa ، lef ، ef و پلاسمید pXoII به اندازه 96 kbp دارای ژن‌های رمز کننده کپسول (Cap A,B,C) است. مطالعات نشان می‌دهد که به دلیل ویرولانس بسیار بالا و همچنین اسپور بسیار مقاوم به عوامل محیطی و جهش زا این باسیل یکی از همگن‌ترین باکتری‌های شناخته شده از نظر تنوع ژنتیکی است (۴-۲). تفاوت خاص بین عامل سیاه زخم و گونه‌های دیگر باسیلوس‌ها، داشتن کپسول و عدم تحرک می‌باشد. از خصوصیات بیوشیمیایی این باکتری تخمیر بعضی از قندها بدون تولید گاز، داشتن اکثرا اکسیداز، کاتالاز، نیترات، VP مثبت و اوره آز منفی است (۵).

ویژگی‌های منحصر به فرد این باکتری سبب شده است تا آن را مستعد جنگ‌افزار بیولوژیکی نماید. مهم‌ترین این ویژگی‌ها عبارتند از: تولید اسپور بسیارکوچک، قدرت مقاومت بسیار زیاد، قدرت بیماریزائی بالا، قابلیت تولید انبوه و سهولت رهاسازی آن به صورت آئروسل ( ۷-۶ ). عامل بیماری سیاه زخم، اسپوری تولید می‌نماید که نسبت به شرایط مختلف فیزیکی مقاوم است. به این ترتیب توانائی بقای آن در محیط بسیار زیاد است. از این-رو، تقریبا در هر نقطه‌ای از جهان یافت می‌شود(۸). تیمارکردن اسپور با حرارت باعث افزایش هیدروفوبیسیتی نسبی آن می‌گردد(۹). روش‌های تشخیصی *باسیلوس آنتراسیس* به صورت کلاسیک و سنتی شامل کشت، تشخیص ایمونولوژیک شکل کپسول و قابلیت لیز شدن توسط گاما فاژ می‌باشد(۱۰).

روش‌های آزمایشگاهی متداول میکروب‌شناسی برای تشخیص باسیل سیاه زخم بسیار مفید است ولی زمان تشخیص قطعی می‌تواند ۴۸-۲۴ ساعت به طول انجامد(۱۱). در نتیجه از روشی جهت شکست اسپور و استخراج DNA و تشخیص مولکولی در مدت زمان بسیار کمتر(حدود ۳ ساعت) استفاده می‌شود(۱۳،۱۲). روش‌های معمول لیز و شکستن اسپور، مکانیکی و شیمیائی است. با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از محلول‌های شیمیائی در نمونه‌های واجد اسپور، روش‌های فیزیکی ارجح هستند. هدف از این مطالعه تعیین روش تشخیص *باسیلوس آنتراسیس* بر اساس شکستن به روش فیزیکی، استخراج DNA از دیواره‌های سخت اسپور و سپس تشخیص مولکولی ژنوم حاصل به روش Multiplex PCR در زمان کوتاه بود.

## مواد و روش‌ها:

تهیه سویه‌های باکتری‌ها: سویه‌های استاندارد گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC:1365)، *باسیلوس سرئوس*(PTCC:1247) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران وسویه34F2 Stern و غیر بیماریزای *باسیلوس آنتراسیس* از سازمان دامپزشکی کل کشور تهیه شدند.

کشت باکتری: باکتری‌ها در محیط آگار خوندار، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از کلنی‌های رشد کرده در شرایط کاملاً استریل لام جهت رنگ آمیزی گرم تهیه شد(۱۴).

تهیه اسپور: برای به دست آوردن اسپور، سویه باکتری‌ها از محیط کشت LB broth به روی محیط اختصاصی تولید اسپور(Ammoniom salt sugar)(۱۵) کشت و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۱۰ روز گرمخانه گذاری شد. سپس در زیر هود بیولوژیک کلاسII از کلنی‌های رشد کرده لام تهیه و رنگ آمیزی مالاشیت گرین انجام گردید. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت سطح محیط کشت حاوی اسپور به وسیله ۱۰- ۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به‌طور متوالی شستشو شد. سوسپانسیون حاصل به داخل لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری منتقل و سانتریفوژ( مدت۳۰ دقیقه، g ۳۷۹۰ ) شد. سپس مایع روئی به طور کامل به محفظه حاوی فرمالدئید منتقل گردید. به رسوب داخل لوله ml ۵ آب دو بار تقطیر اضافه شد و لوله به مدت ۳ دقیقه داخل دستگاه استیرر هموژن شد. سپس برروی سوسپانسیون، اتانول ۹۸ درجه اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در مرحله بعدی محتویات لوله فالکون سانتریفوژ و مایع روئی دور ریخته شد. رسوب درون لوله با ml ۵ آب مقطر دو بار تقطیر دو بارشستشوگردید.سپس رسوب در حجمml ۳ آب

مقطر دو بار تقطیر حل و سوسپانسیون یکنواخت به دست آمد. جهت از بین بردن باکتری‌های رویشی باقیمانده، سوسپانسیون به بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه منتقل شد(۱۶).

شکست دیواره اسپور و استخراج ژنوم: از دستگاه Mini bead beater-8 جهت شکستن اسپور استفاده شد.

ویال‌های مخصوص دردار حاوی بیدهای شیشه‌ای به اندازه ۱/. m m دراتوکلاو استریل گردید. از سوسپانسیون اسپور در شرایط استریل و با رعایت نکات ایمنی مقدار یک میلی لیتر به ویال حاوی بید اضافه شد. ویال‌های حاوی سوسپانسیون در محفظه‌های مخصوص دستگاه اسپورشکن گذاشته شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۸۰ ثانیه توسط بیدهای اختصاصی شکسته شد. برای اطمینان، از محتویات سوسپانسیون حاصل لام تهیه و رنگ آمیزی اختصاصی اسپور(مالاشیت گرین)انجام گردید.

پرایمرها: پرایمرهای اختصاصی تشخیص عامل مورد نظر ازمقالات موجود استخراج گردید(۱۱). جایگاه پرایمر شماره ۱ برروی پلاسمید PxoI به اندازه bp ۱۰۸۳ که رمزکننده ژن pa می‌باشد. جایگاه پرایمر شماره۲ برروی پلاسمید PxoI به اندازه bp ۳۸۵ که رمزکننده ژن lf می‌باشد. جایگاه پرایمر شماره ۳ برروی کروموزوم به اندازه ۱۶۴bp می باشد.

واکنش **Multiplex PCR**: شرایط بهینه واکنش PCR ذکر شده در مقاله مرجع(۱۱) اعمال شد(جدول‌های شماره ۱و۲). محصول واکنش PCR درژل آگاروز ۲ ٪ الکتروفورز و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن تصویر تهیه گردید.

جدول ۱: مقادیر Master mix جهت **Multiplex PCR** از ژنوم استخراج شده اسپور قبل و بعد از بهینه سازی

| ردیف | مواد | مقداراولیه(**µl**) | غلظت نهائی | مقداراولیه(**µl**) | غلظت نهائی |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | DNA Templete | ۱ | ۱ µl | ۱ | ۱ µl |
| ۲ | Buffer PCR ( 10 x) | ۲/۵ | ۱/۲۵X | ۲/۵ | ۱/۰۵X |
| ۳ | $Mgcl_2$ (50 mM) | ۱/۵ | ۳/۷۵mM | ۱/۵ | ۳/۱۵Mm |
| ۴ | dNTPs mM 10 | ۰/۵ | ۰/۲۵mM | ۰/۵ | ۰/۲۱mM |
| ۵ | Primers forward (۳ جفت ) | ۱ | ۵Pmole | ۰۸ | ۳/۳۶Pmole |
| ۶ | Primers reverse (۳ جفت ) | ۱ | ۵Pmole | ۰۸ | ۳/۳۶Pmole |
| ۷ | Taq DNA Polymerase (5U/µl) | ۰./۵ | ۲/۵ U/µl | ۰./۵ | ۲/۵ U/µl |
| ۸ | D.D.W ( آب مقطر دوبار تقطیر) | ۸ | ۸ µl | ۱۳ | ۱۳ µl |
| ۹ | حجم نهائی | ۲۰ | | ۲۳/۸ µl | |

جدول ۲: نحوه اجرای چرخه‌های PCR

| مرحله | درجه حرارت | زمان |
|---|---|---|
| Denaturation | ۹۵درجه سانتی گراد | ۶۰ ثانیه |
| Denaturation | ۹۵ درجه سانتی گراد | ۳۰ ثانیه |
| Annealing | ۵۲ درجه سانتی گراد | ۳۰ ثانیه |
| Extension | ۷۲ درجه سانتی گراد | ۴۰ ثانیه |
| Final Extention | ۷۲ درجه سانتی گراد | ۱۲۰ثانیه |

تائید محصول: پس از استخراج توالی ژن و یافتن جایگاه پرایمرها در روی آن و بدست آوردن اندازه دقیق قطعه تکثیر شده (1083bp) با استفاده از برنامه نرم‌افزار DNASIS ، جایگاه برش آنزیمی مناسب در روی قطعه، بررسی شد. جهت هضم آنزیمی محصول PCR، طبق دستورالعمل هضم آنزیمی عمل شد(محصول PCR به مقدار۵µl، آنزیم Hind III به مقدار ۱µl، buffer 10Xr به مقدار۲µl، آب دو بارتقطیر شده به مقدار ۱۲µl): ابتدا مخلوط فوق به مدت ۳ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به جهت اثر آنزیم مورد نظر انکوبه شد. پس از این زمان، محصولات حاصل از هضم آنزیمی به مدت ۶۵ دقیقه الکتروفورز شدند. جهت مشاهده باندهای برش خورده DNA از ژل آگاروز۲ ٪ استفاده گردید.

تعیین حساسیت و اختصاصیت: از نمونه‌های اسپور شکسته شده توسط دستگاه اسپور شکن رقت‌های صفر تا ۱/۱۰۲٤ تهیه گردید، سپس رقت‌های تهیه شده برروی محیط آگار خوندار جهت شمارش تعداد اسپورها کشت داده‌شد. همچنین برای ژنوم رقت‌های مذکور واکنشPCR و الکتروفورز محصولات PCR انجام گردید.

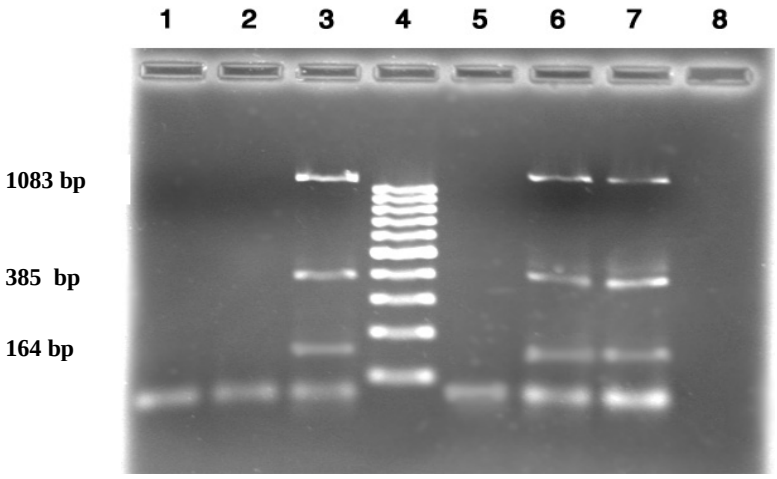
جهت تعیین اختصاصیت آزمایش از باکتری‌های هم جنس *باسیلوس آنتراسیس*(مانند باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و همچنین *E.coli* O157 :H7 و *شیگلادیسانتری* برای استخراج ژنوم و واکنش Multiplex PCR استفاده گردید.

## یافته ها:

نتایج کشت باکتری( رویشی و اسپور): پس از گرمخانه گذاری و رنگ آمیزی گرم از کلنی‌های جنس باسیلوس (باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس)و سویه stern 34f2، باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شد. اسپور حاصل از بهینه‌سازی مرحله اسپورولاسیون و خلوص بالای آن از طریق رنگ آمیزی مالاشیت گرین و بررسی میکروسکوپی نمونه کشت محیط اختصاصی اسپور مورد تائید قرار گرفت.

نتایج الکتروفورز واکنش **Multiplex PCR**: محصول واکنش PCR سوسپانسیون اسپور شکسته شده با رقت ۱/۳۲ سبب ایجاد ۳ باند مجزای مورد انتظار شامل قطعات bp ۱۰۸۳ ، bp ۳۸۵ ، ۱۶۴bp گردید(شکل ۱).

تائید محصول واکنش **Multiplex PCR**: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول bp ۱۰۸۳ توسط آنزیم محدودالاثر برش دهنده Hind III ، دو قطعه با اندازه‌های ۶۹۶bp و ۳۸۶bp حاصل می‌شود که تائیدکننده درستی محصول ایجاد شده توسط پرایمرها است(شکل ۲).




**شکل ۱ : ژل الکتروفورز ۲٪ محصول Multiplex PCR ژنوم اسپور قبل و بعد از شکست**

۱- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

۲- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

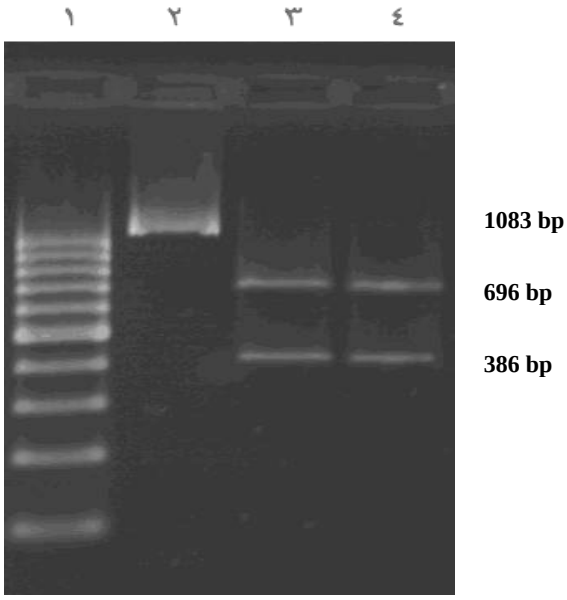
۳-کنترل مثبت(ژنوم استخراج شده سویهStern 34f2)

۴- 100 bp Ladder

۵-کنترل منفی(آب دو بار تقطیر شده)

۶- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

۷- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن




**شکل۲: برش محصول bp ۱۰۸۳ واکنش PCR توسط آنزیم Hind III**

۱- Ladder100 bp(فرمنتاز)

۲- محصول bp ۱۰۸۳ واکنش PCR

۳- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III

۴- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III

حساسیت و اختصاصیت: واکنش PCR از رقت‌های ۱/۳۲ تا ۱/۵۱۲ از نمونه‌های اسپور شکست یافته با دستگاه اسپور شکن نشان داد که حساسیت تشخیص نمونه سوسپانسیون اسپور تا رقت ۱/۵۱۲ که دارای ۷۶۸۰ عدد اسپور در هر میلی‌لیتر است، مورد تائید است. برای بررسی اختصاصیت پرایمرهای انتخابی از ژنوم استخراج شده نمونه‌های باکتری *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *E.coli* O 157 و *شیگلا دیسانتری* استفاده شد. محصولات حاصله بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورزشد. پرایمرهای طراحی شده فقط با *باسیلوس آنتراسیس* محصول تولید کردند.

## بحث:

باتوجه به تولید راحت و سریع اسپور باسیل عامل سیاه زخم و مقاومت بالای آن نسبت به عوامل محیطی، شناسایی باکتری(شکل فعال واسپور) لازم است. همچنین استخراج ژنوم و شکست دیواره باکتری و اسپور ضروری‌تراست. جهت تولید اسپور، از محیط اختصاصی تولید اسپور(Ammoniom salt sugar)(۱۵) استفاده شد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه مقدار یون منگنز و کلسیم در ساختار اسپور نسبت به فرم رویشی زیادتر می‌باشد، پس در نتیجه از این محیط انتخابی جهت تولید تعداد فراوان اسپور استفاده گردید. از طرف دیگر اگر شرایط محیط برای میکروارگانیسم نامساعد گردد، پروتئین‌هائی که در شرایط مساعد غذائی بر روی ژن‌های تولید کننده اسپور در کروموزوم قرار دارند، از کروموزوم برداشته شده و ژن‌های اسپورزائی بارز می‌گردند و باکتری تبدیل به اسپور می‌شود(۵). لذا، طی مدت ۵ الی ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، هر چه به تعداد روزهای انکوباسیون افزوده گردد، شرایط محیطی سخت‌تر می‌شود و فرم رویشی بیشتری به اسپور تبدیل می‌گردد. به این ترتیب، به خلوص بالاتری از اسپوردست می‌یابیم. به دلیل سبک‌تر بودن فرم رویشی نسبت به اسپور،با سانتریفوژ نمودن سوسپانسیون‌های اسپور نسبتی از خلوص و جداسازی اسپورها حاصل شد. در مرحله بعدی افزودن اتانول و آب مقطر دو بار تقطیر شده بر روی سوسپانسیون مخلوط باعث از بین رفتن غشاء فرم‌های رویشی شد. این پدیده باعث نفوذ آب به داخل سیتوپلاسم آنها می‌گردد و با تورم سلولی منجر از بین رفتن نسبی فرم‌های رویشی باکتری می‌شود. در مرحله پایانی و تکمیلی قرار دادن محلول سوسپانسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه، تمام فرم‌های رویشی را از بین برد. جهت اطمینان از زنده بودن اسپورهای حاصله در سوسپانسیون، با کشت مجدد در محیط آگار خوندار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت اسپورها به فرم رویشی تبدیل شدند. این آزمایش، نشان دهنده زنده ماندن اسپورها بعد از تمام مراحل خالص سازی بود.

جهت شکستن دیواره اسپور *باسیلوس آنتراسیس* از روش‌های فیزیکی، شیمیائی و فیریکی-شیمیائی استفاده می‌شود. روش فیزیکی، روش بسیار خوبی برای شکستن اسپورها است. در مطالعات و پژوهش‌های انجام شده در زمینه کاربرد روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم، روش‌های Freeze/thaw – Bead mill – Hot-detergent Treatment homogenization استفاده شده‌اند. ولی نتیجه این مطالعات ارجحیت روش Bead mill homogenization را نسبت به سایرین نشان می‌دهد(۱۳). یکی از شاخصه‌های مهم در تشخیص عوامل باکتریائی تشخیص در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌باشد که روش فیزیکی مورد استفاده در این مطالعه (Bead mill homogenization ) در کوتاه‌ترین زمان ( ۶۰ ثانیه) حاصل گردید. ولی جهت شکست تمام اسپورهای درون سوسپانسیون زمان بیشتری (۱۸۰ ثانیه) جهت استخراج کل ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. در صورتیکه در سایر روش‌های فیزیکی این ویژگی وجود ندارد(۱۳). در روش‌های معمول مورد استفاده جهت استخراج ژنوم به مواد شیمیائی (مانند فنل کلروفرم، جوشاندن، آنزیم ها، بافرها، کیت های تجاری) نیاز است. آنزیم ها و یا دترجنت‌ها می‌توانند به طور بالقوه به آنزیم ها، ارگانل‌های سلولی، ژنوم باکتری آسیب احتمالی برسانند. ولی در روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم که در این مطالعه استفاده شد (Bead mill homogenization ) مواد شیمیائی فوق مصرف نشدند(۱۶). همچنین در مطالعات انجام شده به روش فیزیکی ، در روش‌های Freeze/thaw – Hot- Bead mill homogenization – detergent Treatment در مراحل استخراج از بافر

TENS 2X (Tens 1X is 50 mM Tris HCL[pH 8.0], 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1%[ wt/vol] SDS)

استفاده‌گردید. ولی در روش فیزیکی مطالعه حاضر (Bead mill homogenization ) فقط ازآب دو بار تقطیر استفاده شد.این مورد می‌تواند به ساده بودن روش، کاهش هزینه و زمان کمک کند (۱۳و۱۶).

قبل از شکست فیزیکی اسپور توسط glass bead، در سوسپانسیون مورد نظر DNA خارج سلولی وجود دارد. برای برطرف کردن این عیب و بدست آوردن سوسپانسیون اسپور عاری از آلودگی با DNA، از سوسپانسیون رقت تهیه شد. از این رقت ، که با الکتروفورز محصول Multiplex PCR باند ایجاد نمی‌کند، جهت شکست اسپور استفاده شد.

تشخیص و شناسائی عوامل باکتریائی اسپوردار در زمان بسیار کوتاه‌تر از روش‌های سنتی انجام پذیرفت. برای تبدیل شدن اسپور *باسیلوس آنتراسیس* به سلول‌های رویشی، آن را باید به مدت حداقل۶ ساعت درمحیط آگار خوندار و در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری کرد. این مرحله هم زمان بر می‌باشد. ولی با شکستن اسپور به صورت مستقیم، جهت بدست آوردن ژنوم باکتری، به زمان خیلی کمتری نیاز است(۱۷). به منظور عدم استفاده از مواد شیمیائی در راستای حفظ محیط زیست، و حفظ سلامت کاربران، و جهت اجتناب از هرگونه مواد شیمیائی سمی و مضر، باید به بسط روش‌های سریع و مکانیکی شکست اسپور و روش‌های خالص سازی آن از سوسپانسیون پرداخت. در این روش نسبت به روش‌های سنتی در مجموع هزینه کمتری صرف شد. روش مولکولی Multiplex PCR نسبت به روش‌های سنتی از دقت و حساسیت بالائی برخوردار می‌باشد. دسترسی سریع و آسان به ژنوم اسپور و تشخیص مولکولی مستقیم آن بدون طی‌کردن فرآیند طولانی استخراج ژنوم از مزایای روش ما است. در یکی از پژوهش‌های انجام شده(۱۸) در قسمت استخراج DNA از اسپورهای باکتری، به خالص سازی DNA حاصل از شکست اسپور باکتری اشاره شده است. ولی ما در مطالعه حاضر از دستگاه اسپورشکن استفاده کردیم و نمونه DNA حاصل از شکست اسپور را خالص ننموده و سوسپانسیون حاصل از شکست را جهت تشخیص مولکولی DNA به روش Multiplex PCR بکار بردیم.

## نتیجه گیری:

با توجه به اینکه کنوانسیون منع سلاح‌های میکروبی از باکتری *باسیلوس آنتراسیس* پاتوژن به عنوان یک سلاح میکروبی و خطرناک نام می‌برد، و نیز عدم دسترسی به این باکتری پاتوژن و منع قانونی و اخلاقی استفاده از آن و همچنین عدم وجود پلاسمید PxoII و دارا بودن PxoI، از سویه غیر بیماریزای این باکتری(سویه Stern) به عنوان تولیدکننده اسپور خالص استفاده شد. این سویه رفتاری مشابه با سویه بیماریزای *باسیلوس آنتراسیس* دارد(۲۰-۱۹). نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی، با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization، از سرعت لازم برخوردار می‌باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراج DNA نیست. با این روش، توانستیم به‌طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور باسیلوس آنتراسیس را در نمونه‌ها تشخیص دهیم. به این ترتیب، این مطالعه توانست در ایران موفق به تشخیص سریع اسپور باکتری شود.

## فهرست مراجع:


۱. بروکس اف، بوتل اس، مورس آ. *میکروب شناسی پزشکی جاوتز* ملنیک و آدلبرگز. ترجمه ستوده نیا ع. چاپ سوم، تهران، انتشارات کبیر، ۱۳۸۲، صص، ۲۵۳ تا ۲۵۲.

۲. حاتمی ح. اپیدمیولوژی بیوتروریسم، اولین کنگره ملی بهداشت عمومی و طب پیشگیری، کرمانشاه، ۱۳۷۹، کتاب رایانه‌ای کنگره‌ها، معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، ویرایش ششم، سال ۱۳۸۰، صص، ۶۲۶ تا ۶۲۴.

3. Keim P, Kalif A, Schupp j , Hill K.. Molecular evalution and diversity in *Bacillus anthracis* by AFLP markers. *J Bacteriol .* 1997; **92**: 784- 6.

4. Knisely RF. Selective Medium for *Bacillus Anthracis*. *j Bacterio*1996; **93**: 684-6.

۵. ادیب فر پ. میکروب شناسی پزشکی. چاپ چهارم. قم،انتشارات الهادی، ۱۳۷۵، صص، ۲۸۱ تا ۲۷۷.

6. Pile C James, Malone D jhon, Eitzen M . Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch internal Med*1998; **158**: 429-434.

7. Okinaka R, Cloud K, Hampton O. Sequence, assembly and analysis of pXoI and pXoII. *J Applied Microbiol*1999; **87**:261-62.

8. Hugh Jones M. global anthrax report. *J Appl Microbiol*1999; **87**(2): 189-191.

9. Furukawa S, Naraisawa N, Watanabe T, kawarai T, Myozen K. Formation of spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *J.Food Microbiol*2005; **102**: 107-111.

10. Popovic T, Hoffimaster AR, Ezzell JW, Absire TG. Validation of methods for confirmatory identification of presumptive isolates of *Bacillus anthracis*, *J. AOAC internat l*2001; **88**: 175-177.

۱۱. کرمی ع، رنجبر ر، پورعلی ف، مهرانی ح. تشخیص سریع باسیلوس آنتراسیس به روش PCR، مجله پزشکی کوثر، تهران، پائیز۱۳۸۲، شماره۸(۳) صص ۱۹۷تا ۲۰۴.

12.Philip B, Margaret O, Farzad P, David A . A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis . *Biosensors&Bioelectronics*1999; **14**: 849-852.

13. Cheryl R. K, Kaysie L.B, Dante L.A, Peter C.S, Karen K.H, Paul J.J. Small – Scale DNA Sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environm Microbiol* 1998; **64**: 2463-2472.

۱۴. رجائی م، عطائی ر، قربانی غ، کرمی ع، مهرابی توانا ع. *سیاه زخم*- چاپ دوم، تهران، انتشارات اندیشمند، ۱۳۸۲، صص ۸۶ تا۶۶.

15. Buchanan R. E., Gibbons N. E., manual of determinative bacteriology. Ed. 8, *Baltimore*, Williams & wilkins. 1974; pp: 1689-1690.

16. Warriner k , Waites W.M. Enhanced sporulation *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose *Let Appl Microbiol* 1999; **29**: 97-102.

17. Ellerbrok H, Natterman H, Ozel M, Beutin L, Appel B. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR, *FEMES Microbiol*2002; **214**: 51-59.

18.Tamas T, Jennie C. Hunter C and Terrance L. Development of methods for extracting DNA from bacterial spores. *Environmental remediation technology program*1998; **510**: 1999-2000

19. Sterne M, The use of anthrax vaccines prepared from avirulant (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Veternary Sci. Animal Industry*. 1939: **13**: 307-312.

20. Sterne M, Avirulant anthrax vaccine onderstepoort. *Veternary Sci. Animal Industry* 1946; **21**: 41-43.

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۲۴- ۱۸**

# حساسیت دارویی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نسبت به داروهای رده اول و جایگزین در شهرستان تبریز

مهدی رشدی ملکی[*1]، سید رضا مؤدب[2]

۱) گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، ملکان
۲) دانشکده پیراپزشکی، و مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
نویسنده رابط: مهدی رشدی ملکی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، بلوار شمس تبریزی ، ملکان، آذربایجان شرقی
تلفن : ۰۴۲۲-۸۲۲۰۵۸۴ Me2_roshdi@hotmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۲۰

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** از زمان شروع شیمی درمانی بر علیه بیماری سل، شمار سویه‌های مقاوم به دارو افزایش چشمگیری داشته است. میزان بروز سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB : Multi Drug Resistant tuberculosis) در کشورهای همجوار از جمله آذربایجان بسیار بالا گزارش شده‌است. مراجعه این بیماران به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز باعث افزایش نگرانی مسئولین و اهالی منطقه از خطرِ انتقالِ سلِ مقاوم به دارو شده است. هدف از این مطالعه، تعیین حساسیت دارویی سویه‌های ایزوله شده *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* ( MTB) از بیماران بومیِ مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز نسبت به داروهای ضد سل ردهٔ اول و بعضی از داروهای جایگزین (ردهٔ دوم) بود.

**روش بررسی:** ابتدا ۱۰۳ سویه MTB با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی از نمونه بیماران بومیِ مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز جدا گردید. پس از تهیه سوسپانسیون، بر روی محیط کشت لوانشتاین- جانسون حاوی آنتی بیوتیک‌های ضد سل رده اول و رده دوم کشت داده شد. نتایج به **روش نسبی** (proportional) بررسی شد. از سویه استاندارد H37Rv *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که حساس به تمامی داروهاست، به عنوان شاهد کیفی استفاده شد. داروهای ردهٔ اول شامل ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول، استرپتومایسین و داروهای ردهٔ دوم شامل آمیکاسین، کانامایسین، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین بودند.

**یافته ها:** از مجموع ۱۰۳ سویه، ۱۳ سویه (۱۲/۶ ٪) نسبت به کانامایسین، ۲ سویه (۱/۹ ٪) نسبت به افلوکساسین، ۱ سویه (۱٪) نسبت به آمیکاسین و ۱ سویه (۱٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. از میان داروهای ردهٔ اول، استرپتومایسین به میزان ۷/۸٪ (۸ سویه) و از میان داروهای ردهٔ دوم کانامایسین به میزان ۱۲/۶٪ ( ۱۳ سویه) بیشترین مقاومت دارویی را داشتند. میزان مقاومت MDR-TB ۲/۹٪ (۳ سویه) بود.

**نتیجه گیری:** اکثریت زیادی از سویه‌ها به تمام داروهای ضد سل رده اول حساسیت دارند و میزان MDR-TB اندک است. از میان داروهای ضد سل اصلی و جایگزین، به ترتیب استرپتومایسین و کانامایسین بیشترین مقاومت دارویی را نشان دادند.

**کلید واژه ها:** *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ، داروهای جایگزین، مقاومت دارویی

**مقدمه:**

از میان بیماری‌های عفونی که انسان را مبتلا می‌سازد، بیماری سل همچنان یکی از مهلک ترین آنها باقی مانده است(۱). در حال حاضر بر آورد اپیدمیولوژیست‌ها نشان می‌دهد، حدود یک سوم جمعیت جهان با باسیل سل آلوده‌اند. همچنین سالانه ۳ میلیون نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۱). از زمان شروع شیمی درمانی بر علیه بیماری سل، شمار سویه‌های مقاوم به دارو افزایش چشمگیری داشته است (۲). میزان بروز سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB : Multi Drug Resistant tuberculosis) در کشورهای همجوار از جمله آذربایجان بسیار بالا گزارش شده است (۳). مراجعه این بیماران به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز باعث افزایش نگرانی اهالی منطقه از خطر انتقال سل مقاوم به دارو شده است.

امروزه با گذشت بیش از شصت سال از کشف اولین آنتی‌بیوتیک ضد سل (استرپتومایسین در سال ۱۹۴۳) و دیگر داروهای جدید، بیماری سل هنوز هم یک مشکل جدی بوده و یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا محسوب می‌شود. این امر نگرانی زیادی را برای انسان‌ها فراهم می‌کند. به طوری که در سال ۱۹۹۳، بیماری سل توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO)، یک فوریت جهانی اعلام شد (۴،۱).

در حال حاضر شیوع مقاومت دارویی در باسیل سل، به ویژه به‌صورت مقاومت چند دارویی (MDR-TB)، همچنین بروز سل با مقاومت دارویی بسیار گسترده (XDR-TB: Extensively Drug Resistance)، تهدیدهای جدی برای کنترل و مهار جهانی سل می‌باشند. از طرفی به علت شیوع مقاومت در بیماران مبتلا به ایدز (AIDS)، توجه به بیماری سل و مطالعات وسیع در مورد اپیدمیولوژی مقاومت دارویی سل، توجه خاصی را می‌طلبد (۵،۴).

مقاومت داروئی در مایکوباکتریوم‌ها شامل چند نوع و به قرار ذیل است :

مقاومت اولیه(Primary Resistance): مقاومتی است که بیمار سابقه‌ی مصرف داروی ضد سل را نداشته، بلکه توسط یک سویه مقاوم به دارو آلوده شده است (۶).

مقاومت اکتسابی یا ثانویه (Acquired Resistance): مقاومتی است که در طول درمان اتفاق می افتد. مسبب آن پزشک معالج و یا خود بیمار می‌باشد. پزشک معالج با تجویز نامناسب یا دوز نامناسب دارو و یا اینکه بیمار با مصرف نامرتب داروی تجویز شده یا مصرف کم دارو باعث بروز چنین مقاومتی می‌شوند (۶).

مقاومت چند دارویی (MDR: Multi Drug -Resistance): مقاومتی است که در آن سویه جدا شده ، حداقل به دو داروی اصلی و مهم ضد سل یعنی ایزونیازید و ریفامپین مقاوم باشد(۶).

مقاومت بسیار گسترده (XDR-TB: Extensively Drug -Resistance ):

مقاومتی است که در آن سویه جدا شده مایکوباکتریوم، علاوه برMDR بودن، حداقل به یک فلوروکوئینولون و دست کم به یکی از سه داروی تزریقی آمیکاسین، کانامایسین و کاپرئومایسین مقاوم باشد (۵).

ازعواملی که باعث افزایش مقاومت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به داروها می‌شوند، می‌توان به عدم درمان صحیح ( تجویز نابجای دارو، عدم استفاده از درمان چند دارویی و بکارگیری رژیم تک دارویی، قطع مصرف دارو)، نبود برنامه‌های کنترل بیماری سل در برخی از کشورها، کاهش اثر داروهای ضد سل و بالاخره شیوع بیماری ایدز(AIDS) اشاره کرد(۷).

به‌طور کلی داروهای ضد سل به دو گروه ردهٔ اول و جایگزین (ردهٔ دوم) تقسیم می‌شوند.

از داروهای ردهٔ اول ضد سل می‌توان به ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، پیرازینامید و اتامبوتول اشاره کرد که داروهای اصلی در درمان سل محسوب می‌شوند (۸، ۹).

در مواقعی، رژیم‌های درمانی رایج و متداول (داروهای ضد سل ردهٔ اول) برای درمان بیمارانی که با سویه‌های مقاوم به دارو به‌ویژه مقاوم به چند دارو(MDR-TB) آلوده شده‌اند پاسخگو نیست. لذا برای درمان چنین بیمارانی، سازمان بهداشت جهانی و IUATLD (اتحادیهٔ بین المللی مبارزه با سل و بیماری‌های ریوی : International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) داروهایی را تحت عنوان داروهای جایگزین (ردهٔ دوم) معرفی نموده است (۷). برخی از این داروها که در این مطالعه بررسی شدند، عبارتند از: افلوکساسین، سیپروفلوکساسین آمیکاسین و کانامایسین.

با شیوع ناگهانی سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی، مقاومت دارویی به عنوان یک مشکل جهانی مطرح گردید و بحث‌های جدی درباره تحقیقات و استفاده

گسترده از داروهای رده دوم، حتی رده سوم مطرح شد(۱). یکی از مکانیسم‌هایی که مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) برای فرار از کشته شدن بکار می‌گیرد، ایجاد موتاسیون در ژن‌هایی است که پروتئین‌های هدف را کد می‌کنند(۷). مثلاً علت بروز مقاومت باسیل سل در برابر استرپتومایسین، جهش‌هایی است که در ژن‌های پروتئین $s_{12}$ (rpsl) و 16SrRNA (rrs) رخ می‌دهد و مانع از اتصال استرپتومایسین به زیر واحد کوچک ریبوزوم (30s) می‌شود. همچنین علت بروز مقاومت باسیل سل به ایزونیازید، موتاسیون در ژن‌های katG، inhA و kasA می‌باشد. موتاسیون در ژن katG باعث از دست دادن فعالیت کاتالازی باسیل و موتاسیون در دو ژن دیگر که هر دو در سنتز اسید مایکولیک دخالت دارند، باعث مقاومت در برابر ایزونیازید می‌شوند (۷و۱۰و۱۱). اغلب، پیدایش باسیل‌های مقاوم به دارو در اثر استفاده از درمان تک دارویی می‌باشد. لذا جهت کاهش خطر بروز مقاومت دارویی و همچنین درمان بهتر، از ترکیب چندین دارو استفاده می‌شود. زیرا احتمال بروز مقاومت نسبت به چند دارو به‌طور همزمان بسیار کم است. مقاومت در باسیل سل چندین نوع است. که مهم‌ترین آنها MDR و XDR می‌باشند (۱و۱۰).

با توجه به محدود بودن مطالعات بر روی بیماری سل در ایران، هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت دارویی سویه‌های ایزوله شدهٔ *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از بیماران بومی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل تبریز نسبت به داروهای ضد سل ردهٔ اول و دوم بود.

## مواد و روش ها:

چون هدف از انجام این مطالعه تعیین حساسیت دارویی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTB)بود، لذا با انجام برخی آزمایش‌ها، گونه سویه‌ی جدا شده از نمونه بیماران بومیِ مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز تعیین شد. برای تعیین گونه از آزمایش‌های مختلف از جمله؛ تست نیاسین، تست احیای نیترات، کاتالاز مقاوم به حرارت (۶۸درجه سانتی گراد)استفاده شد. تعداد ۱۰۳ سویهٔ *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایزوله گردید. سپس تأثیر داروهای ضد سل ردهٔ اول و دوم بر روی سویه‌های مورد مطالعه، بررسی شد. تمامی این سویه‌ها بر روی محیط‌های کشت لوانشتاین- جانسون (LJ ) حاوی آنتی بیوتیک و فاقد آنتی بیوتیک (شاهد)کشت داده‌شدند.از سویه استاندارد H37Rv *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که حساس به تمامی داروهاست، به عنوان کنترل کیفی استفاده شد. روشی که برای تعیین حساسیت دارویی سویه‌های جدا شده استفاده شد، روش نسبی (Proportional method) بود. این روش، استاندارد و مرجع است و مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت (WHO ) و CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) می‌باشد. این روش حداقل به ۴-۳ هفته انکوباسیون نیاز دارد (۱و۱۲).

برای این منظور ، ابتدا از سوسپانسیون باکتری رقتی برابر نیم مک فارلند تهیه گردید. بدین ترتیب که مقداری از کلنی باکتری توسط اسپاتول پلاستیکی استریل از محیط کشت اولیه برداشت شده و به داخل لولهٔ مک کارتنی (Mc Carteny ) که حاوی ۳۰-۲۰ عدد پرل شیشه‌ای استریل است، منتقل گردید. سپس در لوله محکم بسته شد و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. توسط پیپت پاستور مقداری آب مقطر استریل به آن اضافه شد و بعد از این که در آن محکم بسته شد، دوباره به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. از سوسپانسیون بدست آمده، نیم مک فارلند تهیه شد و از آن، رقت $10^{-2}$ یا ۰/۰۱ تهیه گردید. برای این کار، مقدار ۰/۱میلی لیتر از نیم مک فارلند به ۹/۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. مقدار ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق شده باکتری با غلظت ۰/۰۱ را به هر یک از محیط‌های کشت LJ حاوی آنتی‌بیوتیک و محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک ( محیط کشت شاهد) تلقیح شد. با توجه به اینکه در هر میلی لیتر از نیم مک فارلند حدود ۱۵۰ میلیون باکتری وجود دارد لذا به هر محیط کشت حدود ۳۰۰ هزار باسیل تلقیح شد). محیط‌ها به مدت ۴۲-۲۸ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱و۱۰و۱۲). با توجه به استانداردها، غلظت نهایی هر یک از داروها در محیط کشت LJ باید به ترتیب زیر می‌بود :

ایزونیازید (۰/۲ µg/ml) ، ریفامپین (۴۰ µg/ml) ، اتامبوتول (۲µg/ml)،استرپتومایسین(۴µg/ml)،سیپروفلوکساسین (۴µg/ml) افلوکساسین(۴ µg/ml)، آمیکاسین(۲۰ µg/ml)، کانامایسین (۲۰ µg/ml) (۷و۱۳و۱۴).

پس از انکوباسیون، تعداد کلنی‌های رشد کرده در محیط شاهد با محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک مقایسه شد. در صورتیکه میزان رشد باکتری (تعداد کلنی‌ها) در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کمتر از یک درصد (۱٪ > ) تعداد کلنی‌ها در محیط کشت بدون نتی‌بیوتیک (محیط کشت شاهد) باشد، سویهٔ فوق حساس محسوب می‌شد. اما چنانچه میزان رشد باکتری مساوی یا بیشتر

از یک درصد (۱٪ ≤ ) کلنی‌ها در محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک باشد، باکتری مقاوم محسوب می‌گردد (۱۷-۱۵).

## یافته ها:

نتایج انجام تست‌های حساسیت دارویی به قرار زیر بود: در مورد مقاومت تک دارویی، از مجموع ۱۰۳ سویهٔ مورد مطالعه تعداد ۲ سویه (۱/۹٪) نسبت به ایزونیازید و ۸ سویه (۷/۸٪) نسبت به استرپتومایسین مقاومت تک دارویی داشتند. مقاومت تک دارویی نسبت به ریفامپین و اتامبوتول تشخیص داده نشد.

از ۱۰۳ سویه، ۳ سویه (۲/۹٪) MDR بودند. از بین آنها، ۲ سویه به تمام داروهای اصلی ضد سل (یعنی ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول و استرپتومایسین) مقاوم بودند و یک سویه هم نسبت به ۳ داروی اصلی یعنی ایزونیازید، ریفامپین و استرپتومایسین مقاوم بود. استرپتومایسین با ۸ سویه (۷/۸٪) بیشترین میزان مقاومت تک دارویی را به خود اختصاص بود.

ریفامپین و اتامبوتول کمترین میزان مقاومت تک دارویی را به خود اختصاص دادند و مقاومتی نسبت به این دو دارو (در حالت تک دارویی) مشاهده نشد. به عبارتی، تمام سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایزوله شده از بیماران نسبت به ریفامپین و اتامبوتول در حالت تک دارویی حساس بودند. تنها ۲ سویه مقاوم، آنهم به‌صورت ترکیبی یعنی یک سویه نسبت به ایزونیازید به همراه اتامبوتول و سویهٔ دیگر نسبت به استرپتومایسین به همراه اتامبوتول مقاوم تشخیص داده شدند.

در مورد مقاومت تک دارویی، از مجموع ۱۰۳ سویه مورد مطالعه، ۱۳ سویه (۱۲/۶٪) نسبت به کانامایسین و یک سویه (۱٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت تک نشان دادند (جدول۱). سویه‌ای که نسبت به آمیکاسین و افلوکساسین مقاومت تک دارویی داشته باشد، تشخیص داده نشد. در بین داروهای جایگزین، کانامایسین بیشترین مقاومت را از خود نشان داد. از ۱۰۳ سویه مورد بررسی، یک سویه (۰/۹ نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت تک دارویی نشان داد. تعداد ۸۸ (۸۵/۴٪) سویه ، نسبت به داروهای ردهٔ اول حساس بودند. حساسیت این ۸۸ سویه نسبت به داروهای جایگزین (ردهٔ دوم) به قرار زیر بود : از ۸۸ سویه مذکور هیچ سویه‌ای به آمیکاسین و افلوکساسین مقاومت تک دارویی نداشت. ۶ سویه (۶/۸٪) به کانامایسین و یک سویه (۱/۱٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت تک دارویی داشتند.

از مجموع ۱۰۳ سویه، ۳ سویه (۲/۹٪) مقاومت چند دارویی داشتند (MDR). از این ۳ سویه، ۲ سویه به کانامایسین مقاوم بود.

جدول ۱ : سویه‌های جدا شده با مقاومت چندگانه (MDR) نسبت به داروهای جایگزین، صرفنظر از حساسیت نسبت به داروهای ردهٔ اول

| نوع مقاومت دارویی | نام داروهای مقاوم | تعداد سویه های مقاوم | درصد |
|---|---|---|---|
| مقاومت تک دارویی (SDR) | KA | ۱۳ | ۱۲/۶ ٪ |
| | AM | صفر | ۰ ٪ |
| | CIP | ۱ | ۰/۹ ٪ |
| | OFX | صفر | ۰ ٪ |
| مقاومت چندگانه | AM, KA, OFX | ۱ | ۱/۹ ٪ |
| | KA, OFX | ۱ | |

KA: Kanamycin, AM: Amikacin, CIP: Ciprofloxacin, OFX: Ofloxacin, SDR: Single Drug Resistant

## بحث:

بیماری سل در اکثریت موارد ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTB) است (۱و۲۴). استفادهٔ غیر اصولی و ناکافی از داروها از جملهٔ مهم‌ترین عواملی هستند که باعث مقاومت به داروهای ضد سل می‌شوند و هر روز بر گستردگی این مقاومت افزوده شود(۷ و ۲۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، اکثریت زیادی از سویه‌ها نسبت به تمام داروهای ضد سل رده اول حساسیت دارند. میزان مقاومت چند دارویی (MDR-TB) کم است. این میزان در مقایسه با برخی از کشورهای همجوار از جمله پاکستان، ازبکستان، ترکمنستان و آذربایجان رقم پایینی است. زیرا در مطالعه‌ای که طی سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۰۲ در پاکستان صورت گرفته میزان MDR، ۲۸ درصد گزارش شده است (۷). یعنی بیش از یک چهارم افراد مسلول در پاکستان مقاومت دارویی از نوع MDR دارند. همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً در مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز انجام گرفته، میزان مقاومت MDR در بین بیماران مراجعه کننده از کشور آذربایجان به این مرکز ۲۷ درصد گزارش شده است. این رقم در کشورهای ازبکستان و ترکمنستان به ترتیب ۱۳ درصد و ۴ درصد اعلام شده است (۱۹،۱۸،۱۱).

در مطالعه حاضر، از میان داروهای ضد سل اصلی، استرپتومایسین و از میان داروهای جایگزین ، کانامایسین بیشترین میزان مقاومت دارویی را از خود نشان دادند. میزان تأثیر داروهای رده اول بر روی سویه‌های MTB به ترتیب عبار تند از : استرپتومایسین < ایزونیازید < اتامبوتول < ریفامپین. یعنی در بین داروهای ضد سل اصلی، ریفامپین بیشترین تأثیر و استرپتومایسین کمترین تأثیر را بر روی سویه‌های MTB دارند. همچنین میزان تأثیر داروهای جایگزین (رده دوم) بر روی سویه‌های MTB به ترتیب عبار تند از : کانامایسین < افلوکساسین < آمیکاسین ≤ سیپروفلوکساسین. یعنی در بین داروهای ضد سل جایگزین (رده دوم)، آمیکاسن و سیپروفلوکساسین بیشترین تأثیر را بر روی سویه‌های MTB دارند. در نتیجه، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین مؤثرترین دارو هستند. به نظر می رسد مقاومت زیاد باسیل سل در برابر کانامایسین، به‌علت استفاده بیش از اندازه آن در درمان عفونت‌هایی مانند عفونت‌های استافیلوکوکی و همچنین درمان عفونت‌های مجاری ادراری باشد(۶).

در مطالعهٔ مشابهی که توسط نامی و همکاران(۲۰) در سال ۱۳۸۵ و در شهر مشهد انجام گرفته، همانند مطالعه ما ، مقاومت تک دارویی به ریفامپین و اتامبوتول، تشخیص داده نشد. میزان تأثیر داروهای رده اول بر روی سویه‌های MTB به ترتیب عبارت بودند از : استرپتومایسین < ایزونیازید ≤ اتامبوتول < ریفامپین. در اینجا نیز ریفامپین مؤثرترین دارو بوده است . این نتایج دقیقاً با یافته‌های ما همخوانی دارد. در مطالعه ایشان، از بین داروهای ضد سل اصلی، استرپتومایسین بیش از سایر داروها مقاومت دارویی داشته است که با یافته‌های ما همخوانی دارد.

Surendra و همکاران (۱۳) میزان مقاومت دارویی در جهان را از سال ۲۰۰۲-۱۹۹۴ میلادی، مشخص کرده‌اند. طبق این مطالعه، میزان مقاومت MDR-TB در ایران بین ۶/۴-۳ درصد گزارش شده که با نتایج مطالعه حاضر (۲/۹ درصد) همخوانی دارد. اصغرزاده و همکاران (۳) هم بر روی سویه‌های MTB جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل در تبریز مطالعه کرده‌اند. از مجموع ۱۲۰ سویه‌ی مورد بررسی، ۹۶/۷درصد نسبت به اتامبوتول حساس بودند و ۳/۳ درصد به آن مقاوم بوده‌اند. همچنین ۱۰ درصد نسبت به ریفامپین، ۱۰/۸۳ درصد نسبت به ایزونیازید و ۲۲/۵ درصد به استرپتومایسین مقاوم بوده‌اند. نتایج این مطالعه که استرپتومایسین مقاوم ترین دارو و اتامبوتول و ریفامپین مؤثرترین دارو بوده‌اند، با یافته‌های مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد.

سازمان جهانی بهداشت طبق گزارشی در مورد مقاومت دارویی در ۳۵ کشور جهان، بالاترین میزان مقاومت را در بین داروهای ضد سل اصلی، نسبت به استرپتومایسین اعلام کرده است (۲۱). همچنین مطالعه‌ای توسط Ozturk و همکاران (۲۲) در ترکیه و بر روی زندانیان انجام گرفت. بیشترین میزان مقاومت دارویی در بین داروهای رده اول، نسبت به استرپتومایسین گزارش شده‌است که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد.

## نتیجه گیری:

میزان مقاومت دارویی، به‌خصوص مقاومت چند دارویی در استان آذربایجان شرقی، نسبت به میانگین کشوری گزارش شده

از طرف سازمان بهداشت جهانی پایین‌تر است.

بیشترین میزان مقاومت دارویی در بین داروهای مطالعه شده مربوط به استرپتومایسین و کانامایسین است.

آمیکاسین و سیپروفلوکساسین دو داروی مؤثر بر روی سویه‌های MTB می‌باشند. در موارد بروز مقاومت دارویی می‌توان از آن‌ها استفاده نمود.

## فهرست مراجع:


1. Rodrigo G, Antonio R, Luiz A. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2006; **101**(7): 697-714.
2. Paramasivan CN, Venkataraman P. Drug resistance in tuberculosis in India. *Indian J Med Res*, 2004; **120**: 376-377.

۳ . اصغرزاده م، نهائی م ر، رفیع ع. شناسایی سویه‌های مقاوم به اتامبوتول *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به روش MAS-PCR و مقایسه آن با روش Proportion. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران*، ۱۳۸۶، دورهٔ ۱۷، شمارهٔ ۵۷، صص ۵۶-۵۰

4. Sharma SK, Mohan A. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. *Indian J Med Res*, 2005**; 121**: 550-567.
5. . Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martín-Casabona N, *etal*.. Extensively drug resistance in tuberculosis (XDR-TB): global survey of supranational reference laboratories for *Mycobacterium tuberculosis* with resistance to second-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005**; 9** : 53-77.

۶. رفیع ع، مؤدب س ر. ۱۳۸۲، اصول مایکوباکتریولوژی، تبریز، انتشارات ستوده،۱۳۸۲، ص ۱۴۱

۷. مؤدب س ر، رفیع ع. حساسیت سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و غیر توبرکلوزی نسبت به آمیکاسین وکانامایسین. مجله علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ۱۳۸۴، ۴، صص ۵۴-۴۷.

8. Saydam C, Cavuosoglu C, Burhanoglu D, Ozkalay N, Badak F, Bilgic A. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Strains to First-Line and Second- Line Anti tuberculosis Drugs in Ege University Hospital. *Turk J Med Sci*, 2001; **31**: 395-400.
9. Sethi S, Sharma S, Sharma SK, Meharwal SK, Jindal SK, Sharma M. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. *Indian J Med Res*, 2004; **120** (5): 468-471.
10. Leung ET, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam TH, Kao RY, *etal*. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in inhA. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(3): 1075-1078.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfalle MA. Medical Microbiology, 4th ed, St. Louis, Mosby 2002; 366-377.
12. Ormerod LP. Multidrug-resistant tuberculosis: Epidemiology prevention and treatment. *Br Med Bull*, 2005; **74** : 17–24.
13. Surendra K, Sharma , Alladi Mohan. Multidrug-Resistant tuberculosis: A menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest*, 2006; **130**:261-272.
14. Sharma SK, Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res*, 2004**; 120** : 354–376.
15. Bjorn P, Seven H. Drug-Resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *Int J Antimicrob Agents*,1999; **13**: 93-97.
16. Poojary A, Nataraj G, Kanade S, Mehta P, Baveja S. Rapid antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* : Its utility in resource poor settings. Indian *J Med Microbiol*, 2006;**24**(4):268-72.
17. Cox HS, Orozco JD, Male R, Ruesch-Gerdes S, Falzon D, Small I *etal*. Multidrug–resistant tuberculosis in central Asia. *Emerg Infect Dis,* 2004; **10**(5): 865-872.
18. Butt T, Ahmad RN, Kazm SY, Rak N. Multidrug- resistant tuberculosis in northern Pakistan. *J pak Med Assoc,* 2004; **54**(9): 469-472.
19. Walwaikar PP, Morye VK, Gawde AS. Ofloxacin in multidrug-resistant tuberculosis . *JIMA*, 2003; **101**(03): 210-212.
20. Namaei M, Sadeghian A, Naderinasab M, Ziaee M. Prevalence of primary drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mashhad, Iran. *Indian J Med Res*, 2006**; 124** : 77-80.
21. WHO. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs -- Worldwide, 2000-2004. *MMWR* 2006; **55**(11): 301-305.
22. Ozturk C, Balbay O, Kaya D, Ceyhan I, Balt I, Sahhin I. The Resistance to Major Antituberculous Drugs of *Mycobacterium*

*tuberculosis* Strains Isolated from the Respiratory system Specimens of Tuberculosis Patients. *Jap J Infect Dis*, 2005**; 58**: 47-49.

23 . WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS, WHO CDS TB, Geneva, 2001.

24. Gupta P, Jadaun GP, Das R, Gupta UD, Srivastava K, Chauhan A, Sharma VD, Chauhan DS, Katoch VM. Simultaneous ethambutol & isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res,* 2006; **123** (2):125-130.

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۳۰- ۲۵**

# ارزیابی نقش موتاسیون ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت نسبت به مترونیدازول در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*

محمد کارگر [*1] ، مریم باقرنژاد[1]، عباس دوستی[2]

۱) گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
۲) گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
نویسنده رابط: محمد کارگر ، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
همراه : ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ microkargar@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۳/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۱۲

**چکیده:**

**زمینه و اهداف:** برای درمان زخم معده ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* ، مترونیدازول یکی از آنتی بیوتیک‌های کلیدی است. هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* به مترونیدازول با روش دیسک دیفیوژن و ارزیابی نقش ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول بود.

**روش بررسی:** این مطالعه مقطعی – توصیفی در سال ۱۳۸۶ بر روی ۲۶۳ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد . *هلیکوباکتر پیلوری* با روش رنگ آمیزی گرم ، اوره آز، کاتالاز ، اکسیداز و PCR تعیین هویت شد. برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. در انتها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ، غیرفعال شدن ژن *rdxA* در اثر موتاسیون در سویه‌های مقاوم و نیمه حساس به مترونیدازول ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ازتست دقیق فیشر استفاده شد.

**یافته ها:** از ۸۴ سویه جدا شده ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳۳ ) و ۷ سویه نیمه حساس (۸/۳۳) شناسایی شد . در دو سویه مقاوم (۴٪) ، حذف ۲۰۰ جفت بازی در ژن *rdxA* مشاهده گردید. با آزمون آماری مشخص شد که بین مقاومت به مترونیدازول و علایم بالینی ($P>0.05$)و همچنین حذف ژن *rdxA* ($P>0.05$)ارتباط معنی دار وجود ندارد .

**نتیجه گیری:** با توجه به فراوانی اندک میزان موتاسیون در ژن *rdxA* ، ارزیابی سایر مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به مترونیدازول به نظر ضروری می‌رسد.

**کلید واژه ها:** *هلیکوباکتر پیلوری* ، مترونیدازول، مقاومت ، ژن *rdxA*

## مقدمه:

درمان عفونت *هلیکوباکترپیلوری* بر اساس رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی است، که ترکیبی از مهارکننده‌های پمپ پروتونی و آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند . مترونیدازول یکی از مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌هایی است که در این رژیم‌ها به کار می‌رود. مهم‌ترین عامل شکست این رژیم‌های درمانی مقاومت دارویی است (۱). مکانیسم‌های زیادی در مورد مقاومت به مترونیدازول وجود دارد که مهم‌ترین آنها شامل پمپ یونی (efflux) ، جهش در ژن NADPH غیر حساس به اکسیژن (*rdxA*) ، فلاوین اکسیدوردوکتاز(*frxA*)، پروتئین‌های شبه فری دوکسین (*fdxA* و *fdxB*) و پیروات اکسیدوردوکتاز (*porA,porB*) است. از بین مکانیسم‌های یاد شده مهم‌ترین مکانیسم گزارش شده، غیرفعال شدن ژن *rdxA* می‌باشد (۲) . به منظور دستیابی به حداکثر میزان حذف عفونت *هلیکوباکترپیلوری* آگاهی از میزان حساسیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده در هر منطقه ضروری است. برای اولین بار Ossenokop و همکارانش در سال۱۹۹۹ در کشور هلند ،غیرفعال شدن ژن *rdxA* را در ایجاد مقاومت به مترونیدازول مورد ارزیابی قرار دادند (۳). Kown در ایالت متحده امریکا (۲۰۰۰) و Kato در ژاپن (۲۰۰۲) هم نشان دادند که جهش در ژن *rdxA* مهم‌ترین عامل ایجاد مقاومت به مترونیدازول است(۴و۵) . مقالات نمایه شده در سایت‌های معتبر (SID و ISI) نشان می‌دهد که مطالعه بر روی تعیین مقاومت هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول در ایران مربوط به روش‌های دیسک دیفیوژن و یا حداقل غلظت بازدارنده (MIC) است . هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری بود.

## مواد و روش ها:

این مطالعه مقطعی- توصیفی در تابستان ۱۳۸۶ بر روی بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد. بیماران به خاطر مشکلات گوارشی مانند درد شکم ، حالت‌های تهوع و غیره به پزشک مراجعه کرده بودند. پس از معاینه، پزشک متخصص انجام اندوسکوپی را جهت درمان ضروری تشخیص داد . قبل از انجام اندوسکوپی مشخصات دموگرافیک بیماران (از قبیل جنس ،سن ، سابقه مصرف دارو و غیره) ثبت گردید. برای انجام اندوسکوپی از دستگاه ویدیواندوسکوپ مدل الیمپوس استفاده شد . از هر بیمار سه نمونه بیوپسی از قسمت آنتروم معده جمع‌آوری شد .یک قطعه بیوپسی به لوله‌های آزمایش اوره‌آز برای انجام تست اوره آز سریع(RUT) منتقل گردید. سپس برای کشت و آزمون PCR یک قطعه از نمونه بیوپسی به ویال‌های جداگانه حاوی فسفات بافر سالین استریل(PBS) اضافه شد . نمونه‌ها در دمای پایین و در کمتر از سه ساعت به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی و بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد . برای کشت نمونه‌ها از محیط بروسلاآگار حاوی ۱۰٪ خون گوسفند واجد وانکومایسین(۶mg/L) ، تری متوپریم (۵mg/L) وآمفوتریسین B (۲mg/L) استفاده شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه گذاری گردید . تعیین هویت مقدماتی کلنی‌ها با آزمون اوره‌آز ،رنگ‌آمیزی گرم ،تست کاتالاز و اکسیداز انجام گردید. از کلنی‌های جدا شده، استخراج DNA با روش boiling انجام شد. به منظور استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی از کیت استخراج DNA ساخت شرکت فرمنتاز (لیتوانی ) استفاده گردید . سپس برای شناسایی وجود ژن *ureC* در نمونه‌های بیوپسی و نیز تایید کلنی‌های جدا شده از آزمون PCR استفاده شد (۶) . روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط : حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه (Hot start)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه(Denaturation) ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه(Annealing)، ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) انجام شد. برای این منظور ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X ،۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) ، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) ، ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱۶/۷میکرولیتر آب مقطر اضافه شد . پس از شناسایی و تایید هویت کلنی‌های *هلیکوباکتر پیلوری*، آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گردید. میزان حساسیت کلنی‌ها به مترونیدازول با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشدها با توجه به دستور شرکت سازنده دیسک(Himedia , India )بررسی شد.

استخراج DNA از باکتری های حساس ،نیمه حساس و مقاوم به مترونیدازول با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد. از پرایمرهای *rdxA1* و *rdxA2* (جدول۱) به منظور ارزیابی میزان مقاومت به ژن *rdxA* استفاده شد . تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی نشان دهنده حذف ۲۰۰ جفت

بازی در ژن *rdxA* و تکثیر قطعه ۸۰۰ جفت بازی نشان دهنده عدم ارتباط ژن *rdxA* با مقاومت به مترونیدازول است (۵ و۶).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ازتست دقیق فیشر استفاده شد.

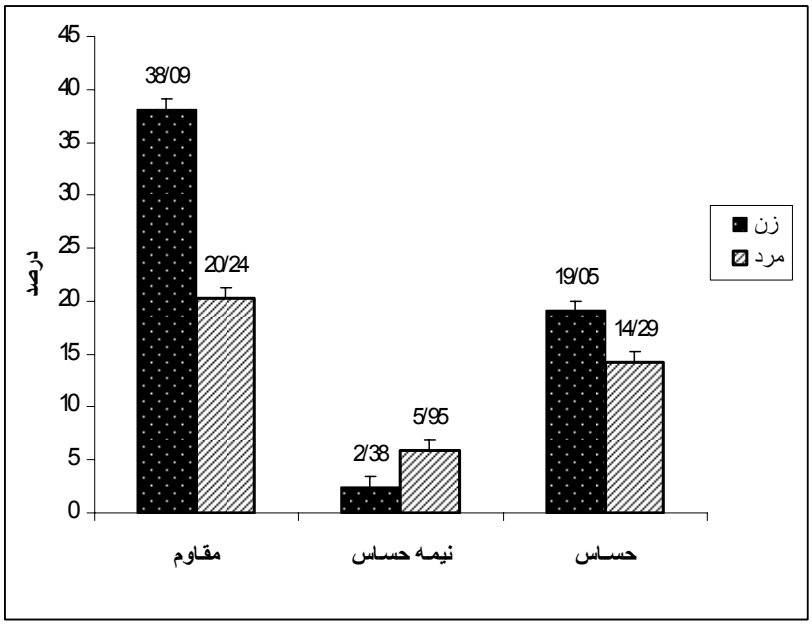
جدول ۱ : پرایمرهای مقاومت به مترونیدازول در *هلیکوباکتر پیلوری*

| ژن | پرایمر | آمپلیکون (bp) |
|---|---|---|
| *ureC* | F : 5' - GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG- 3'<br>R :5' – GCT TAC TTT CTA ACA ACG CGC- 3' | 295 |
| *rdxA* | RdxA1 : 5' – AATTTGAGCATGGGGCAGA-3'<br>RdxA2 : 5' – GAAACGCTTGAAAACACCCCT-3' | 800 |

## یافته‌ها:

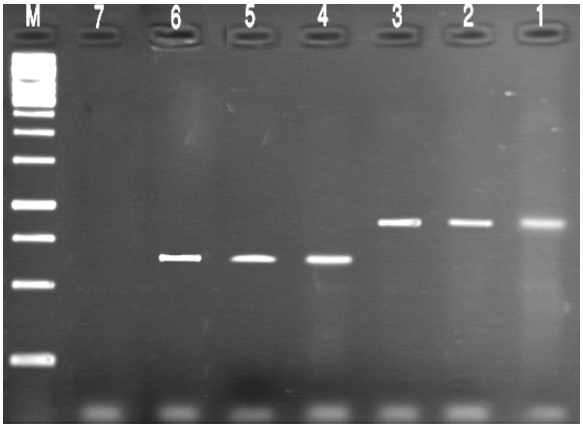
در این مطالعه، ۲۶۳ نفر بررسی شدند. از این تعداد ۱۵۷ زن(۵۹/۷۰٪) ، با میانگین سنی ۴۶/۸۳ سال و ۱۰۶ مرد(۴۰/۳۰٪) با میانگین سنی ۴۷/۲۱ سال بودند . جوان‌ترین بیمار ۱۲ سال و مسن‌ترین ۸۶ سال سن داشت . در گروه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال بیشترین تعداد (۲۴/۷۰٪) و در گروه سنی ۸۰ تا ۹۰ سال کمترین تعداد (۱/۱۴٪) قرار داشتند. آزمون مربع کای نشان داد بین تعداد بیماران و گروه‌های سنی مختلف ارتباط معنادار وجود دارد ( P=0.007). بین گروه‌های سنی و جنسیت بیمار ارتباط معنا دار مشاهده نشد (P=0.324 ). از مجموع نمونه‌های بیوپسی مورد بررسی با روش PCR ،تعداد ۲۲۳ نفر (۸۴/۸ ٪ ) از بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری بودند . از کشت ۲۶۳ نمونه بیوپسی بر روی محیط انتخابی بروسلاآگار ۱۰۰ سویه ( ۳۸٪ ) از طریق تست های اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم شناسایی شد. پس از انجام PCR، ۸۴ سویه (۸۴٪) تایید شدند.

از کل نمونه‌های مثبت شناسایی شده با روش PCR، ۴۹ نمونه (۵۸/۳٪) مربوط به بیماران زن و ۳۵ نمونه (۴۱/۷٪) مربوط به بیماران مرد بود . از ۸۴ سویه شناسایی شده، ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳٪) به مترونیدازول و ۷ سویه نیمه حساس (۸/۳٪) شناسایی گردید(نمودار۱). ۴۹ سویه جدا شده (از ۳۲ زن و ۱۷ مرد) مقاوم به مترونیدازول بودند. با آزمون دقیق فیشر مشخص گردید که بین مقاومت به مترونیدازول و جنس مونث ارتباط معنی داری وجود دارد(P=0.043).




نمودار۱ : درصد مقاومت *هلیکوباکتر پیلوری* به مترونیدازول با روش دیسک دیفیوژن به تفکیک جنسیت بیماران

از مجموع سویه‌های مقاوم به مترونیدازول در دو سویه حذف در ژن *rdxA* شناسایی شد (شکل ۱) . در هیچکدام از سویه‌های نیمه حساس به مترونیدازول حذف ژن *rdxA* مشاهده نشد .




شکل ۱: الکتروفورز محصول **PCR** ژن ***rdxA*** . ستون های ۱ تا ۳ قطعه ۸۰۰ جفت بازی سویه‌های مقاوم (فاقد جهش) ، ستون‌های ۴ و ۵ قطعه ۶۰۰ جفت بازی سویه‌های مقاوم (دارای جهش) ، ستون ۶ کنترل مثبت ، ستون ۷ کنترل منفی و ستون ۸ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی را نشان می دهد

## بحث:

مترونیدازول یک نیتروایمیدازول سنتتیک و یکی از داروهای مهم رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی درمان عفونت های ناشی از *هلیکوباکترپیلوری* است . ظهور سویه‌های مقاوم به مترانیدازول مهم‌ترین مسأله در درمان عفونت *هلیکوباکترپیلوری* است . از نظر بالینی مقاومت به مترونیدازول بسیار مهم است، زیرا موجب کاهش ۵۰ درصدی رژیم‌های درمانی می‌شود. میزان مقاومت به مترونیدازول با توجه به ناحیه جغرافیایی و موقعیت بیماران از ۱۰ تا ۹۰ درصد متفاوت است . در کشورهای در حال توسعه میزان مقاومت بالاست که احتمالا به علت استفاده مکرر از این دارو در درمان عفونت‌های ناشی از پروتوزاها است (۷). میزان مقاومت در مکزیک ، برزیل و سنگاپور به ترتیب ۷۶/۳درصد ، ۵۳ درصد و ۶۲/۷ درصد می باشد(۱۰-۸ ) . میزان مقاومت در کشورهای توسعه یافته کمتر از کشورهای در حال توسعه است . به عنوان مثال میزان مقاومت در آلمان ، ایتالیا و پرتغال به ترتیب ۲۶/۲۰درصد ، ۳۲٪ درصد و ۱۴/۹۰ درصد گزارش شده است (۱۳-۱۱). در ایران مقاومت به مترونیدازول بسیار شایع است. به طوری که ۴۶ تا ۵۱ درصد از سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* به این دارو مقاومند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان مقاومت در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* جدا شده از شهرکرد ( ۵۸/۳۳درصد) ، مطابق با میزان مقاومت در کشورهای در حال توسعه است . محمدی و همکاران با روش دیسک دیفیوژن در سال ۱۳۸۲ در تهران میزان مقاومت را ۶۰ درصد گزارش کردند. همچنین مهاجری و همکاران در کرمانشاه در سال ۱۳۸۲ با روش یاد شده میزان مقاومت به مترونیدازول را ۳۴ درصد گزارش نمودند (۱۴) . میزان مقاومت در مناطق مختلف دنیا با توجه به الگوی استفاده از نیتروایمیدازول‌ها به خصوص مترونیدازول متفاوت است (۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت به مترونیدازول در زنان و مردان یکسان نیست. در این بررسی میزان مقاومت در زنان بیشتر از مردان بود. این مسأله ممکن است به خاطر تجویز نیتروایمیدازول‌ها به ویژه مترونیدازول در درمان عفونت حاصل از باکتری‌های بی هوازی در زنان باشد.

مترونیدازول برای فعال شدن بایستی به شکل متابولیت سمی احیا شود. چندین نیتروردوکتاز توسط *هلیکوباکترپیلوری* بیان می‌شود که یکی از مهم‌ترین نیتروردوکتازهای *هلیکوباکترپیلوری*، NADPH غیرحساس به اکسیژن است که به وسیله ژن *rdxA* رمزدهی می شود (۴) در پروتوزاها و باکتری‌های پاتوژن ، احیای گروه نیترو برای فعال شدن احیایی و به دنبال آن تشکیل حدواسط های هیدروکسیل آمین ضروری است. در واقع به خاطر ایجاد حدواسط‌های احیایی غیر پایدار است که آسیب ، شکست و باز شدن مارپیچ DNA و در نهایت مرگ سلول باکتری ایجاد می‌شود (۱و۴). مهم‌ترین مکانیسم‌های پیشنهاد شده در مورد مقاومت به مترونیدازول، حذف رادیکال‌های سمی اکسیژن توسط کاتالازها یا سوپراکسید دیسموتازهای تغییریافته،

مکانیسم ترمیم کارآمد DNA و فقدان عملکرد ردوکتازهای می‌باشد(۴). Goodwin و همکاران در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد کردند که اغلب مقاومت به مترونیدازول با جهش‌های نقطه‌ای در ژن *rdxA* رمزدهی کننده نیتروردوکتاز غیر حساس به اکسیژن در ارتباط است (۱۵) .

Kown و همکاران نقش سه ژن *rdxA* ، *frxA* و *fdxA* را در ایجاد مقاومت به مترونیدازول در ۵۴۴ سویه بالینی بررسی کردند. آنها نشان دادند که غیرفعال شدن ژن *frxA* مشابه غیرفعال شدن ژن *rdxA* و موجب افزایش MIC ( تا ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر ) و غیر فعال شدن ژن *fdxB* باعث ایجاد مقاومت متوسط در سویه‌های مقاوم به مترونیدازول می‌شود(۱۶). در سال ۲۰۰۱ ، Jeong و همکاران نشان دادند که غیر فعال شدن ژن *frxA* موجب افزایش مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های حامل ژن ناقص *rdxA* می شود. اما اثر کمی بر حساسیت به مترونیدازول در سویه‌های حامل الل سالم و کارآمد *rdxA* می‌شود(۱۷).

علاوه بر این Yang وهمکارانش در سال ۲۰۰۴ ژن ناقص *rdxA* را در سویه های حساس به مترونیدازول شناسایی کردند (۱۸). Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۹ ژن ناقص *frxA* را در سویه‌های حساس *هلیکوباکترپیلوری* شناسایی کردند . نتایج پژوهش این محققین با بررسی‌های Yang و Jeong و همکاران مطابقت داشت (۱۹) . در رابطه با نقش *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول بحث زیادی وجود دارد . Kown و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که جهش ژن *rdxA* در تمام سویه‌های مقاوم جدا شده از شمال امریکا وجود دارد . این در حالی است که در سال ۲۰۰۹ ، Kim و همکاران جهش‌های تغییر کدون را در سویه‌های مقاوم و حساس به مترونیدازول شناسایی کردند . تاثیر جهش بر حساسیت و یا مقاومت به مترونیدازول وابسته به تنوع ژنتیکی طبیعی (natural genetic diversity) سویه است . به همین دلیل حتی اثر جهش‌های مشابه با توجه به تنوع ژنتیکی طبیعی متفاوت خواهد بود. به عنوان مثال، جهش‌های تغییر کدون ممکن است فعالیت پروتئین حاصل را کاهش دهد در حالی که جهش‌های دیگر ممکن است تاثیر چندانی بر عملکرد پروتئین نگذارد. جالب توجه است که Kim و همکاران سویه‌های مقاوم با MIC بالا (بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) را که ژن سالم و کارآمد *rdxA* داشتند، جدا کردند (۱۹). این نتایج با بررسی Marais و همکاران مطابقت داشت . Marais و همکاران بیان کردند که مقاومت به مترونیدازول در *هلیکوباکترپیلوری* ممکن است مستقل از ژن‌های *rdxA* و *frxA* رخ دهد. بنابراین، امکان دارد مکانیسم‌های دیگری مانند *fdxA* (فری دوکسین ) ، *fld* (فلاودوکسین ) و... در مقاومت به مترونیدازول نقش داشته باشد (۲۰) . علاوه بر این Van Amestrang و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که جهش ژن‌های *HPO97* (پروتئین شبه Tol C ) در ایجاد مقاومت به مترونیدازول نقش دارد(۲۱).

در این مطالعه نقش موتاسیون ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت مترونیدازول ارزیابی شد. نتایج نشان دهنده میزان اندک موتاسیون ژن *rdxA* در سویه‌های مورد بررسی می‌باشد. اما با این روش امکان شناسایی سایر مکانیسم‌های یاد شده وجود نداشت. بنابراین، به منظور شناسایی دقیق‌تر موتاسیون حذفی ، تعیین توالی ژن *rdxA* سویه‌های جدا شده و ارزیابی سایر مکانیسم‌های مقاومت به مترونیدتزول در پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد .

## نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که به دلیل میزان بالای مقاومت نسبت به مترونیدازول در بیماران مورد پژوهش ضرورت جایگزینی آن با سایر آنتی بیوتیک‌ها در رژیم‌ها درمانی وجود دارد . با توجه به فراوانی اندک موتاسیون ژن *rdxA* سویه‌های مقاوم به مترونیدازول در شهرکرد، ارزیابی سایر مکانیسم‌های مقاومت به منرونیدازول از طریق کاهش جذب به‌واسطه پمپ‌های یونی ، بیان بیش از حد پروتئین ترمیمی RecA و بررسی جهش در سایر نیتروردوکتازها مانند *frxA* در پژوهش‌های بعدی در منطقه مورد پژوهش و سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد .

## تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل پشتیبانی اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند .

## فهرست مراجع:


1.Canton R ,Argilia C, Rafael L , Baquero F. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* .*Rev Med Microbio* 2001;**12** : 47-61.

2. Collins, J,Ali-Ibrahim A, Smoot DT .Antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* .*Med Clin Am* 2006;**90**:11-25.

3. Ossenkopp YJ, Pot RGJ , Westerloo DJ, Goodwin A, Grauls CMJE, Berg D. Insertion of mini- IS605 and deletion of adjacent sequence in the nitroreductase (*rdxA*) gene causes metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637 .*Antimicrob Agents Chemother*1999;**11**:2657-2662.

4. Kown DH, EL-Zataari F.K , Kato M. , Osato M, Reddy R ,Yamaoka Y. Analysis of *rdxA* and involvement of additional gene encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*frxA*) and ferredoxin-like protein (*fdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;**44** :2133- 2144

5. Kato S,Fujimura S , Udagawa H,Shimizu T, Maisawa S,Ozawa K,Linuma K. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanes Children J *Clinic Microbiol* .2002; **40**:649-653.

6. Smith SI ,Oyedeji KS, Arigbabu AO,Cantet F, Megraud F,Ojo O *et al* . Comprasion of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens.*World J Gastrol* 2004;**10**(13):1958-60.

7. Cavallaro L.G,Egan B,O'Morain C,Di Mario F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection .*Helicobacter* , 2006;11:36-39.

8. Torres J , Camorlinga-Ponce M , Perez Perez G , Garaza A.M , Dehesa M , Gonzale V , *et al* .Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico . J *Clini Microbiol* , 2001 ;**39**: 2677-2680.

9. Prazeres Magalhaes , De Magalhaes D.M , Compos Barbosa D.V , Aguiar Rocha G , Nogueria Mendes , Santos A *et al* . *H.pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil . *Antimicrob Agents Chemother* , 2002;**46**(6):2021-2023.

10. Teo E.K , Fock K.M , Ng .M, Khor J.L , Tan A.L . Mertronidazole – resistant *Helicobacter pylori* in an Urban Asian population . *Gastroentrol Hepatol* , 2002, **15:**494-497 .

11. Wolle K, Leodolter A, Malfertheiner P , Konig W .Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany : stable primary resistance from 1995 to 2000.J *Med Microbiol* 2000 ; **51**:705-709.

12. Toracchio S, Marziol L . Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002 .*Dig Liver Dis* , 2003; 35:541-545.

13. Cuchi Burgos E , Forne Bardera M , Qulntana Riera S , Lite Lite J , Garau Alemany J . Evolution of the sensitivity of 235 strains of the *Helicobacter pylori* from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment . *Enferm Infect Microbiol Clin* .2002;20 :157-160 .

۱۴. مهاجری پ، نوابی ج ، سلیمی ق ، قمری م ، عبـدلی غ . میزان مقاومت آنتی بیوتیکی *هلیکوباکترپیلوری* بدست آمده از بیوپسی معده مراجعین به بیمارستان امام خمینی (ره) کرمانشاه ، *فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی لرستان*، سال ۱۳۸۳، شـماره ۲۱ . صص ۱۸-۹ .

15. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJO, Berg DE , Hoffman PS .Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutation in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28:383-393.

16. Kown DH, Pena J, Osato MS, Fox G , Graham DY , Versalovice J .Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates . *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **46:793**-796.

17. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Akada H, Fox J, Hoffman P, Berger D .Role of *frxA* and *rdxA* nitroreductase of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to Metronidazole . *J Bacteriol* 2001; **183**:5155-5162.

18. Yang Y.J , Wu J.J ,Sheu B.S , Kao A.W , Huang A . The *rdxA* gene plays a more major role than *frxA* gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan .*Helcobacter* , 2004 ;9:400-407 .

19. Kim S.Y , Joo Y M , Lee H S ,Chung I , Yoo Y J , Merrel D.S *etal* . Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA* . *J Antibiotics* , 2009 ; 62:43-50 .

20. Marais A , Mendz G.L , Hazell S.L , Megraud F . Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori* : the genome era . *Microbiol Mol Biol Rev* , 1999;63:642-647.

21. van Amesterdam K , Bart A and van der Ende A.A . *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole . *Antimicrobe Agents Chemother* , 2005**;49**:1477-1482.

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۳۵ - ۳۱**

# بررسی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* نزد مردان نابارور در مقایسه با گروه کنترل

محمد نیاکان[۱*]، باقر مرادی[۱]، شهرام راغب[۲]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه شاهد
۲) پزشک عمومی
نویسنده رابط : محمد نیاکان ، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه شاهد
تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ همراه: ۰۹۱۲ ۱۰۱۴۰۶۰ niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۱/۲۴

**چکیده:**

**زمینه و اهداف:** ناباروری و مشکلات ناشی از آن برای هر زوجی می‌تواند مسئله ساز باشد. میکروارگانیسم‌ها و به‌ویژه *اوره‌آپلاسما اوره آلیتیکوم* (*Ureaplasma urealyticum*)از عوامل ناباروری هستند. اما، ارتباط این ارگانیسم با ناباوری کاملاً مشخص نشده است. برای اثبات نقش باکتری مذکور این مطالعه با هدف تعیین *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* نزد مردان نابارور در مقایسه با گروه کنترل انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه از نوع مورد- شاهدی (Case-control) بود که روی ۴۰ نفر از مردان نابارور با مایع منی( Semen) غیرطبیعی انجام شد. این افراد به کلینیک ناباروری پژوهشکده رویان مراجعه می‌کردند. ۴۰نفر از مردان سالم نیز به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. از هر دو گروه ضمن تکمیل پرسشنامه، نمونه Semenاخذ شد و به محیط ترانسپورت (PPLO broth ) حاوی اوره، آنتی بیوتیک، مواد افزودنی و با pH=5/5 انتقال داده شد. برای کشت نمونه‌ها نیز از محیط کشت PPLO agar و مواد مورد نیاز استفاده شد. کلنی‌های ایجاد شده با روش Dienes رنگ‌آمیزی و مطالعه شدند. اطلاعات بدست آمده توسط روش‌های آماری Chi-square ، Man-Whitney و T-test و در نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** میانگین سن افراد گروه مورد ۳۱/۸۷ سال و گروه شاهد ۳۱/۴۵ سال بود. میزان جداسازی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۱۱ نفر (۲۷/۵ درصد) و۴ نفر (۱۰ درصد) بود. نتایج بیانگر ارتباط معنی‌دار($P<0.045$) بین ناباروری و ابتلا به عفونت با *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* بود.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها ارتباط معنی‌دار بین ناباروری و عفونت با *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* را در افراد گروه مورد نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد.

**کلید واژه ها:** ناباروری مردان،*اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، کشت

## مقدمه:

ناباروری یکی از معضلات برخی از خانواده‌ها است و تقریباً از هر ۵ زوج، یک زوج نابارور می‌شوند. تقریبا علت نیمی از موارد ناباروری مربوط به عوامل مردانه است. بیماری‌های عفونی ناحیه تناسلی به خصوص مایکوپلاسما (Mycoplasma) و به‌طور مشخص *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* (*Ureaplasma urealyticum*)در بروز آن نقش دارند(۱). بعضی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک نیز در مردان با عفونت مایع منی (باکتریوسپرمی) ارتباط دارد. عفونت می‌تواند به‌طور مستقیم باعث؛ کاهش غیرطبیعی تعداد اسپرم در مایع منی شود، کاهش تحرک و تغییرات مرفولوژیکی در اسپرم شود، و در نتیجه قدرت باروری را کاهش دهد(۲).

اوره‌آپلاسما با تولید نورآمینیداز از مرحله لانه گزینی بلاستوسیت ممانعت می‌کند، و موجب مسمومیت تخمک نیز می‌گردد. علاوه بر آن، با تغییر PH ناحیه واژن موجب؛ سقط جنین ، یا باعث کاهش تعداد و کارایی اسپرم، و اختلال خصوصیات فیزیولوژیک مایع واژن و نفوذپذیری اسپرم می‌شود(۳).

ناباروری به دو صورت اولیه و ثانویه بروز می‌کند (۴و۵). در زمینه بیولوژی، ژنتیک و فیزیولوژی، درمان نیز با موفقیت بیشتری صورت می‌پذیرد(۶).اگر چه با وجود این پیشرفت‌ها وقوع ناباروری هنوز چندان کاهش نیافته است(۷). ناباروری در میان سیاهان و زوج‌های کم سوادنیز شایع‌تر است(۸). برای جلوگیری از این بیماری باید زمان مطلوب حامله شدن رعایت و از عواملی که در کاهش حاملگی نقش دارند، مانند سیگار کشیدن در سنین پائین، پرهیزشود(۹و۱۰). از علل شایع دیگر، مشکلات در نزد مردان است که مربوط به نقص در دستگاه تناسلی یا اختلالات عملکردی اسپرم‌ها می‌باشد(۱۱). ناباروری‌های بدون توجیه، اشکالی از بیماری هستند که در آن نتایج بررسی‌های کلینیکی و پاراکلینیکی طبیعی به‌نظر می‌رسد (۱۲).

U.urealyticum از عوامل ناباروری محسوب می‌شود. اوره-آپلاسما با تولید $O_2$ و $H_2O_2$ موجب آسیب غشاء سلولی می‌شود و با آزاد کردن آنزیم اوره‌آز باعث تولید آمونیاک و نابودی اسپرم‌ها می‌شود(۱۳و۱۴). خوشبختانه، اوره‌آپلاسما به درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب پاسخ می‌دهد(۱۵). اما، ارتباط این ارگانیسم با ناباوری کاملاً مشخص نشده است. برای اثبات نقش U. urealyticum در ناباروری مردان این مطالعه با هدف تعیین اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم نزد مردان نابارور در مقایسه با گروه کنترل انجام شد.

## مواد و روش ها:

این مطالعه از نوع مورد – شاهدی (Case-control) بود. برای انجام آن ۴۰ نفر از مردان نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروری پژوهشکده رویان شهر تهران که علت مشخصی (فیزیولوژیک، هورمونال و آناتومیکی) برای ناباروری نداشتند، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند. ۴۰ نفر از مردان سالم مراجعه کننده به همان مرکز، که از نظر عوامل مردانه بررسی شده بودند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.افرادی که در یکماه اخیر آنتی‌بیوتیک مصرف کرده بودند از این مطالعه کنار گذاشته شدند.

ضمن تکمیل پرسشنامه، نمونه مایع منی جمع آوری شد. با بررسی و تشخیص مایع منی غیرطبیعی، نتایج گزارش شد. تشخیص مایع منی غیرطبیعی برابر دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO ) انجام شد. عدم مطابقت ۵ معیار از ۸ معیار اعلام شده در جدول ۱ ، حاکی از غیرطبیعی بودن نمونه دارد(۱۶و۱۷).

جدول۱: آنالیزمایع منی وحداقل مقادیراسپرم طبیعی

| | |
|---|---|
| حجم انزال | ۵/۵ الی ۱/۵ میلی لیتر |
| تعداد اسپرم | ۲۰×۱۰۶ اسپرم در میلی لیتر |
| حرکت | >٪۵۰ |
| کیفیت حرکت | ۲( بر اساس مقیاس ۴-۱ ) |
| مورفولوژی | ٪۳۰< اشکال طبیعی |
| PH | ۷/۲- ۷/۸ |
| تعداد لکوسیت ها | ≤۱ |
| زمان مایع شدن | ۲۰-۱۵ دقیقه |

نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط PPLO broth (HIMEDIA Inc.) به آزمایشگاه ارسال شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط کشت اختصاصی PPLO agar base (Oxoid, Inc.) با فیلتر غشایی (Micron, Millipore ۰،۲۲) فیلتراسیون گردید.این محیط کشت با ترکیبات عصاره مخمر به میزان ۲۵ ٪، اوره ۱۰ ٪. سرم نرمال اسب به میزان ۱۰ ٪ و DNA ۰/۲ درصد، پنی‌سیلین به میزان ۵۰۰-۲۵۰ واحد در هر میلی‌لیتر غنی شده بود (۱۸). پس از رشد باکتری‌ها و رنگ‌آمیزی اختصاصی (روش Dienes ) نمونه ها زیرمیکروسکوپ بررسی شدند(۱۹و۲۰).

اطلاعات جمع‌آوری ودر فرم‌های اطلاعاتی کدگذاری شد. برای پردازش اطلاعات از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از روش‌های آماری Chi-square ، Man-Whitney و T-test استفاده شد.

## یافته ها:

جمعیت مورد مطالعه در هر دو گروه مورد و شاهد به دو گروه سنی زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال تقسیم شدند. تعداد گروه سنی بالای ۳۰ سال در هر دو گروه مورد و شاهد نسبت به گروه سنی زیر ۳۰ سال بیشتر بود.

میانگین سن ازدواج در افراد گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۳/۸۵ ± ۲۴/۸۳ و ۵/۰۲ ±۲۵/۹۳ سال بود. از ۱۱ نفر مرد نابارور که آلودگی با *U. urealyticum* داشتند، در گروه مورد ۸ نفر زیر ۲۵ سالگی و ۳ نفر بالای ۲۵ سالگی ازدواج کرده بودند . میانگین مدت ناروری در گروه مورد ۴/۰۰ ±۵/۸۳ سال بود. در این مطالعه مدت ناباروری به دو دسته کمتر از ۵ سال و بیشتر از ۵ سال تقسیم شد. همچنین ارتباط مصرف سیگار و حضور *U. urealyticum* نزد مردان نابارور بررسی شد. جهت تعیین ارتباط از آزمون Man-Whitney استفاده شد که ارتباط معنی‌داری بین متغیرهای مذکور بدست نیامد ((P>0.05).

توزیع فراوانی آلودگی با *اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم* در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان آلودگی با این باکتری در گروه مورد ۱۱ نفر (۲۷/۵٪) و در گروه شاهد ۴ نفر (۱۰٪) بوده است. در بررسی ارتباط بین ابتلا به عفونت و ناباروری در افراد مورد مطالعه از آزمون کای دو (Chi-square) استفاده شد و بین دو متغیر ارتباط معنی‌دار مشاهده گردید(P<0.045 ).

جدول۲: توزیع فراوانی آلودگی با *اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم* نزد افراد مورد مطالعه

| افراد مورد مطالعه | گروه مورد | | گروه گنترل | | جمع |
|---|---|---|---|---|---|
| اوره اپلاسمااوره آلیتیکوم | تعداد | درصد | تعداد | درصد | |
| دارد | ۱۱ | ۲۷/۵ | ۴ | ۱۰ | ۱۵ |
| ندارد | ۲۹ | ۷۲/۵ | ۳۶ | ۹۰ | ۶۵ |
| جمع | ۴۰ | ۱۰۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۸۰ |

## بحث:

نقش *اوره‌آ پلاسمااوره‌آلیتیکوم* در بروز ناباروری در چند سال اخیر مطرح شده‌است. اما این ارتباط تا کنون به‌خوبی مشخص نشده است(۱). با انجام این مطالعه میزان آلودگی به *اوره‌آ پلاسما اوره آلیتیکوم* نزد مردان نابارور، که علت مشخصی (فیزیولوژیک، هورمونال و آناتومیکی) برای ناباروری نداشتند، با گروه شاهد مقایسه شد. نتایج نشان دهنده وجود رابطهٔ معنی‌دار در ناباروری مردان و آلودگی با *اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم* است.

در مطالعه Rodriguez و همکاران، میزان *اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم* جداشده درگروه مورد ارتباط معنی‌داری را با ناباروری مردان نشان می‌دهد (۱۶). اما، نسبت به مطالعه ما درصد پائین‌تری (۲۳/۵ درصد) را گزارش نموده‌اند. در مطالعه Sanocka و همکاران ، میزان *اوره آ پلاسمااوره‌آلیتیکوم* جدا شده ۲۴/۸ درصد اعلام شده است(۱).

حسینی و همکاران در شهر تهران، فراوانی این باکتری در زنان گروه‌های مورد (۳۰ درصد) و شاهد (۱۵ درصد) را گزارش

می‌کنند، که البته ارتباط معنی‌دار هم نداشتند(۷). درمطالعه ما حداقل سن در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۲۲ و ۲۳ سال می‌باشد و حداکثر سن هم به ترتیب ۴۵ و ۵۵ سال است. بیشترین فراوانی در گروه مورد و شاهد ۳۴-۳۰ سال و کمترین فراوانی نسبی در هر دو گروه مورد و شاهد کمتر از ۲۰ سال می‌باشد.

از مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده چنین برمی‌آید که آلودگی هم در افراد سالم و هم در افراد نابارور وجود دارد. اما، در مقام مقایسه این میزان در افراد مبتلا به ناباروری بیشتر است. آلودگی در مردان باعث کاهش تعداد، کارآیی اسپرم و اختلال در نفوذپذیری آن می‌شود. همچنین این آلودگی می‌تواند از طریق اسپرم به همسر نیز منتقل شود(۱۰). مواردی مانند پایبندی به مسائل اخلاقی، و کم بودن شرکای جنسی متعدد در جامعه ما نیز از جمله عواملی است که می‌تواند باعث کاهش آلودگی با *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* نسبت به سایر مطالعات باشد.

## نتیجه گیری:

با توجه به یافته‌های فوق مبنی بر حضور چشمگیر *اوره‌آ پلاسما اورآلیتیکوم* نزد افراد مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد می‌توان چنین نتیجه گرفت که این باکتری نزد افراد نا بارور مسئله ساز می‌باشد.اصلاح روند بروز آلودگی وتشخیص و درمان در زمان مناسب می‌تواند مانع بروز بیماری عقیمی و عواقب مهم آن شود. توجه به روش‌های کشت و تشخیص افتراقی این باکتری هنوز از جایگاه خوبی برخوردار است.

## فهرست مراجع:


1. Sanocka M D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* 2005**; 67**: 51-6
2. Khalili MB, Sharifi Mk. The effect of bacterial infection on the quality of human's spermatozoa. *Iranian J Pub Health* 2001; **25**:62-10
3. Je O, Klein M. **M**coplasma infectious. [editorial]. *Man clin microbial*. 1986; **12**(4):443-460

۴. کیستنر. جی رایان اس برکووتیز، ال باربیری. *اصول بیماری‌های زنان*, ترجمه سینا ش، رحیم زاده پ، پور صمیمی پ، چاپ اول، تهران، نشرسماط، ۱۳۸۴، صص ۴۴۴-۴۳۵.

۵. برک جاناتان اس، هیلاردپائولا، آدایشی الی. *بیماری‌های زنان نواک* . ترجمه امیرخانی ژ. تهران، انتشارات حیان، ۱۳۸۶، صص ۴۶۵-۴۵۷

۶ . کی، پانگ، ربار، سولز. *ارزیابی و درمان ناباروری*. ترجمه کریم زاده م . چاپ اول، انتشارات یزد، ۱۳۷۵، صص ۸-۳

۷. حسینی س م، نیاکان م, *بررسی میزان فراوانی اوراپلاسما اورالیتیکوم در زنان نابارور و برنامه IVF در مقایسه با گروه کنترل*، پایان نامه پزشکی عمومی، تهران، دانشکده پزشکی، شماره پ/۱۲۸ دانشگاه شاهد، ۱۳۸۲.

8. Gray RH. Epidemiology of infertility. *Am J obstet Gynecol* 1990; **2**:154.

۹. اسپیروف لئون. *اندوکرینولوژی بالینی زنان و نازایی اسپیروف*. ترجمه ذکایی ه . چاپ اول، تهران، انتشارات تیمورزاده، ۱۳۷۹،صفحات ۸۷۹-۸۶۴

10. Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *fertile sterile* 1986**; 46**:545

۱۱. جعفری س ح ، *بررسی ناباروری مردان تشخیص و درمان*. تهران: انتشارات حیان,۱۳۸۲ صفحات ۳۷۹-۳۷۴

12. Crosignani PG, Unexplained infertility. [editorial] *Hum Repord* .1993**(8)**99-105
13. Kathleen A, Stellrecht Amy M. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas, *J Clin Microbiol*. 2004 (42):1528-1533
14. Mariais NF, Wessel S. *Chlamydia trachomatis* and *mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infections in women prevalence, risk and management.*J Reprot Med*.1991; **36**(3):161-4.

15. Gump DW, Gibson M, Ashikaga T. lack of association between genital Mycoplasma and infertility, *Engle J Med* .1990???;937-914
16. Rodriguez R,Gonzales GF, Kortebani G , Genital infection and infertility, *Reproductive Tract Infections*, 2001, **19**(6): 261-267
17. WHO, Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical mucus interaction Press concern, 1992; PP:1-30
18. Agata B, Peter F, Jens F, Hans J K, Svend B , Gunna Ch . Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis in vitro* organ culture study, *Human Reproduction* .2007, **22**(4):968-979
19. Robin A. J. Nicholas, Yi-C L , Konrad S, Helmut H, Katie. Strains of the *Mycoplasma* ovine/caprine serogroup 11 is reclassified as *Mycoplasma bovigenitalium*, *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **(58**) 308-312
20. Ross J D C, Jensen J S, *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection; implication for screening testing , and treatment, *Sext Transmit Infect* 2006 **(82**):269-271

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۴۲-۳۶**

# ارزیابی کیفیت میکروبی کره‌های عرضه شده در تهران در سال ۱۳۸۶

فرشته تفنگ سازان [۱*]، مرتضی خمیری[۱]، گیتی کریم[۲]، سعید حسنی[۳]، سعیده سیف هاشمی[۴]

۱) گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲)گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
۳) گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴) دانشکده صنعت غذای تهران، دانشگاه جامع علمی کاربردی تهران
نویسنده رابط: فرشته تفنگ سازان، گروه علوم و صنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
همراه:۰۹۱۲۱۴۸۴۹۵۶ fereshteh_eng@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله :۸۸/۲/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۱/۲۱

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** آلودگی کره به میکروارگانیسم‌ها در خارج از محدوده استاندارد، همانند دیگر موادغذایی، خطر بالقوه برای سلامتی انسان محسوب می شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی کیفیت میکروبی کره‌های عرضه شده در تهران در سال ۱۳۸۶ بود.

**روش بررسی:** طی ۵ ماه، ۴۸ نمونه قالب کره بسته بندی شده به‌طور تصادفی از مناطق مختلف شمال، مرکز و جنوب شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نظر وجود و میزان کلی‌فرم‌ها ، (*S.aureus*) *Staphylococus aureus*، سرماگراها و کپک مطابق طبق آزمون‌های مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مورد آزمایش قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۴۸ نمونه جمع‌آوری شده ۳۱ نمونه (۶۴/۵۸٪) از نظر تعداد کلی‌فرم‌ها خارج از محدوده تعریف شده استاندارد بود. تعداد نمونه‌های آلوده در مناطق شمال، مرکز و جنوب تهران به ترتیب ۹ (۲۹٪)، ۱۱ (۳۵،۵٪) و ۱۱ (۳۵،۵٪) بود. نتایج انجام آزمون‌های تأییدی و شناخت کلی‌فرم مدفوعی نشان داد که ۸ نمونه (۱۶/۶۶٪) به *E.coli* ۵ نمونه (۱۶/۱۲٪)به Citrobacter و ۱۸ نمونه (۵۸/۰۶٪)به Enterobacter آلوده بود. *Staphylococus aureus* در هیچ کدام از نمونه‌هاجدا نشد. تعداد سرماگراهای شمارش شده در هیچ کدام از نمونه‌ها خارج از دامنه تعریف شده استاندارد نبود. آلودگی به کپک در ۳ نمونه (۶/۲۵٪) به ترتیب ۱ نمونه در مرکز و ۲ نمونه در جنوب بازار تهران یافت شد.

**نتیجه گیری:** درصد قابل توجهی از نمونه‌ها واجد باکتری‌های کلی فرمی هستند که قطعاً غیرقابل مصرف می‌باشند.

**کلید واژه ها:** کره، تهران، آلوگی، میکروارگانیسم‌ها، استاندارد

**مقدمه:**

شیر و فرآورده‌های لبنی یکی از مهم‌ترین گروه موادغذایی مصرفی روزانه هر فرد محسوب می‌شوند. کره یکی از قدیمی‌ترین محصول لبنی شناخته شده در دنیاست و نقش مهمی در تغذیه بشر دارد (۱). از آنجاییکه کره یک محصول لبنی حاصل از خامه یا شیر می‌باشد، کیفیت کره تولید شده تا حد زیادی وابسته به کیفیت شیر استفاده شده می‌باشد. قابلیت نگهداری کره هم تا حد زیادی به کیفیت باکتریولوژیکی آن بستگی دارد که خود تحت تأثیر شرایط بهداشتی فرآیند تولید و همچنین نگهداری است (۴-۲).

فساد کره اغلب بر اثر فعالیت میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌گردد که؛ قادر به رشد در حرارت‌های پایین هستند، یا پس از ذوب قادر به فعالیت می‌باشند، با تولید لیپاز و عمل لیپولیز و پروتئولیز، باعث طعم بد و تغییر رنگ کره می‌گردند (۵).

در زمینه ویژگی‌های میکروبی شیر و فرآورده‌های آن از جمله کره تحقیقات زیادی صورت گرفته است. هالیدی و همکاران(۲۰۰۳)، گزارش نمودند که *E. coli*، Salmonella و *Listeria monocytogenes* می‌توانند در کره‌های نمک‌دار حاصل از خامه با pH=۶ در حال نگهداری در شرایط با رطوبت ۸۵٪ و دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد رشد کنند. همچنین نشان دادند که میزان بقای *E.coli* در فرآورده‌های پرچربی با pH برابر با ۳/۸ تا ۵/۵ و نمک ۱/۵تا ۵٪ و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، نسبت به سایر فرآورده‌ها بیشتر است(۶). تقوایی عربی(۱۳۸۴)، وضعیت بهداشتی کره‌های نیمه صنعتی و سنتی عرضه شده به بازار تهران در شرایط انجماد رابررسی نموده است. او گزارش نمود که از ۵۰ نمونه کره سنتی مورد آزمایش به ترتیب ۶٪ (سه نمونه) به *E. coli* ، ۴۸٪ (۲۴ نمونه) به کلی‌فرم، ۹۶٪ (۴۸ نمونه) به کپک و ۱۰۰٪ (همه نمونه‌ها) به میکروارگانیسم‌های سرماگرا آلوده بودند(۷).

بنابراین، شناسایی میکروارگانیسم‌های کره به عنوان ماده غذایی فرآیند شده، و تعیین میزان آلودگی میکروبی آن در بسیاری از شرایط (مانند نگهداری و فساد) ضرورت دارد. این ضرورت به منظور تولید غذاهای سالم، آموزش و توصیه‌های بهداشتی اکید در نگهداری سالم و بهداشتی در منازل و رستوران‌ها کاملا محسوس است. لذا، این مطالعه با هدف ارزیابی آلودگی میکروبی کره‌های عرضه شده به بازار مصرف تهران در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت.

## مواد و روش ها:

**۱- انتخاب و جمع آوری قالب‌های مختلف کره:**

این بررسی طی ۵ ماه (ماه‌های خرداد تا مهر) در سال ۱۳۸۶ انجام شد. نمونه قالب‌های کره عرضه شده در مناطق مختلف شمال، مرکز و جنوب بازار مصرف در تهران به تعداد و فواصل زمانی مساوی از هر ۳ منطقه جمع آوری شدند.

نمونه‌ها با رعایت اصول نمونه‌برداری (تحت شرایط استریل، در مجاورت یخ خشک گرانولی داخل فلاسک‌های یونولیتی مخصوص نمونه برداری، بلافاصله بدون اینکه از حالت انجماد خارج شوند در زمان حداکثر ۳ ساعت) جمع‌آوری و به محل آزمایشگاه منتقل شد.

**۲- آماده‌سازی نمونه:**

نمونه‌ها تحت شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط دمایی اتاق نگهداری شده تا کمی نرم شوند. سپس ۱۰ گرم کره از تمامی بخش‌های مختلف سطح، مرکز و ته قالب کره توزین شد. نمونه‌ها در حمام آب ۴۵ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. ۹۰ میلی‌لیتر محلول پپتون استریل با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه شد. پس از به‌هم زدن کامل از فاز آبی آن برای کشت‌های زیر برداشته شد (۸).

**۳- شمارش کلی‌فرم‌ها به روش شمارش پرگنه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد:**

۱ میلی لیتر از فاز آبی سوسپانسیون تهیه شده کره با محلول پپتون استریل در ظرف پتری ریخته شد. سپس محیط کشت وایولت رد بایل آگار (Violet Red Bile agar) به آرامی اضافه شد. پس از مخلوط کردن اجازه داده شد تا سرد شود. سپس در گرمخانه ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید، کلنی‌های ارغوانی- بنفش شمارش شدند (۹).

**۴- آزمایشات تأییدی کلی‌فرم‌ها:**

۱۰ عدد کلنی(نماینده تمام کلنی‌ها) به لوله حاوی آبگوشت سبز درخشان لاکتوزدار (Brilliant green Lactose Bile broth) دارای لوله دورهام اضافه شد. سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تولید گاز در لوله

دورهام نشانگر باکتری‌های کلی‌فرم بود. سپس از لوله‌های حاوی گاز، یک حلقه فیلدوپلاتین برداشت شد و روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو ( EMB ) به‌صورت خطی داده شد. کلنی‌های ارغوانی تیره با مرکز سیاه دارای جلای سبز رنگ کلی‌فرم مدفوعی در نظر گرفته می‌شوند. به منظور افزایش تعداد آن‌ها کلنی‌ها روی محیط پلیت کانت آگار ( Plate Count agar) کشت شد، و سپس تست IMViC انجام شد (۹).

۵- شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا:

مقادیر ۰/۱ و ۱ میلی لیتر از فاز آبی سوسپانسیون تهیه شده کره با محلول پپتون استریل به ظرف پتری استریل اضافه شد. سپس محیط کشت پلیت کانت اسکیم میلک آگار ( Plate Count Skim Milk agar) به آن افزوده شد. پس از مخلوط کردن، اجازه داده شد تا سرد شوند. سپس در گرمخانه ۶/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۰ روز قرار گرفت. کلنی‌های دوکی شکل سفید رنگ شمارش شدند (۱۱).

۶- شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک:

۱ میلی لیتر از فاز آبی سوسپانسیون تهیه شده کره با محلول پپتون استریل به ظرف پتری استریل اضافه شد. سپس محیط کشت عصاره مخمر دکستروز اکسی تتراسایکلین آگار ( Dextrose Oxytetracycline agar)آرام آرام به آن اضافه شد، مخلوط شد و اجازه داده شد تا سرد شود. سپس در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ الی ۵ روز گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های کپک شمارش شدند (۱۲).

۷- روش شناسایی و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*:

۱ میلی لیتر از فاز آبی سوسپانسیون تهیه شده کره با محلول پپتون استریل به ۹ میلی لیتر محیط گوشت پخته ( Cooked Meat broth) منتقل شد. سپس به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از آن در سطح محیط کشت برد پارکر آگار (Baird Parker agar) اضافه شد، و توسط میله پخش کننده شیشه‌ای پخش شد. ظروف پتری در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ الی ۴۸ ساعت نگهداری شدند. کلنی‌ها به رنگ سیاه براق با لبه نازک سفید و هاله شفاف در اطراف شمارش شدند (۱۳).

۸- تجزیه وتحلیل آماری:

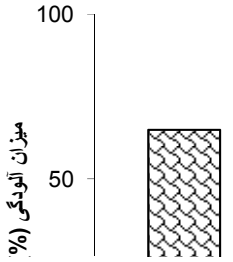
داده‌های حاصل، توسط نرم افزار آماری SAS (Version 9.1) پردازش شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD (Least Significant Difference) در سطح ۵٪ مقایسه شدند.

## یافته ها:

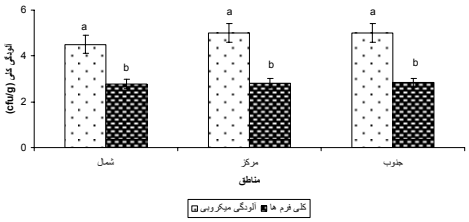
از ۴۸ نمونه قالب‌های کره جمع‌آوری شده از بازار مصرف تهران، ۳۱ نمونه (۶۴/۵۸٪) از نظر تعداد کلی‌فرم خارج از محدوده تعریف شده استاندارد بود (نمودار ۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ کدام از نمونه‌های مورد آزمایش جدا نشد. بررسی‌های آماری نشان داد که سرماگراهای شمارش شده در هیچ کدام از نمونه‌ها خارج از دامنه تعریف شده استاندارد نبودند. همچنین آلودگی به کپک نیز در ۳ نمونه (۶/۲۵٪) مشاهده گردید.

بین نمونه‌های مناطق مختلف بازارتهران از نظر میزان آلودگی‌های میکروبی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p<0.05$). (نمودار ۲ )

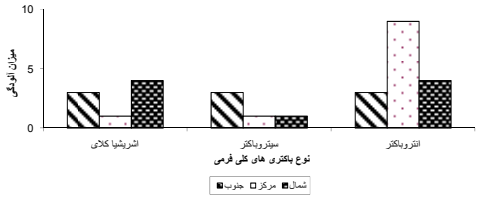
نتایج آزمون‌های تأییدی و شناسائی کلی‌فرم‌های مدفوعی توسط تست IMViC نشان داد که ۸ نمونه (۱۶/۶۶٪) حاوی *E.Coli*، ۵ نمونه (۱۶/۱۲٪) حاوی Citrobacter، ۱۸ نمونه (۵۸/۰۶٪) حاوی Enterobacter، بود (نمودار ۳).




نمودار ۱: درصد آلودگی میکروبی نمونه‌های کره




نمودار ۲: میزان آلودگی میکروبی نمونه‌های کره به تفکیک مناطق مختلف تهران




نمودار ۳: کلی‌فرم‌های جدا شده از نمونه‌های کره به تفکیک مناطق مختلف تهران

## بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد آلودگی هیچ یک از نمونه‌های کره عرضه شده در بازار مصرف تهران به میکروارگانیسم‌های سرماگرا خارج از دامنه تعریف شده استاندارد نیست. نمونه‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلودگی ندارند. اما، آلودگی به کلی فرم‌ها در بیش از نیمی از نمونه‌ها به اثبات رسید.

آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به دلیل دست‌کاری و انتقال عوامل آلوده کننده در حین بسته‌بندی کره باشد. از سوی دیگر کره‌های موجود در بازار ایران عمدتاً از کره‌های وارداتی فاقد بار میکروبی تهیه می‌شود (۱۴). بنابراین، عدم حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های مورد بررسی به دلیل عدم مقاومت این باکتری در شرایط سرما و انجماد نیست. البته *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین پاتوژن‌هائی است که از طریق عدم رعایت موازین بهداشتی منتقل می‌شود (۱۵).

منشأ اصلی میکروارگانیسم‌های سرماگرا شیر خام است. این ارگانیسم ها در فرآیند پاستوریزاسیون به طور کامل از بین می‌روند، و از طریق منابع انسانی به موادغذایی راه می‌یابند(۱۶). بنابراین، عدم وجود آنها در خارج از دامنه استاندارد، نشان می‌دهد که خامه مورد استفاده در تهیه کره به خوبی پاستوریزه شده است و این میکروارگانیسم‌هاهم کاملاً از بین رفته‌اند.

نتایج حاکی از آلودگی نمونه‌های مورد بررسی به کپک است. مهم‌ترین منبع آلودگی به کپک‌ها، محیط و هوایی است که عملیات بسته‌بندی در آنجا انجام می‌شود. معمولاً در پاستوریزاسیون خامه، جهت تولید کره، استفاده از دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و بالاتر موجب نابودی آنها می‌شود (۱۷). لذا، می‌توان نتیجه گرفت که حضور کپک‌ها در فرآورده‌های پاستوریزه شده از جمله کره، نشانگر آلودگی پس از پاستوریزاسیون است.

میزان آلودگی به کلی‌فرم‌ها در درصد قابل توجهی از نمونه‌ها، بر اساس استاندارد ملی ایران، بیش از حد مجاز است. آلودگی‌های موادغذایی به کلی‌فرم‌ها می‌تواند از طریق وسائل آلوده بسته‌بندی و پرسنل عمل‌آوری موادغذایی نیز صورت گیرد. بنابراین، دقت افراد عمل‌آورنده موادغذایی در تمیز و بهداشتی کردن وسائل کار، در کاهش چنین آلودگی‌هایی، جلوگیری از شیوع بیماری‌ها و عواقب وخیم ناشی از آن‌ها چه در حین تولید و چه در حین نگهداری و توزیع حائز اهمیت است. همچنین کنترل شرایط و دمای نگهداری در فروشگاه‌های عرضه‌کننده کره و حفظ زنجیره سرد (انجماد) به روش صحیح و بهداشتی تا زمان مصرف کره در جلوگیری از بروز آلودگی مؤثر خواهد بود(۱۸ و ۱۹).

اینروث و همکاران(۲۰۰۰)، آلودگی ثانویه شیر پاستوریزه با باکتری‌های گرم منفی سرمادوست را طی پرکردن اتوماتیک بسته‌ها بررسی کرده‌اند. منابع آلودگی طی فرآیند پر کردن

به ترتیب؛ ماشین‌های پر کننده، آب پسماند در کف ماشین‌های پر کننده، و آب کندانسه شده روی گلوگاه‌های پرکننده گزارش شدند. به‌طور کلی آنها پر کردن بسته‌ها را نقطه بحرانی آلودگی ثانویه با باکتری‌های گرم منفی اعلام نمودند(۲۰).

واجتن و همکاران(۱۹۹۸)، کیفیت بهداشتی شیر و فرآورده‌های آن را در لهستان مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه ۱۳/۹ درصد از کره‌های مورد آزمایش آلوده به کلی‌فرم‌ها بودند که از آنها *E. coli* و Salmonella جدا گردید (۲۱). بالابیو و لئون(۱۹۹۸)، Salmonella، *E. coli* و Listeria را درکره را به‌عنوان مخاطرات بهداشتی برای بهداشت عمومی اعلام نمودند (۲۲). داستونز و ریموند(۱۹۹۵)، در مطالعه بر روی کیفیت میکروبی و بهداشتی کره‌های عرضه شده در بازارهای ریودو ژانیرو، ۵۶/۹درصد از نمونه‌ها را آلوده به کلی‌فرم و ۳۷/۵درصد از نمونه‌ها را کلی‌فرم مدفوعی مثبت بیان نمودند(۲۳).

در ایران هم مطالعات متعدی انجام شده است. حاجی محمدی و همکاران(۱۳۸۷)، در بررسی میزان آلودگی میکروبی ۸۵ نمونه کره سنتی توزیع شده در شهر ملکان در فصل تابستان و پاییز گزارش نمودند که ۳/۵٪ آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۸/۲درصد آلوده به *اشریشیاکلای* بودمد. در میزان آلودگی در فصول سرد و گرم اختلاف معنی‌دار یافت نشد. آلودگی به سالمونلا هم در هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید. آنها تدوین مقررات جامع جهت کنترل بهداشتی این محصول را امری ضروری اعلام کردند (۲۴). یار احمدی و همکاران(۱۳۸۷)، در موضوع بررسی آلودگی بار میکروبی کل، کلی‌فرم و *اشرشیاکلای* شیر خام از مرحله دوشش تا تحویل به کارخانه در استان لرستان را گزارش نمودند. میانگین بار میکروبی در کلیه فصول سال ۶/۴۳±۰/۳۷ cfu/ml بود. اثر ماه‌های مختلف سال، مراحل مختلف نمونه‌گیری از شیر و ظرفیت مراکز جمع آوری بر روی بار میکروبی کل، کلی‌فرم و *اشرشیاکلای* کاملاً معنی‌دار بود ($P<0.01$). کمترین بار میکروبی در دی ماه ( 6.31±0.38 cfu/ml) و بیشترین بار میکروبی در مرداد ماه ( 6.57±0.31 cfu/ml)بود. کاهش بار میکروبی از شهریور ماه شروع و در دی و بهمن به کمترین میزان رسید. همچنین بیشترین و کمترین میزان باکتری‌های کلی‌فرم و *اشرشیاکلای* به ترتیب در ماه‌های شهریور، دی، بهمن و اسفند بود. آنها مشکل مهم جمع‌آوری شیر در استان لرستان و یکی از علل مهم افزایش بار میکروبی را دوری برخی مراکز جمع‌آوری شیر تا کارخانه و مدت زمان طولانی انتقال شیر به کارخانه اعلام نمودند (۲۵). طاهری یگانه و همکاران(۸۵-۱۳۸۴)، هم در مطالعه بر روی ۱۷۷ نمونه شیر پاستوریزه در استان همدان، اعلام کردند وضعیت شیر استان نسبت به استاندارد ملی به‌طور معنی‌داری پایین و در حد استاندارد می‌باشد. آنها همچنین دلیل این امر را تجهیزات کارخانجات به دستگاه‌های پیشرفته روز، رقابت مثبت بین کارخانجات و کنترل مداوم سازمان‌های مربوطه بیان نمودند (۲۶). سالاری و همکاران(۱۳۸۵)، در بررسی آلودگی میکروبی شیر و فرآورده‌های آن در استان یزد، مجموعاً ۱۹۸ نمونه مختلف را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد ۶۸/۷درصد مطلوب، ۲۴/۲درصد قابل قبول و ۷/۱درصد غیر قابل قبول بودند. حداکثر و حداقل سطح پذیرش مطلوب به ترتیب مربوط به شیر (۸۱/۳درصد) و پنیر (۳۶/۱درصد) بود. ضمناً بین میزان آلودگی و نوع فرآورده لبنی اختلاف معنی‌داری یافت شد. آنها بان نمودند که علی‌رغم کوشش‌هایی که در مورد پیشگیری از آلودگی موادغذایی به عمل می‌آید هنوز این موضوع به عنوان تهدیدی برای سلامت مردم مطرح است (۲۷).

رشد میکروارگانیسم‌های سرماگرا بستگی به درجه حرارت محیط دارد. اگر درجه حرارت کاهش یابد، میزان رشد به‌طور افزایشی کند می‌شود. حضور سرماگراها در کره و محصولات مشابه نشانگر شرایط نگهداری مناسب و طولانی مدت در دماهای یخچالی است (۲۰ و ۲۸). چون تعداد آنها در مطالعه حاضر در هیچ نمونه‌ای خارج از محدوده تعریف شده استاندارد نبود، می‌توان نتیجه گرفت شرایط نگهداری و توزیع مناسب بوده است، و محصول در معرض شرایط آلوده کننده قرار نداشته است.

بر اساس استاندارد ایران آلودگی فرآورده‌های لبنی به باکتری‌های کلی‌فرم مدفوعی که شاخص آن *E. coli* است باید صفر باشد. اما در بررسی حاضر درصد قابل توجهی از نمونه‌ها واجد این باکتری و قطعاً غیرقابل مصرف بوده‌اند. این نتیجه ضعف و عدم رعایت موازین بهداشتی در حین تولید کره را به خوبی نشان می‌دهد. وجود این آلودگی میکروبی در کره نشانگر خطرات بهداشت عمومی ناشی از وجود و انتقال باکتری‌های بیماریزای دیگر از جمله سالمونلا، شیگلا و نیز انواعی از اشریشیاکلای بیماریزا از جمله *E. coli* O157:H7 هم می‌باشد (۳۱-۲۹).

## نتیجه گیری:

آلودگی نمونه‌های کره عرضه شده در بازار مصرف تهران به *استافیلوکوکوس اورئوس* و میکروارگانیسم‌های سرماگرا خارج از دامنه تعریف شده استاندارد نیست. کپک در تعداد اندکی از نمونه‌ها وجود دارد. اما با توجه به اینکه آلودگی به کلی‌فرم‌ها در درصد قابل توجهی از نمونه‌ها بیش از حد مجاز است، مسلما غیرقابل مصرف هستند.

اهمیت فوق‌العاده شناسایی این میکروارگانیسم‌ها به عنوان شاخص آلودگی‌های میکروبی کره، به عنوان ماده‌غذایی فرآیند شده، ما را به توصیه‌های ذیل رهنمون می‌سازد: اکثر میکروارگانیسم‌های موجود در خامه در مرحله پاستوریزاسیون تولید کره از بین می‌روند.به‌علاوه، نگهداری کره در سرما (زیر صفر) نیز موجب به تعویق انداختن رشد میکروبی می‌شود. بنابراین، بخشی از آلودگی‌های باکتریایی ناشی از آلودگی ثانویه در زمان بسته‌بندی و عرضه می‌باشد. این آلودگی به دلیل تماس با دست آلوده یا وسایل و لوازم آلوده انتقال می‌یابد. آلودگی با رعایت اصول اولیه بهداشت فردی و بهداشت تجهیزات و وسایل کار قابل کنترل می‌باشند. لذا، توصیه می‌شود آموزش اصول بهداشتی و فرهنگ‌سازی در کنار بازرسی‌های بهداشتی کارشناسان متخصص بهداشت موادغذایی نهادینه شود تا مخاطرات ناشی از آنها کنترل گردد.

## تقدیر و تشکر:

از مدیریت محترم شرکت موادغذایی شکلّی آقای دکتر شکروی و مدیریت کنترل کیفیت خانم دکتر سیف هاشمی ما را در انجام این مطالعه یاری کردند ، کمال تشکر را داریم.

## فهرست مراجع:


۹. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شیر و فرآورده‌های آن، شمارش کلی‌فرم‌ها قسمت اول، روش شمارش پرگنه‌ها در ۳۰ درجه سانتی‌گراد (بدون غنی-سازی). چاپ اول، ۱۳۸۶، شماره ۱-۵۴۸۶.

۱۰. کریم گ. آزمون‌های میکروبی مواد غذایی. چاپ چهارم، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۲، صص ۵۲ تا ۷۲.

۱۱. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. روش شمارش میکروب‌های سرماگرا در شیر و فرآورده‌های آن در ۶/۵ درجه‌سانتی گراد. چاپ اول، ۱۳۸۶، شماره۳۴۵۱.

۱۲. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. شیر و فرآورده‌های آن، شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک در پلیت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. چاپ اول، ۱۳۸۶، شماره ۱۰۱۵۴.

۱۳. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. میکروبیولوژی مواد غذایی-روش شمارش میکروب‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت. چاپ اول، ۱۳۸۶، شماره ۳-۶۸۰۶.

۱۴. تفنگ‌سازان ف، خمیری م، کریم گ، حسنی س، سیف هاشمی س. ارزیابی کارآیی روش استاندارد برای شناسایی

1. Early R. *The technology of dairy products*. 2nd ed. . USA; Springer. 2004; **PP:**158-198.
2. Herreros MA, Fresno JM, Gonzalez Prieto MJ, Tornadijo ME. Technological characterization of acid lactic bacteria isolated from Armada cheese. *J Inter Dairy* 2003; **13**:469-479.
3. Metin M. The Ankara Turkish Trade Exchange centre public. *Dairy products quality control*. 1977; **1**:103-352.

۴. مرتضوی س ع، قدس روحانی م، جوینده ح. تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی. چاپ سوم، مشهد، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۷۴، صص ۳۷۱ تا ۴۰۰.

5. Robinson RK. *Dairy microbiology handbook*. 3rd ed. UK; Wiley. 2002; **PP**:123-170.
6. Halliday SL, Barbara B, Beuchat LR. *Food microbiology*. 3rd ed. USA; McGraw-Hill. 2003; **PP**:159-168.

۷. تقوایی عربی ت. بررسی کیفیت بهداشتی و آلودگی‌های میکروبی در کره‌های تولید شده در واحد نیمه صنعتی و سنتی. پایان‌نامه دامپزشکی، دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، صص ۴۰ تا ۸۵.

۸. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. حد مجاز آلودگی‌های میکروبی در فرآورده‌های شیر. چاپ دوم، ۱۳۸۴، شماره ۲۴۰۶.

اول ۸۵ با استاندارد ملی. پانزدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران، همدان. ۱۳۸۶، صص ۱۵۴-۱۵۸.

۲۷. سالاری م، شریفی م، گلزاری م، صدر آبادی ع، کفیلیان م. بررسی آلودگی میکروبی شیر و فرآورده‌های آن در استان یزد. *مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ایران*، ۱۳۸۵، شماره ۴۶، صص۲۳ تا ۲۶.

28. Downey WK. Review of the progress of dairy science flavor important from pre and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *J Dairy Research* 1985; **47**:237-242.
29. Adams MR, Moss MO. *Food microbiology*., 2nd ed. . USA; Springer Verlay. 2002; **PP**:1-5.
30. Erikson MC, Hung Y. *Quality in frozen food*. 1st ed. New York; Chapman and Hall. 1997; **PP**:176-211.
31. Marth EH, Steele JL. *Dairy microbiology*, 2nd ed. USA; CRC Press. 2002; PP: 93-120.

کلی‌فرم‌ها در کره و پیشنهاد روش غنی سازی بعنوان روش جایگزین. *مجله علوم و صنایع غذایی ایران- دانشگاه تربیت مدرس*، در نوبت چاپ

15. Belickova E. The ecology of *Staphylococcus aureus* in raw and heat-treated cow's milk. *J Food Vet* 2000; **12:**211-214.
16. Michel VA, Hauwuy A, Chamba JF. Raw cow-milk micro flora diversity and influence of conditions of production. *J food micro* 2001; **11:**575-592.
17. Macy H, Coulter ST, Combs WB. Observation on the quantative changes in the micro flora during the manufacture and storage of butter. *J Food Micro* 1983; **14**:82-93.
18. Barbara ML, Tony CBP, Grahame WG, Bernard M. *The microbiological safety and quality of foods*. 1st ed. USA; Aspen.2000; **PP:**22-145.

۱۹.نجف نجفی م، نخچیان ح. میکروبیولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی. چاپ اول، مشهد، انتشارات پژوهش توس. ۱۳۸۲، جلد اول، صص ۱۸۸ تا ۲۴۸.

20. Eneroth A, Ahrne S, Molin G. Contamination of milk with gram-negative spoilage bacteria during filling of retail container. *J Elsevier Science* 2000; **14:**123-127.
21. Wajton B, Rezanska H. Hygenic quality of milk and milk product in Poland. *J Food Science* 1998; **52**:108-111.
22. Ballabio L, Leon S. Microbiological standards for some food of animal origin. *J Food Science* 1998; **37**:19-24.
23. Dossantons E, Raimound S. Microbiological evaluation of butter produced from the market of Riode Janeiro indicator and pathogenic microorganisms. *J Food Microbiol* 1995; **6**(3): 244-229.

۲۴. حاجی محمدی ب، اطهاری سش، جامی م، احسانی ع. بررسی میزان آلودگی میکروبی کره‌های سنتی در شهر ملکان. هجدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران،تهران.۱۳۸۷، صص ۱۳۷ تا ۱۳۸

۲۵. یار احمدی ب، مهدوی ح، مویدی نژاد ا. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان. بررسی آلودگی بار میکروبی کلی‌فرم و *اشریشیاکلای* شیر خام از مرحله دوشش تا تحویل به کارخانه در استان لرستان خرم آباد. ۱۳۸۷.

۲۶. طاهری یگانه ع، صالحی س، غفوری خسروشاهی ا. بررسی وضعیت شیر پاستوریزه تولیدی استان همدان از لحاظ میزان اسیدیته و بار آلودگی میکروبی در نیم سال دوم ۸۴ و نه ماهه

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۴۸- ۴۳**

# بررسی فراوانی اپشتین بار ویروس (EBV) دربلوک‌های نمونه بیوپسی سرطان مری دراستان‌های مازندران و گلستان در سال ۱۳۸۷

محمدرضا حق‌شناس[۱*]، علیرضا رفیعی[۲]، فروه ذبیحیان[۳] ، فرشاد نقشوار[۴]

۱) گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲) مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳) دانشجوی پزشکی ، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴) گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
نویسنده رابط: محمدرضا حق‌شناس، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی ساری، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، ساری
تلفن: ۰۱۵۱ -۲۲۶۲۵۸۶ haghshenas2001@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۳۰

## چکیده:

**زمینه و اهداف**: سرطان مری یکی از سرطان‌های شایع در ناحیه مازندران و گلستان است، که در کمربند آسیایی سرطان مری واقع شده است. علت سرطان مری به‌درستی مشخص نمی‌باشد. عفونت با(Epstein Barr Virus (EBV عامل بسیاری از بدخیمی‌ها در انسان از جمله عامل لنفوم بورکیت و لنفوم هوچکین شناخته شده است. همچنین این ویروس می تواند با سرطان‌های معده و نازوفارنکس نیز ارتباط داشته باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی EBV در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به کارسینوم سنگفرشی مری (ESCC) =Esophageal squamous cell carcinoma در استان های مازندران و گلستان در سال ۱۳۸۷انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه توصیفی-مقطعی بر روی نمونه‌های بیوپسی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی مری انجام شد که بیماری آنها از لحاظ بالینی و پاتولوژی تایید شده بود. DNA از بلوک‌های پارافینی با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA جدا شد. سپس ژنوم ویروس EBV با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس EBV و به روش Polymerase Chain Reaction (PCR)تکثیر گردید. در نهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ جدا و الکتروفورز گردید.

**یافته ها:** ۴۰ نمونه سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC) مورد مطالعه شامل ۲۲ نمونه (۵۵٪) مرد و ۱۸ نمونه (۴۵٪) زن بود. از ۴ نمونه (۱۰٪) ژنوم ویروس EBV جدا شد. موارد مثبت شامل ۳ نمونه (۱۳/۲٪) مرد و ۱ نمونه (۵/۵٪) زن بودند.

**نتیجه گیری :** بر اساس نتایج مثبت ویروس EBV در تعدادی از نمونه‌ها به نظر می‌رسد ویروس EBV ممکن است یکی از عوامل موثر در سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC) باشد.

**کلید واژه ها:** PCR ، ویروس اپشتین بار، سرطان سلول سنگفرشی مری ، مازندران، گلستان

**مقدمه:**

عفونت ناشی از Epstein Barr Virus (EBV) یکی از عوامل مهم مرتبط با سرطان‌ها از جمله لنفوم بورکیت، لنفوم هوچکین و غیر هوچکین، کارسینوم نازوفارنکس و بدخیمی سلول‌های دندریتیک و فولیکولار شناخته شده است(۲،۱). EBV همچنین با سرطان‌های حلق – مری و سرطان معده در ارتباط است (۴،۳). سرطان‌های بافت اپی تلیالی و لنفاوی مانند سرطان‌های نواحی شکم، ریه و رحم نیز با عفونت این ویروس ارتباط دارند (۵،۴). سرطان مری به عنوان نهمین بدخیمی شایع و ششمین عامل سرطان در جهان محسوب شده و جزء کشنده‌ترین انواع سرطان طبقه‌بندی می‌شود. اگر چه شیوع سرطان مری در نقاط مختلف جهان متفاوت است، اما شیوع آن در برخی مناطق بالاترین میزان محسوب می‌شود. این نواحی شامل کمربند آسیایی سرطان مری (شمال‌شرق‌ترکیه و نیز کشورهای قزاقزستان ، ترکمنستان، تاجیکستان ، عراق ، ایران تا شمال چین ، هنگ کنگ و ژاپن ) و کشورهای جنوب غرب آفریقا ، فرانسه و قسمت‌هایی از آمریکا است (۷،۶). احتمال بروز سرطان مری در شمال چین, شمال آسیا و شمال ایران بیشتراز سایر مناطق جهان می‌باشد (۶). در سال‌های اخیر در مقالاتی به نقش EBV در بروز کارسینوم سنگفرشی مری ( Esophageal squamous cell carcinoma= ESCC) اشاره شده‌است (۷) با این حال، هنوز ارتباط این دو نامشخص و موضوعی بحث برانگیز می‌باشد. استان‌های مازندران و گلستان بر روی کمربند جهانی سرطان مری قرار گرفته‌اند و در واقع یکی از مناطق پرخطر ابتلا به این سرطان محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه تاکنون در ایران مطالعه خاصی در این ارتباط انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ویروس EBV در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به ESCC انجام گردید.

## مواد و روش‌ها:

این بررسی به روی نمونه‌های ۴۰ بیمار شامل۲۲ مرد (۵۵٪) و ۱۸ زن (۴۵٪) در محدوده سنی ۴۰ تا ۵۵ سال با میانگین سنی ۴۷/۶۵±۴/۴۵ سال و انجام شد. نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی(ره) ساری که از استان‌های مازندران و گلستان مراجعه کرده بودند جمع آوری شده بود. حجم نمونه باتوجه به مطالعات متعدد قبلی (۹،۸) و معنی دار بودن این جامعه و نیز باتوجه به شیوع تعداد افراد مبتلا تعیین شد. به طور تصادفی ۴۰ نمونه از نمونه‌های موجود در بانک بافت بیمارستان امام گرفته شد. صحت تشخیص ESCC علاوه بر یافته‌های بالینی با معیارهای پاتولوژی توسط پاتولوژیست تأیید شد. از بلوک‌های پارافینی ابتدا برش‌های ۵ تا ۷ میکرونی آماده گردید و تا انجام آزمایشات نهایی در فریزر ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. روش‌هایی که برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به طور خلاصه شامل چهار مرحله زیر می‌باشد:

۱) زدودن و حذف پارافین (دپارافینیزاسیون) از نمونه‌های پاتولوژی سرطان مری، (۲)استخراج DNA سلول‌های سرطانی، (۳) ازدیاد DNA با استفاده از روش PCR، (۴)الکتروفورز بر روی ژل آگارز که توضیح مراحل انجام شده فوق به صورت زیر می‌باشد.

۱- دپارافینیزاسیون (زدودن و حذف پارافین از نمونه‌های پاتولوژی سرطان مری): برای شروع کار ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۰دقیقه در گزیلن (غلظت) قرار گرفت. مجدداً ۱۰دقیقه در گزیلن جدید قرار گرفت. بلافاصله بعد از خروج از گزیلن به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۱۰۰٪ و بعد به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۹۵٪ قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در آب قرار گرفت (۱۰).

۲- استخراج **DNA**: استخراج DNA با استفاده از کیت اختصاصی محصول شرکت KIAGEN ایران به نام Purification kit صورت زیر انجام گرفت. بافت موجود به وسیله TLB (tissue lysis buffer) و پروتئینازK لیز شد تا اسیدنوکلئیک موجود درآن آزاد گردد. سپس درحضور سایر محلول‌های نمکی اختصاصی، نوکلئیک اسید با ماتریکس سیلیکایی به طور اختصاصی باند می‌شد. اسید نوکلئیک با ماتریکس باند شده باقی می‌ماند و بااستفاده از مرحله شستشو و سانتریفوژ سایر بقایای سلولی از DNA موردنظر جدا شده و از ماتریکس سیلیکایی خارج می‌شد. در مرحله آخر بااستفاده از DNA , Elution Buffer از ماتریکس سیلیکایی جدا شده و تا زمان انجام تست PCR در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۰).

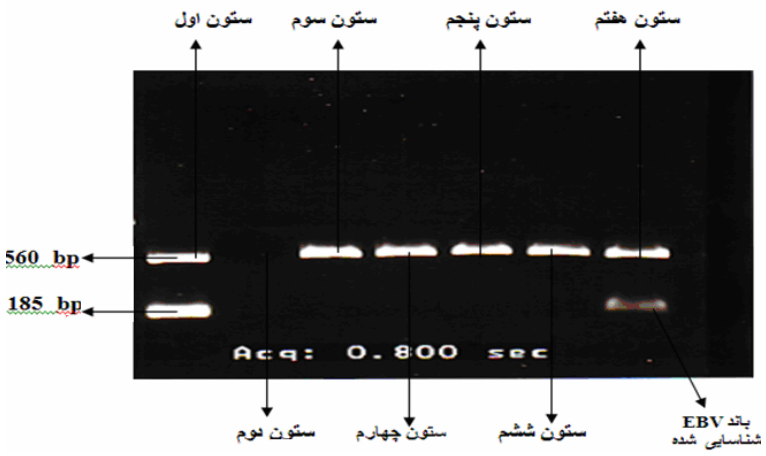
۳- مرحله انجام تست **PCR:** تست PCR با دستگاه شرکت DNA تکنولوژی روسیه مدل MTC 410 انجام‌شد (۱۱).پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص این ویروس به قرار زیر بود :

Forward primer:
5' – CACCTTAGACTCTGGAGGA – 3'
Reverse primer:
5' – TAAAGATACAGCAGCGCAG – 3'

۴- الکتروفورز بر روی ژل **(RUN)**: محصول PCR، روی ژل اگارز ۱ ٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. اگر ژن ویروس همراه DNA استخراج شده بود با load آن بر روی ژل الکتروفورز باند حاوی ژن ویروس ازدیاد شده، مشاهده می‌شد (۱۲). جهت الکتروفورز مقدار ۵ لاندا از DNA حاصل از PCR و ۵ لاندا از loading buffer با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت زمان ۴۰ دقیقه تحت الکتروفورز قرار می‌گرفت. سپس ژل را خارج کرده به دستگاه تصویر برداری (Gel Doc) منتقل می‌شد. پس از مشاهده باندهای تکثیر یافته، عکس ژل با استفاده از ترمال پرینتر ، چاپ می‌گردید .

## یافته‌ها:

نتایج PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ ٪ در شکل ۱ نشان داده شده است. ۴ (۱۰٪) نمونه حاوی Band ناشی از EBV بودند که بیانگر شیوع آلودگی ۱۰٪ نمونه‌ها با این ویروس بود (جدول ۱). نمونه‌های EBV مثبت، شامل نمونه‌های ۳ (۷۵٪) مرد و ۱ (۲۵٪) زن بود، که نشانگر اختلاف قابل توجه بین فراوانی ابتلا به EBV در بین مردان و زنان بود. چون تعداد زنان EBV مثبت بسیار اندک بود عملا این اختلاف مورد بررسی واقع نشد. به‌عبارت دیگر بیوپسی ۳ مرد (۱۳/۶٪)و ۱ زن (۵/۵٪) مبتلا به سرطان مری آلوده به ویروس EBV بود.




شکل۱: الکتروفورزمحصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید ۱ ٪ و شناسایی ژنوم EBV درنمونه ستون هفتم . باند ۵۶۰ جفت بازی نشان دهنده کنترل داخلی جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و باند ۱۸۵bp بخشی از ژنوم تکثیر یافته EBV است. ستون دوم نشان دهنده کنترل منفی (فاقد DNA ) است.

جدول ۱: نمونه‌های بافتی مورد بررسی به تفکیک سن و جنس بیماران

| EBV | جنس | | مجموع | میانگین سن + SD± |
|---|---|---|---|---|
| | مرد | زن | | |
| موارد EBV+ | ۳(٪۷۵) | ۱ (٪۲۵) | ۴ (٪۱۰) | ۴۸،۵۰± ۴،۷۹ |
| موارد EBV- | ۱۹ (٪۵۲،۸) | ۱۷ (٪۴۷،۲) | ۳۶ (۹۰) | ۴۷،۵۵ ± ۴،۴۸ |
| جمع | ۲۲ (٪۵۵) | ۱۸ (٪۴۵) | ۴۰ (٪۱۰۰) | ۴۷،۶۵ ± ۴،۴۵ |

## بحث:

نتایج آلودگی تعدادی از نمونه‌های بیوپسی سرطان مری را به EBV نشان می‌دهد.

سرطان مری به عنوان نهمین بدخیمی شایع و ششمین عامل سرطان در جهان محسوب می‌شود ونیز به عنوان یکی از کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها طبقه‌بندی شده است (۱۳). در کشورهای غربی خطر سرطان مری به‌طور کلی پایین است. بررسی‌ها نشان داده‌است که مصرف فراوان الکل و تنباکو می‌تواند عامل بیش از ۹۰درصد موارد سرطان مری در این نواحی باشد.( ۶). در صورتی که در ایران به‌خصوص در ناحیه شمالی (استان‌های مازندران و گلستان)، که روی کمربند سرطان مری هستند، مصرف این مواد پایین است. لذا، توجیه مناسبی جهت شیوع بالای سرطان مری در این نواحی نمی‌توان یافت (۱۴). بنابراین عوامل خطرزای دیگری را باید در رابطه با شیوع بالای سرطان مری سلول سنگفرشی در این نواحی تصور نمود.

عوامل ویروسی همانند EBV می‌تواند یکی از فاکتورهایی باشد که شیوع بالای این نوع سرطان را در این نواحی توجیه می‌نماید. مکانیسم ورود و اثر EBV به درستی شناخته شده نیست (۱۵) اما بررسی‌های مختلف نشان داده است که این ویروس می‌تواند سلول‌های اپی‌تلیال را آلوده کرده و سبب ترانسفورماسیون آنها به سمت بدخیمی شود (۱۸-۱۶). اخیرا نشان داده شده است که EBV با متوقف کردن بیان مولکول پیش آپوپتوزی Bax موجب مهار آپوپتوز در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌شود (۱۹). در حالیکه تاثیری در افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوزی Bcl-2 و c-Myc ندارد (۲۰). همچنین ویروس EBV با القاء تولید سیتوکاین ضد التهابی IL-10 موجب رشد و تکثیر سلول‌های B در لنفوم بورکیت می‌گردد (۲۱). از طرفی در مطالعات قبلی نقش ویروس EBV در سرطان معده، بیماری هوچکین، لنفوم بورکیت و سرطان‌های نازوفارنژیال ثابت شده است (۲۲). بنابراین بررسی فراوانی و ارتباط بین آلودگی به EBV و سرطان مری با توجه به شیوع بالا در این نواحی لازم به نظر می‌رسد . شایان ذکر است که به رغم اینکه این نواحی روی کمربند آسیایی سرطان مری قرار دارند تا به حال مطالعه‌ای در این مورد در ایران انجام نشده است. اما نتایج مطالعات در سایر کشورها با توجه به شیوع بالای این سرطان موید شیوع بالاتری از EBV می باشد. به طور مثال در سوئد ۲۰ درصد (۱۵)، در فرانسه ۲۱/۴ درصد (۱۶) و در آلمان ۴۰ درصد نمونه‌ها (۲۳) آلودگی به EBV داشتند. این در حالی است که در کشورهای آسیایی مثل چین و ژاپن بین آلودگی به ویروس EBV و ESCC ارتباطی وجود ندارد(۲۴). در مطالعه حاضر میزان شیوع ویروس EBV در نمونه‌های بیوپسی سرطان مری ۱۰ درصد است. اختلاف موجود در نتایج بدست آمده در همراهی عفونت EBV با سرطان مری در نقاط مختلف دنیا، می‌تواند ناشی از تفاوت در مناطق جغرافیایی و عوامل محیطی و حتی عوامل ژنتیکی باشد(۲۴،۱۴-۱۶). بی‌شک برای پیشگیری و کاهش میزان بیماری‌های مختلف در جامعه و ارتقاء سطح سلامت عمومی، شناخت عوامل ایجاد کننده بیماری‌ها و درک اهمیت هر یک از آن‌ها به عنوان نخستین گام عملی مطرح می‌باشد . در مورد EBV و بیماری‌های متعددی که توسط این ویروس ایجاد می‌شود نیز این اصل کلی حاکم است. لذا، انجام مطالعات اپیدمیولوژی می‌تواند در برنامه ریزی‌ها و سیاست گذاری‌های سلامت جامعه مورد استفاده قرار گیرد، و توجه دوباره و بیش از پیش کادر بهداشتی درمانی را جلب نماید. باید در نظر داشت که گاهی تفسیر نتایج آزمایشگاهی سخت و پیچیده است. این امر باید توسط

متخصصین آشنا با روند پاتوژنز ویروس EBV و آزمایشات مربوطه، که دسترسی به بیمار و بررسی‌های کلینیکی و پاراکلینیکی کامل او را لازم دارد، انجام گیرد (۲۲).

## نتیجه‌گیری:

با توجه به آلودگی در ۱۰درصد از نمونه‌های بیوپسی سرطان مری در این مطالعه، می‌توان مطرح کرد که: احتمالا بین آلودگی به این عفونت ویروسی و سرطان مری می‌تواند نوعی ارتباط وجود داشته باشد، و ویروس EBV یکی از عوامل موثر در سرطان مری در این مناطق محسوب شود، و ممکن است این ویروس در پاتوژنز سرطان مری نقش داشته باشد. اما، با توجه به شیوع بالای این سرطان در این مناطق باید همچنان به دنبال دخالت سایر عوامل خطر مداخله‌گر در این سرطان نیز بود. برای اثبات این مدعا باید با انجام یک مطالعه گسترده‌تر، و به‌ویژه مطالعات مورد- شاهدی و یا کوهورت،این فرضیه را به‌صورت کاملا علمی اثبات نمود.

## فهرست مراجع:


1. Sandlund JT, Gorban ZI, Berard CW, Sixbey J, Razzouk B, Talalayev A, *et al*. Large proportion of Epstein-Barr virus-associated small noncleaved cell lymphomas among children with non-Hodgkin's lymphoma at a single institution in Moscow, Russia. *Am J Clin Oncol* 1999; **22**(5):523-5.
2. Vasef MA, Ubaidat MA, Khalidi HS, Almasri NM, Al-Abbadi M, Annab HZ. Association between Epstein-Barr virus and classic Hodgkin lymphoma in Jordan: a comparative study with Epstein-Barr virus-associated Hodgkin lymphoma in North America. *South Med J* 2004; **97**(3):273-7.
3. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrmel H, Vedeler C, Grønning M, *etal.* Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; **64**(4):539-42.
4. Lindhout E, Lakeman A, Mevissen ML, de Groot C. Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med*. 1994; **179**(4):1173-84.
5. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M, Ziaja M, Gołabek W. Epstein-Barr virus antibodies in blood serum of patients with laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*. 2002 ;**56**(1):45-8.
6. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalz J. *Harrison's Principles of Internal Medicin*; 17th Edition, New York: McGraw Hill Medical Publication Division, 2008;PP:479-713.
7. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 2009;**143**(2):209-21.
8. Jenkins TD, Nakagawa H, Rustgi Ak. The association of Epstein Barr virus DNA with esophageal squamonus cell carcinoma. *Oncogene*. 1996 ,; **13** (8): 1809-1813.
9. Abdirad A, Ghaderi-Sohi S, Shuyama K, Koriyama C, Nadimi-Barforoosh H, Emami S, *et al.* Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a report from Iran in the last four decades. *Diagn Pathol.* Published online 2007 Jul 15. doi: 10.1186/1746-1596-2-25.
10. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-combeded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev* 2003; **27**:397-404.
11. Ben-Ezra J, Johanson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-combeded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem* 1991; **39**:351-354.
12. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**(21):10325-9.
13. Faried A, Kimura H, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, *etal*. Expression of carbohydrate antigens in human esophageal squamous cell carcinoma: prognostic application and its diagnostic implications. *Ann Surg Oncol*. 2007; **14**(2):960-7.
۱۴. مدرس شهاب ، مدرس شهرزاد ، عفونت ویروس اپشتین بار (EBV) در کودکان و بالغین شهر تهران. *مجله علمی*

*نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران*، ۱۳۷۷ شماره ۳ ، صص ۱۷۹ تا ۱۸۳.

15. Wang J, Noffsinger A, Stemmermann G, Fenoglio – Oreiser C. Esophageal Squamous cell carcinomas arising in patients from a high – risk area of North china lack an association with Epstein – Barr virus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;**8**(12):1111-4 .
16. Hummei M, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Korbjiuhn PH. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular location of EBV gene products. *J Haematol* 1992; **82**:689-694.
17. Hummei M, Anagnostopulos I, korbjkuhn P. Epstein- Barr virus in B- cell non- Hodgkin's lymphomas : unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *J Pathol* 1995; **175**: 263-271.
18. Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci*. 2008; **99**(9):1726-33.
19. Ueda S, Maeda Y, Yamaguchi T, Hanamoto H, Hijikata Y, Tanaka M, *etal*. Influence of Epstein-Barr virus infection in adult T-cell leukemia. *Hematology*. 2008; **13**(3):154-162.
20. Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI, Ferrasi AC, Mota RM, *l*. Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and Bax in gastric carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2008; **17**(2):82-9.
21. Samanta M, Iwakiri D, Takada K Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene*. 2008; **27**(30):4150-60.
22. Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol*. 1992; **66**(5):2689-97.
23. Mizobuchi S, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Terada M. Absence of human papillomavirus 16 and – 18 DNA and Epstein – Barr Virus DNA in esophageal squamous cell carcinoma *Jpn J Clin Oncol*, 1997; **27** (1): 1-5
24. Ohfuji S, Osaki M, Tsujitani S, Ikeguchi M, Sairenji T, Ito H. Low frequency of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Int J Cancer*. 1996; **68**(6):710-5.

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۵۴- ۴۹**

# بررسی شیوع هپاتیت B و مقایسه آن با نتایج آزمایشات مواد مخدر و سفلیس در ۱۰۰۰ مرد داوطلب ازدواج مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی شهید هاشمی نژاد-۱۳۸۸

احترام ملکیان نایینی[۱*] ، محمد رضا متولی باشی[۲]

۱) مرکز بهداشت غرب تهران ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲)گروه روان شناسی و علوم تربیتی، دانشگاه تربیت معلم کرج
نویسنده رابط: احترام ملکیان نایینی ، مرکز بهداشت غرب تهران ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
تلفن: ۴۴۰۹۶۴۰۴ همراه : ۰۹۱۲۴۵۹۲۲۴۲ malekiyany@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۳/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۲۶

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** هپاتیت B از عوامل مهم عفونی در جهان می‌باشد، که میزان حاملین آن از ۱٪ تا ۲۰٪ متغیر است. درصد شیوع آن در ایران بر حسب استان‌های مختلف و مطالعات گوناگون، متفاوت است. به لحاظ گذر ایران از شیوع متوسط به شیوع کم، مطالعات بیشتری نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین شیوع هپاتیتB و مقایسه آن با نتایج آزمایشات مواد مخدر و سفلیس درمردان داوطلب ازدواج مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی شهید هاشمی نژاددر سال ۱۳۸۸ بود.

**روش بررسی:** در بهار ۱۳۸۸ آنتی‌ژن HBs در ۱۰۰۰ مرد داوطلب ازدواج، آزمایش شد. این گروه برای انجام آزمایشات اجباری قبل از ازدواج به مرکز تحقیقاتی و آزمایشگاهی شهید هاشمی نژاد تهران مراجعه کرده بودند. آنتی‌ژن HBs به روش الیزا، سفیلیس به روش RPR (Rapid Plasma Reagine ) و مواد مخدر به روش تست مورفین سریع آزمایش شد. در صورت پاسخ مثبت در دو آزمایش اخیر روش‌های تاییدی انجام می‌گرفت. نتایج آزمایشات سه گانه با استفاده از روش logit و آزمون T مقایسه شدند.

**یافته ها:** افراد مورد مطالعه در گروه سنی ۴۵-۲۰ سال قرار داشتند. آنتی ژن HBs در ۸ نفر مثبت شد. شیوع هپاتیتB ۰/۸٪ یا ۸ در ۱۰۰۰ بود. بین وجود آنتی ژن HBs با سن افراد تفاوت معنی دار مشاهده نشد( $P>0.05$).آزمایشات اپیوم نزد ۲ نفر(۰/۲٪) مثبت بود. آزمایش سیفلیس در هیچ مورد مثبت نبود. بین ابتلا به هپاتیت B و مثبت بودن آزمایش مواد مخدر ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$).

**نتیجه گیری:** ۸ /۰ درصد داوطلبین حامل HBs آنتی ژن هستند و آزمایش مواد مخدر در ۰/۲ درصد مثبت است. بین ابتلا به هپاتیت B و مثبت بودن آزمایش مواد مخدر ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

**کلید واژه ها:** HBV,HBs Ag ،مواد مخدر، سیفیلیس، ازدواج

**مقدمه:**

هپاتیتB (Hepatitis B)، ویروسی است با ژنوم DNA دو رشته‌ای حلقوی که یکی از عوامل مهم عفونی در دنیا می‌باشد. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در دنیا به آن مبتلا می‌باشند. سالانه ۵۰۰۰ نفر از بیماری مزمن کبدی ناشی از آن از بین می‌روند(۱)، که نمایانگر یک مشکل بهداشت عمومی است. کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نیست. در ایران بیتش از ۳۵٪ افراد با ویروس هپاتیت B در تماس بوده‌اند(۲). ۸۰-۷۰٪ هپاتیت‌های مزمن توسط ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus) ایجاد می‌شود، که در نیمی از آنان بیماری به‌سوی ایجاد سیروزکبد پیش می‌رود(۳و۴). این بیماری نسبت به HIV بسیار عفونی‌تر است و از طریق تماس جنسی، تماس با خون و فرآورده‌های آلوده و نیز از طریق مادر به فرزند منتقل می‌شود. در صورتی که ۳۰٪ راه‌ها نامشخص است.(۲)

مارکرهای مختلفی برای تشخیص این بیماری وجود دارد که هرکدام درشرایط خاص بیماری درخون قابل اندازه‌گیری هستند. در بین آنها آنتی‌ژن HBs علامت پایداری عفونت است(۵). HBs Ag ،آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B است که ۱۰ – ۱ هفته بعد از برخورد با ویروس ایجاد می‌شود. بعد از شروع هپاتیت، در نیمی از بیماران به صورت مزمن باقی می‌ماند و می‌تواند به دیگران منتقل شود(۵). از آنجا که علائم بالینی آلودگی با HBV غیر ازموارد حاد نامحسوس است، تست غربالگری وجودHBs آنتی‌ژن ، روش نسبتاً ساده‌ای برای تشخیص ابتلا به هپاتیت B است.

درایران مراکزی برای انجام آزمایشات قبل از ازدواج وجود داردکه آزمایشاتی از قبیل تالاسمی، سیفلیس و مواد مخدر را به‌صورت آزمایش‌های اجباری قبل از ازدواج انجام می‌دهند. اما انجام آزمایش هپاتیت داوطلبانه است. بیماری هپاتیت B با توجه به روش‌های انتقال، برای جامعه جوان ما می‌تواند تهدید باشد. علاوه بر احتمال آلوده نمودن افراد جامعه توسط حاملین، انتقال همسران آلوده به یکدیگر و انتقال مادر به جنین، که در ایران بیشترین راه انتقال شناخته شده است(۲و۶)، اهمیت مسئله را بیشتر می‌کند. به نظر می‌رسد بررسی وجود HBs آنتی ژن در خون افراد جوان داوطلب ازدواج، که در آستانه تولد فرزند نیز می‌باشند، ضروری است. افراد با HBs آنتی‌ژن مثبت باید تحت مراقبت‌های ویژه پزشکی از نظر بیماری‌های مزمن کبدی قرار گیرند و نیاز درمان در آنها بررسی شود. همچنین همسران افرادی که HBV حاد دارند باید با ایمونو گلوبولین هپاتیت B تحت پروفیلاکسی قرار گیرند (۱و۶). در مقطع کنونی، داوطلبین ازدواج (گروه سنی ۴۵-۲۰ سال) شامل کسانی است که تاکنون تحت برنامه واکسیناسیون کشوری قرار نگرفته‌اند. هدف از این مطالعه تعیین شیوع هپاتیتB و مقایسه آن با نتایج آزمایشات مواد مخدر و سفلیس درمردان داوطلب ازدواج مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی شهید هاشمی‌نژاد-۱۳۸۸ بود.

## مواد و روش ها:

این مطالعه توصیفی بر روی مردان مراجعه‌کننده به آزمایشگاه شهید هاشمی‌نژاد تهران انجام گرفت. از مراجعین داوطلب شرکت در طرح رضایتنامه کتبی گرفته شد. شرط ورود به مطالعه داشتن سن بین ۴۵-۲۰ سال و عدم ابتلا به هپاتیت B مزمن بود. از ۱۰۰۰ نفر نمونه خون جمع‌آوری شد. بعد از جداسازی سرم جهت بررسی بیماری سفیلیس آزمایش RPR ( Rapid Plasma Reagine ) صورت گرفت. نمونه‌های سرم در لوله‌های استریل شده با اشعه گاما، جداگانه تا زمان انجام آزمایش هپاتیت در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. نمونه ادرار افراد، روزانه با حضور ناظر اتاق نمونه‌گیری ادرار جهت آزمایش مواد مخدر (اپیوم) جمع‌آوری شد. برای آزمایش مواد مخدر، ابتدا از نوارهای سریع (راپید) تست مورفین استفاده شد. موارد مشکوک یا مثبت توسط روش کروماتوگرافی ستونی نازک لایه (Thin layer chromatography) آزمایش شدند.

برای انجام آزمایشات هپاتیت B از جستجوی HBs آنتی ژن به روش الیزا استفاده شد. روش الیزا برای انجام آزمایش هپاتیتB یک روش تاییدی است(۷).برای این منظور از کیت Incontrol Acon USA استفاده شد. حساسیت آنالیز آن ۰/۲ نانوگرام در میلی‌لیتر است. حساسیت این کیت بیش از ۹۹/۹ درصد و اختصاصیت آن برابر ۹۹/۹ است(۱). اساس این تست فاز جامد و الیزای ساندویچ است. میکروپلیت‌ها با آنتی‌بادی‌های منوکلونال مخصوص ساب تایپ‌های HBs Ag پوشیده شده‌اند. ۵۰ لانداز سرم عاری از همولیز، لخته و آلودگی میکروبی افراد

به میکروپلیت‌ها اضافه شد. در مرحله بعد ۵۰ لاندا بافر کونژوگه شامل IgG ضد HBs Ag باند شده به Procline Thimerosal پروکسیداز، اضافه گردید. بعد از مخلوط شدن توسط شیکر به مدت یک ساعت درگرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.این زمان برای اتصال مواد و تشکیل ساندویچ کافی بود.در مرحله بعد عمل شستشو انجام شد. بافر شستشو شامل بافر Tris Hcl حاوی ۰/۱ درصد Tween 20 بود.در صورت وجود آنتی‌ژن در سرم، اتصال آنتی‌ژن آنتی‌بادی در چاهک صورت می‌گرفت و بعد از اضافه کردن کونژوگه کمپلکس Ab-Ag-Conjo تشکیل می‌شد.عمل شستشو با اضافه کردن ۳۵۰ لاندا بافر رقیق شده ۵ بار به هر چاهک صورت گرفت. در صورت عدم تشکیل این کمپلکس، مواد اضافه جدا و از محیط خارج شد. بعد از مرحله شستشو تمام چاهک‌ها زیر نور از لحاظ وجود حباب بررسی شدند. بعد از اطمینان از نتیجه عمل، سوبستراهای A و B به میزان ۵۰ لاندا به چاهک‌ها اضافه گردید. سوبسترای A شامل بافر سیترات فسفات و دزوکسی متیل سولفوکساید (DMSO) و سوبسترای B حاوی تترامتیل بنزیدین (TMB) بود که هر دو در Proclin TM 300 ۰/۱ درصد نگهداری شده بودند. در انتهای مرحله اضافه نمودن سوبستراهای A و B ،روی پلیت باپوشش مخصوص پوشیده شد و بعد از ۱ دقیقه شیکر شدن به مدت ۱۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گردید. در مرحله آخر ۵۰ لاندا محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop) حاوی اسید سولفوریک به هر چاهک اضافه شد تا انجام واکنش متوقف گردد و رنگ زرد پایدار ایجاد شود. کنترل منفی شامل سرم منفی نگهداری شده در نئوماسین و Thimerosal بود. کنترل مثبت شامل HBs آنتی‌ژن محلول در بافر PBS و مواد نگهدارنده بود. تمام چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر در برابر طول موج۶۳۰ نانومتر رفرانس با دستگاه الیزا ریدر Strip reader stat Fax خوانده شد.

محاسبه:

در هر بار آزمایش (Run) عدد Cut Off به قرار زیر محاسبه گردید

میانگین کنترل منفی ها + ۰/۰۷۰ = Cut Off

صحت انجام آزمایش وقتی تأیید شد که کنترل مثبت دارای OD بیش از ۱ و کنترل منفی کمتر از ۰/۱۰۰ باشد. نمونه‌هایی با OD بیشتر از عدد Cut Off ، مثبت و نمونه‌هایی با OD کمتر از آن، منفی در نظر گرفته شد(۱).

نمونه‌هایی با ۱۰٪ +/- Cut Off به‌عنوان نمونه مشکوک گزارش شد، که بر روی آنها عمل دابلیکیت الایزا انجام گردید. نمونه هایی که هر دو آزمایش نتیجه مثبت یکسان حاصل کردند برای تأیید به آزمایشگاه دیگری ارسال شد تا توسط فرد دیگر و دستگاه الایزار ریدر دیگری انجام گردد.

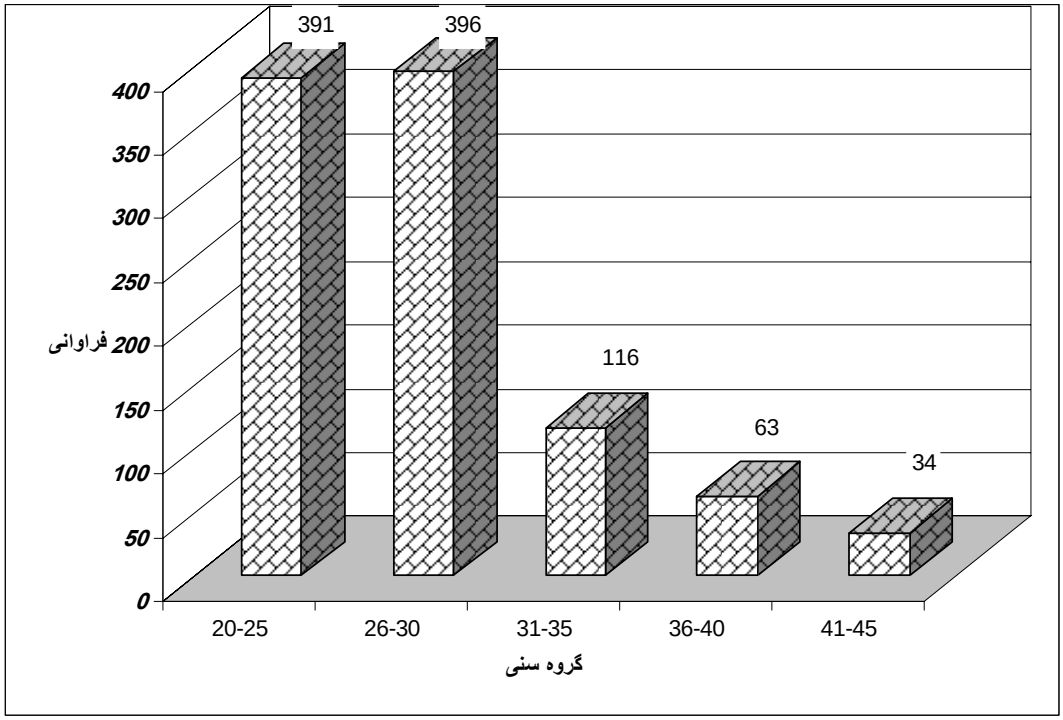
## یافته‌ها:

در این بررسی ۱۰۰۰ نفر مرد جوان داوطلب ازدواج که بین ۲۰ تا ۴۵ سال سن داشتند مورد آزمایش هپاتیت B، سیفلیس و اپیوم (مواد مخدر) قرار گرفتند. افراد در گروه‌های سنی ۵ تایی تقسیم شدند. بیشترین تعداد مراجعه کننده در گروه سنی ۳۰ – ۲۶ سال قرار داشتند (نمودار ۱) در مجموع ۸ نفر (۰/۸ ٪) دارای HBs Ag مثبت شدند که از این تعداد بیشترین فراوانی متعلق به گروه سنی ۴۵-۴۱ سال بود (جدول ۱).

آزمایش راپیداپیوم (مواد مخدر) در 20 نفر(۲ ٪) مثبت شد. از این تعداد، آزمایش ۲ نفر (۰/۲ ٪) با روش گروماتوگرافی تایید و پاسخ اپیوم آنها مثبت شد. پاسخ مثبت اپیوم متعلق به گروه سنی ۳۵-۳۱ سال بود (جدول ۱).

پاسخ آزمایش RPRجهت بیماری سیفلیس در هیچکدام از داوطلبان مثبت نبود (جدول ۱).

همچنین ارتباط معنی داری بین ابتلا به هپاتیت B و مثبت بودن آزمایش مواد مخدر وجود نداشت ($P > 0.05$). به‌عبارتی هیچکدام از افراد HBs آنتی ژن مثبت دارای پاسخ آزمایش مواد مخدر مثبت نشدند.




**نمودار ۱: توزیع فراوانی داوطلبین ازدواج مراجعه کننده به آزمایشگاه شهید هاشمی نژادتهران به تفکیک گروه های سنی**

**جدول ۱: نتایج آزمون‌های HBs آنتی‌ژن، مواد مخدر و سیفیلیس در مردان داوطلب ازدواج به تفکیک گروه‌های سنی**

| گروه سنی | تعداد | تعداد آزمون راپید اپیوم مثبت | تعداد TLC مثبت | تعداد HBs Ag مثبت | تعداد RPR مثبت |
|---|---|---|---|---|---|
| ۲۰-۲۵ | ۳۹۱ | ۸ | ۱ | ۲ | ۰ |
| ۲۶-۳۰ | ۳۹۶ | ۸ | - | ۲ | ۰ |
| ۳۱-۳۵ | ۱۱۶ | ۳ | ۱ | ۱ | ۰ |
| ۳۶-۴۰ | ۶۳ | ۱ | - | ۱ | ۰ |
| ۴۱-۴۵ | ۳۴ | - | - | ۲ | ۰ |
| جمع | ۱۰۰۰ | ۲۰ | ۲ | ۸ | ۰ |

**بحث:**

نتایج مطالعه شیوع هپاتیت B را ۰/۸ درصد و آزمایش مواد مخدر را ۰/۲ ٪ نشان داد. آزمایش سیفیلیس منفی بود. تفاوت معنی داری بین وجود Ag در سرم و سن افراد مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

شیوع هپاتیت B ۰/۸ درصد است. به دلیل محدود بودن تعداد نمونه، نتایج را به تمام کشور نمی‌توان تعمیم داد. اما باید در نظر گرفت این میزان در میان جوانانی است که غیر از حضور در اجتماع در آستانه ازدواج می‌باشند. همسران آنان هم به دلیل خطر بالای انتقال از طریق جنسی در معرض می‌باشند. به تبع آن در صورت آلودگی مادر، به‌خاطر احتمال بالای انتقال عفونت به نوزاد، فرزند نیز در خطر عفونت است. ابتلای یک فرد جدید اگر به بهبودی خود بخود منجر نشود می‌تواند کانون آلودگی تازه‌ای در جامعه باشد. هزینه پیگیری و درمان بیماران مزمن را نباید فراموش کرد. گفته می‌شود در ایران ۵۰۰۰ نفر سالانه به پیوند کبد نیاز دارند که هزینه آن در کشور ۵۰ میلیون تومان و در خارج از کشور ۳۰۰ – ۲۰۰ میلیون تومان می‌باشد. در ایران بیش از ۵۰ درصد پیوند کبد به دلیل سیروز کبد ناشی از HBV است.(۲)

درصد بدست آمده در مطالعه ما، وقتی واقعی تر است که افراد آلوده به ویروس هپاتیت B واقع در مرحله نهفتگی (۶-۴ هفته بعد از برخورد با ویروس) را اضافه کنیم. این مرحله‌ای است که HBs آنتی‌ژن به مقدار قابل اندازه‌گیری در روش‌های روتین نرسیده است. همچنین افرادی که با ژنوم جهش یافته این ویروس آلوده شده‌اند و یا عفونت همزمان ( coinfection ) دارند، دارای HBs آنتی‌ژن منفی هستند که باید به این تعداد اضافه شوند(۱).

در۲۰ سال اخیر آمار متفاوتی از شیوع هپاتیت B در ایران گزارش شده است. گفته می‌شود از ۳ درصد در سال ۷۰ به ۲ درصد رسیده است و متعاقب طرح واکسیناسیون نوزادان و گروه نوجوانان آمار رو به کاهش است(۲). نتایج بدست آمده در مطالعه ما اختلاف معنی‌داری با شیوع در سال ۱۳۷۰ را نشان می‌دهد($P< 0.05$).

در مطالعه‌ای که در شهر کرمانشاه بر روی داوطلبان ازدواج انجام شده است شیوع ۸ در ۱۰۰۰ گزارش شده که مساوی نتیجه مطالعه حاضر است(۸).

به گزارش سازمان انتقال خون، شیوع هپاتیت B در اهداء کنندگان خون در سال ۱۳۸۶ در پایگاه اراک، ۰/۲۹ درصد بوده است(۹) که با نتایج حاصل از مطالعه ما تفاوت معنی دار ندارد ( $P> 0.05$ ).

در اهداءکنندگان داوطلب در شهر ایلام شیوع ۰/۶ درصد بوده است(۱۰). در بیماران خاص به دلیل انتقال خون مکرر و خطر بالای انتقال، درصد بالاتری را شامل می‌شوند. HBs آنتی‌ژن در هموفیلی‌های شهر کاشان ۲۶/۷ درصد گزارش شده است (۱۱و۱۲).

دومین آزمایش انجام شده بر روی داوطلبان، آزمایش عدم اعتیاد یا اپیوم است که در غربالگری اولیه ۲۰ نفر (۲ درصد) و در آزمایش تاییدی وجود تریاک و مشتقات آن در ادرار ۲ نفر ( ۰/۲ درصد) تأیید شد. بیشترین دلیل پاسخ مثبت کاذب در آزمایش راپید اپیوم مصرف قرص‌های کدئین‌دار است که جوانان در شرایط اضطراب مانند مراجعه به مراکز آزمایشگاهی اپیوم، مصرف می‌کنند. مراکز انجام آزمایشات قبل از ازدواج وابسته به دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور مهم‌ترین پایگاهی هستند که جوانان موظف می‌باشند قبل از ازدواج آزمایشات اجباری، تعیین شده توسط متولیان سلامت جامعه، را در آن مراکز انجام دهند. غیر از آزمایش مهم تالاسمی، آزمایش عدم اعتیاد بیشتر جنبه آگاهی زوج یا زوجه را در بردارد. اگرچه اعتیاد عواقب بیشماری را برای اجتماع به وجود می‌آورد اما خطر انتقال فیزیولوژیک ندارد.

سومین آزمایش انجام شده تست غربالگری سیفیلس است (RPR) که در تمام جامعه مورد مطالعه منفی گردید. اگرچه تنها راه انتقال بیماری سیفلیس تماس جنسی و نیز انتقال مادر به جنین است، اما با بالا رفتن سطح بهداشت عمومی و آگاهی مردم و تغییر ساختاری نظام بهداشتی جامعه، میزان رو به کاهش است. به‌طوری که در مطالعه دیگری در مرکز هاشمی نژاد که بر روی ۴۷۱۶۹ نفر انجام شد ۲۱ مورد RPR مثبت (۴٪) بدست آمد که هیچکدام در تست تأییدی FTA ( Fluorescent treponema antibody assay) مثبت نگردید. (۱۳)

درصد مثبت آزمایش هپاتیت B به عنوان یک تست اختیاری از درصد دو آزمایش سیفلیس و مواد مخدر به عنوان تست‌های اجباری قبل از ازدواج بالاتر بود.

## نتیجه گیری:

۰/۸ درصد داوطلبین حامل HBs آنتی‌ژن هستند. به نظر می‌رسد غربالگری HBs آنتی ژن و گنجاندن آن در آزمایشات اجباری قبل از ازدواج از اهمیتی مشابه دو آزمایش دیگر برخوردار است. هزینه‌ای که برای انجام این تست پرداخت می‌شود، می‌تواند از پرداخت هزینه‌های بسیار سنگین آینده جلوگیری کند. اگر چه با طرح کشوری واکسیناسیون هپاتیت B، درصد ابتلاء به این بیماری رو به کاهش است اما لازم است حداقل در مراکز انجام آزمایشات قبل از ازدواج افراد بالای ۲۰ سال، که مشمول طرح واکسیناسیون بوده‌اند، در طی چند سال آینده مورد ارزیابی HBs آنتی ژن قرار گیرند. از سوی دیگر تا زمانی که طرح واکسیناسیون شامل تمام گروه‌های سنی داوطلب ازدواج شود، امکان واکسیناسیون رایگان برای خانواده افراد مبتلا فراهم گردد. افراد با HBs آنتی‌ژن مثبت باید از نظر سیر بیماری و ایجاد بیماری‌های مزمن کبدی تحت مراقبت‌های پزشکی قرار گیرند و لزوم درمان در آنان بررسی شود. در صورت HBV حاد همسر این افراد باید تحت پروفیلاکسی با HBIG قرار گیرند.

کلاس‌های مشاوره قبل از ازدواج معمولاً بعد از انجام آزمایش خون برای زوجین تشکیل می‌شود. این آموزش فرصت مغتنمی است که اطلاعات بهداشتی را در اختیار زوجین قرار دهد. لزوم انجام آزمایش هپاتیت B و آشنایی با این بیماری باید در مطالب آموزشی گنجانده شود. پیشنهاد می‌گردد آموزش و مشاوره‌های قبل از ازدواج ، قبل از انجام آزمایشات انجام گیرد. به این ترتیب در صورت اجباری نبودن آزمایش هپاتیت بعد از آموزش در خصوص این بیماری در زوجین انگیزه انجام آن به‌طور داوطلبانه ایجاد گردد.

## فهرست مراجع:


1. Krugman S, Glies J.P. Viral Hepatitis Type B. Further observation on natural history and prevention *J.Med* 2006:193**; 8**: 288-302
2. Merat S, Malekzadeh R, Rezvan H. Hepatitis B in Iran. *Arch Iran Med*. 2004; **12**:34-36

۳. بوهانی عامر . بررسی ابتلاء به هپاتیت B و D در بیماران سیروز کبدی، پایان نامه دکترای علوم آزمایشگاهی،دانشگاه علوم پزشکی اهواز ،۱۳۷۵ ، ص ۱۲۰-۱۱۴

۴. ملکیان نائینی احترام. بررسی شاخص‌های آنتی ژنتیک هپاتیت B و C و D در بیماران سیروز کبدی شهر تهران،*مجله بهداد*، ۱۳۸۱ . سال سوم، شماره ۱۰ ،ص ۱۶تا۱۸.

5. Blumberg BS. The discovery of Australian antigen and it's relation to viral hepatitis. *Vitro* 1971; **7**: 223
6. Farzadegan.The prevalence of HBSAg,HBSAb &HBe Ab in healthy blood donors and high risk group in Iran.*Sang*.1979;**73**:182-190
7. Lind E, Miller H, Ludke Julia E. *Manual of laboratory Immunology*. 2nd ed , Phladelphia , saunders . 1999;pp:70-74

۸ . ظرف نیا افسانه ، کمر بسته شهین ، فتح الهی سهیلا . بررسی شیوع هپاتیت B در زوجین مراجعه کننده به آزمایشگاه اپیوم شهر کرمانشاه . اولین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی ، ۱۳۸۶ . تهران. ص ۲۷۴

۹. سادات مهدویانی فاطمه ، ایزدی نبی اله ، رفیعی محمد . بررسی روند شیوع هپاتیت B و C و HIV براساس خصوصیات دموگرافیک اهداء کنندگان خون اراک، طی سال‌های ۸۶-۸۳. دومین کنگره بین المللی ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی.۱۳۸۷ ، تهران.ص ۲۱۶

۱۰. فلاحی شهاب ، کیانی جلال . شیوع هپاتیت B در اهداکنندگان داوطلب در ایلام . اولین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی . ۱۳۸۶ ، تهران .ص ۲۸۱

۱۱. بهادری جواد ، عابدی کرانه . بررسی شیوع هپاتیت B و C در بیماران هموفیلی شهر کاشان .دومین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی .۱۳۸۷.تهران. ص ۲۷۰

۱۲. مهدویانی فاطمه ، صارمی سعید ، رفیعی محمد. بررسی شیوع هپاتیت B و فاکتورهای خطر مربوط در بیماران دیالیزی استان مرکزی ، اولین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی.۱۳۸۳ .تهران. ص ۳۳۰

۱۳. ملکیان احترام. بیماری سیفلیس . *ماهنامه اخبار آزمایشگاهی* .سال هستم، شماره ۷۴ . مهر ۸۸ . ص۱۸

**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۵۸- ۵۵**

## مقاله کوتاه

# گزارشی از اپیدمیولوژی سل خارج ریوی در شهرستان شهریار در سال ۱۳۸۷

صمد ولی زاده[۱] ، مجتبی معماریانی*[۲] ، رضا بیگ وردی[۳] ، حامد معماریانی[۴]

۱) مرکز سل شهرستان شهریار ، مرکز بهداشت شهریار (سهراب علی بخشی) ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲) بخش میکروب شناسی ، گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳) گروه میکروب شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴) دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
نویسنده رابط: مجتبی معماریانی ، بخش میکروب شناسی ، گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
**همراه :** ۰۹۱۲۴۸۴۹۸۵۹ memaryani@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۱/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۱/۱

**چکیده:**

**زمینه و اهداف:** *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* معمولاً در ریه‌ها ایجاد عفونت می‌کند. اما در یک سوم موارد ممکن است اندام‌های دیگر غیر از ریه‌ها را نیز درگیر نماید. هدف از این مطالعه، تعیین اپیدمیولوژی سل خارج ریوی در شهرستان شهریار در سال ۱۳۸۷ در بیماران مراجعه کننده به مرکز سل شهریار(سهراب علی بخشی) بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی – مقطعی ، متغیرهای مختلف مرتبط با موارد جدید سل خارج ریوی در سال ۱۳۸۷ با استفاده از آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته ها:** در مجموع از ۱۲۷ بیمار مبتلا به سل ،۴۱ مورد (۳۲/۳٪) دارای سل خارج ریوی بودند. میانگین سنی بیماران دارای سل خارج ریوی ۱۶/۴±۳۵/۹ سال بود. ۲۵ نفر (۶۱٪) از مبتلایان به سل خارج ریوی ، زن و۱۶ نفر (۳۹٪) مرد بودند.۳۰ نفر (۷۳/۲٪) ملیت ایرانی و ۱۱ نفر (۲۶/۸٪) ملیت افغانی داشتند. غدد لنفاوی ، شایع ترین جایگاه عفونت در ۱۲ نفر (۲۹/۳٪) بود. سل استخوان و یا مفاصل در۷ نفر (۱۷/۱٪) ، درگیری پلور در ۴ نفر (۹/۸٪) ، سل دستگاه گوارشی در ۴ نفر (۹/۸٪) و سل نواحی دیگر بدن در۱۴ نفر ( ۳۴٪ ) پس از آن قرار داشتند. همچنین یک بیمار (۲/۴٪) از نظر HIV مثبت بود.

**نتیجه گیری:** تشخیص درست سل خارج ریوی یکی از مشکلات پیش روی علم پزشکی است. با توجه به تشابه تظاهرات بالینی سل خارج ریوی با انواع مختلف از بیماری‌ها ، بکارگیری روش‌های تشخیصی مناسب از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

**کلید واژه ها :** سل خارج ریوی ، اپیدمیولوژی ، شهریار

**مقدمه:**

*مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* معمولاً در ریه‌ها ایجاد عفونت می‌کند. اما در یک سوم موارد ممکن است اندام‌های دیگری غیر از ریه‌ها را نیز درگیر نماید. سل خارج ریوی دارای علائم متنوعی است ، بنابراین ممکن است به بسیاری از بیماری‌ها شباهت داشته باشد(۱). با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه حاضر با هدف تعیین اپیدمیولوژی سل خارج ریوی در شهرستان شهریار در سال ۱۳۸۷ انجام پذیرفت.

در این مطالعه توصیفی – مقطعی ، با مراجعه به دفتر ثبت بیماران در مرکز سل شهرستان شهریار(سهراب علی بخشی)، تمامی موارد جدید بیماری سل در سال ۱۳۸۷ استخراج گردید. تمامی بیمارانی که مبتلا به سل خارج ریوی بودند از نظر متغیرهای سن ، جنس ، ملیت و عضو درگیر با استفاده از آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در مجموع از ۱۲۷ بیمار مبتلا به سل ، ۴۱ مورد (۳۲/۳٪) دارای سل خارج ریوی بودند. میانگین سنی بیماران مبتلا به سل خارج ریوی ۱۶/۴±۳۵/۹ سال بود. ۲۵ نفر (۶۱٪) از مبتلایان به سل خارج ریوی ، زن و ۱۶ نفر (۳۹٪) مرد بودند. میانگین سنی مردان ۲۰/۲±۳۴/۱ سال و میانگین سنی زنان ۱۳/۷±۳۷/۰ سال بود. گروه سنی ۳۱ تا ۴۰ سال دارای بیشترین بیماران زن مبتلا به سل خارج ریوی بود. بیشترین توزیع فراوانی سل خارج ریوی در مردان، در گروه سنی ۲۱ تا ۳۰ سال قرار داشت (جدول ۱). ۳۰ نفر (۷۳/۲٪) ملیت ایرانی و ۱۱ نفر (۲۶/۸٪) ملیت افغانی داشتند. ۳۸ بیمار (۹۲/۷٪) ساکن شهر و ۳ نفر (۷/۳٪) ساکن روستا بودند. غدد لنفاوی از نظر فراوانی، در۱۲ نفر (۲۹/۳٪) شایع ترین جایگاه عفونت بود. سل استخوان و یا مفاصل در ۷ نفر (۱۷/۱٪) ، درگیری پلور در۴ نفر (۹/۸٪) و سل دستگاه گوارشی نیز در۴ نفر (۹/۸٪) پس از آن قرار داشتند (جدول ۲). همچنین یک نفر (۲/۴٪) از بیماران مبتلا به سل خارج ریوی با درگیری غدد لنفاوی، HIV مثبت بود.

بیشتر مطالعات انجام گرفته، میزان سل خارج ریوی نسبت به کل موارد سل را بین ۲۰ تا ۳۳٪ اعلام کرده اند(۶-۲) گرچه در برخی بررسی‌های دیگر ، این میزان تا ۴۱٪ نیز گزارش شده است (۷). در مطالعه ما، ۳۲/۳٪ از مبتلایان ، به سل خارج ریوی دچار شده بودند.

غدد لنفاوی معمولاً شایع‌ترین جایگاه درگیری است (۱). در بررسی حاضر نیز غدد لنفاوی با۲۹/۳٪ ، شایع‌ترین جایگاه درگیری در سل خارج ریوی بود. در بررسی‌های متانت و همکاران، عفونت غدد لنفاوی ۲۳/۲٪ از کل موارد سل خارج ریوی را به خود اختصاص داد(۲). امین زاده و همکاران در مطالعه خود در شهر تهران، این میزان را ۳۵/۸٪ اعلام کردند(۸). در مطالعه شفیق و همکاران در شهر بابل، این میزان برابر با ۵۴/۹٪ بود(۳). بررسی‌های رکنی و همکاران در مشهد هم نشان داد که سل غدد لنفاوی در ۳۳/۵٪ از بیماران مبتلا به سل خارج ریوی دیده شده است(۴). در همین رابطه، بررسی دیگری در شهر اراک، این میزان را ۵۰٪ گزارش کرده است(۵). مطالعه دیگری طی ۵ سال در چهارمحال و بختیاری ، لنفادنیت سلی را با ۴۲٪ شایع‌ترین مورد اعلام کرده است(۹).

سل استخوانی، به عنوان دومین یا سومین عامل شایع سل خارج ریوی محسوب می‌گردد. در بررسی حاضر، درگیری استخوان‌ها و یا مفاصل با ۱۷/۱٪، دومین علت شایع سل خارج ریوی بود. این میزان در مطالعات معینی(۵) ، متانت(۲) ، مردانی(۹) ، رکنی(۴) و امین زاده(۸) به ترتیب ۲۵٪، ۱۲٪، ۱۸٪، ۱۱/۵٪ و ۱۴/۸٪ گزارش شده است. اسپوندیلیت سلی(Pott's disease)، نوعی دیگر از سل استخوانی است که در آن، ستون مهره‌ها درگیر می‌شود(۱). با توجه به اهمیت بیماری فوق و علائم بالینی متفاوتی که دارد ، این نوع درگیری در مطالعه حاضر به عنوان یک مورد مجزا از سل استخوانی در نظر گرفته شد.

سل پلور(پلورزی) به عنوان دومین یا سومین علت شایع سل خارج ریوی نامبرده شده است. در مطالعات متانت(۲) و رکنی (۴)، عفونت پلور به ترتیب ۱۲/۲٪ و ۲۰/۷٪ از موارد خارج ریوی را به خود اختصاص دادند. در بررسی ما نیز به عنوان سومین عامل شایع (۹/۸٪) شناخته شد که بسیار کمتر از مطالعات فوق می‌باشد.

در مطالعه حاضر، سل سیستم گوارشی و سل صفاق (پریتوان) به ترتیب سومین (۹/۸٪) و چهارمین (۷/۳٪) علت شایع سل خارج ریوی بودند. علائم سل گوارشی شامل درد، کم اشتهایی ، اسهال، انسداد روده ، آسیت ، خونریزی و احساس ایجاد یک توده قابل لمس شبیه به کارسینوما می‌باشد. درگیری کبد، طحال ، پانکراس و گاهی اوقات صفاق (پریتوان) نیز به عنوان بخشی از سل گوارشی محسوب می‌گردند(۱۰) اما در بررسی حاضر،

سل صفاقی به عنوان یک مورد مجزا از سل گوارشی در نظر گرفته شد. در مطالعه متانت و همکاران ، سل صفاقی و سیستم گوارشی به ترتیب ۷/۹٪(سومین عامل) و ۲/۴٪ از موارد خارج ریوی را به خود اختصاص دادند(۲). در بررسی دیگری ، سل صفاقی با ۱۰٪ به عنوان سومین عامل گزارش شده است (۹) اما در مطالعه امین زاده ، این میزان برابر بـا ۱۷/۲٪ بود(۸). این آمار متناقض شاید به دلیل عدم تشخیص مناسـب بیمـاری و یا ناشی ازاختلافات اپیدمیولوژیک باشد.

این مطالعه نشان می‌دهد که سل خارج ریوی هنوز به عنوان یک عـامل مهـم در اپیدمیولوژی سل مطرح می‌باشد. با توجه به تشـابه تظاهرات بالیـنی سـل خارج ریـوی به انواع مختلفی از بیماری‌ها ، بکارگیـری روش‌های تشخـیصی منـاسب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

جدول ۱: توزیع سنی بیماران مبتلا به سل خارج ریوی مراجعه‌کننده به مرکز سل شهرستان شهریار در سال۱۳۸۷

| گروه سنی / جنس | ۰ تا ۱۰ سال | ۱۱ تا ۲۰ سال | ۲۱ تا ۳۰ سال | ۳۱ تا ۴۰ سال | ۴۱ تا ۵۰ سال | ۵۱ تا ۶۰ سال | ۶۱ تا ۷۰ سال | ۷۱< سال | جمع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مرد | ۰(٪۰) | ۲(٪۱۲/۵) | ۹(٪۵۶/۳) | ۱(٪۶/۲) | ۱(٪۶/۲) | ۰(٪۰) | ۱(٪۶/۲) | ۲(٪۱۲/۵) | ۱۶(٪۱۰۰) |
| زن | ۰(٪۰) | ۳(٪۱۲/۰) | ۵(٪۲۰/۰) | ۷(٪۲۸/۰) | ۳(٪۱۲/۰) | ۵(٪۲۰/۰) | ۲(٪۸/۰) | ۰(٪۰) | ۲۵(٪۱۰۰) |

جدول ۲: توزیع فراوانی انواع سل خارج ریوی در بیماران مراجعه‌کننده به مرکز سل شهرستان شهریار در سال ۱۳۸۷

| جایگاه عفونت | موارد عفونت | |
|---|---|---|
| | تعداد | درصد |
| غدد لنفاوی | ۱۲ | ۲۹/۳ |
| استخوان و یا مفاصل | ۷ | ۱۷/۱ |
| پلور | ۴ | ۹/۸ |
| دستگاه گوارش | ۴ | ۹/۸ |
| صفاق (پریتوان) | ۳ | ۷/۳ |
| ستون مهره ها | ۳ | ۷/۳ |
| دستگاه تناسلی | ۳ | ۷/۳ |
| رحم | ۱ | ۲/۴ |
| کلیه | ۱ | ۲/۴ |
| مننژ | ۱ | ۲/۴ |
| پوست | ۱ | ۲/۴ |
| چشم | ۱ | ۲/۴ |
| جمع | ۴۱ | ۱۰۰ |

## فهرست مراجع:


۹. مردانی م. سل خارج ریوی و بررسی ۱۴۶ مورد، *مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران* ۱۳۷۹، دوره هجدهم، شماره ۴ ، صص ۲۸۲ تا ۲۸۷.

۱۰. سمنانی ش، بشارت س، رفیعی س، کشتکار ع، روشندل غ، عبدالهی ن و همکاران. گزارش ۵ ساله سل گوارشی و شکمی در استان گلستان. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان* ۱۳۸۵، دوره هشتم، شماره ۳، صص ۲۴ تا ۲۸.

1. Mandell GL, Bennetts J, Dolin R. *Principles and practice of infectious disease*. 6th ed. Churchill Livingstone Inc ,USA. 2005; PP: 2852-2886.

۲. متانت م، صالحی م، شریفی مود ب، جهان تیغ ع ، روحانی ز. بررسی اپیدمیولوژیک سل خارج ریوی در شهرستان زاهدان، *مجله طبیب شرق* ۱۳۸۴، سال هفتم ، شماره ۴ ، صص ۲۷۵ تا ۲۷۹.

۳. شفیق ا، سیادتی س. سل خارج ریه و پلور در بیمارستان شهید بهشتی بابل طی ۱۴ سال، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان* ۱۳۸۳، سال ششم، شماره ۱۴، صص ۶۱ تا ۶۵.

۴. رکنی ف، اعتمادی ج. بررسی اپیدمیولوژی سل خارج ریوی در شهرستان مشهد. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد* ۱۳۸۱، شماره ۸۷، صص ۹ تا ۲۳.

۵. معینی ل. بررسی اپیدمیولوژیک علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی بیماران مبتلا به سل بستری در بیمارستان ولی عصر اراک. *مجله ره آورد دانش* ۱۳۸۱، سال پنجم، شماره ۱، صص ۳۷ تا ۴۱.

۶. خلیل زاده نوری ل، بهره مند ا، صنمی ع، حرفه منش ع. سل خارج ریوی ناشی از کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. بیست و سومین کنگره منطقه ای اتحادیه بین المللی مبارزه با سل و بیماری‌های ریوی همزمان با سیزدهمین کنفرانس سالانه سل کشور، تهران، سال ۱۳۷۶، ص ۱۳.

۷. طاهری ا، حیدرنژاد ح، حبیب زاده د. بررسی روند بیماری سل در ۵ سال گذشته در مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز (۸۰-۱۳۷۶)، خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره سل کشوری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، سال ۱۳۸۱، ص ۶۲.

۸. امین زاده ز، اخیانی ح. تظاهرات بالینی بیماران مبتلا به سل خارج ریوی بستری در بیمارستان لقمان حکیم تهران، *مجله طبیب شرق* ۱۳۸۴، سال هفتم، شماره ۴، صص ۲۸۳ تا ۲۸۷.

# نامه به سر دبیر

## انتروکوک‌ها و اهمیت آنها در ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری

محمد رهبر، بخش میکروب شناسی، آزمایشگاه مرجع سلامت، تهران

عفونت‌های دستگاه ادراری جزو شایع‌ترین عفونت‌های اکتسابی در جامعه و بیمارستان می‌باشند. به‌طور تخمینی سالیانه حدود ۲۵۰ میلیون نفر به آن مبتلا می‌گردند. عفونت‌های دستگاه ادراری معمولا به‌طور اختیاری درمان می‌شوند و بیشترین موارد مصرف آنتی بیوتیک را به خود اختصاص می‌دهند. .پزشکان برای درمان مناسب و جلوگیری از مقاومت داروئی بایستی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها مطلع باشند.(۱)

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی می‌باشند که به‌عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش تلقی می‌گردند. این باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌خصوص عفونت‌های دستگاه ادراری ( به‌واسطه سوند گذاری و تجویز آنتی بیوتیک‌ها ) عفونت‌های داخل شکمی و عفونت‌های لگنی نقش اساسی دارند .علاوه بر این انتروکوک‌ها بیماری‌های دیگری نیز مانند عفونت‌های زخم، باکتریمی ،اندوکاردیت به‌ویژه در نوزادان و به‌ندرت مننژیت ایجاد می‌کنند . *انتروکوکوس فکالیس* عامل اصلی(۸۰ تا ۹۰٪ ) این‌گونه عفونت‌ها می‌باشد. پس از آن *انتروکوکوس فسیوم* (۱۰ تا ۱۵٪) در رده دوم قرار دارد. مقاومت انتروکوک‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌ها به‌ویژه آمپی سیلین، آمینوگلیکوزیدها،سفالوسپورین‌ها و وانکومایسین درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها را با مشکل مواجه کرده‌است. سویه‌های مقاوم به وانکومایسین اغلب به سایر آنتی بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌باشد و بیشتر در سویه‌های *انتروکوکوس فسیوم* مشاهده می‌گردد(۲).

نمونه‌های ادرار فراوان‌ترین نمونه ارسالی جهت کشت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی می‌باشد،که تقریبا حدود ۸۰٪ کل نمونه‌ها را تشکیل می‌دهد.اگرچه انسیدانس عوامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری تا اندازه‌ای در بیماران بستری وسرپائی ممکن است متفاوت باشد، ولی با اینهمه ارگانیسم‌هائی مانند *اشریشیاکولی* به‌همراه سایر باسیل‌های گرم منفی روده‌ای جزوشایع‌ترین عوامل می‌باشند. دربین کوکسی‌های گرم مثبت، انتروکوک‌ها از عوامل مهم عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشند و تقریبا سومین عامل مهم دستگاه ادراری در بیماران بستری است. به‌عنوان مثال در مطالعات De Francesco و همکارانش در ایتالیا انتروکوک‌ها بعد از *اشریشیا کولی* دومین عامل عفونت دستگاه ادراری است، که حدود ۹٪ موارد مثبت را در بیماران سرپائی و ۱۲٪ در بیماران سرپائی را تشکیل می‌داده است (۳). دریک مطالعه هشت ساله که توسط Orrett و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام شده انتروکوک‌ها با۱۱٪ ایزوله در بین نمونه‌های مثبت در رده چهارم عامل عفونت‌های دستگاه ادراری بوده است (۴). در مطالعه‌ی دیگری که توسط امین وهمکارنش در بیمارستان امام‌خمینی اهواز انجام شده است انتروکوک‌ها بعد از *اشریشیا کولی*، کلبسیلا، استا فیلوکوک‌ها، انتروباکتر و پسودو موناس در مرتبه ششم قرار داشتند(۵). در مطالعه صادری و همکارانش در بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران انتروکوک‌ها با ۱۰/۵ ٪ موارد مثبت بعد از *اشریشیا کولی* در مرتبه دوم قرار داشتند (۱)و درمطالعه رنجبر و همکارنش در مرکز طبی کودکان در تهران انتروکوک‌ها با ۸/۷٪ چهارمین عامل عفونت‌های دستگاه اداری بوده‌اند(۶) در یک مطالعه چند مرکزی که شامل ۵۵ بیمارستان در ۱۲ استان بوده است و توسط کلانترو همکارانش انجام شده است انتروکوک‌ها با ۹/۶٪ جداسازی در رده چهارم عوامل عفونت‌های دستگاه ادراری قرار گرفته‌اند.(۷)

اخیرا مقاله‌ای، در شماره۳و۴ (پائیز وزمستان صفحات ۵۸-۵۳) سال ۱۳۸۷ مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، توسط رضوان منیری و همکارانش تحت عنوان بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار چاپ شده است. این مقاله حاکی از جداسازی در صد خیلی بالائی از انتروکوک در بیمارستان شهید بهشتی کاشان ازنمونه‌های ادرار می‌باشد. در مطالعه نامبردگان از ۶۰۰ نمونه ادرار کشت داده شده ۱۱۴ (۱۹٪) سویه انتروکوک جدا شده است . این نتیجه با هیچکدام از آمارهای موجود مطابقت ندارد. همانطور که همه می‌دانیم حدود ۸۰٪ از نمونه ادرار کشت منفی می‌باشند، و *اشریشا کولی* ۵۰-۶۰٪ موارد را مثبت را تشکیل می‌دهد. لذا، جایگاهی برای پاتوژن‌های دیگر در مطالعه نامبرده گان متصور نمی‌باشد. با یک محاسبه ساده اگر موارد مثبت کشت‌های ادرار را به‌طور خوش بینانه حدود۲۰٪ در نظر بگیریم ۱۲۰ مورد کشت مثبت خواهیم داشت. این در حالی است که در مطالعه نامبردگان ۱۱۹ مورد فقط انتروکوک جداشده است! در نتیجه جایگاه باکتری‌های شایع دیگر مانند *اشریشیا کولی*، کلبسیلا،انتروباکتر و غیره ملحوظ نمی‌باشد. لذا، بنظر می‌رسد همکاران محترم نویسنده مقاله به این امر مهم توجه نکرده‌اند و یا در درج تعداد نمونه‌ها اشتباهی رخ داده است .


1.Saderi H, Owlia, P,Jalali Nadoushan , Zaer F,Zandieh E. A3-year study of demographic characteristics of patients with urinary tract infection,microbial etiology,and susceptibility testing of isolated bacteria to antibiotics in Shaheed Mostafa Khomeini hospital. *Iran J Pathol*. 2006;**3**:99-104

2.Marothi YA, Agnihotri H , Dubey. Enterococcal resistance-An overview. *Indian J Med Microbiol*. 2005;**23**:214-9

3.De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Negrini R, Manca N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. *Med Sci Monit*. 2007;**13**(6):BR136-44.

4.Orrett FA,Connors E. Entrococcal urinary tract infections ,eight years experience at a regional hospital in Trinidal ,West Indies .*Chin.Med J*. 2001;**11**:90-92

5.Amin M, Mehdinegad M, Pourdanchi Z. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. *Jundishapur J Microbiol*. 2009;**2**:118-123

6.Ranjbar R, Haghi- Ashtiani,Jonaidi Jafari , Abedini. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iran J Pulic Health*. 2009; 38:134-138

7.Kalatar E, Motlag ME, Lornejad H ,Reshadmanesh. Prevalence of urinary tract pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in children at hospitals in Iran. *Iran J Clin Infect Dis*. 2008;**3**:149-153

# پاسخ به سر دبیر

**سر دبیر محترم مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**

**با سلام و احترام در پاسخ به نامه به سردبیر در باره‌ی نقد مقاله تحت عنوان " بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار ":**

**انتروکوکوس به عنوان دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی در جهان مطرح است. بیشترین عفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های انتروکوکوس به صورت عفونت ادراری (UTI) بوده و همراه با استفاده از کاتتر و یا سایر وسایل می‌باشد(۱). در حال حاضرایزولاسیون انتروکوکوس‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک در مراکز بیمارستانی دنیا رو به افزایش است(۲). بالاترین میزان UTI ناشی از انتروکوکوس در کانادا ۱۶/۸ درصد، در امریکا ۱۲/۵ درصد و در اروپا ۱۱/۷ درصد گزارش شده است (۱و۲ ). بنا براین، جدا کردن ۹۵ ایزوله‌ی انتروکوکوس از نمونه‌ی ادرار ۶۰۰ بیمار بستری در بیمارستان آموزشی ( ۱۵/۸۳ درصد ) که دارای علائم بالینی و آزمایشگاهی عفونت ادراری هستند( میزان گلبول‌های سفید در آزمایش ادرار مساوی یا بیشتر از ۵ در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی زیاد )، به شرطی که محیط مناسب و تست‌های استاندارد بیوشیمیایی برای تشخیص استفاده شود، جای تعجب ندارد، و هم خوانی با سایر مطالعات در سایر نقاط جهان دارد. در ضمن کلیه نمونه‌های انتروکوک جدا شده با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تایید گردیده و از نظر مولکولی نیز با PCR تایید شده‌است.**

**رضوان منیری**
**گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی**
**دانشگاه علوم پزشکی کاشان**

1. Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; **32** (Supply 2) : S133-45.
2. Seema Sood, Meenakshi Malhotra, B.K. Das & Arti Kapil. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 2008; **128 :**111-121.

# یادداشت سردبیر

مقاله‌ای تحت عنوان "بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار " در شماره۳و۴ (پائیز و زمستان، صفحات ۵۸-۵۳) سال ۱۳۸۷ مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران به چاپ رسید. در این مقاله از نمونه ادرار ۶۰۰ بیمار بستری ۱۱۴ سویه (۱۹٪) انتروکوک جدا شده‌است. با انعکاس نظرات داوری به نویسنده محترم رابط ، ایشان به چند سطر اول و منابع ۸-۶ مقاله استناد نمودند. مراجع ۶ و ۷ به ترتیب مقاله‌های Ronald و گزارش سیستم ملی مراقبت عفونت‌های بیمارستانی(NNIS) در امریکا (۱۹۹۹-۱۹۹۰) هستند و مرجع ۸ هم کتابی است که در دسترس اینجانب نیست. به نظر می‌آید که جدا شدن این تعداد سویه انتروکوک به توضیح نیاز دارد. لذا، مطلب حاضر پیرامون این موضوع نگاشته شد.

درکتاب هاریسون به عنوان مرجع طب داخلی، *E. coli* عامل حدود۸۰٪ ازعفونت‌های حاد(سیستیت و پیلونفریت) در بیمارانی شناخته شده که کاتتر، ناهنجاری‌های اورولوژیک و یا سنگ ندارند. enterococci گاهی باعث سیستیت بدون عارضه (uncomplicated) در زنان می‌شود. enterococci و *Staphylococcus aureus* بیشتر عامل عفونت در بیمارانی هستند که سنگ کلیه دارند و یا سابقه استفاده از ابزار درمانی و یا جراحی را دارند (۱).

کتاب مندل به عنوان مرجع طب عفونی بعد از اشاره به اهمیت *E. coli* در عفونت حاد ، متذکر می‌شود که به ویژه در صورت وجود ناهنجاری‌های ساختاری دستگاه ادراری، فراوانی نسبی عفونت ناشی از گونه‌های.... و نیز انتروکوکسی و استافیلوکوکسی به مقدار زیاد افزایش می‌یابد. این گونه‌ها در عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان بیشتر جدا می‌شوند.۸۰٪ یا بیشتر UTI بیمارستانی با استفاده از کاتتر ادراری همراه است (۲).

در کتاب اورولوژی اسمیت هم عامل ۸۰٪ موارد سیستیت و پیلونفریت بدون عارضه به *E. coli* نسبت داده می‌شود. سایر اوروپاتوژن‌هایی که شیوع کمتری دارند، شامل گونه‌های کلبسیلا، پروتئوس، انتروباکتر و انتروکوکسی است. در جدولی که مدت درمان را برحسب نوع عفونت ادراری توصیه می‌نماید انتروکوکسی را در موارد complicated UTI ، پروستاتیت و اپیدیدیمیت ذکر می‌کند. البته از مقاله Ronald هم به عنوان رفرانس نام می‌برد (اما نه در انتساب بیش از ۲۰ درصد عفونت به انتروکوکسی) (۳).

Ronald هم در مقاله خود ۸۰٪ عفونت‌های بدون عارضه و اکتسابی از جامعه را به *E. coli* و ۱۰٪ تا ۱۵٪ دیگر را به *Staphylococcus saprophyticus* نسبت می‌دهد. سپس از وجود انتروکوکسی در بیماران دیابتی نام می‌برد. درنتیجه‌گیری مربوط به عفونت بدون عارضه اضافه می‌کند: با آنکه اتیولوژی UTI ثابت باقی مانده، اما آگاهی از روند مقاومت محلی اکنون بخش لاینفک درمان تجربی موفق برای عفونت بدون عارضه است. سرانجام در انتهای مقاله اضافه می‌نماید : با آنکه در طول دهه‌های اخیر در اوروپاتوژن‌های غالب تغییرات حداقلی روی داده است، اما در الگوی مقاومت ضد میکروبی تغییرات معنی‌دار ایجاد شده است. (۴)

گزارش سیستم ملی مراقبت عفونت‌های بیمارستانی (NNIS ) در امریکا (۱۹۹۹-۱۹۹۰) هم به انواع عفونت‌ها به تفکیک انواع بخش‌های مراقبت ویژه می‌پردازد و عفونت‌های ادراری منتسب به انتروکوک را در مجموع برای این بخش‌ها ۱۳/۸ درصد اعلام می‌کند(۵).

با بیان آنچه گذشت ، یادآور می‌شود ۶۰ تا ۸۰٪ نمونه‌هایی که برای کشت ادرار به آزمایشگاه ارسال می‌شوند یا فاقد عامل اتیولوژیک عفونت هستند و یا حاوی آلوده کننده‌ها می‌باشند(۶). بنابراین، این سئوال مطرح است که چگونه از ۶۰۰ نمونه ادرار۱۱۴ (۱۹٪) سویه انتروکوک جدا شده است؟ فراموش نکنیم که۸۰٪ یا بیشتر UTI بیمارستانی با کاتتر ادراری همراه است (۲و۷و ۸) در حالیکه درمقاله مورد

بحث، دربین ۶۰۰ نفر فقط ۵ نفر (۵/۳٪) سوند ادراری دارند. حال از۶۰۰ بیمار، که قطعا کشت تعدادی از آنها منفی است و فقط ۵/۳٪ کاتتر ادراری دارند ، چگونه میزان جداسازی انتروکوک ۱۹٪ است؟ با آنکه انتروکوکسی به عنوان عامل عفونت بیمارستانی شناخته شده، اما این یافته با کتاب‌های مرجع و نیز با مقاله‌ها، مطابقت ندارد. اشتباهات نمونه‌برداری یا درج نتایج را هم نباید از نظر دور داشت.لذا، نویسنده محترم "نامه به سردبیر" آگاهانه طرح موضوع نمودند.

ضمن تشکر از همکاران ارجمندی که مقاله ارزشمند فوق را به دفتر مجله ارسال نمودند ، یادآوری نکاتی چند ضروری است:

۱- طرح این مباحث از ارزش علمی مقاله مذکور و زحمتی که همکاران محترم نویسنده مقاله متقبل شده‌اند، به هیچ وجه نمی‌کاهد.

۲- در مقاله‌های میکروب‌شناسی بالینی، بکرات برخورد می‌شود که جامعه آماری، برای استنتاج کامل و صحیح، به روشنی معرفی نمی‌شود. پر واضح است که استنتاج در این نوع مقاله‌ها باید با وضعیت بالین مطابقت داشته باشد، و یا دلایل قانع کننده‌ای در اختلاف موجود ارائه شود .

۳-اصلح است که چالش علمی (که جزء لاینفک علم است)، در حیطه مجلات علمی مطرح شود، تا این مجلات هم به ایفای رسالت خود نائل شوند.

۴- در مجله میکروب‌شناسی پزشکی ، باید مطالب به صورتی درج شوند که قابل استناد مجامع پزشکی و همکاران بالینی باشند.

۵- سردبیری مجله خود را موظف دانست که عین متن نامه به سردبیر را در اختیار نویسنده محترم رابط مقاله مذکور قرار دهد، و پاسخ ایشان را هم در کنار نامه به سردبیر به قضاوت جامعه علمی میکروب‌شناسی محول نماید.

ضمن آرزوی موفقیت روزافزون برای نویسندگان محترم مقاله مورد بحث و نامه به سردبیر، امید است که این موضوع باب جدیدی باشد که مجله انجمن علمی میکرب‌شناسی ایران را به جایگاه واقعی و رسالت اصلی خود رهنمون سازد.

مسعود شریفی

سردبیر مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

1.Stamm WE. Urinary tract infections, Pyelpnephritis, and Prostatitis. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo Dl, Jameson Jl, Loscalzo J, eds. *Harrison's principles of internal medicine.* 17th ed. USA; McGrow Hill. 2008; PP:1820.

2.SoBel JD, Kaye D. Urinary tract infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases.* 6th ed. Philadelphia; Cherchil livingstone. 2005; PP: 875-903.

3. Nguyen HT. Bacterial infections of the genitourinary tract. In: Tanagho EA, McAninch JW, eds. *Smith's general urology.* 17th ed. USA; McGrow Hill. 2008;Pp:193-218

4.Ronald A: The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens**.** *Am J Med* 2002; **113**: 14S-19S.

5.National Nosocomial Infections Surveillance System: National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999, *Am J Infect Control* 1999; **27**: 520-532.

6.Forbes BA, Sahm DF, Weissfeid AS. *Bailey and Scott's Diagnostic microbiology* . 12th ed. China; Mosby , 2007; PP:848.

7.Sharifi M. Bacteriuria in catheterized patients of gynecology ward. *Arch Irn Med* 1999;**2** (4) 198-201.

8.Sharifi M. Catheter associated bacteriuria in neurosurgery ward at Ayatollah Taleghany Medical Center of Kermanshah. *Med J Tabriz University of Medical Sciences and Health services* 2001; **37** (51):45-51.

## 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: E-mail:

امضاء و تاریخ:

### 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

# A report on the epidemiology of extra-pulmonary tuberculosis in Shahriar district in, 2008-2009

**Valizadeh S[1], Memariani M *[2], Bigverdi R[3], Memariani H[4]**

**1)Shahriar Tuberculosis Center, Shahriar Public Health Network, Iran University of Medical Sciences, Shahriar, Iran**
**2) Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health , Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
**3) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
**4) Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran**

**Corresponding author :** Memariani M, Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health , Tehran University of Medical Sciences.
Mobail: 09124849859 E.mail : Memaryani@gmail.com

**ABSTRACT**
**Background and objectives:** *Mycobacterium tuberculosis* is usually associated with pulmonary infections. However, it may affect any organ other than lungs in one third of patients. This study was conducted to assess the epidemiology of extra-pulmonary tuberculosis in patients referred to Shahriar Tuberculosis Center.
**Materials and methods:** In this cross-sectional study, new cases of extra-pulmonary tuberculosis were evaluated using statistical analysis. All patients were registered from April 2008 to March 2009.
**Results:** Out of 127 patients with tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis was diagnosed in 41(32.3%) cases with the mean age of 35.9±16.4(SD).There were 16(39%) males and 25(61%) females. Of these patients, 73.2% were Iranian and the others were Afghani. The sites commonly involved were lymph nodes (29.3%), bones and joints (17.1%), pleura (9.8%) and gastrointestinal tract (9.8%) respectively. Moreover, one patient (2.4%) was co-infected with HIV.
**Conclusion:** Correct diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis is a major obstacle for medicine because it resembles many other infections. Hence, proper screening tests should be carried out.
**Keywords:** extra-pulmonary tuberculosis , epidemiology, Shahriar

# An investigation on the prevalence of hepatitis B and its comparison with the results obtained from opium and syphilis tests in men between 20-45 years old referring to Central Laboratory of Hasheminejad, Tehran, 2009

**Malekian Naeeni E[1*], Motevalli Bashi MR[2]**

**1) Iran University of Medical Sciences, Tehran West Health Center, Tehran, Iran**
**2)Tarbiat Moaalem University, Faculty of Psychology & Educational Science ,Karaj, Iran**

**Corresponding author** : Malekian Naeeni E, Iran University of Medical Sciences, Tehran West Health Center, Tehran, Iran .
Tel: +98-21-44096404 Mobail: 09124592242 E.mail : malekiyany@yahoo.com

**ABSTRACT**
**Background and objectives**: Hepatitis B virus is one of the most common and important agent of acute, chronic hepatitis, liver cirhhosis and hepato cellular carcinoma in the world. In Iran the rate of infection varies in different provinces.
The aim of this research was to study the prevalence of hepatitis B and its comparison with the results obtained from opium and syphilis tests in young men who want to get married in Tehran.
**Materials and Method**: The blood samples belonging to males (20-45 years old) referred to Hasheminejad Laboratory were collected and examined for HBs Ag levels by ELISA. Syphilis and opium were investigated by RPR and TLC tests respectively. The data were analyzed by chi-square and descriptive statistical tests.
**Result**: Among 1000 persons tested, 8(0.8%) cases were HBs Ag positive, 2(0.2%) cases were TLC positive and there was any positive result for RPR. There was any HBs Ag and opium positive in the same case.
**Conclusion**: According to the results obtained from our study, the rates of HBs Ag positive was less than expected rate. It is maybe due to prevention plans in our country.
**Keywords:** HBs Ag, HBV, opium, syphilis

# Frequency of Epstein Barr Virus in esophageal squamous cell carcinoma biopsies in Mazandaran and Golestan provinces in 2008

**Haghshenas MR[1*], Rafiei A[2], Zabihian F[3], Naghshvar F[4]**

**1) Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran**
**2) Molecular and Cellular Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran**
**3) Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran**
**4) Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran**

**Corresponding author :** Haghshenas MR, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences.
Tel: +98 -151- 2262586 E.mail: aghshenas2001@yahoo.com

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the most common malignancies in a few region of northern Iran (Mazandaran and Golestan). Epstein Bar Virus (EBV) infection is an important cause of many human malignancies including Burkett's lymphoma and Hodgkin's disease. EBV has also been associated with nasopharyngeal and gastric cancers. The aim of this study was to determine the prevalence of EBV in biopsy sections obtained from patients with ESCC in Mazandaran and Golestan provinces in 2008.

**Material and Method:** This was a cross-section descriptive study on 40 surgical specimens of clinically and pathologically confirmed esophageal cancer. DNA was extracted from paraffin-embedded blocks using a commercial DNA extraction kit. EBV-DNA was amplified by using EBV-sequence specific primers using polymerase chain reaction. DNA amplification product was revealed by electrophoresis on 1% agarose gel.

**Results:** The biopsy sections were belonged to 22 (55%) male and 18 (45%) female patients. We found EBV in 4 (10%) of 40 specimens. Three (13.2%) of 4 EBV-positive biopsies denoted to males and the only one (5.5%) was female.

**Conclusion:** Identification of EBV in 10% of esophageal cancer biopsies, might suggests a role of EBV in ESCC in Northern Iran.

**Keywords:** ESCC , EBV, PCR

# The study on the microbial level contamination of butter offered in Tehran in 2007

**Tofangsazan F[1*], Khomeiri M [1], Karim G [2], Hasani S[3], Seyfhashemi S [4]**

1) Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
2) Department of Food Health ,Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
3) Department of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
4) Faculty of Food Sciences and Technology, University of Applied Science and Technology, Tehran, Iran.

**Corresponding author** : Tofangsazan F, Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
Mobail : 09121484956 E.mail : fereshteh_eng@yahoo.com

## ABSTRACT

**Background and objectives:** Microbial contamination of butter out of the range of standard as other food products is a hazard for human health. In this research the microbial level contamination of butter marketed in north, centre and south of Tehran were studied.

**Materials and methods:** In this study, the existence of Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococus aureus*, Psychrotrophic bacteria and moulds in 48 samples of packed butter, collected from markets in three area of north, centre and south of Tehran were tested and measured according to the examination of Standard Institute of Iran.

**Results:** Of 41 butter samples**,** 31 (64.58%) were out of the acceptable level of the microbial contamination. The number of contaminated samples in north, centre and south of Tehran were as 9 (29%), 11 (35.5%) and 11(35.5%) respectively. The results of confirmation and IMViC tests of fecal Coliforms showed contamination of eight samples (16.66%) to *E. coli*, five samples (16.12%) to Citrobacter spp. and 18 samples (58.06%) to *Enterobacter* spp. *Staphylococus aureus* contamination was not observed in any samples. Besides, statistical analysis indicated that psychrotrophic bacteria were not out of the range of standard in any of samples. Three samples (6.25%) were contaminated to moulds that one and two samples were from centre and south of Tehran respectively.

**Conclusion:** The significant number of butter samples contained coliforms, which definitely are not suitable for consumption. More attention is needed to hygienic control of factories related to dairy products for food safety in the community.

**Keywords:** Butter, Tehran's Market, Conontamination , Micro orcanisms, Standard

# The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* in semen of infertile men

**Niakan M* , Moradi B, Ragheb SH**

**Depatment of Microbiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.**

**Corresponding author**: Niakan M, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
Tel: +98(21)88964792 Mobile : 09121014060 E.mail : niakan@shahed.ac.ir

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Infertility is one of the most important problems for every couple. Micoorganisms, in particular *Ureaplasma urealyticum*, are among the causative agents of infertility, although the correlation of this organism and infertility is not quite clear.
The aim of this study was to determine the prevalence of *Ureaplasma urealyticum* in semen of infertile men.

**Material and Method:** In this case- control study, presence of *Ureaplasma urealyticum* was investigated in 40 infertile patients referred to infertility clinic of Rooyan institute. The study group was compared to 40 normal men as a control case group. The prepared questionnaires were filled by both groups. Semen samples were taken and added to PPLO broth containing urea, antibiotics and necessary additives with pH 5.5 as transport medium, and sent to microbiology laboratory. The samples were cultured on PPLO agar then the grown colonies were studied by Dienes staining followed by standard identification tests. The information were analyzed with SPSS software by frequency, chi-square and T-test Method.

**Results:** The mean age of patient and control groups were $31.87 \pm 5.22$ and $31.45 \pm 5.81$ respectively. The rates of isolation of *Ureaplasma urealyticum* were 11(27.5%) in patients and 4 (10%) in normal controls, which the difference was statistically significant ($P < 0.045$).

**Conclusion:** We have shown a significant increase in *Ureaplasma urealyticum* infection in infertile men. The finding of this study reveals the significant correlation between infertility and *Ureaplasma urealyticum* infection in patients' group compared to healthy controls.

**Key Words:** Men infertility, *Ureaplasma urealyticum*, Culture

# The role of *rdxA* mutation in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* strains

**Kargar M[1], Baghernejad M [1], Doosti A[2]**

**1) Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom, Iran**
**2) Biotechnology Research Center, Shahrekord Azad University, Shahrekord, Iran**

**Corresponding author**: Kargar M, Islamic Azad University, Department of Microbiology.
Mobile:09173149203 E.mail : microkargar@gmail .com

**ABSTRACT**

**Background and objectives:** Metronidazole is a key component for treatment of peptic ulcer caused by *Helicobacter pylori* infection . The aim of this study was to determine the role of *rdxA* gene in metronidazole resistance in *H.pylori* strains isolated from Hajar hospital of Shahrekord, Iran .

**Materials and methods**: This cross-sectional study was done on 263 patient who referred to endoscopy department of Hajar hospital of Shahrekord on summer 2007. *H.pylori* was identified using gram stain, urease, catalase, oxidase tests and PCR method. Metronidazole Resistance was evaluated according to Standard Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Specific primers were used for detection of 200bp deletion in sensitive, semi-sensitive and resistance strains.

**Results:** Out of 84 isolated strains, 49 (58.33%) and 7 (%8.33) were resistant and semi-sensitive to metronidazole respectively. However 200bp deletion in *rdxA* gene was observed in only 2 strains .Statistical analysis indicated that there was no relation between metronidazole resistance, clinical criteria and *rdxA* gene deletion.

**Conclusion:** Regarding to low frequency of *rdxA* gene mutation observed in our survey, the study of other possible molecular mechanisms involved in resistance to metronidazole is recommended.

**Keywords:** *Helicobacter pylori* , Metronidazole resistance , *rdxA* gene

# Drug susceptibility pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains to first and second line drugs in Tabriz, Iran

**Roshdi Maleki M [1], Moaddab SR [2]**

**1) Department of Biology, Islamic Azad University, Malekan, Iran**
**2) Paramedical Faculty and Research Center for TB and Pulmonary Diseases, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran**

**Corresponding author**: Roshdi Maleki M, Malekan, Islamic Azad University, Department of Biology. East Azarbadjan. Mobail: 0914 320 0846 E.mail : Me2_roshdi@hotmail.com

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** The Number of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains have increased significantly since the chemotherapy started against TB. The incidence rates of MDR-TB in adjacent countries of Iran such as Azerbaijan has been reported in extremely high level. The referring patients from these countries to Tabriz research center for TB and pulmonary diseases have been raised the anxiety of contagion risk of drug-resistant TB. The aim of this study was to investigate the in vitro susceptibility of isolated *M. tuberculosis* strains to the first and some second line anti-tuberculosis drugs.

**Materials and Methods:** Initially, 103 *M. tuberculosis* strains were identified by conventional culture and biochemical tests. Then drug susceptibility of the strains were investigated by proportional method on Lowenstein – Jensen medium. H37Rv *M. tuberculosis* (susceptible to all drugs) was used as a control strain. The tested drugs were isoniazid, rifampin, ethambutol and streptomycin as first line anti-tuberculosis drugs, and amikacin, kanamycin, ofloxacin and ciprofloxacin as second line drugs.

**Results:** Thirteen out of 103 tested strains (12.6%), were resistant to kanamycin, two strains (1.9%) were resistant to ofloxacin, one strain (1%) was resistant to amikacin and one strain (1%) was resistant to ciprofloxacin. Among the first line drugs, the highest resistance was observed against streptomycin (7.8 %). Besides, the strains showed the highest level of resistance against kanamycin (12.6%). The rate of multidrug-resistant (MDR) strains was 2.9 % in present study.

**Conclusion:** The majority of strains were resistant to all first line drugs and the rate of MDR was low in this study. Among the first and second line drugs, the highest rates of resistance were observed against streptomycin and kanamycin respectively.

**Keywords***: Mycobacterium tuberculosis*, First line drugs, Second line drugs, Drug resistance

# Rapid molecular detection of *Bacillus anthracis* spores

**Parvin Sh , Ahmadi A , Poorali F, Karami A***

**Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran**

**Corresponding author** : Karami A, Molecular Biology Research Center, Baqyiatallah University of Medical Science.
Tel: +98-21-88040060 E.mail : Karami@bmsu.ac.ir

**ABSTRACT**

**Background and Objectives:** *Bacillus anthracis* as a spore-forming, aerobic, gram-positive bacterium is the causative agent of the anthrax disease. In recent years, it has been used in the bioterrorism attacks. Its spore is highly resistant to physical and chemical agents. For rapid detection of *B.anthracis* spore by molecular methods, it is necessary to extract genomic DNA by disrupting the spores. The aim of this study was rapid molecular detection of *B.anthracis* DNA by Multiplex PCR using rapid physical disruption of spore in a short time without extraction of the genome.

**Material and Method:** Genome of non-virulent strain of *B.anthracis* spores (Stern Vaccine strain) was extracted by Mini Bead Beater-8 system by using 0.1 mm glass beads in 5000 RPM. The sample was directly used for PCR. Multiplex PCR technique was used for detection of bacterial DNA using 3 pairs of primers. Amplified PCR products generated 3 fragments of DNA that were analyzed by agarose gel electrophoresis. Detection limit and specificity of the test were determined at different spore dilutions by using other bacterial strains belonging to the same genus.

**Results:** By this method, *B.anthracis* spores could be disrupted within 3 minutes, and detected with specific primers by Multiplex PCR method. PCR products of 1083bp, 385bp, 164bp were analyzed in %2 agarose gel. By Hind III restriction enzyme, larger PCR product (1083bp) was confirmed. Detection limit by CFU/ml method was determined by 1/512 dilution of suspension with 7680/ml spore or 7 spore/µl.

**Conclusions** : The results of optimization showed that the physical disruption method by glass bead and Bead Meal Homogenization has the proper speed of 3 minutes and there is no need for DNA extraction. By this method, we were able to rapidly disrupt, detect the spore of *B.anthracis* in samples specifically and with high sensitivity.

**Key Words:** Rapid detection- *Bacillus anthracis* - Spore - Multiplex PCR

# Detection of $bla_{CTX}$, $bla_{TEM}$ beta-lactamase genes in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from selected Tehran hospitals

**Shahcheraghi F [1], Akbari Shahmirzadi N [1], Abbasalipour Bashash M [1], Jabbari H [2], Amirmozafari N [3]**

**1) Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran**
**2) Center for Environmental Research(CER), Digestive Diseases Research Center (DDRC), HCV Research Group, Iranian Research Center for HIV/AIDS(IRCHA),Tehran University of Medical Sciences(TUMS), Tehran, Iran**
**3) Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**

**Corresponding author** : Shahcheraghi F, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran
Mobail : 09122972232 E.mail : shahcheraghifereshteh@yahoo.com

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Due to importance and prevalence of ESBL producing isolates in nosocomial infections, this study was undertaken with the aims to determine antibiotic susceptibility patterns, identification of ESBL producing isolates and detection of $bla_{CTX}$ , $bla_{TEM}$ of *Acinetobacter* spp in clinical isolates from selected Tehran hospitals.

**Material and Method:** Ninety five isolates of *Acinetobacter* were collected from Tehran's hospitals. Susceptibility patterns of various antibiotics and MIC for ceftazidime were determined by disk diffusion and microbroth dilution methods respectively based on CLSI protocols. The ESBL producers were screened by phenotypic confirmatory test. PCR was used for detection of $bla_{CTX}$ and $bla_{TEM}$ genes.

**Results:** The lowest and highest resistance rates to investigated antibiotics were seen against colistin (4.2%) and cefexime (100%) respectively. By using PCT, 18.9% of the isolates were ESBL positive. About 83.1 % of *Acinetobacter* isolates showed MIC $\geq$ 64 µg/ml to ceftazidime, however only 18.9% of isolates were ESBL producer. Based on the results from PCR technique,1.2% and 12.8% of the isolates were TEM and CTX positive respectively.

**Conclusion:** The rate of MIC to ceftazidime and presence of $bla_{TEM}$ and $bla_{CTX}$ among ceftazidime resistant isolates was very noteworthy in present study. Since less than one fifth of the isolates in present study were ESBL producer, it seems that apart from beta-lactamases, other resistance mechanisms such as efflux pumps and impermeability of the cell membrane may be responsible for this situation.

As resistance factors are located on mobile elements, identification and detection of strains producing these enzymes is important in preventing of the expansion of these isolates

**Keywords:** *Acinetobacter*, Antibiotic resistance, ESBL, CTX,TEM

# Table of Contents

## Bacteriology

**Detection of *bla*$_{CTX}$ ,*bla*$_{TEM}$ beta-lactamase genes in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from selected Tehran hospitals** **I**
Shahcheraghi F , Akbari Shahmirzadi N , Abbasalipour Bashash M, Jabbari H, Amirmozafari N

**Rapid molecular detection of *Bacillus anthracis* spores** **II**
Parvin Sh , Ahmadi A , Poorali F, Karami A

**Drug susceptibility pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains to first and second line drugs in Tabriz, Iran** **III**
Roshdi Maleki M , Moaddab SR

**The role of *rdxA* mutation in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* strains** **IV**
Kargar M , Baghernejad M , Doosti A

**The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* in semen of infertile men** **V**
Niakan M , Moradi B, Ragheb SH

## Food Microbiology

**The study on the microbial level contamination of butter offered in Tehran in 2007** **VI**
Tofangsazan F , Khomeiri M , Karim G , Hasani S , Seyfhashemi S

## Virology

**Frequency of Epstein Barr Virus in esophageal squamous cell carcinoma biopsies in Mazandaran and Golestan provinces in 2008** **VII**
Haghshenas MR , Rafiei A , Zabihian F , Naghshvar F

**An investigation on the prevalence of hepatitis B and its comparison with the results obtained from opium and syphilis tests in men between 20-45 years old referring to Central Laboratory of Hasheminejad, Tehran, 2009** **VIII**
Malekian Naeeni E , Motevalli Bashi MR

## Short communication

**A report on the epidemiology of extra-pulmonary tuberculosis in Shahriar district in, 2008-2009** **IX**
Valizadeh S , Memariani M , Bigverdi R , Memariani H

# In the name of God

**Iranian Journal of Medical Microbiology**
The official publication of the Iranian society of microbiology

**Volume 3, Number 1**
**Spring 2009**

ISSN: 1735 - 8612

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

**Owned and published by:**
Iranian Society of Microbiology
**Chairman:**
Gholam Reza Irajian Ph.D
**Editor in Chief:**
Massoud Sharifi Ph.D

**Executive Manager:**
Reza Ranjbar Ph.D
**Treasurer:**
Mohammad Niakan Ph.D
**Editorial Assistant:**
Azar dokht Khosravi Ph.D

**Editorial Bord:**
Abdollahi, Hamid Ph.D- Alborzi, Abdolvahhab MD
Amir Mozafari, Nor Ph.D- Ataee, Ramezan Ali Ph.D
Irajian, Gholam Reza Ph.D- Mehrabi Tavana, Ali Ph.D
Niakan, Mohammad Ph.D- Rahbar, Mohammad Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D- Sharifi, Massoud Ph.D
Tabaraie, Bahman Ph.D- Taheri Kalani, Morovat Ph.D

**Consultants of this Issue:**
Eslami, Gita Ph.D- Farshad, Shohreh Ph.D
Fatholahzadeh, Bahram Ph.D- Ghaemi, Ezzat Allah Ph.D
Haghshenas, Mohammad Reza Ph.D- Irajian, Gholam Reza Ph.D
Khalili, Mohammad Bagher Ph.D- Khosravi, Azar Dokht Ph.D
Modarres, Shahab Ph.D- Mojtahedi, Ali Ph.D
Nahaee, Mohammad Reza Ph.D- Rahbar, Mohammad Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D- Salari, Mohammad Hosein Ph.D
Sharifi, Massoud Ph.D- Soltan Dallal, Mohammad Mehdi Ph.D
Tabaraie, Bahman Ph.D- Tadayon, Keyvan Ph.D
Zahraei Salehi, Taghi Ph.D

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

**Designer:**
Mina Arian
**Address:** P.O.Box: 14515-715, Tehran, Iran
**Telfax:** +98(21)88020916
**E-mail:** jmicrobiology@gmail.com
**Website:** www.ism.ir
**Cover design & Print:** Firooz Group