بسم الله الرحمن الرحیم

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

فصلنامه :
سال ۳، شماره ۴
زمستان 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 انگلیسی :
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 حجت احمدی ، دکتر فرشته افتخار
دکتر غلامرضا ایراجیان ، دکتر سعید بوذری
دکتر علی محمد بهروزی خواه، دکتر بهمن تبرائی
دکتر محمد رضا حق شناس ، دکتر رضا رنجبر
دکتر محمد رهبر، دکتر فرشته شاهچراغی
دکتر مسعود شریفی ، دکتر حشمت ا... طاهرخانی
دکتر شهره فرشاد ، دکتر پریسا فرنیا
دکتر محمد مهدی فیض آبادی ، دکتر پرویز کوخایی
دکتر علی مجتهدی ، دکتر مهدی محبعلی
دکتر شهاب مدرس ، دکتر مجتبی موسویان
دکتر محبوبه نادری نسب ، دکتر محمد رضا نهایی
دکتر سعید ولی زاده، دکتر رسول همکار

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

تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن متالو بتالاکتاماز bla-VIM در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان (۸۸-۱۳۷۸) ۱

حسین فاضلی، زهرا مصلحی تکانتپه ، غلامرضا ایراجیان، منصور صالحی

استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* ۹

آرزو طهمورث پور، رسول صالحی، روحا کسری کرمانشاهی ، گیلدا اسلامی

بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم TNF-α و IFN-γ به روش‌های ELISA و PCR-RFLP در بیماران مبتلا به سل ریوی و مقایسه آن با افراد سالم ۱۵

مهدیه بیات، جمیله نوروزی، پرویز پاکزاد، پریسا فرنیا ، صابر انوشه ، سید مهران مرعشیان، محمد ورهرام، مهدی کاظم پور، محمد رضا مسجدی، علی اکبر ولایتی

بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران مبتلا به سردردهای میگرنی ۲۴

مرتضی حسین زاده ، افرا خسروی ، ستار کیخاونی، سارا ملکشاهی ، رضا خراسانی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در مراکز آموزشی درمانی گرگان در سال ۸۸-۱۳۸۷ ۳۱

حمید واعظ ، کیومرث قاضی سعیدی ، عبدالوهاب مرادی، علیجان تبرایی ، بهناز خدابخشی، مسعود بازوری، نسترن گلریز ، عزت ا.. قائمی

عفونت های بیمارستانی

مقایسه فراوانی تولید آنزیم β-لاکتاماز و الگوی حساسیت باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح در بیمارستان فوق تخصصی الزهرا-اصفهان ۳۷

شیلا جلال پور، روحا کسری کرمانشاهی ، اشرف‌السادات نوحی ، حمید زرکش اصفهانی

ویروس شناسی

بررسی مولکولی فراوانی ویروس *هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۸ ۴۶

پیام قاسمی دهکردی، حسن ممتاز ، عباسعلی رضائیان ، رامین یعقوبی

تک یاخته شناسی

فرایند جداسازی دو ژن *wsp* و *16S rRNA* باکتری داخل سلولی ۵۳
***Wolbachia pipientis* در پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل بیماری لیشمانیوز**
جلدی نوع روستائی ایران
پرویز پرویزی، فرزانه فردید، عارف امیرخانی

واژه گزینی در میکروب شناسی

۶۱

فراخوان

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 ۵۵ تا ٦۲ .

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 ۵۰ تا ٦۱ .

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 (۲۵٤*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 ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۸-۱

تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن متالو بتالاکتاماز bla-VIM در سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان (۸۸-۱۳۷۸)

حسین فاضلی[۱] ، زهرا مصلحی تکانتپه[۲]، غلامرضا ایراجیان *[۲]، منصور صالحی[۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲)گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳) گروه ژنتیک دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نویسنده رابط: دکتر غلامرضا ایراجیان، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران
دورنگار: ۸۸۰۵۸۶۴۹ – ۰۲۱ girajian @ yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۶/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۹

چکیده:

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) عامل اصلی عفونت زخم‌های سوختگی است. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به داروهای ضد باکتریائی و به‌خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت آن دو چندان می‌شود. به‌علاوه، سویه‌های تولید کننده آنزیم متالوبتالاکتامازها در جهان رو به افزایش است. هدف از این مطالعه تعیین الگوی حساسیت دارویی و میزان شیوع سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده متالوبتالاکتاماز دربیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم (ع) اصفهان بود(۸۸-۱۳۷۸).

روش بررسی: از ۱۱۱ بیمار دچار سوختگی و بستری در بیمارستان امام موسی کاظم(ع) اصفهان در طی سال‌های۸۸-۱۳۷۸، ۷۹ سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شد. تست حساسیت داروئی با روش کربی- بائر انجام شد. در سویه‌های مقاوم به ایمیپنم تولید متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی (IPM-EDTA) تشخیص داده شد. با استفاده از فناوری PCR وجود ژن VIM بررسی گردید.

یافته ها: درصد مقاومت به داروهای ضد باکتریائی به شرح ذیل بود:ایمیپنم ۹۴/۹٪، پیپراسیلین ۹۷/۴٪، سیپروفلوکساسین ۹۸/۷٪، توبرامایسین ۹۵٪، سفتازیدیم و تیکارسیلین هر یک ۱۰۰ ٪. با روش IPM-EDTA، ۴۱ (۵۵/۸٪) سویه مقاوم به ایمیپنم، تولید کننده متالو بتالاکتاماز بودند. ۳۴ سویه (۴۳٪) حاوی ژن VIM بودند.

نتیجه گیری : نتایج نشان داد سویه‌های *P. aeruginosa* به سفتازیدیم وتیکارسیلین کاملا مقاوم و بیش از ۹۴٪ آنها به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. شیوع تولید متالو بتالاکتاماز در سویه‌های جدا شده بیش از انتظار است. بنابراین، تشخیص الگوی مقاومت داروئی این باکتری به‌خصوص تشخیص سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز در پیشگیری و کنترل عفونت‌های ناشی ار آن اهمیت زیادی دارد.

کلید واژه ها: متالو بتالاکتاماز، *P. aeruginosa*، آزمایش حساسیت داروئی ، ژن VIM، زخم سوختگی

مقدمه:

یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی و درمانی در بسیاری از نقاط دنیا ضایعات سوختگی می‌باشد. بیماران مبتلا به این ضایعات در معرض خطر عفونت‌های بیمارستانی هستند. زیرا، زخم‌های سوختگی مکان استقرار باکتری‌های فرصت طلب از جمله *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد. استفاده از روش‌های مراقبتی جدید موارد عفونت زخم‌های سوختگی را کاهش داده است. اما، هنوز امکان بروز عفونت های مرگبار در سوختگی‌های شدید به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه وجود دارد که عموماً باعث افزایش بیماری و مرگ و میر در سراسر دنیا می‌گردد(۱). به‌عنوان مثال، در ایالات متحده آمریکا سالیانه حدود ۱۰۰،۰۰۰ مورد ضایعه سوختگی شدید اتفاق می‌افتد که منجر به مرگ حدود ۵،۰۰۰ نفر می‌گردد (۲).

در بیماران با ضایعات سوختگی شدید عوامل اصلی دخیل در عفونت، تخریب پوست و همراه شدن آن با کاهش سطح دفاعی (سلولی و هومورال) به‌صورت موضعی و سیستمیک می‌باشد (۸-۳). محل سوختگی (سطحی یا عمقی)، به‌علت نکروز بافتی، محیط غنی از پروتئین است که جایگاه ویژه‌ای برای استقرار و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند(۱۳-۹). نکروز بافتی و تخریب عروق خونی محل، از حضور عوامل دفاعی و ترکیبات ضد میکروبی ممانعت به‌عمل می‌آورد (۱۰ و ۱۴).

P. aeruginosa و *Staphylococcus. aureus* مهم‌ترین و شایع‌ترین عواملی هستند که از عفونت زخم‌های سوختگی جدا می‌شوند. در مطالعه سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در هلند مشخص گردید که این دو باکتری به ترتیب ۳۷- ۲۷ درصد و ۳۰-۲۷ درصد عامل عفونت زخم بوده‌اند (۳) منبع *P.aeruginosa* عامل عفونت زخم‌های سوختگی ممکن است منشاء داخلی (دستگاه گوارش) یا محیطی داشته باشد (۱۵). در محیط بیمارستان سویه‌هایی از *P. aeruginosa* وجود دارند که دارای مقاومت چند گانه (Multi. Drug- resistant) هستند. این سویه‌ها از محیط و دست پرسنل جدا شده‌اند.

در مطالعات انجام شده در ایران مشخص شده که مقاومت چندگانه سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی به مرحله نگران کننده‌ای رسیده است. در مطالعاتی که در مرکز سوختگی توحید انجام شد مشخص گردید که فراوانی *P. aeruginosa* ، ۷۳/۹ ٪ می‌باشد. بیش از ۹۵ ٪ این سویه‌ها به جنتامایسین، کاربنی سیلین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتی زوکسیم و تتراسیکلین و بیش از ۹۰٪ به آمیکایسین و ۸۲ ٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۶) در مطالعه دیگر در ایران ۸۶/۶ ٪ سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران سوختگی به سفتی زوکسیم، ۸۶ ٪ به آزترونام، ۷۹/۸٪ به کاناماسین و ۱۵/۵ ٪ به ایمی پنم مقاوم بودند. به‌علاوه، از ۱۲۷ سویه مورد بررسی، ۲۴ سویه جدا شده از بیماران و یک سویه جدا شده از محیط MDR بودند (۱۷).

در بسیاری از کشورها مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* به ترکیبات بتالاکتام رو به افزایش است (۲ و ۱۸). برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به ترکیبات بتالاکتام، از کرباپنم‌ها (ایمیپنم – مروپنم) که نسبت به اثر اکثر بتالاکتامازها مقاوم می‌باشند، استفاده می‌شود(۱۹). اما، در سال‌های اخیر مقاومت به کرباپنم‌ها به‌ویژه در سویه‌های جدا شده از موارد بالینی گزارش شده است. این مقاومت به‌علت کاهش نفوذ دارو و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کرباپنم‌ها مثل متالو بتالاکتامازها (MBL) است (۲۰). متالوبتاکتامازها از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در گروه ۳ از طبقه بندی Bush و کلاس B از طبقه بندی Ambler قرار دارند. اعضاء کلاس B به سه زیر کلاس BI و BII و BIII تقسیم می‌شوند. در زیر کلاس BI ، بر اساس ساختمان مولکولی، چهار گروه IMP وSPM و VIM و GIM وجود دارد. متالو بتالاکتامازها در جایگاه فعال خود دارای روی (zn) می‌باشند و توسط شلاته کننده‌های فلزی از قبیل دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) مهار می‌شوند. ولی توسط مهار کننده‌های بتالاکتاماز مثل سولباکتام، تازوباکتام و یا کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.

آنزیم‌های متالو بتالاکتاماز اولین بار در سال ۱۹۸۸ از ژاپن گزارش شد. در حال حاضر سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالو بتالاکتاماز از سراسر دنیا گزارش می‌شوند. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتا لاکتام‌ها به جز مونوباکتام (آزترونام) هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون‌ها قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های پسودوموناس و باکتری‌ها دیگر از جمله انتروباکتریاسه را دارند (۲۱ و ۲۲و ۲۴)

P. aeruginosa یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی از جمله زخم‌های سوختگی است. از سوی دیگر تا کنون

ممانعت‌کننده‌ای برای این آنزیم شناخته نشده است و میزان شیوع سویه‌های *P. aeruginosa* حاوی ژن متالو بتالاکتامازها هم در حال افزایش است. لذا، تعیین الگوی مقاومت داروئی *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران و تعیین تولید متالو بتالاکتامازها جهت کنترل و درمان عفونت‌های بیمارستانی ضروری به‌نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر علاوه بر تعیین الگوی حساسیت داروئی سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران دچار سوختگی، تولید آنزیم متالو بتالاکتاماز و حضور ژن VIM هم با روش فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

سویه‌های باکتری: ۱۱۱ نمونه از زخم بیماران مبتلا به عفونت‌های سوختگی، بستری در بیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی‌کاظم (ع) اصفهان، طی سال‌های ۸۸-۱۳۸۷ جمع آوری شد. نمونه‌ها روی محیط-های آگار خوندار و EMB (Merck) کشت داده شد و با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی، سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* تعیین هویت گردید. سویه‌ها جهت آزمایشات بعدی در محیط مایع (Merck) Luria-Bertani حاوی ۳۰٪ گلیسرول در 80°- نگاهداری شد.

آزمایش حساسیت داروئی: برای تعیین الگوی مقاومت دارویی از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-baure) بر روی محیط مولر هینتون آگاراستفاده شد. آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده عبارت بودند از:ایمیپنم (I) (هایمدیا- هند) سفتازیدیم (CAZ) ، پیپراسیلین (PIP), سیپروفلوکساسین(CIP)، تیکارسیلین (TIC) وتوبرامایسین (NN)(پادتن طب- ایران). از سویه *پسودوموناس آئروژینوزای* ATCC:27853 به عنوان شاهد استفاده شد.

تولید متالوبتالاکتاماز: سویه‌های مقاوم به ایمیپنم (منطقه ممانعت <۱۶mm) جهت بررسی تولید متالو بتالاکتاماز (MBL) انتخاب شدند.

روش فنوتیپی **IPM-EDTA**: در این روش محلول نیم مولار EDTA (۱۸۶/۱گرم $disodiumEDTA.2H_2O$ در ۱۰۰۰میلی لیترآب مقطر) تهیه و pH محلول به‌وسیله NaOH در ۸ تنظیم گردید. محلول به وسیله اتوکلاو (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۵ پاوند براینچ مربع و به‌مدت ۱۵ دقیقه)استریل شد. µl ۷۵۰ از محلول EDTA روی دیسک ایمیپنم µg ۱۰ تلقیح شد تا دیسک IPM –EDTA به دست آمد(۲۳) .

چند کلنی خالص *پسودوموناس آئروژینوزا* به لوله حاوی محیط TSB (Trypticase Soy Broth) تلقیح شد و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کدورت محیط معادل استاندارد نیم مک فارلند (1×10^{8}) تنظیم شد. این محلول توسط سوآب استریل در سطح محیط مولر هینتون آگارکشت داده شد و دیسک‌های IPM-EDTA و IPM در سطح آگار قرار داده شد. افزایش منطقه ممانعت از رشد دیسک IPM-EDTA به مقدار ≥۷ mm نسبت به دیسک ایمیپنم به تنهایی به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شد(۲۳).

تعیین ژن متالوبتالاکتاماز: جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (Boiling)استفاده شد .به این منظور چندین کلنی خالص باکتری در۵ml محیط TSB تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. ۱/۵ml از محیط TSBدر لوله‌های اپندورف ریخته شد و در دور ۱۸۰۰۰ ×g به مدت ۵ دقیقه میکروفیوژ شد. مایع رویی کاملاً تخلیه و رسوب با حدود ۵۰۰µl آب مقطر دیونیزه به خوبی ورتکس گردید. محلول حاصل حدود ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرارگرفت. در پایان ۱۰ دقیقه دردور ۱۸۰۰۰ ×g میکروفیوژ شد. محلول رویی جهت انجام واکنش PCR به لوله‌های اپندورف جدید منتقل شد(۲۲).

PCR: واکنش PCR به منظور تکثیر DNA استخراج شده در حجم نهایی۲۵ µl به ترتیب زیرانجام شد: بافر PCR ۲/۵ µl ،کلرید منیزیوم ۲/۵mM ،مخلوط الیگونوکلئوتیدها ۰/۲mM، ۰/ ۲۵mM ازهر پرایمر، ۱۰۰ng DNA الگو ، آنزیم Taq polymerase 2U وتا حجم نهایی (۲۵ µl) آب مقطر.

برنامه PCRدر ۳۰ سیکل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به قرار ذیل انجام شد:

مرحله اولیه جدا سازی دو رشته در 94° سانتی‌گراد به مدت ۵دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته(Denaturing Step) در 94° سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing Step)در $56/5^{\circ}$ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف (Extension Step) در72° سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی(Final Extension Step) در دمای 72° سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه .

از آب مقطر به عنوان شاهد منفی و از سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* VIMمثبت(*P. aeruginosa* PO510 producing bla_{VIM-1}) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. (سویه شاهد از بخش میکروب‌شناسی انستیتوپاستور ایران دریافت گردید).

در این روش از یک جفت پرایمر اختصاصی مربوط به ژن blaVIM که محصول آن باندی به طول ۳۸۲bp می‌باشد (Metabion آلمان) استفاده گردید.(۲۳)

1) 5′-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3′
2) 5′-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG -3′

محصولات PCR توسط ژل آگارز ۵/ ۱درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز شد و سپس محصولات توسط نور UV مشاهده گردید .(۲۲)

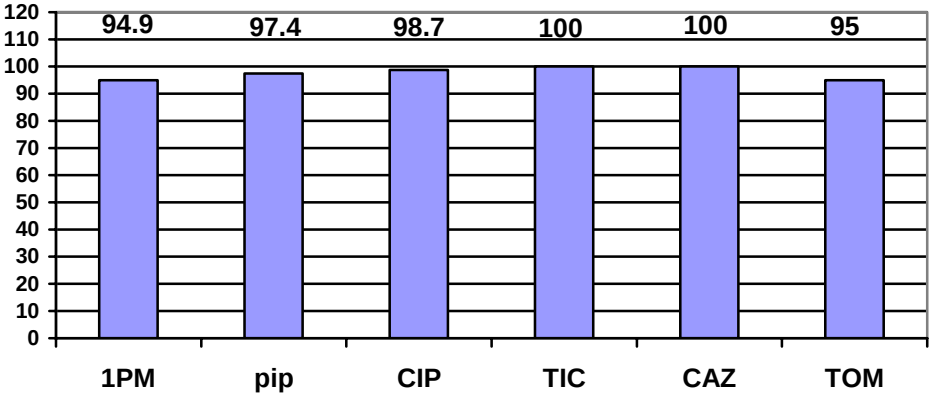
جهت پردازش اطلاعات از نرم افزار spss10 استفاده شد .

یافته‌ها:

از ۱۱۰ بیمارسوختگی ۴۸ نفر (۴۴٪) مرد و ۶۲ نفر (۵۶ ٪) زن بودند، که در بیمارستان بستری و درجه سوختگی آنها دو یا سه بود. دامنه سنی بیماران از یک تا ۶۰ سال متغیر بود. بیشترین بیماران در گروه سنی ۴۰- ۲۱سال (۵۸/۵٪) و کمترین آنها در گروه ۱۰-۱ سال (۱۰٪) قرار داشتند.

۱۱۱ نمونه زخم برداشت شد. از ۷۹(۷۱/۱ ٪) نمونه *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شد که شایع‌ترین ارگانیسم جدا شده از بیماران با عفونت سوختگی بود. از ۳۲ (۳۸/۹٪) نمونه دیگر، باکتری‌های دیگر جدا شدند.

درصد مقاومت داروئی سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در نمودار ۱ نمایش داده شده است; بالاترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم وتیکارسیلین (۱۰۰٪)وکمترین آن مربوط به ایمیپنم(۹۴/۹٪) بود.



نمودار ۱: درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا*

IPM: ایمیپنم — TIC: تیکارسیلین
PIP: پیپراسیلین — CAZ: سفتازیدیم
CIP: سیپروفلوکساسین — TOM: توبرامایسین

از ۷۴ سویه *پسودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به ایمیپنم، ۴۱ سویه(۵۵/۴٪) به روش IPM– EDTA،متالوبتالاکتاماز مثبت بودند.

تمام سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* (بدون در نظر گرفتن مقاومت به ایمیپنم)به منظور شناسایی ژن blaVim، PCR شدند. ۳۴ سویه (۴۳/۳٪) از نظر ژن VIMمثبت بود.

بحث:

در مطالعه حاضر ۷۱/۱ درصد نمونه‌ها واجد *P. aeruginosa* هستند. تمام سویه‌ها به سفتازیدیم وتیکارسیلین و بیش از ۹۴ درصد به ایمیپنم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم می‌باشند، که ۵۵/۴ درصد از آنها تولیدکننده متالو بتالاکتاماز هستند. در روش PCR ، ۴۳ درصد از تمام سویه‌ها حاوی ژن VIM می‌باشند.

سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالوبتالاکتاماز (معمولاً دارای مقاومت چندگانه) عامل عفونت‌هایی می‌باشند که درمان آنها مشکل‌زا است و منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. افزایش در طیف و تنوع متالو بتالاکتامازها در سویه‌های *P. aeruginosa* باعث محدودیت درمانی، حداقل در سه قاره (آسیا، اروپا و آمریکای جنوبی) گردیده است. این امر منجر به استفاده از رژیم‌های داروئی ترکیبی (استفاده از چند ترکیب ضد میکروبی) شده است. با توجه به اینکه سویه‌های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز به بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده مقاوم می‌باشند. لذا یا باید به فکر سنتز ترکیبات ضدمیکروبی قوی‌تر با مکانیسم عمل جدید بود و یا از داروهای قدیمی با سمیت زیاد مثل Polymyxin B یا Colistine استفاده نمود (۲۴) سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز مسئول بروز عفونت‌های بیمارستانی طولانی مدت و شدید می‌باشند(۲۵). در یک مطالعه مورد - شاهدی در ژاپن(۲۰۰۳)، مشخص شد میزان مرگ و میر در بیمارانی که با سویه‌های *P. aeruginosa* تولید کننده متالو بتالاکتاماز عفونی شده‌اند، نسبت به بیمارانی که با سویه‌های متالو بتالاکتاماز منفی عفونی شده‌اند، بیشتر است (۲۶)

در مطالعه حاضر تمام سویه‌ها به سفتازیدیم و تیکارسیلین و بیش از ۹۴ درصد به ایمیپنم، پیپراسیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم می‌باشند. الگوی مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* در مطالعه حاضر و مطالعات دیگر در ایران در جدول ۱ خلاصه شده‌است.

جدول ۱ :مقایسه مقاومت سویه‌های *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده در ایران از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۸ (۲۰۰۳-۲۰۰۹)

محققین	سال تحقیق	ایمیپنم	پیپراسیلین	سیپروفلوکساسین	سفتازیدیم	سفتی زوکسیم
عزیز ژاپنی و همکاران (۲۲)	۲۰۰۳	۶۷/۱	۱۴/۳	۲۷/۱	۱۵/۷	
خسروی و همکاران (۲۸)	۲۰۰۶	۴۱	۶۸		۸۳	
صادری و همکاران (۲۵)	۲۰۰۷	۳۸/۲		۴۹/۲۲	۷۴/۲	۸۵/۱۶
شاهچراغی و همکاران (در دست چاپ)	۲۰۰۵-۲۰۰۷	۱۲/۴				
میر صالحیان و همکاران (۲۸)	۲۰۰۸	۶۳	۷۰	۸۳	۸۵	
سلیمی و همکاران (۱۷)	۲۰۰۸	۳۰/۲	۳۴/۱		۷۵/۲	۸۶/۸
مطالعه حاضر	۲۰۰۹	۹۴/۹	۹۷/۴	۹۸/۷	۱۰۰	

روند این مطالعات در کل افزایش میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. ولی این افزایش دارای نوساناتی، از جمله در مورد ایمیپنم است. با توجه به اینکه در همه مطالعات از روش انتشار دیسک استفاده شده است. علت این نوسانات می‌تواند؛ تفاوت مقاومت در مناطق مختلف، نوع عفونت، و یا نوع دیسک‌های مورد استفاده باشد. اما در کل این موضوع تأمل برانگیز است و بیشتر باید مورد بررسی و تعمق قرار گیرد.

در مطالعه حاضر میزان مقاومت افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد که علت آن می‌تواند؛ بستری شدن بیماران در مرکز سوختگی در یک منطقه خاص (اصفهان) باشد که بیماران از سایر شهرهای استان نیز به آن ارجاع شوند و نیز می‌تواند نشان دهنده شیوع مقاومت در میان سویه‌های *P. aeruginosa* بیمارستانی باشد.

در مطالعه حاضر جهت غربالگری سویه‌های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز از روش IPM-EDTA استفاده شد. مشخص گردید که ۵۵/۴ درصد سویه‌های مقاوم به ایمیپنم، تولید کننده متالو بتالاکتاماز می‌باشند. در مطالعه خسروی و همکاران با روش E-test در سال ۲۰۰۷ این میزان ۱۹/۵۱ درصد (۲۹) و در مطالعه صادری و همکاران که با روش CAZ-EDTA انجام شد ۶۳/۳ درصد می‌باشد(۲۵). در مطالعه شاهچراغی و همکاران(۳۱) این میزان ۷۲ درصد است. در فرانسه (۲۰۰۴) با روش IPM-EDTA میزان ۴۶ درصد (۳۰) و در کشور کره ۳۱ درصد گزارش گردیده است (۳۰). نتایج مطالعه حاضر با مطالعه صادری و همکاران در تهران (۲۵) تقریباً مشابه می‌باشد، ولی با مطالعه شاهچراغی (۳۱) متفاوت است. علت آن می‌تواند استفاده از روش E-test یا Micro dilution باشد. نتایج این مطالعه با کشورهای دیگر نیز متفاوت است که علت آن می‌تواند استفاده از روش‌های متفاوت و تفاوت در میزان مقاومت در سایر نقاط جهان باشد.

فناوری PCR و استفاده از پرایمرای اختصاصی برای تشخیص ژن blaVIM نشان داد صرفنظر از مقاومت سویه‌ها به ایمیپنم، ۴۳ درصد حاوی ژن VIM هستند. از این تعداد ۶ سویه در روش فنوتیپی منفی بودند و ۱۴ سویه که با روش فنوتیپی تولید کننده متالو بتالاکتاماز بودند با روش PCR منفی بودند. در مورد اول شاید روش فنوتیپی بکار گرفته شده حساسیت کافی ندارد و در مورد دوم نیز شاید باکتری‌ها دارای ژنهایی غیر از VIM هستند و یا از مکانیسم‌های مقاومت دیگری استفاده می‌کنند.

در مطالعه شاهچراغی (۳۱) ۱۶ سویه (۲۳/۵درصد) با روش PCR متالو بتالاکتاماز مثبت بودند (حاوی ژن VIM) که ۱۲ سویه با روش فنوتیپی مثبت و ۴ سویه با روش فنوتیپی منفی بودند. این مطالعه بر روی سویه‌های جدا شده از عفونت های مختلف انجام شده است. در مطالعه خسروی۸ سویه (۱۹/۵۱٪) از سویه‌های *P. aeruginosa* جدا شده از زخم‌های سوختگی حاوی ژن VIM هستند. تمام سویه‌ها با E-text نیز تولید کننده متالو بتالاکتاماز می‌باشند(۲۹). در مطالعه حاضر میزان سویه‌های متالو بتالاکتاماز مثبت (فنوتیپی و ژنوتیپی) بیشتر از دو مطالعه فوق می‌باشد، که نشان دهنده افزایش میزان سویه‌های تولید کننده متالو بتالاکتاماز است.

نتیجه‌گیری:

مطالعه نشان داد سویه‌های *P. aeruginosa* مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. تولید متالو بتالاکتاماز در سویه‌های جدا شده از بیماران سوختگی پیش از انتظار شایع است.

به دلیل افزایش شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف درباکتری‌های گرم منفی به‌ویژه *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان‌ها و باتوجه به اینکه باکتری‌های مقاوم می‌توانند ژن‌های مقاومت را به سایر باسیل‌های گرم منفی، از جمله انتروباکتریاسه، انتقال دهند (۱۸)، طرحی نو جهت مبارزه با گسترش سویه‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز اهمیت فوری دارد. از این بین می‌توان به اقدامات تشخیصی در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها جهت جداسازی و تشخیص این سویه‌ها اشاره کرد .

تقدیر وتشکر:

از کارکنان محترم گروهای میکروب‌شناسی، ژنتیک و آزمایشگاه بیمارستان سوانح وسوختگی امام موسی کاظم(ع) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خصوص آقای دکتر بهرام نصر اصفهانی، آقای دکتر سروش نیا و خانم گیلدا امینی سپاسگذاری می‌گردد. از کارکنان محترم گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست مراجع:

1. Rastegar Lari A, laghehbandan A, Nosocomial infections in a Iranian burn care center. *Burns* 2000; **26**: 737-740.
2. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R, Burn wound infections *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**(2):403-34.
3. Bielecki A, Glik J, kawecki M, Martinsdos santos, VAP. Towards understanding *pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol lett* 2008; **30**: 777-790.
4. Alexander JW, Mechanism of immunologic suppression in burn injury. *J Trauma* 1990;**30**(12 Suppl): 70-5.
5. Griswold JA. White blood cell response to burn injury. *Semin Nephrol* 1993;**13**(4):409-15.
6. Hansbrough J. F, Field, Jr. T O, Gadd M A, Soderberg C. Immune response modulation after burn injury: T cells and antibodies. *J. Burn Care Rehabil* 1987; **8**:509–512.
7. Heideman M, Bengtsson A. The immunologic response to thermal injury. *World J Surg* 1992;**16**(1):53-6.
8. Lederer J. A, Rodrick M. L, Mannick J A. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock.* 1999;**11**:153–159.
9. Barret JP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Reconstr Surg* 2003;**111**(2):744-50.
10. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns* 2004;**30**(4):357-61.
11. Manson WL, Klasen HJ, Sauer EW, Olieman A. Selective intestinal decontamination for prevention of wound colonization in severely burned patients: a retrospective analysis. *Burns* 1992;**18**(2):98-102.
12. Manson WL, Pernot PC, Fidler V, Sauer EW, Klasen HJ. Colonization of burns and the duration of hospital stay of severely burned patients. *J Hosp Infect*. 1992;**22**(1):55-63.
13. Nasser S, Mabrouk A, Maher A. Colonization of burn wounds in Ain Shams University Burn Unit. *Burns* 2003;**29**(3):229-33.
14. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues* 2002;**13**(3):382-97.
15. Altoparlaku, Erols, Akcay MN, Celebi F, Kadanali A. The time-related changes of antimicrobial ressitancc patterns and predominant bacterial profiles of burn woundsawski, and body flora of burned patients. *Burns* 2004; **30**(7): 660-664.
16. Rastegar LA, Bahrami, H H, and Alaghehbandan, R. Pseudomonas infection in Tohid Burn center, Iran. *Burns*.1998;**24**: 637-641.
17. Salami H, owlia P, Yakhchali B, Rastegar lari A. Drug susceptibility and molecular epidemiology of *pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn unit. J infect Dis 2009;**5**(4): 308-313.
18. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns* 2006; 32: 343-7.
19. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for Differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(10):4623-9.
20. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, and et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2909-13.
21. Anne merie Queenan and Karen Bush. carbapenemases: the versatile B-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; **20**(3): 440 – 458.
22. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;**43**(7):3129-35.
23. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2002;**40**(10):3798-3801.
24. Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zorawski M, Olszanska D, Tryniszewska E. Metall0- B-Lactamases of *psoudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to B-lactam antibiotics. *Folia Histochemica et cytobiologica* 2008;**46**(2): 137-142.
25. Saderi H, Karimi Z, Owlia P, Bahar A A, Akhavi Rad S M B. Phenotypic Detection of Metallo- beta- lactamase producing

pseudomonas aeruginosa strain Isolated from Burned patients. *Iran J path*ol 2008;**3**(1): 20-24.

26.Hirajata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- B-lactamase producing *paseudomonas aeruginosa. Clin infect Dis*. 2003;**37**: 26-32.

۲۷. میر صالحیان ا ,فیض آبادی م, اکبری نخجوانی ف, جبل عاملی ف, گلی ح. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در بیماران سوختگی . *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران* .مرداد۱۳۸۷ دوره۶۶ شماره۵:صص ۳۳۳ تا۳۳۷.

28. Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 ;**60**(1):125-8.

29. Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gondoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y ,*et al*.Virulence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* In vitro.*Antimicrob.Agents Chemothe*r 2004;**48**:1876-1878.

30.Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm*?. Clin Microbiol Rev* 2005;**18**(2):306-25.

31.Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization 0f metallo – beta- lactamase producing strains of *pseudomonas aeruginosa* in Teharan. Iran. *New microbiologyica* (in press).

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۱۴- ۹

استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*

آرزو طهمورث پور[۱*]، رسول صالحی[۲] ، روحا کسری کرمانشاهی[۳] ، گیلدا اسلامی [۴]

۱) گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد خوراسگان اصفهان
۲) گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پایه پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه الزهرا تهران
۴) گروه انگل شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
نویسنده رابط: آرزو طهمورث پور، گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد خوراسگان اصفهان
تلفن:۰۳۱۱-۶۲۷۸۳۱۴ arezootahmourespour@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۷/۵ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب جهت reverse transcriptas PCR ، هیبریدیزاسیون در نورترن بلاتینگ و آنالیز بیان ژن با Real Time PCR از اهمیت بسیاری برخوردار است. در بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی محلول و غیر محلول تولید شده مانع استخراج RNA می‌شوند. لذا، بدون کاربرد روش مناسب برای حذف این پلی‌ساکاریدهاروش‌های مولکولی مبتنی بر RNA برای این باکتری‌ها مقدور نیست. هدف از این مطالعه استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* بود.

روش بررسی: برای استخراج RNA از سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم، *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و یک سویه *استرپتوکوکوس موتانس* جداسازی شده از پلاک دندانی استفاده شد. پس از تشکیل بیوفیلم در پلیت‌های میکروتیتر پلی استیرنی ۲۴ خانه‌ای استخراج RNA با ۳ روش انجام شد. ۱ : روش معمول استخراج RNA از سلول‌های پلانکتونیک با محلول RNX-Plus (سیناژن). ۲: کیت و دستگاه HYBAID Ribolyser و لوله‌های حاوی انواع دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی به منظور لیز بهتر سلول‌ها. ۳: تلفیقی از دو روش محلول RNX-Plus ، دستگاه HYBAID Rybolyser و لوله‌های حاوی انواع دانه. میانگین نسبت جذب نوری در ۲۸۰/ ۲۶۰نانومتر هر روش با نرم افزار excel و برآورد فاصله اطمینان توافقی از خطای استاندارد مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد روش معمول برای استخراج RNA (روش ۱) از سلول‌های پلانکتونیک مناسب نیست. استفاده از دستگاه HYBAID ribolyser و لوله‌های حاوی دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی با شکل و اندازه متفاوت، حداکثر لیز سلولی رابدون آسیب به RNA ایجاد کرد. در روش‌های ۲و۳(دستگاه HYBAID ribolyser به تنهائی و همراه با محلول RNX-Plus) میانگین نسبت جذب نوری حاصل از RNA استخراج شده تفاوت معنی دار آماری با روش معمول (روش ۱) نشان داد($P<0.05$).

نتیجه گیری : فناوری‌های مناسب در حذف پلی ساکاریدها و ایجاد حداکثر لیز سلولی موثرتر از روش‌های معمول استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم است. اما، استفاده از دستگاه و محلول تجاری RNX plus (روش سوم) به دلیل استفاده از محلول‌های ارزان تر و قابل دسترس مناسب‌تر است.

کلید واژه ها: استخراج RNA, *استرپتوکوکوس موتانس* ، بیوفیلم

مقدمه:

اعضاء گروه *استرپتوکوکوس موتانس* به عنوان عمده‌ترین عوامل اتیولوژیک تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان شناخته شده‌اند (۳-۱). مطالعات بسیاری برای بررسی بیان ژن‌های باکتری‌ها در حالت پلانکتونیک انجام گرفته است. ولی از آنجا که سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم با همتای پلانکتونیک خود متفاوت می‌باشند، نیاز به انجام مطالعات جداگانه برای بررسی خصوصیات و بیان ژن‌های سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم می‌باشد(۴). برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن از فنآوری‌های متعددی می‌توان استفاده نمود که یکی از قابل اعتمادترین و حساس ترین آنها real-time PCR (qRT_PCR) quantitative reverse transcriptase می‌باشد. این روش نیاز به RNA با مقدار مناسب و خلوص بالا دارد. لذا، استخراج RNA با کمیت مناسب و کیفیت قابل قبول از اهمیت بسیاری برخوردار است(۵). تا کنون گزارشات متعددی مبنی بر استخراج RNA از سلول‌های *استرپتوکوکوس موتانس* در شرایط پلانکتونیک ارائه شده است. ولی استخراج RNA از سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از پیچیدگی بیشتری برخوردار است و با روش‌های معمول استخراج از سلول‌های پلانکتونیک قابل اجرا نمی‌باشد. زیرا پلی ساکاریدهای لوان و دکستران خارج سلولی تولید شده، که در اتصال و تشکیل بیوفیلم باکتری نقش دارند، با فرایندهای استخراج اسید نوکلئیک تداخل داشته و مانع خروج این ترکیبات از داخل سلول می‌گردند (۶). در مطالعات مختلف روش‌هایی که برای استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* استفاده شده‌اند بر پایه استفاده از محلول‌های هموژنیزه کننده گران‌قیمت، یا تجهیزات خاصی از جمله دستگاه‌هایی مثل سونیکاتورها و یا افزودن دانه‌های مختلف برای لیز بیشتر سلولی می‌باشد(۶). سونیکاتور با تولید امواج شدید در اثر انفجار حباب‌های داخلی باعث پراکنده شدن سلول‌های بیوفیلم و پلی ساکاریدهای موجود درماتریکس بیوفیلم می‌گردد. درنتیجه محلول هموژنی حاصل می‌شود که پس از شستشو به راحتی پلی ساکاریدها از آن خارج‌می‌گردند و استخراج RNA بهتر صورت می‌گیرد. به‌علاوه، برای حداکثر لیز سلولی محققین از دستگاه‌های دیگری چون Fast prep cell disrupter نیز استفاده نموده‌اند (۷). در این مطالعه روش‌های متعدد استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها:

آماده سازی سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*:

در این مطالعه از *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و یک سویه *استرپتوکوکوس موتانس* جداشده از پلاک دندانی استفاده شد.

برای تشکیل بیوفیلم، ۲۰ میکرولیتر از کشت شبانه استرپتوکوک در Brain Heart Infusion broth (BHI) به چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر پلی استیرنی ۲۴ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۲ ml از BHI براث تکمیل شده با ۱٪ سوکروز به چاهک‌ها اضافه شد و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی ۵٪ CO_2 به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری گردید. سپس محلول مواد غذایی و محیط کشت از چاهک‌ها خارج و هر چاهک با محلول بافر (PBS) شستشو داده شد تا سلول‌های غیر متصل و سلول‌های دارای اتصال ضعیف از چاهک خارج شوند. سپس محیط کشت تازه به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. دوباره محلول مواد غذایی خارج، چاهک‌ها شسته شد و سلول‌های بیوفیلم با ۲ ml از BHI براث حاوی ۱٪ سوکروز به مدت ۴ ساعت دیگر گرماگذاری گردید. سپس محلول خارج شد، چاهک‌ها شسته شد و سلول‌های بیوفیلم با کمک سواب استریل از ته میکروتیتر پلیت کنده و در PBS معلق شد. برای جدا شدن سلول‌ها از سواب، ورتکس کوتاهی انجام شد تا به صورت یکنواخت در PBS توزیع گردد (۷).

سلول‌ها در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد، و دو بار با PBS شسته شد. رسوب حاصله دوباره در PBS معلق و ورتکس شد تا هموژن و یکنواخت گردد.

استخراج **RNA** :

روش ۱:استفاده از محلول تجاری RNX-Plus (۸)

به طور خلاصه، ۱ ml از محلول RNX – Plus به۱۰۰ µl سوسپانسیون سلول‌ها اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به ازاء هر ml ۱از محلول فوق ۲۰۰ µl کلروفرم افزوده شد و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتریفوژ گردید. فاز رویی به دقت به میکروتیوب جدید انتقال یافت و هم حجم آن

ایزوپروپانل افزوده شد و ۱۵ دقیقه در ۴ درجه قرار داده شد. سپس ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتریفوژ گردید. مایع رویی خارج شد و رسوب حاصله با ۲۰۰ الی ۳۰۰ میکرولیتر از اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد. سپس الکل را باکمک سمپلر تاحد امکان خارج نموده و رسوب حاوی RNA خشک گردید. RNA استخراج شده مورد بررسی کمی (بررسی غلظت RNA با بیوفوتومتر) و کیفی (الکتروفورز) قرار گرفت(۹).

روش ۲ : استفاده از کیت و دستگاه HyBAID ribolyser و دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی با شکل واندازه‌های متفاوت.

به لوله ریبولایزر حاوی دانه‌ها ۵۰۰ µl ماده تثبیت کننده RNA، ۵۰۰ µl از فاز زیرین محلول فنل اسیدی و۱۰۰ µl کلروفرم ایزوآمیل الکل افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. از سوسپانسیون سلول‌ها در PBS (۱۰۰ mg ـ ۵۰ رسوب سلولی یا 10^9 سلول باکتری) ۲۰۰ µl به لوله ریبولایزر افزوده شد. لوله ریبولایزر با حفظ توازن و تعادل به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه HYBAID ribolyser قرار داده شد و سرعت دستگاه با درجه ۶ تنظیم شد. این دستگاه با سرعت بسیار زیاد لوله‌ها را درجهت های مختلف حرکت می‌دهد. در اثر این حرکت دانه‌های داخل لوله‌ها که ترکیبی از دانه‌های کروی و با شکل نامنظم و از جنس های شیشه ، سرامیک یا پلاستیک هستند باعث حداکثر لیز سلولی در کوتاه‌ترین زمان یعنی بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه می‌گردد. انرژی وارد شده در اثر این چرخش دمای لوله را به میزان ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد افزایش می‌دهد. این افزایش دما غیرفعال شدن نوکلئازها توسط دترجنت‌ها را تسهیل می‌کند ولی به RNA آسیبی نمی‌رساند. علاوه بر این افزایش دما کمک می‌کند که فنل داغ، به عنوان یک روش موثر شناخته شده در جداسازی RNA، استفاده گردد.

سپس لوله به مدت ۱ الی ۲ دقیقه روی یخ قرار می‌گیرد تا از گرمای آن کاسته شده و به دمای اتاق برسد.

محلول به میکروتیوب فاقد RNase انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید، تا فازها جدا شوند. سپس فاز رویی با دقت بدون برخورد با فاز میانی خارج و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. پس از افزودن ۳۰۰ µl کلروفرم-ایزوآمیل الکل، محلول فوق به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۲ دقیقه با سرعت بالا (۱۲۰۰۰ ×g) در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا دوباره فازها از یکدیگر جدا گردند. فاز رویی مجددا به میکروتیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله ۵۰۰ µl از محلول DEPC Isopropanol Percipitation Solution به محلول فوق اضافه شد. پس از ۱ الی ۲ دقیقه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا RNA رسوب نماید. رسوب حاصله قابل مشاهده بود. شستشوی RNA رسوب نموده، ۲ بار هر بار با ۲۵۰ میکرولیتر محلول نمکی اتانول ۷۵٪ انجام شد. الکل با کمک سمپلر خارج شد و رسوب خشک گردید. به رسوب کاملا خشک RNA ، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase (آب تیمار شده با DEPC) اضافه شد و به کمک چند بار پر و خالی کردن سمپلر کاملا حل گردید. برای حل شدن بهتر RNA، به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این حال RNA استخراج شده مورد بررسی کمی و کیفی قرار گرفت(Cat no. RY66050).

روش ۳ : استفاده از محلول تجاری RNX-Plus با استفاده از دستگاه HyBAID ribolyser و لوله حاوی دانه‌های شیشه و سرامیکی (تلفیقی از دو روش ۱و۲).

به لوله ریبولایزر حاوی دانه‌ها، ۱ml از RNX-Plus، ۵۰۰ µl و ۲۰۰µl کلروفرم افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۰۰ µl از سوسپانسیون سلول‌ها در PBS به لوله ریبولایزر افزوده شد. لوله ریبولایزر مطابق روش ۲ در دستگاه HYBAID ribolyser به مدت ۳۰ ثانیه با درجه ۶ قرار داده شد. این روش نیز علاوه بر افزایش دما کمک می‌کند که فنل اسیدی داغ موجود در محلول RNX-Plus به عنوان یک روش موثر شناخته شده در جداسازی RNA استفاده گردد. سپس لوله به مدت ۱ الی ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا دمای آن به دمای اتاق برسد.

محلول به میکروتیوب فاقد RNase انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید تا فازها جدا گردند. فاز رویی بدون برخورد با فاز میانی خارج و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. پس از افزودن ۳۰۰ µl کلروفرم به محلول فوق به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و سپس ۲ دقیقه با سرعت بالا(۱۲۰۰۰ ×g) در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. تا دوباره فازها از یکدیگر جدا گردند و فاز رویی به میکروتیوب جدید انتقال یافت. هم حجم محلول فوق ایزوپروپانل افزوده شد و پس از ۱ الی ۲ دقیقه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا

RNA رسوب نماید. RNA رسوب نموده با µl ۵۰۰ ازمحلول اتانول ۷۵٪ ۱ شستشو داده شد. الکل به‌وسیله سمپلر خارج و رسوب خشک گردید. به رسوب کاملا خشک RNA ، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase اضافه شد و با چند بار پر و خالی نمودن سمپلر حل گردید. در این حال RNA استخراج شده مورد بررسی کمی و کیفی قرار گرفت.

بررسی خلوص و تمامیت **RNA**:

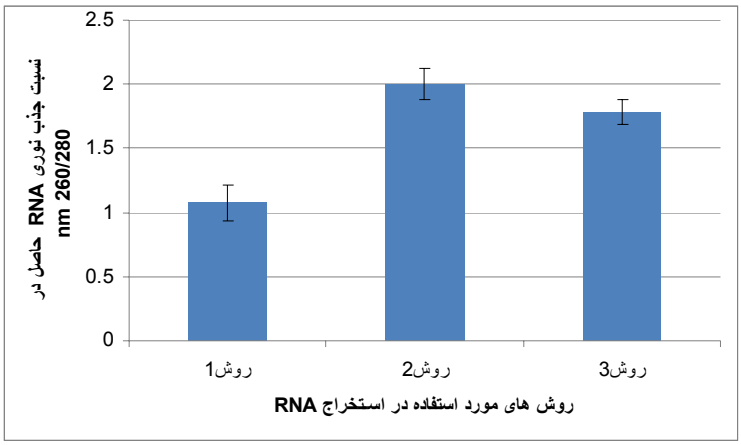
کمیت RNA استخراج شده با کمک دستگاه بیوفوتومتر اپندورف در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ و کیفیت آن با دستگاه الکتروفورز و مشاهده RNA استخراج شده بر ژل باکمک دستگاه ژل داکیومنتیشن مورد ارزیابی قرار گرفت(۹).

آنالیز آماری:

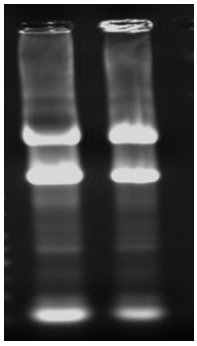
در این آزمایش سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و سویه جداسازی شده از پلاک دندان با قدرت بالایی در تشکیل بیوفیلم در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. مقایسه میانگین نسبت جذب نوری در ۲۶۰/۲۸۰نانومتر حاصل از هر روش با استفاده از نرم افزار excel و برآورد فاصله اطمینان توافقی از خطای استاندارد انجام شد.

یافته‌ها:

میانگین نسبت جذب نوری RNAهای استخراج شده با ۳ روش در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر در نمودار ۱ نشان داده شده است. بین روش‌های ۲ و۳ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج این دو روش با روش ۱ دارای تفاوت معنی دار بودند ($P < 0.05$). در شکل ۱ تصویر RNA استخراج شده به روش‌های ۲ و۳ ارائه شده است که از کیفیت مناسبی برخوردار می‌باشند.



نمودار۱ : میانگین نسبت جذب نوری حاصل از RNAهای استخراج شده از سویه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* در ۳ روش مورد استفاده



شکل ۱: RNA استخراج شده به روش‌های HyBAID ribolyser و HyBAID ribolyser با محلول تجاری RNX-Plus

بحث:

در این مطالعه ۳ روش استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم بررسی شدند. روش اول (روش معمول) برای سلول‌های پلانکتونیک استفاده می‌شود، روش دوم مطابق دستورالعمل کیت HYBAID ribolyser استفاده شد، و در روش سوم از تلفیق دو روش، یعنی به جای کیت، از محلول تجاری، ارزان و در دسترس RNX-Plus استفاده شد.

روش‌های معمول و موجود مورد استفاده برای استخراج RNA (مثل روش ۱) برای سلول‌های پلانکتونیک یا سلول‌های موجود در بافت‌ها و غیره طراحی شده‌اند. در حالی که استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم به کمک این روش‌ها نتایج خوب و قابل قبولی ندارد. زیرا تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی محلول و غیر محلولی که در تشکیل بیوفیلم مخصوصا بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*، برسطح دندان و نهایتا ایجاد پوسیدگی دندان و سایر بیماری‌های پریودنتال دخالت دارند، با فرایندهای استخراج RNA تداخل عمل دارند. از طرفی حضور مقادیر کم RNA استخراج شده همراه با مقدار زیاد مواد آلاینده از جمله همان پلی ساکاریدها در کیفیت روش‌های مولکولی مثل سنتز RT PCR – cDNA و هیبریدیزاسیون در نورترن بلاتینگ (۱۰) تاثیر می‌گذارد. لذا حذف این پلی ساکاریدها در مراحل استخراج RNA امری ضروری به نظر می‌رسد.

روش ۲ (کیت تجاری) در مقایسه با دو روش دیگر از قابلیت بالاتری برخوردار است. روش ۳ نیز کاملا قابل قبول است. چون در این روش از مواد ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر استفاده می‌شود از نظر اقتصادی نیز به صرفه‌تر می‌باشد.

تام و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای حداکثر لیز سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* به منظور استخراج RNA از گلوله‌های شیشه‌ای و دستگاهی به نام Fast Prep Cell Disrupter (Bio 101; Savant Instruments, Inc., NY, USA) استفاده نمودند و RNA با کیفیت مناسب به دست آوردند(۷).

کوری و همکار نیز در سال ۲۰۰۷ در تحقیق مشابهی به این نکته اشاره نمودند که برای حداکثر لیز سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* می‌توان از سونیکاسیون و افزودن دانه‌ها همراه با شستشوی مکرر استفاده نمود. استفاده از این روش‌ها باعث استخراج RNA با کمیت وکیفیت بهتری از روش‌های معمول موجود می‌گردد(۶).

در مطالعه حاضر نیز مشابه مطالعه کوری و همکاران، استفاده از دستگاه ریبولایزر به جای سونیکاتور باعث حصول محلول یکنواخت از سلول‌های پراکنده شده بیوفیلم و پلی ساکاریدهای پخش شده در محلول گردید. با شستشو در مراحل بعدی میزان پلی ساکاریدهای حذف شده بیشتر شد و استخراج RNA بهتر صورت گرفت. نتایج این دو روش (HyBAID ribolyser و HyBAID ribolyser با محلول تجاری RNX-Plus) با روش معمول تفاوت معنی‌دار دارند. بنابراین، بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان با استفاده از روش‌های ۲ و۳ به RNAی سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* با کمیت وکیفیت مناسب دست یافت.

نتیجه‌گیری:

روش سوم یعنی استفاده از دستگاه و محلول تجاری RNX plus به دلیل حصول RNA با کمیت و کیفیت مناسب از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* همچنین به دلیل استفاده از محلول‌های ارزان‌تر و قابل دسترس مناسب‌تر است.

فهرست مراجع:

1.Rosen R., Bachrach G., Bronshteyn M., Gedalia I., Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus, Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii and Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; **195**(2): 205–210.

2.Goodman S. D., Qian G. Characterization of the *gtfB* and *gtfC* Promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. Plasmid 2000; **43:** 85–98.

3.Loesche W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; **50**: 353–380.

4.Welin J. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2004: **70** (6): 3736-41.

5.Hunt M. Real time PCR. Microbiology and Immunology online. University of South Carolina School of Medicine. 2006; http://

pathmicro. med.SC. edu/ PCR/ real time – home. Htm. Accessed date

6.Cury J.A., Koo, H.. Extraction and purification of total RNA from *Streptococus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; **365**: 208-214.

7.Tam A., Shemesh, M., Wormser, U., Sintove, A., Steinberg, D. Effect of different iodine formulation on the expression and activity of *S.mutans* glucosilteransferase & fructosil - transferase in biofilm & planktonic environment. *J Antimicrob Chemother*. 2006; **57**:865-71.

8.Puissant C. and L. Houdebine. An improvement of the single method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate Phenol chloroform Extraction. Bio Techniques. 1991; **8**:148-149.

9.Sambrooke J., Frritsch EF., Manitis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. 2000. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold spring Harbor, N.Y. Chapter 7.PP:1-77

10. Wanqian L., Bochu W., Chuanren D., Biao L., A method for isolating functional RNA from callus of Dendrobium candidum contented rich polysaccharides, Colloids Surf. B Biointerfaces 2005; **42**: 259–262.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۲۳- ۱۵

بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم TNF-α و IFN-γ به روش‌های ELISA و PCR-RFLP در بیماران مبتلا به سل ریوی و مقایسه آن با افراد سالم

مهدیه بیات[1*]، جمیله نوروزی[1]، پرویز پاکزاد[1]، پریسا فرنیا[2]، صابر انوشه[2]، سید مهران مرعشیان[2]، محمد ورهرام[2]، مهدی کاظم پور[2]، محمد رضا مسجدی[2]، علی اکبر ولایتی[2]

۱)گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲)مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی(MRC)، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)،بیمارستان مسیح دانشوری، دارآباد، تهران
نویسنده رابط: مهدیه بیات، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
همراه: ۰۹۱۲۲۸۳۸۲۵۵ kavoshgroup597@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۴/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۸

چکیده:

زمینه و اهداف: مقاومت یا ایمنی سلولی در برابر عفونت توبرکولوز، بستگی به عملکرد لمفوسیت‌های T، که فعال کننده ماکروفاژهای از بین برنده مایکوباکتریوم‌های داخل سلولی‌اند، دارد. لمفوسیت‌های T از طریق ترشح شبکه‌ای از فاکتورهای محلول سایتوکاین‌ها، مسئول این روابط سلولی‌اند و طی سه دهه اخیر به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اولین رخداد عفونت در میزبان با یک پاتوژن، پاسخ ایمنی ذاتی است که شامل عملکرد سایتوکاین‌هایی همچون TNF-α و IFN-γ می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی موتاسیون‌های ژن TNF-α و IFN-γ به روش PCR-RFLP و اندازه گیری سطح سرمی این دو سایتوکاین در دو گروه شاهد و بیمار به روش ELISA و ارتباط آنها با بیماری سل ریوی بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی (case-control) ۹۳ بیمار مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت از بیمارستان مسیح دانشوری انتخاب شدند. گرده شاهد شامل ۱۰۳ فرد سالم، بدون هیچ سابقه به توبرکولوز بود. ژنوتیپ پنج ناحیه از TNF-α و یک ناحیه از IFN-γ با استفاده از روش PCR-RFLP شناسایی شد. میزان سطح سرمی این دو سایتوکاین با استفاده از روش ELISA بررسی شد. اطلاعات روش ELISA با آزمون Mann-Withney U بدست آمد. برای یافتن نقطه حد نصاب (cut off)از ROC curve استفاده شد. داده‌های روش PCR-RFLP با آزمون دقیق فیشر، تجزیه وتحلیل شد.

یافته ها: با روش PCR-RFLP، تفاوت معنی داری در دو منطقه TNF-308 وTNF-857 از نظر فراوانی موتاسیون میان دو گروه شاهد و مورد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روش ELISA تفاوت معنی داری میان دو گروه شاهد و مورد در باره IFN-γ وجود داشت ($P < 0.05$). یک نقطه حد نصاب (cut off) به عنوان مارکر سرولوژیک برای بررسی سریع‌تر توبرکولوز میان نقاط OD مثبت و منفی به دست آمد. این نقطه cut off برای IFN-γ ، ۱۹mg/dl/. بود.

نتیجه گیری : موتاسیون در دو نقطه ۸۵۷- و۳۰۸ - TNF-α به طور معنی دار دیده شد. این تفاوت در هیچ یک از نقاط دیگر TNF-α و IFN-γ مشاهده نشد. نتایج روش ELISA نشان داد پاتوژن‌های مایکوباکتریایی به تولید سایتوکاین‌هایی نظیر IFN-γ به‌طور فراوان وابسته هستند. تست‌های سرولوژیک، با توجه به نقطه حد نصاب (cut off) IFN-γ ، به بیماران کمک می‌کند تا در افراد توبرکولوز مثبت، نتایج سریع تر مورد شناسایی قرار گیرند.

کلید واژه ها: توبرکولوز، IFN-γ ، TNF-α، PCR-RFLP، ELISA

مقدمه:

بیماری سل، نمونه‌ای از عفونت با نوعی باسیل درون سلولی است که در آن، ایمنی حفاظتی و ازدیاد حساسیت پاتولوژیکی همراه با هم وجود دارند. ضایعات بافتی نیز به‌طور عمده در اثر پاسخ‌های ایمنولوژیک میزبان ایجاد می‌شود. بعد از آلوده شدن میزبان به *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*، بدن با ترشح سایتوکاین‌هایی از خود در مقابل این میکروارگانیسم به عنوان یک آنتی ژن، محافظت می‌کند. از جمله مهم‌ترین این سایتوکاین‌ها، می‌توان به TNF-α و IFN-γ اشاره کرد (۱و۲). بیماری سل، همچنان یکی از مشکلات بزرگ بهداشتی بسیاری ازکشورهای جهان است. مرگ و میر سالیانه بیش از ۳ میلیون از مجموع ۲۵ میلیون مسلول در جهان و مسلول شدن میلیون‌ها انسان در هر سال، برگ سیاهی در تاریخ تمدن بشری در قرن بیست‌ویکم است. در حال حاضر، یکی از مشکلات موجود در برنامه سل، حتی در برخی از کشورهای توسعه یافته، تاخیر در تشخیص می‌باشد(۲). حساسیت به این بیماری در میان افراد مختلف، متفاوت است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از عوامل میزبانی و به‌ویژه حساسیت ژنتیکی افراد به این بیماری باشد(۳). سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های ترشح شده از سلول‌های ایمنی ذاتی و سازشی (adaptive) هستند که بسیاری از اعمال این سلول‌ها را میانجی‌گری می‌کنند(۴). سایتوکاین‌هایی که در پاسخ به آنتی‌ژن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، در ایجاد التهاب و ایمنی دخالت دارند(۵). در واقع، TNF-α وIFN-γ در فرایند دفاع میزبانی در برابر عفونت‌های مایکوباکتریایی دارای نقش محوری می‌باشند(۲و۶).

با اندازه گیری سطح سرمی و همچنین ژنوتایپینگ TNF-α و IFN-γ با روش های ELISA وPCR- RFLP در تلاش هستیم تا با بررسی‌های انجام شده بتوانیم به طور قطع حضور و یا عدم حضور چشمگیر این سایتوکاین‌ها را در افراد بیمار و سالم تشخیص دهیم. لذا، هدف از این مطالعه، تعیین سطح سرمی دو سایتوکاین TNF-α وIFN-γ و همچنین تعیین ارتباط پلی مورفیسم آنها در جایگاه‌های مختلف از نظر ایجاد موتاسیون‌های ایجاد شده بود. تا بر این اساس، نقش این سایتوکاین‌ها بر کارآیی و قابلیت پاسخ‌های ایمنی در برابر عفونت *مایکو باکتریوم توبرکولوزیس* به عنوان عامل تشخیصی، شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها:

برای ارزیابی سایتوکاین‌های IFN-γ و TNF-α در بیماران مسلول و مقایسه آنها با افراد شاهد از دو روش PCR-RFLP و ELISA استفاده شد. طرح حاضر در قالب مورد - شاهدی (Case-Control) صورت گرفت. ۹۳ بیمار مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت از بیمارستان مسیح دانشوری انتخاب شدند. ۱۰۳ نفر شاهد سالم بدون هیچ سابقه‌ای از بیماری سل گروه شاهد را تشکیل دادند. سن متوسط بیماران مبتلا به سل ریوی ۵۰ سال و افراد شاهد ۳۹ سال بود. اطلاعات حاصل از روش ELISA با روش آماری Mann-Withney U به دست آمد. برای یافتن نقطه حد نصاب (cut off) از منحنی ROC استفاده گردید. همچنین اطلاعات حاصل از روش PCR-RFLP با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر، تجزیه و تحلیل شد.

به طور خلاصه مراحل کارPCR-RFLP به شرح ذیل بود :

۱- ۱۰میلی‌لیتر نمونه خون افراد مورد مطالعه جمع‌آوری شد. اطلاعات بیماران با استفاده از پرسشنامه (شامل نام و نام خانوادگی، جنسیت، سن، ملیت، شهرستان محل سکونت، آدرس و شماره تلفن محل سکونت، سابقه ابتلا به بیماری سل در خانواده و نزدیکان، زمان تشخیص بیماری، سابقه بستری و درمان و مشخصات پزشک معالج) جمع‌آوری گردید.

۲- ۳ تا ۵ میلی لیتر از نمونه خون به لوله فالکون حاوی ۲۰۰λ EDTA ۵٪ منتقل شد. این نمونه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور rpm ۱۳۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از جداسازی پلاسما، جهت انجام تست سرولوژی (ELISA) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. از باقیمانده محتوای لوله‌ها برای استخراج DNA ، با استفاده از روش فنل-کلروفرم ایزو آمیل الکل، استفاده شد.

۳- انجام PCR-RFLP که شامل مراحل:

الف- محاسبه مقادیر برای تهیه Master mix در روش PCR و انجام PCR که منجر به تهیه PCR Product گردید.

ب – انجام گرادیان MgCl2 و گرادیان دمایی برای تنظیم هر پرایمر در دستگاه PCR.

ج- الکتروفورز، مشاهده و آنالیز باندهای حاصل از محصول PCR.

د- هضم آنزیمی محصولات PCR.

ه- الکتروفورز ، مشاهده و آنالیز باندهای حاصل از هضم آنزیمی.

۴- انجام روش ELISA .

روش **PCR-RFLP** برای **IFN-γ-179**

در ابتدا گرادیان دمایی و گرادیان MgCl2 برای پرایمر ۱۷۹- به صورت جداگانه در دستگاه PCR تنظیم گردید.

در مورد IFN-γ ، برای بررسی پلی مورفیسم ناحیه ۱۷۹- ، ابتدا PCR با استفاده از جفت پرایمرهای

5'-ATCAAT GTG CTT TGT GAA TGAA-3′ و

5'-CCG AGA GAA TTA AGC CAA AGA - 3′

، انجام شد و قطعه تکثیر یافته که طولی در حدود ۴۶۱ bp داشت تحت تاثیر آنزیم *AvaII* قرار گرفت.

در مورد TNF-α ، برای بررسی پلی مورفیسم ناحیه ۳۰۸- ابتدا با استفاده از جفت پرایمر

5′-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3′ و5′-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3′ ، PCR انجام گردید و قطعه تکثیر یافته که طولی در حدود 107bp داشت تحت اثر آنزیم *Nco I* (با نام تجاری *Bsp 19 I*) قرار گرفت.

همچنین برای بررسی پلی مورفیسم در نواحی ۲۳۸- و ۲۴۴- با استفاده از جفت پرایمر

5'-CCT CAA GGA CTC AGC TTT CTG -3' و 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCA GATC-3' ناحیه مورد نظر تکثیر داده شد. قطعه بدست آمده که در حدود ۲۳۰bp می‌باشد، تحت اثر آنزیم‌های برش‌دهنده قرار گرفت. برای ناحیه ۲۳۸- از آنزیم *Bgl II* و برای ناحیه ۲۴۴- از آنزیم *Bsaj I* استفاده شد.

در ادامه پلی مورفیسم نواحی ۸۵۷- و ۸۶۳- مورد بررسی قرار گرفتند. به ترتیب، PCR با استفاده از جفت پرایمرهای

5'-GGC TCT GAG GAA TGG GTT AC-3' و

5'-CCT CTA CAT GGC CCT GTC TAC- 3'

5'-GGC TCT GAG GAA TGG GTT AC-3' و

5'-CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT ACG-3'

، انجام گرفت. قطعات تکثیر یافته به ترتیب دارای طولی در حدود ۱۲۷ bp و ۱۰۵ bp بودند که تحت اثر آنزیم *Tai I* قرار گرفتند. (نکته: برای تمام ژل‌ها از مارکر ۱۰۰bp استفاده شد و برای بررسی اثر آنزیم و مشاهده الگوی برش، همه نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز الکتروفروز شدند). البته ذکر این نکته ضروری است که در همه نواحی مورد بررسی واجد پلی مورفیسم، الگوی حاصل از هضم آنزیمی ممکن است به صورت هتروزیگوت یا هموزیگوت ظاهر شوند .

روش ELISA برای سنجش سطح سرمی **TNF-α** و **IFN-γ** در بیماران مسلول و مقایسه آنها با افراد شاهد از کیت‌های مربوطه (human kits IFN-γ & TNF-α) محصول کمپانی Bender med systems (استرالیا) ، استفاده گردید.

مراحل کار **ELISA** :

بر روی پلاسمای خون گروه مورد و شاهد ، مراحل ذیل به ترتیب انجام گرفت :

۱- نوارهای حاوی چاهک‌های کوچک با محلول شستشو دو بار مورد شستشو قرار گرفت.

۲- محلول استاندارد طبق دستور العمل آماده گردید.

۳- ۱۰۰µl از sample diluents به تمام چاهک‌های ردیف مخصوص استاندارد اضافه شد.

۴- ۱۰۰µl از محلول استاندارد به اولین چاهک استاندارد اضافه شد. سپس با روش تیتراسیون به ترتیب ۱۰۰µl از اولین چاهک به دومین چاهک و به همین ترتیب تا آخرین چاهک اضافه شد. ۱۰۰µl آخرین چاهک خارج گردید.

۵- ۱۰۰µl از sample diluents به چاهک بلانک اضافه شد.

۶- ۵۰µl از sample diluents به چاهک‌های نمونه‌ها اضافه گردید.

۷- ۵۰µl از نمونه های سرم به چاهک های نمونه‌ها اضافه شد.

۸- محلولBiotin-conjugate (به عنوان آنزیم کونژوگه) آماده شد و به اندازه ۵۰µl به همه چاهک‌ها اضافه گردید..

۹- روی نوارها با فیلم مخصوص پوشانده شد، و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۱۰- محلول‌های درون چاهک‌ها خالی شد، و سه مرتبه مجدداً شستشو داده شد.

۱۱- محلول streptavidin-HRP (به عنوان آنزیم دوم) آماده گردید و به میزان ۱۰۰µl به همه چاهک‌ها اضافه شد.

۱۲- روی چاهک‌ها با فیلم مخصوص پوشانده شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۱۳- محلول های درون چاهک‌ها خالی شد و مانند مرحله قبل، سه مرتبه شستشو داده شد.

۱۴- ۱۰۰µl از سوبسترای TMB (به عنوان رنگزا) به همه چاهک‌ها اضافه گردید.

۱۵- نوارها برای مدت ۱۰ دقیقه در انکوبه شیکردار (این مرحله در تاریکی انجام شد) نگهداری شد.

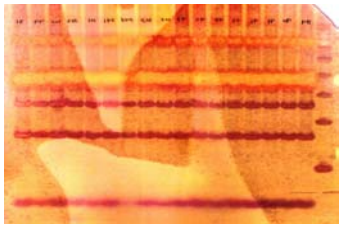
۱۶- ۱۰۰µl از محلول متوقف کننده (Stop solution) به همه چاهک‌ها اضافه گردید.

۱۷- بلافاصله پلیت را در دستگاه ELISA-reader قرار داده شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر، ODها قرائت شدند.

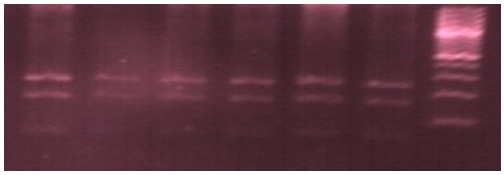
یافته‌ها:

نتایج مربوط به PCR

در مورد IFN-γ، در صورتی که ناحیه ۱۷۹- دارای نوکلئوتید G باشد در سه ناحیه برش می‌خورد و در صورتی که در این ناحیه، نوکلئوتید T مستقر باشد در دو ناحیه برش خواهد خورد. پس از هضم محصول PCR با آنزیم *AvaII*، ۴ نوع باند مشاهده گردید: (bp ۴۰۱, ۲۴۲bp، bp ۱۵۹ وbp ۶۰). اگر باندهای bp ۲۴۲، bp ۱۵۹و bp ۶۰ ایجاد شود نشان دهنده موتاسیون G و اگر باندهای bp ۴۰۱ و bp۶۰ ایجاد شود نشان دهنده موتاسیونT است. ایجاد سه باند ۶۰ و ۱۵۹ وbp ۲۴۲ ای نشان دهنده موتاسیون G می‌باشد . برای مثال، یکی از اشکال حاصل از هضم آنزیمی IFN-γ روی هر دو نوع ژل آگاروز و پلی آکریل آمید نشان داده شده است. هضم آنزیمی محصول PCR ژن ۱۷۹- IFN-γ روی ژل پلی آکریل آمید (شکل ۱- الف) وروی ژل آگاروز ۳٪ (شکل ۱- ب) نشان می‌دهد که مشاهده باندها روی ژل پلی آکریل آمید دقیق‌تر و واضح‌تر است.



الف)



ب)

شکل۱: الف) هضم INF-γ ناحیه ۱۷۹- روی ژل پلی آکریل آمید . ب) همین هضم را روی ژل آگاروز ۳٪ نشان می‌دهد که پس از هضم با آنزیم *AvaII* ، ایجاد سه باند روی مکان‌های ٦٠ و ١٥٩ و bp ٢٤٢ کرده است. این باندها گویای ژنوتیپ هموزیگوت GG می‌باشند. باند اول نشان دهنده مارکر ۱۰۰bp است.

در مورد ناحیه ۳۰۸- از TNF-α در صورتی که این ناحیه واجد نوکلئوتید G باشد برش می‌خورد، اما در صورت وجود نوکلئوتید A برش نخواهد خورد. در صورتی که قطعه مورد نظر برش خورده باشد دو قطعه bp ۲۰ و bp ۸۷ قابل مشاهده خواهند شد.

در صورتی که ناحیه ۲۴۴- و۲۳۸- واجد نوکلئوتید G باشند برش خورده و در صورتی که دارای نوکلئوتید A باشد برش نخواهد خورد .

اما در مورد ناحیه ۸۵۷- از TNF-α ، در صورتی که نوکلئوتید C مستقر باشد برش خورده و در صورت وجود نوکلئوتید T برش نخواهد خورد .در صورتی که در ناحیه ۸۶۳- نوکلئوتید C موجود باشد برش نخورده ولی اگر A وجود داشته باشد برش می‌خورد .

در آنالیز ژنوتایپینگ پلی مورفیسم IFN-γ در ناحیه ۱۷۹- ، همه آلل‌ها به صورت هموزیگوت در آمده‌اند. بنابراین، هیچ گونه موتاسیونی در این ناحیه رخ نداده است، و نمی‌توان به عنوان عامل تشخیصی روی این نوع پرایمر کار کرد. در مورد پرایمرهای TNF-α، پرایمرهای ۳۰۸- و ۸۵۷- دارای ارزش تشخیصی بودند($p<0.05$). پرایمرهای ۸۶۳- و ۲۳۸- دارای ارزش تشخیصی نبودند($p>0.05$). در مورد پرایمر۲۴۴- از TNF-α نیز به دلیل اینکه همه پرایمرها هموزیگوت بودند نمی‌توان از آن به عنوان عامل تشخیصی استفاده کرد(جدول ۱).

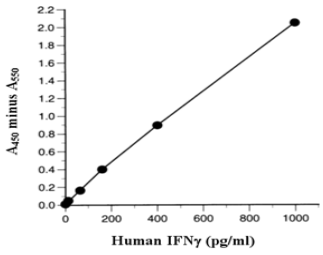
جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتایپینگ مناطق مختلف ژن‌های TNF-α و IFN-γ با روش PCR-RFLP

	ژنوتیپ سایتوکاین	مورد:۹۳N		شاهد:۱۰۳N		P Value
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
IFNγ-179 GG/TT	GG	۹۳	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۰	P>0.05
TNFα-308 AA/GG	GA	۹	۹/۷	۱۶	۱۵/۵	**P<0.05**
	GG	۸۴	۹۰/۳	۸۷	۸۴/۵	
TNFα-238 AA/AG	GG	۶۸	۷۳/۱	۹۸	۹۵/۱	P>0.05
	AG	۷	۷/۵	۵	۴/۹	
	AA	۱۸	۱۹/۴	۰	۰	
TNFα-244 GG/AA	GG	۹۳	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۰	……..
TNFα-863 AC/AA	AA	۳	۳/۲	۰	۰	P>0.05
	CA	۲۱	۲۲/۶	۲۹	۲۸/۲	
	CC	۶۹	۷۴/۲	۷۴	۷۱/۸	
TNFα-857 CC/TT	CC	۵۱	۵۴/۸	۸۳	۸۰/۶	P<0.05
	TC	۴۱	۴۴/۱	۱۸	۱۷/۵	
	TT	۰	۰	۲	۱/۹	

با توجه به میزان فراوانی ایجاد موتاسیون در ژنوتایپ‌های مناطق مختلف در TNF-α و IFN-γ ، تنها در منطقه ۳۰۸- و ۸۵۷- از TNF-α ، تفاوت معنی داری از نظر ایجاد موتاسیون وجود دارد. بنابراین، این دو منطقه می‌توانند از نظر بالا بردن قابلیت ابتلا به بیماری سل حائز اهمیت باشند. در ناحیه ۱۷۹- ژن IFN-γ و نواحی ۲۳۸- ، ۲۴۴- ، ۸۶۳- در ژن TNF-α یا موتاسیون رخ نداده و یا درصد فراوانی آن کم و بی معنی است. به همین دلیل این دو منطقه در بالا بردن قابلیت ابتلا به بیماری سل نمی‌توانند حائز اهمیت باشند.

نتایج مربوط به ELISA

پس از اندازه‌گیری سطح غلظت سایتوکاین‌های ذکرشده با استفاده از منحنی ذیل، ODها را روی محور غلظت عمود کرده و غلظت مربوط به هر OD بر حسب pg/ml (پیکو گرم بر میلی لیتر) به دست آمد.

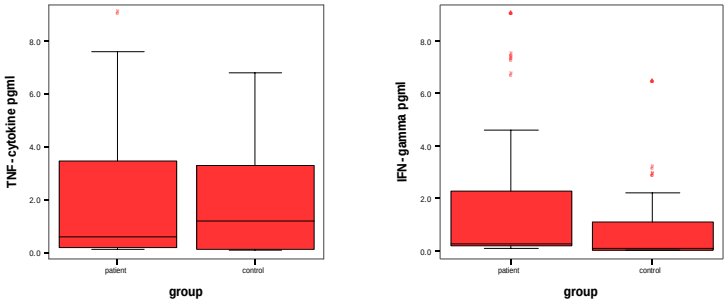


در نمونه‌های پلاسمای مورد آزمایش، در مورد TNF-α هیچ همبستگی بین دو گروه شاهد و مورد وجود نداشت. در IFN-γ بین دو گروه شاهد و مورد همبستگی مشاهده گردید (جدول ۲) و (نمودار۱ – الف).

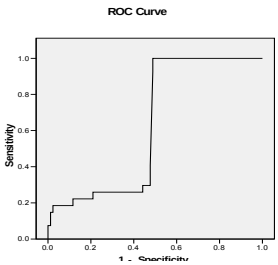
با توجه به اختلاف معنی‌داری که در بین گروه‌های شاهد و مورد در سایتوکین IFN-γ مشاهده شد یک نقطه حد نصاب (cut off) در آن بررسی شد، تا بتوان از آن به عنوان یک عامل سرولوژیک برای تشخیص سریع بیماری سل استفاده کرد (نمودار ۱– ب).

جدول۲: میانگین سطح سرمی IFN-γ و TNF-α در بیماران مبتلا به سل ریوی و گروه شاهد

control					case					
Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum	Mean	
۲/۱	۰/۱	۱/۲	۶/۸	۱/۹	۲/۰	۰/۱	۱/۰	۷/۰	۲/۰	αTNF-cytokine level
۰/۹	۰	۰/۱	۶/۴	۰/۶	۲/۰	۰/۱	۰/۴	۷/۴	۱/۶	IFN- γ cytokine level



الف



ب

نمودار ۱: الف)میزان همبستگی IFN-γ و TNF-α در دو گروه شاهد و بیمار. همبستگی در IFN-γ وجود دارد، در مورد TNF-α مشاهده نمی شود. ب) نقطه حد نصاب(cut off)در ناحیه ۱۷۹- IFN-γ

بحث:

در سال‌های اخیر محققین زیادی در تلاش‌اند تا با استفاده از روش‌های مختلف سرولوژی و مولکولی ارتباطی را میان سطح سرمی سایتوکاین‌های محرک *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* (IL-10، IL-12، IFN-γ، TNF-α) و بیماری سل پیدا کنند. همچنین با بررسی‌های ژنوتیپی به جستجوی مناطق موتاسیون‌زای محرک ژنی پرداخته‌اند و نتایج عمده‌ای نیز به دست آورده‌اند (۲).

در سال ۲۰۰۲، مطالعاتی در شیکاگو به وسیله Ping An روی TNF-α صورت گرفت. اما، رابطه‌ای را بین منطقه ژنی موتاسیون‌زا و قابلیت ابتلا به سل بین گروه‌های مورد و شاهد نیافتند (۷).

در مطالعه حاضر، در IFN-γ ، در منطقه ۱۷۹- از نظر پلی مورفیسم همگی هموزیگوت هستند(GG) که ارزش تشخیصی در این مورد وجود ندارد. همین طور IFN-γ از نظر سطح سرمی نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر خلاف TNF-α ، مشاهده شد که سطح سرمی IFN-γ در دو گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌دار دارد.

در سال ۲۰۰۳، در اسپانیا Dolores Lopes-Mderuelo ، روی ژن IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، ژن IL ۱۰- ناحیه G/A ۱۰۸۲- و ژن TNF-α ناحیه A ۳۰۸- در بیماران مبتلا به سل ریوی مطالعه نمود. او نشان داد که فقط در مورد IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، رابطه معنی‌داری با عفونت سل ریوی وجود دارد (p= ۰/۰۰۰۰۸). این ارتباط معنی دار در مورد IL ۱۰- و TNF-α مشاهده نگردید. یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که ژن IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، دارای اهمیت ویژه‌ای به عنوان عامل ژنتیکی برای مقاومت به بیماری سل محسوب می‌شود. بنابراین، نقص ژنتیکی در تولید IFN-γ در افراد هموزیگوت برای آلل A ۸۷۴+ IFN-γ می‌تواند موجب افزایش خطر آن در پیشرفت بیماری سل شود. پیشنهاد شد چنانچه طراحی‌ها و دستکاری‌هایی روی این ژن انجام دهند بعید نیست که بتوان از این ناحیه ژنی، در ساخت واکسن بر علیه بیماری سل استفاده نمود (۸).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۳ توسط Awomoyi و Newport در گامبیا روی پلی مورفیسم گیرنده ۱ IFN-γ انجام شد. آنها به این نتیجه رسیدند که IFN-γ برای دفاع و ایمنی میزبان بر علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها به ویژه بر علیه پاتوژن‌های مایکوباکتریومی ضروری می‌باشد. کودکانی که فاقد زنجیره های گیرنده ۱ IFN-γ هستند، استعداد بالاتری برای ابتلا به بیماری‌های مایکوباکتریومی مثل سل دارند. بنابراین ایجاد موتاسیون بر روی ژن گیرنده ۱ از IFN-γ (IFN-γ R1) منجر به افزایش قابلیت ابتلا به عفونت‌های مایکوباکتریایی از جمله سل در افراد می‌گردد (۹).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ در ایران، توسط میر سعیدی و طبرسی روی ارتباط میان پلی مورفیسم‌های گیرنده ۱ IFN-γ و بیماری سل ریوی انجام گرفت. نتایج نشان داد که میان ابتلاء به بیماری سل و لوکوس ۳۹۵ از گیرنده ۱ IFN-γ ارتباط وجود ندارد. میزان پلی مورفیسم هتروزیگوت در این لوکوس از ۵۰ فرد مورد آزمایش فقط ۲٪ گزارش گردید، که رقم معنی‌داری نبود و در بقیه افراد هیچ موتاسیونی دیده نشد (۱۰).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۴ در برزیل توسط Martha Maria روی مناطق ۲۳۸- و ۳۰۸- از ژن TNF-α صورت گرفت. مشاهده شد که آلل TNF-α -۳۰۸G و TNF-α -۲۳۸A در ارتباط با افزایش ابتلا به سل می‌باشند (p= ۰/۰۰۰۰۲). بنابراین دو آلل ۲۳۸G- و TNF-α -۳۰۸A ، یک عامل حفاظتی بر علیه *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* به شمار می‌روند. نتیجه گرفته شد که این دو آلل در این مناطق در اکثر مطالعات دارای ارزش تشخیصی هستند (۱۱).

همان طور که از نتایج مطالعه حاضر مشاهده می‌شود، در مورد دو منطقه روی ژن TNF-α، یعنی ۲۳۸- و۸۵۷ – ، موتاسیون به طور معنی‌داری در دو گروه مورد و شاهد مشاهده می‌شود. این دو منطقه می‌توانند دارای ارزش تشخیصی باشد. اما با توجه به اینکه این دو منطقه از نظر پلی مورفیسم ارزشمند می‌باشند آن را با استفاده از روش ELISA نیز مورد بررسی قرار دادیم. تا ارزیابی شود که آیا این تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد و شاهد در سطح سرمی آنها نیز مشاهده می‌شود یا خیر؟ در این مورد هم هیچ تفاوت معنی داری در سطح سرمی دو گروه مورد و شاهد در TNF-α مشاهده نشد.

در مورد IFN-γ که در منطقه ۱۷۹- از نظر پلی مورفیسم همگی هموزیگوت بودند و ارزش تشخیصی در این مورد وجود نداشت، نیز از نظر سطح سرمی مورد بررسی قرار گرفت. در این مورد بر خلاف TNF-α، مشاهده گردید که سطح سرمی در دو گروه مورد و شاهد دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. در روش

ELISA در این مطالعه که مقایسه بین سطح غلظت سرمی سایتوکاین‌های IFN-γ وTNF-α در بین افراد مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت و افراد سالم صورت گرفته است، تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته و یا مکتوب نشده است.

در انتها با توجه به مباحث ذکر شده مشاهده شد IFN-γ و TNF-α سایتوکاین‌های کلیدی در ایجاد التهاب در اثر آلودگی با *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* محسوب می‌شوند. با مطالعات گسترده‌تر و با شناسایی مناطق حساس موتاسیون‌زا در افراد مبتلا می‌توان علاوه بر روش‌های تشخیصی مولکولی در مدت زمان کوتاه‌تر، راه‌های درمانی مناسبی را نیز در این جهت بررسی کرد.

نتیجه‌گیری:

قابلیت ابتلا به توبرکولوزیس در دو منطقه ۳۰۸- و ۸۵۷- بر روی ژن TNF-α قابل بررسی و بحث است. مطالعه پلی مورفیسم روی ژن TNF-α نسبت به مناطق ژن IFN-γ برای بیماری سل ریوی تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد.

طبق یافته‌های مطالعه حاضر مشاهده شد، به دلیل اینکه نتایجی که در روش بررسی پلی مورفیسم با استفاده از PCR-RFLP به دست آمد، با یافته‌های روش ELISA منطبق و هماهنگ نبودند، بنابراین این دو روش در یک راستا و یک جهت نیستند. نمی‌توان با انجام یکی از این روش ها و به دست آوردن یک نتیجه آن را برای روش دیگر نیز تعمیم داد. لذا، موارد زیر نیز پیشنهاد می‌گردد:

۱- به کارگیری نمونه‌های بیشتر در گروه‌های سنی و جنسی و حتی در نژادهای مختلف مورد نیاز است.

۲- با روشPCR-RFLP و با طراحی پرایمرهای مختلف مناطق موتاسیون‌زای بیشتر و متنوع‌تری را در ژن‌های TNF-α و IFN-γ بررسی نمود. منطقه‌ای با اختلاف معنی دار در حد بالا بین گروه‌های مورد و شاهد شناسایی کرد .

۳- با دستکاری‌های ژنتیکی و همچنین مطالعات گسترده‌تر روی این مناطق حتی به روش‌های درمانی نظیر تولید واکسن بر علیه بیماری نیز نائل گردید.

تقدیر وتشکر:

بدینوسیله از اساتید و همکاران محترم بیمارستان مسیح دانشوری که در انجام این تحقیق کمک نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست مراجع:

1.Gerard J.Nau; Joan F.L.Richmond,Ann Schlesinger, *Human Macrophage activation programs induced by bacterial pathogens*, PNAS.Vol.99,No.3. 2001; PP: 1503-1508.

2. Kaufmann S, Paul van Helden P, Rubin E, and Warwick J. Britton; *Handbook of tuberculosis, immunology and cell biolog.* first ed. San Diego; Academic Press, 2008;PP: 374-375

3. Lenfant C; Nelson S. *Obstructive Pulmonary Disease*. In Lenfant C, ed. the series *"Lung Biology in Health and Disease,"* .New York; Marcel Dekker, 1991; PP : 1-21.

4. Ruehlmann J; Rong Xiang; Andreas G; Carrie S, Ralph A, Reisfeld. *Chemokine Gene Therapy Combines with Antibody-Cytokine Fusion* . Cancer Research 61 , 2001 ; PP: 8498-8503

5. Brooks F; Butel S. Morse A. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology*. 23nd ed. Boston; McGraw Hill, 2004; PP: 422-423

6. Jinquan T; Gang Z. *Cellular & Molecular Immunology* Wuhan University in China .Cancer Research 63 ; 2005; **2**(5): 343-349

7. Vlahov D, Margolick JB, Phair J, O'Brien TR, Lautenberger J, O'Brien SJ, Winkler CA. Tumor Necrosis Factor- α inducible promoter variant of interferon-γ accelerate CD4+ T Cell depletion in human immunodeficiency virus 1 infected individuals, National Cancer Institute , 2002, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12854077. (Accessed by 2001).

8. Lopez Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Juan J.Vzuez,and Carmen Montiel. interferon-γ and Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. 2003; http:// ajrccm.atsjournals.org/cgi/content/full/167/7/970. (Accessed by 2004).

9. Awomoyi AA, Nejentsev S, Richrdson J, Hull O , Kokh M, Podinovskaia J, McAdam,J M, Blackwell D ,KwiatkowskiM , Newport J. No

association between interferon-γ receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. 2003; www.ncbi.nlm.nih.gov › Journal List › Thorax › v.59(4); (Accessed Apr 2004).

10.Mirsaeidi SM, Houshmand M, Tabrsi P, Banoei MM, Zargari L , Amiri M, Mansouri SD, Sanati MH, Masjedi MR. Lack of association between interferon-γ receptor-1 polymorphism and pulmonary TB in Iranian population sample; 2005; *www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233916;* (Accessed 2006).

11. Martha M; de Oliveira; Jocilea C. S. de Silva; Josenef C; Lucia H. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF-a (-238 / -308) gene among TB and non TB patients. January 2004 ; www.scielo.br/pdf/jbpneu/v30n4/en_v30n4a12.pdf. (Accessed April 2004).

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۳۰- ۲۴

بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران مبتلا به سردردهای میگرنی

مرتضی حسین زاده [۱] ، افرا خسروی [۱] * ،ستار کیخاونی [۲]، سارا ملکشاهی [۳] ، رضا خراسانی [۳]

۱) گروه ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۲) گروه روانشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۳) مرکز بهداشت شهرستان ایلام
نویسنده رابط: افرا خسروی ، گروه ایمنی،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
تلفن : ۲۲۷۱۴۰ - ۰۸۴۱ afrakhosravi@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۸/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۸

چکیده:

زمینه و اهداف: میگرن شایع‌ترین نوع سردرد است. به‌طوریکه ۱۵-۱۲ ٪ مردم جهان از آن رنج می‌برند. یکی از جدیدترین یافته‌ها وجود ارتباط بین عفونت *هلیکوباکترپیلوری* و انواع میگرن است. هدف از این مطالعه تعیین تیتر آنتی بادی علیه *هلیکوباکترپیلوری* در بیماران مبتلا به میگرن در مقایسه با افراد سالم بود.

روش بررسی: این مطالعه به‌صورت مورد- شاهدی بر روی بیماران مراجعه کننده به درمانگاه مغز واعصاب و مطب‌های خصوصی شهر ایلام، به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی ساده، انجام گرفت. گروه مورد ۷۰ نفر بیمار که تشخیص میگرن در آنها قطعی بود. ۷۰ نفر از افراد سالم به‌عنوان گروه شاهد با مشخصات دموگرافیکی همسان گدوه موردانتخاب شدند. نمونه خون جهت تعیین تیتر آنتی بادی *IgG* علیه *هیلکوباکترپیلوری* (روش ELISA) و گروه خون جمع‌آوری شد. میانگین تیتر آنتی بادی در دوگروه مورد و شاهد با آزمون *T-student* مقایسه گردید.

یافته ها: در گروه مورد، بیشترین گروه خون O در ۳۵ نفر (۵۰٪) بود. بیشترین مبتلایان به میگرن در ۲۸ نفر (۴۰٪) زن خانه دار بود که در ۲۱ نفر (۴۵/۷٪) عادات ماهانه در بروز سردرد موثر بود. ۵۳ نفر (۷۵/۷٪) از مبتلایان به میگرن دارای اختلالات گوارشی مختلف بودند. در۴۸ نفر (۶۸/۶٪) بروز میگرن با مواد غذائی خاص ارتباط داشت. مهم‌ترین عامل بروز میگرن وجود استرس در ۱۵ نفر(۲۱/۴٪) گزارش گردید که در ۹۱/۴٪ آنان اضطراب به‌دنبال سردرد مشاهده شد. در ۵۱ نفر (۷۲/۹٪) مبتلایان اختلالات خواب وجود داشت. میانگین تیتر آنتی بادی در گروه مورد ۶۰/۰۸ و در گروه شاهد ۲۱/۸۲ بود، که اختلاف معنی دار نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه گیری : اختلاف معنی دار در تیتر آنتی‌بادی می‌تواند نشان دهنده اهمیت بررسی عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در مبتلایان به میگرن کلاسیک باشد. در این رابطه نیاز به انجام تست‌های تکمیلی بیشتری است. ممکن است با درمان قطعی و ریشه کنی این باکتری بتوان به بهبودی یا کاهش شدت و دوره‌های سردردهای میگرنی امیدوار بود.

کلید واژه ها: میگرن، *هلیکوباکترپیلوری*، IgG ، ELISA

مقدمه:

میگرن بیشترین نوع سردرد در همه جوامع بشری از جمله ایران است. به‌طوریکه ۱۵-۱۲٪ مردم جهان از آن رنج می برند و یکی از شایع‌ترین علل مراجعه بیماران به مطب‌های تخصصی اعصاب را تشکیل می‌دهد . میگرن سردردی است دوره‌ای با زمینه ارثی و خانوادگی که از هنگام کودکی، نوجوانی و یا اوایل میانسالی آغاز می‌شود و در خانم‌ها شیوع بیشتری دارد . میزان درد، خفیف تا شدید بوده و ممکن است با یکی یا همه نشانه‌هایی مانند گریز از روشنایی و صدای احساس ضربان *(obbing)* در سر، تهوع و استفراغ... همراه باشد(۱).

میگرن به چهار دسته، با پیش درآمد (*(aura)* میگرن کلاسیک)، میگرن بدون *aura* (مشترک)، انواع دیگر میگرن و سردرد خوشه‌ای یا *Cluster* طبقه‌بندی می‌گردد(۳-۱). انواع مختلف میگرن در اکثر منابع عبارتند از: میگرن افتالموپلژیک، میگرن پیوسته *(Status)*، میگرن با عارضه، میگرن کودکان و میگرن شکمی (۲،۱).

طبق تحقیقات انجام گرفته فاز سردرد حملات میگرنی در اثر اتساع عروق خارج جمجمه‌ای و نشانه‌های نورولوژیک در اثر انقباض عروق داخل جمجمه‌ای بوجود می‌آید. پاتوژنز آن به سه فاز تقسیم می‌گردد؛ فاز اول تولید درد در ساقه مغز، فاز دوم به‌صورت فعالیت وازوموتور که موجب انقباض یا انبساط شریان‌های داخل و خارج مغز می‌گردد، و فاز سوم فعال شدن سلول‌های هسته مدولری عصب سه قلو *Caudalis* و در نتیجه آزاد شدن نوروپپتیدی وازواکتیو در انتهای عروق عصب سه قلو (۵،۲). به نظر می‌رسد که سروتونین در ایجاد سردرد میگرنی نقش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. تحریک سلول‌های سروتونورژیک باعث ایجاد سردردهای میگرنی و افزایش گردش خون مغزی شده و همچنین رزرپین که یک تخلیه‌کننده سروتونین محسوب می‌شود خود یک عامل دردزا در میگرن به شمار می‌آید (۴،۳).

تاکنون عوامل مختلفی از قبیل؛ ژنتیک، مواد غذایی و دارویی، اختلالات خواب، استرس، عوامل محیطی مانند سرو صدا، نور زیاد، بوهای مختلف و رطوبت، عوامل کاری، عادت ماهانه، ضربه‌های شدید، مشروبات الکلی و ... به عنوان عوامل مساعد کننده و زمینه ساز سردردهای میگرنی شناخته شده‌اند(۱). همچنین اخیراً به نقش بیماری‌های عفونی و پاسخ‌های سیستم ایمنی نسبت به عفونت‌ها، اختلالات سیستم گوارشی و اثرات آن در بروز سردردهای میگرنی توجه شده است . یکی از جدیدترین مسائل پژوهشی احتمال وجود ارتباط بین عفونت فعال *هلیکوباکترپیلوری* و بروز انواع سردردهای میگرنی می‌باشد. از آنجا که این باکتری با ترشح *platelet activating factor* (*PAF*) می‌تواند موجب ترشح سروتونین از پلاکت‌ها گردد، می‌تواند در ایجاد سر دردهای میگرنی که به علت افزایش سروتونین ایجاد می‌شوند ، نقش داشته باشد. به همین خاطر در تحقیقات جدیدی که از سال ۲۰۰۲ شروع شده است، نقش فعالیت *هلیکوباکترپیلوری* در سردردهای میگرنی توجه شده است (۷و۸) .

در مطالعات انجام شده توسط تونکا و همکاران در ترکیه نشان داده شد که زمان و شدت سردردهای میگرنی بعد از ریشه‌کنی *هلیکوباکترپیلوری* تا ۸۴،۶ درصد کاهش پیدا می‌کند (۹). همچنین گابریلی نشان داد که در میزان بروز و شدت سردردهای میگرنی بین گروه درمان شده از نظرعفونت *هلیکوباکترپیلوری* و گروه شاهد(بدون درمان) تفاوت معنی‌داری وجود دارد(۱۰). گاسبارینی در ایتالیا نشان داد که مدت، شدت و عود مجدد حملات میگرنی درگروهی که از نظر عفونت *هلیکوباکترپیلوری* درمان شده‌اند نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (۱۱).

آلودگی بالغین با *هلیکوباکترپیلوری* در کشورهای توسعه یافته ۵۰-۴۰٪و در کشورهای در حال توسعه به ۸۰٪ می‌رسد. همچنین درصد بالایی از کودکان در این مناطق آلوده می‌باشند. از آنجا که شیوع سردردهای میگرنی در سال‌های اخیر به شدت رو به افزایش بوده است (۱). لازم است که ارتباط بین عفونت فعال *هلیکوباکترپیلوری* و سردردهای میگرنی مورد پژوهش قرار گیرد. مطالعه حاضر با این هدف تعیین تیتر آنتی‌بادی ضد *هلیکوباکترپیلور* در بیماران مبتلا به میگرن انجام شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه به صورت مورد- شاهدی در مدت ۶ ماه بر روی ۷۰ بیمار، با تشخیص قطعی میگرن، مراجعه‌کننده به مطب‌های خصوصی و درمانگاه مغزواعصاب شهر ایلام انجام شد. گروه مورد از بین پرونده‌های موجود با استفاده از جدول اعداد تصادفی و به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی ساده از جامعه بیماران مبتلا به میگرن انتخاب شدند. این گروه شامل ۲۴ مرد(۳۴/۳٪) و ۴۶ زن(۶۵/۷٪) با محدودهٔ سنی ۱۷ تا ۵۲ و میانگین ۳۵ سال بود. همچنین ۷۰ نفر از افراد سالم و بدون ابتلاء به میگرن (از

میان همراهان بیماران، کارکنان و دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی ایلام) به صورت همسان با مشخصات دموگرافیکی بیماران به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند . از گروه‌های مورد و شاهد به صورت حضوری و توسط پرسشنامه خود ساخته، اطلاعات لازم ویکسان اخذ گردید. نمونه خون جهت آزمایش‌های الیزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی *IgG* علیه *هیلکوباکترپیلوری* و گروه خون، جمع آوری شد. داده‌ها با نرم افزار *SPSS(15)* تجزیه و تحلیل شدند. میانگین تیتر آنتی‌بادی در دو گروه مورد و شاهد با استفاده از آزمون *T-student* برای دو جامعه مستقل مقایسه گردید.

یافته‌ها:

بیشترین میزان سردردهای میگرنی از نظر شغل در ۲۸ زن خانه‌دار (۴۰د٪)، در ۱۲ دانشجویان (۱۷/۱٪) و در ۸ کارمند (۱۱/۴٪) وجود داشت. بیشترین سردرد میگرنی از نظر میزان تحصیلات به ترتیب در ۲۱ نفر دیپلم (۳۰٪)، ۱۸ نفر بی سواد (۲۵/۷٪) و۱۳ نفر فوق دیپلم (۱۸/۶٪) مشاهده گردید. ۵۳ نفر (۷۵/۷٪) بیماران میگرنی دارای اختلال گوارشی بودند که نشانه رابطه‌ای مستقیم بین مشکلات گوارشی با میگرن می‌باشد.

همچنین ۴۸ نفر (۶۸/۶٪) بیماران بین بروز و شدت سردرد و استفاده از مواد غذائی خاص ارتباط قائل بودند. بیشترین ارتباط را به ترتیب برای پنیر (۱۷/۱ ٪)، غذاهای چرب (۱۲/۹٪) و ادویه‌جات (۱۱/۴٪) می‌دانستند.

۶۴ نفر (۹۱/۴ ٪) ذکر کردند که اضطراب به دنبال سردرد ایجاد می‌شود. ۵۱ نفر (۷۲/۹٪) دارای اختلال در خواب بوده و ۲۷ نفر (۳۸/۶٪) کم خوابی را گزارش کردند. ۳۵ نفر (۵۰٪)از مبتلایان به میگرن، گروه خونی *O* داشتند(جدول۱).

جدول ۱: متغیرهای موردمطالعه در بیماران مبتلا به میگرن

ردیف	عنوان متغیر	بیشترین فراوانی	درصد
۱	گروه خون (ABO)	گروه O	% 50
۲	گروه خون(RH)	مثبت	% 58.5
۳	شغل	زنان خانه دار	% 40
۴	میزان تحصیلات	دیپلم	% 30
۵	وجود اختلالات گوارشی	مثبت	% 75.5
۶	نوع اختلالات گوارشی	ریفلاکس	% 47.1
۷	وجود سابقه میگرن در خانواده	مثبت	% 54.3
۸	علل بروز سردرد	استرس	% 21.4
۹	منشا سردرد	فرونتال	% 55.7
۱۰	اختلال در خواب	کم خوابی	% 38.6
۱۱	تاثیر مواد غذایی خاص در بروز و شدت سردرد	پنیر	% 17.1
۱۲	تاثیر استرس در بروز و شدت سردرد	مثبت	% 91.4
۱۳	تاثیر سروصدا در بروز و شدت سردرد	مثبت	% 80
۱۴	تاثیر نور شدید در بروز و شدت سردرد د	مثبت	% 51.9
۱۵	تاثیر ضربه به سر در بروز و شدت سردرد	مثبت	% 52.9
۱۶	تاثیر عادت ماهانه بانوان در بروز و شدت سردرد	مثبت	% 69.5
۱۷	بروز کم اشتهایی بدنبال سردرد	مثبت	% 97.1
۱۸	بروز اضطراب بدنبال سردرد	مثبت	% 91.4
۱۹	انتشار درد به چشم‌ها بدنبال سردرد	مثبت	% 81.6

۳۷ نفر (۵۲/۹ ٪) ارتباط بین ضربهٔ ناگهانی و ایجاد سردرد، ۲۳ نفر (۳۲/۹٪) ارتباط بین بیماری‌های خاص و ایجاد سردرد را ذکر کردند. در میان کلیه بیماری‌های ذکر شده اختلالات گوارشی (۱۰ ٪) از بقیه شایع‌تر بود. در زنان مورد مطالعه مشخص گردید که۴۸ نفر (۶۹/۵ ٪) آنان بین عادات ماهانه و ایجاد سردرد ارتباطی را قائل هستند .از نظر فراوانی میگرن بر حسب منشأ سردرد سردردهای فرونتال (۵۵/۷ ٪) و سپس سردردهای تمپورال (۳۳/۳٪) شایع‌تر بودند.۵۴ نفر (۷۷/۱٪) به وجود ارتباط بین سردرد و تغییر در اشتها معتقد بودند و بیشترین کم اشتهایی (۹۷/۱&) گزارش گردید .در مطالعه انجام گرفته۲۱ نفر (۳۰٪) افراد زود عصبانی شدن و ۱۳ نفر (۱۸/۶٪) عدم تمرکز به‌دنبال سردرد را ذکر کردند.

محدوده تیتر آنتی‌بادی درگروه مورد ۱۴۶-۱۸ با میانگین ۶۰/۰۸ و در گروه شاهد ۱۳۶-۲ با میانگین ۲۱/۸۲ بود. آزمون *t* مستقل بین بروز میگرن و سطح تیتر آنتی‌بادی در دو گروه ارتباط معنی داری داشت (P=۰/۰۴۸)(جدول ۲).

جدول ۲: محدوده و میانگین تیتر آنتی‌بادی ضد *هلیکوباکترپیلوری* در گروه‌های مورد و شاهد

	محدوده تیتر آنتی بادی	میانگین سطح آنتی بادی
گروه مورد (مبتلایان به میگرن)	۱۴۶ - ۱۸	۶۰/۰۸
گروه شاهد (افراد سالم)	۱۳۶ - ۲	۲۱/۸۲

بحث:

در این مطالعه مشخص شد که بیشترین گروه خونی مبتلایان به میگرن گروه *O* می‌باشد. این میزان می‌تواند از کثرت گروه خونی *O* در سطح جامعه باشد. ولی بروز میگرن در ۴۱/۵ درصد افراد با گروه *Rh* منفی حائز اهمیت است. زیرا بروز این نوع گروه خونی در نژاد سفید پوست حداکثر ۲۵-۲۰ درصد جامعه را تشکیل می‌دهد. این موضوع نیازمند تحقیقات ویژه می‌باشد. متأسفانه تا کنون در این مورد تحقیقی صورت نگرفته‌است. ولی در یکی از مطالعات چندین مارکر ژنتیکی در ۱۱۲ بیمار میگرنی غیر خویشاوند، در مقابل گروه شاهد تصادفی همگن، مقایسه شد که اختلاف معنی‌دار در سیستم گروه خونی *ABO* ، *Rh* مشاهده نگردید(۱۲).

در مورد فراوانی مشاغل وسطوح تحصیلی مختلف در مبتلایان به میگرن ، در مطالعه واتر و همکاران میزان ضریب هوشی و سطح اجتماعی – اقتصادی در ۴۰۰ نفر از مبتلایان میگرن بررسی شد. هیچگونه شواهد نسبی بر تفاوت ضریب هوشی، میزان تحصیلات و موقعیت اجتماعی مبتلایان به میگرن بدست نیامد. پیشنهاد گردید که افراد دارای هوش بیشتر یا سطح اجتماعی بالاتر در صورت ابتلا به میگرن بیشتر به پزشک مراجعه نمایند(۱۳).

در مورد ارتباط بین اختلالات گوارشی و میگرن، در بررسی *Meucci* و همکاران بر روی ۳۷۸ بیمار با اختلالات گوارشی و ۳۱۰ شاهد در ایتالیا مشخص کردند که بین زنان مبتلا به میگرن و اختلال گوارشی از نوع ریفلاکس و زخم معده ارتباط معنی‌دار ($P<۰/۰۰۶$) وجود دارد. ولی در مورد مردان این ارتباط معنی‌دار نبود(۱۵). همچنین در گزارش مرکز درمانی *IBS* تأکید شده است که بین اختلالات گوارشی و میگرن رابطهٔ مستقیمی وجود دارد و هر اختلال آزاردهنده سیستم گوارشی می‌تواند باعث بروز و تشدید سردردهای میگرنی گردد. حتی آلرژن‌های

غذایی و افزایش آنتی بادی *IgE* نسبت به برخی از مواد خوراکی نیز با بروز و شدت سردردهای میگرنی مرتبط می‌باشد(۱۶). مطالعه ماورومیچالیس و همکاران در مصر نتایج اندوسکوپی و بیوپسی بر روی ۳۱ کودک مبتلا به سردردهای میگرنی با میانگین سنی ۱۲ سال را به شرح ذیل اعلام نمود: ازوفاژیت ۱۳نفر(۴۱/۹٪)، گاستریت در کورپوس ۱۶نفر(۵۱/۶٪)، گاستریت دوانتروم ۱۲نفر(۳۸/۷٪)، دئودونیت ۲۷نفر(۸۷/۱٪)و ۲۹ نفر نیز دارای ضایعات التهابی در سیستم معدی – روده‌ای بودند (۱۷). همچنین در بسیاری از مطالعات که توسط *Pradalier* و همکارانش انجام شده است، مشخصاً بین میگرن و اختلالا گوارشی مختلف ارتباط واقعی مشاهده شده است (۱۸).

در ارتباط با سابقهٔ خانوادگی میگرن در مطالعه استوارت و همکاران در آمریکا بر روی ۵۳۲ نفر بیمار میگرنی و گروه شاهد همگن مشاهده شد که شروع اولیه حملات میگرنی و شدت آن با وابستگی خانوادگی درجه اول ارتباط معنی داری داشته *(CI=1.30 To 2.72)* و میزان *Risk Relative* برابر ۱/ ۸۸ بوده است (۱۹). در مطالعه گرویل و همکاران مشاهده شد که عوامل ژنتیکی نقش مهمی را در اتیولوژی میگرن بدون *aura* بازی می‌کند. شرکت یا سهم ژنتیک در بروز میگرن در مردان و زنان مشابه است. علیرغم اینکه در زنان شیوع بیشتری دارد ولی عوامل محیطی در بروز میگرن به یک نسبت اهمیت دارند و این عوامل در هر فردی به صورت مستقل عمل می‌کنند(۲۰).

درموردارتباط بین موادغذایی خاص وبروز و شدت میگرن، در مطالعه خانم وونگ و همکاران گروه‌های غذایی خاص شامل غذاهای دارای فنیل اتیل آمین و غذاهای دارای هیستامین مهم‌ترین موادغذائی مؤثر در بروز و شدت سردرد معرفی شدند. از میان آنها می‌توان به پنیر، شکلات، مرکبات ، غذاهای چرب ، کافئین ، کاکائو ، موز ، بادمجان، اسفناج، توت فرنگی، گوجه و به‌خصوص مشروبات الکلی و آبجو اشاره کرد. همچنین مواد غذایی خاص هم باعث تسکین و برطرف شدن دردهای میگرنی می‌گردد که مهم‌ترین آنان شامل جوانه سیر تازه، جعفری، نعناع، بابونه معطر ، مکمل‌های ویتامین *(E,B5)* و غذاهای حاوی منیزیوم و کلسیم می‌باشد (۲۱).

در مورد ارتباط بین استرس و بروز و شدت میگرن در مطالعه‌ای که توسط آنتونی و همکاران در مورد بررسی مقدار سروتونین پلاسما در بیماران میگرنی انجام گرفت نشان داده شد که دفع ادراری *5HIAA* که کاتابولیت سروتونین است در جریان حملات میگرنی به‌شدت افزایش دارد، که نشانه وجود استرس در زمان حملات میگرنی است. پیشنهاد می‌شود از متی سرژید، که آنتاگونیست سروتونین است، در درمان میگرن استفاده شود(۲۲). در مطالعهٔ واکوگن و همکاران که بر روی ۱۴۱ بیمار میگرنی و ۱۰۹ شاهد همگن انجام گرفت مشخص گردید، که استرس و اضطراب در گروه مورد به صورت معنی دار از گروه شاهد بیشتر است و نیازمند درمان کلینیکی می‌باشد. اما درجات افسردگی در هر دو گروه پائین و نیازمند درمان نیست . پیشنهاد می‌شود که استرس به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل شروع و پایداری حملات میگرنی منظور شود(۲۳) . در مطالعه آنتونی و همکاران، میزان اسیدهای چرب آزاد پلاسما و پروستاگلاندین *E1* در بیماران میگرنی بررسی شد. مشاهد شد که سروتونین و اسیدهای چرب آزاد پلاسما در اکثریت قاطع بیماران مبتلا به حملات میگرنی (تا ۶۰ درصد) افزایش معنی‌داری داشته اما سطح *PGE1* پلاسمایی در بروز حملات میگرنی افزایش معنی‌داری ندارد(۲۴).

درمورد وجود اختلالات خواب در بیماران میگرنی میلر و همکاران بر روی ۱۰۸ کودک ۱۲-۲ و میانگین ۲/۳ ± ۹/۱ سال سردردهای میگرنی مطالعه انجام داده‌اند. پرسشنامه‌های خواب توسط والدین تکمیل و مشخص گردید که اختلالات خواب در مقایسه با گروه شاهد همگن بسیار بیشتر بوده و تفاوت معنی‌دار دارد(۲۵). پاویا و همکاران ارتباط بین سردرد و اختلالات خواب را بر روی ۲۵ بیمار با سردردهای صبحگاهی وشبانه بررسی کرده‌اند. نشان داده شد که بین انواع سردردهای موجود سردردهای میگرنی و تنشی تقریباً نیمی از اختلالات خواب را شامل می‌شوند(۲۶).

درمورد تاثیرعوامل محیطی بربروز و شدت میگرن مطالعات بسیاری انجام شده که همگی نشان دهندهٔ این مسئله است که تأثیر عوامل و محرکات محیطی بر بروز میگرن قطعی است. ولی درجهٔ تأثیر از فردی به فرد دیگر متفاوت و مستقل می‌باشد. یکی از مهم‌ترین آنها مطالعه رابینز و همکاران بر روی ۴۹۴ بیمار میگرنی است، که بسیاری از عوامل محیطی از قبیل تغییرات آب و هوائی، گرسنگی، اشعه خورشید، فعالیت جنسی و ... را بررسی کرده و نتایج قابل توجهی بدست آورده‌اند(۲۷).

درموردتاثیر قاعدگی برشروع و شدت حملات میگرنی در مطالعه پال و همکاران مشخص گردید که بیش از ۶۰ درصد زنان تحت مطالعه ابراز کردند که بین شروع قاعدگی و بروز

میگرن ارتباط وجود داشته و افـزایش تعـداد دفعـات و شـدت میگرن با نزدیک شدن به زمان قاعدگی بیشتر می‌شود. داروهـایی که در کاهش تظاهرات بالینی و زمان دورهٔ قاعدگی مـؤثر اسـت بر تسکین میگرن نیز تأثیر دارد(۲۸). همچنـین در مطالعـهٔ دیگـر همین محقق نشان داده شد که بروز حملات میگرنـی در دو روز اول قبل از شروع قاعدگی به صورت بدون *aura* و در روز آخر قاعدگی به صورت معنـی‌داری نـسبت بـه سـایر زمانهـا بیـشتر می‌باشد(۲۹).

هدف اصلی ا این مطالعه تعیین فراوانی آنتـی بـادی *IgG* علیـه هلیکوباکترپیلوری در دو گروه مورد و شاهد و مقایـسه ایـن دو گروه بود. همانطور که از نتـایج مـشهود اسـت ایـن اخـتلاف معنی‌دار بود. یعنی نشان می‌دهد که بین سطح تیتـر آنتـی بـادی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* و بروز سردردهای میگرنی رابطه وجـود دارد. تونکا و همکاران در ترکیه بر روی ۷۰ نفر بیمار میگرنـی و ۶۰ نفر شاهد ، زمان و شدت سردردهای میگرن را قبل و بعـد از ریشه کنی *هلیکوباکترپیلوری* بررسی کردند. نتیجـه گرفتنـد کـه ۸۴/۶ درصد بیماران که درمان ریشه‌کنـی هلیکوبـاکتر را انجـام داده اند و ۷۵٪ بیماران با درمان کلاسیک، از درمان سود بـرده و باعث کمتر شدن علائم سردرد و بهبودی گردیده اسـت (۹). در مطالعه گابریلی و همکاران بر روی ۱۴۸ بیمار با تشخیص قطعـی میگرن که در آنها عفونت فعـال *هلیکوبـاکتر پیلـوری* بـا تـست تنفسی اوره اثبات گردیده بود، درمـان آنتـی‌بیـوتیکی مناسـب و ریشه‌کنی باکتری انجام شد. سپس تواتر وشـدت و زمـان بـروز حملات میگرنی در آنها به مـدت یکـسال مـورد پیگیـری قـرار گرفت. در بیمارانی که نـابودی *هلیکوبـاکترپیلوری* بـا موفقیـت انجام شده بود اختلاف معنـی‌داری در کـاهش تـواتر، شـدت و مدت حملات میگرنی نسبت به بیمـاران بـا سـابقهٔ عـود مجـدد بیماری مشاهده گردید(۱۰). همچنـین در مطالعـه گاسـبارینی و همکـاران در ایتالیـا بـر روی ۲۲۵ بیمـارمیگرنی کـه از نظـر *هلیکوباکترپیلوری* با تـست تنفـسی اوره مثبـت بودنـد، درمـان ریشه‌کنی انجام شد. در بیمارانی که درمان موفق داشتند در مدت ۶ ماه پیگیری مشخص گردید که از نظر تواتر، شـدت و مـدت زمان حملات میگرنی کاهش چشمگیری داشتند و اختلاف آنـان با بیماران دارای عـود مجـدد هلیکوبـاکتر معنـی‌دار بـود (۱۱). همچنین در بررسی دیگر گاسپارینی ۱۷۵ بیمار(۴۹ نفر بـا *aura* و ۱۲۶ نفر بدون *aura* با تعیین کلیـهٔ مشخـصات در برابـر ۱۵۲ شاهد همگن ارزیابی شدند . شیوع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در هر دو گروه با و بدون *aura* تقریباً برابر بود. ولـی نتـایج نـشان دادند که هلیکوباکتری با *cag.A* به‌طور قـوی بـا میگـرن دارای اوره آ مرتبط است و پاسخ‌های التهابی شـدید مخـاط معـده در برابر عفونت این باکتری باعث آزاد شـدن مـدیاتورهای التهـابی می‌گردد، که می‌تواند سبب تنگی عـروق مغـزی شـده و باعـث ایجاد حالت اوره‌آ گردد(۳۰).

نتیجه‌گیری:

دراین مطالعه محدودیت‌ها وکاستی‌هایی وجـوددارد کـه انتظـار می‌رود در مطالعات بعدی تکمیل شود. اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های *IgA*, *IgM* ، تـست تنفـسی اوره آز و انجـام *PCR* بـرروی بیوپسی اندوسکوپی بیماران مبتلا در جهت تـشخیص دقیـق تـر عفونت فعال *هلیکوبـاکترپیلوری* بایـد مـد نظـر باشـد. در ایـن صورت می‌توان به تعیین حالت تهاجمی باکتری کمـک کـرده و پـژوهش‌هـای مداخلـه‌ای در درمـان مبتلایـان بـه عفونـت *هلیکوباکترپیلوری* و بررسی بروز، مـدت و شـدت سـردردهای میگرنی را درآینده طراحی نمود. با توجه به نتایج ایـن مطالعـه و تحقیقات مشابه، وجود اختلاف معنی‌دار در تیتر آنتی‌بـادی *IgG* علیه هلیکوباکتر پیلوری نشان دهنـده اهمیـت بررسـی دقیـق‌تـر عفونت فعال در مبتلایان به میگرن باشد. ممکن اسـت در برخـی موارد با درمان قطعی و ریشه کنی این باکتری بتوان به بهبودی یا کاهش شدت و دوره‌های سردردهای میگرنی ناشی از آن امیدوار بود.

فهرست مراجع:

1.Deleu D., Hanssens Y.& Wotrhing E.A.; Symptomatic and proprtylactic treatment of migraine :A critical reappraisal. C*lin Neuropharmacol* 1998,**2**1(5):267-279.

2. Diener H.C ., Kaube H . limmroh V. A practical guide to the management and prevention of migraine ,*Drugs* 1998, ***56***(5):811-824.

3.Ferrari M.D , Migraine , *Lancet* 1998,**351**:1043-51.

4.Ganong W.F ,: Review of Medical physiology , 19th ed., USA, Appleton & Lange. ,1999 ,pp:98-99,250-251.
5.Johnson K.W .; Phebus L.A. , Cohen M.L . Serotonin in migraine : theories , animal models and emerging therapies , *Prog. Drug Res*. 1998 ,**51**:219-244.
6.Kallela M. Farkklla M, Saljohmaa.O. Fyhrquist F. Endothelin in migraine Patents , *Cephalalgia* ,1998, **18**(6):329-332.
7.Mascia A., Afra J, Schoenen J. Dopamine and migraine :A review of pharmacological , biochemical , neurophysiological and therapeutic data. *Cephalalgia* ,1998,**18**(4):174-182.
8.Panconesi A, Sicuteri R. Headache induced by serotonergic agonists –a key to the interpretation of migraine pathogenesis . *Cephalalgia* ,1997,**17**(1):3-14.
9.Tunca A, Turkey C, Tekino O, Kargili A, Erbayrak M. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor migraine ? a case control study . *Acta Neurol Belg* 2004;,**104**(4) :161-4.
10.Maurizio Gabrielli,Francesco Franceschi,Giuseppe Fiore,Marcello Candelli,Alessandro Armuzzi,Veronica Ojetti.Beneficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on migrainc *J Headache Pain* 2001 ; **12**:.
11.Gasbarrini , A .De luco .A . Fiore ,G . Gambrielli M, Franceschi F, Ojetti V .Bene ficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on migraine . *Hepat Gastroenterol* . 1998: **45**(21) :765-70.
12. Pardo , J. Carracedo ,A. Munoz I , Castillo J, Lema M, Noya M.. Genetic Markers : association study in migraine .*Cephalagia* 2002; **15**.(3): 200-204
13.Waters . W.E .migraine : Intelligence , social class , and familial prevalence *Br Med J* 1971 ; **2**: 77-81.
14.Bigal , ME .Lipton , RB . winner ,P. Migraine in adolsceuts : association with socioeconomic status and family History . *Neurology* .2007 :**64**(1) :16-25.
15. Meucci G , Radelli F , Prado A, Bortoli A, Crotta S, Cerrato C. Increased prevalence of migraine in patients with universtigated dyspepsia referred for open –access upper gastrointestinal endoscopy , *Endoscopy J* 2005; **37** (7) :622-5.
16. IBS Treatment center .1224Madison street , suite 1220, seattle , Washington 98104 .(206) 264-1111.
17. Movromichalis , I .Zaramboukast , T . Giala , MM . Migraine of gastrointestinal origin . *Eur .J Pediatr* 1995; **154 :**, 406-410.
18. Pradalier , A. Devars du meyne , Jf Migraine and digestive disorders , *Gastroenterol Clinic Biology* 2005 ; **29** (2):156-161.
19. Stwasrt wf , Bigal ME, kolonder K**,** Dowson A, Liberman IN, Lipton RB**.** Familial Risk of migraine . variation by proband age at onset and headache severity .*Neurology* 2006 **; 66**(3):344-8.
20. Gervil M , Ulrich V, Kaprio J, Olesen J, Russell MB. The relative role of genetic and environmetal factors in migraine without aura .*Neurology* 1999 ; **53 :**:995.
21. Wong , C: migraine and Diet .about .com Health's Disease and Content is reviewed by our Medical Review Board .Nov 2006.
22. Anthony ,M. Mracp ,MB . Hinterberger , H. Lance JW. Plasma serotonin in migraine and stress .*Arch Neurology* 1967: **16**(5) :544-552.
23. Wacogne ,C.Lacoste , JP.Guilibert E, Hugues FC. Le Jeunne C. Stress – anxiety , depression and migraine *Cephalagia* 2003 ; **23**(6) :451-455.
24. Anthony , M : Plasma free fatty acids and prostaglandine E 1 in migraine and stress . *J Head Face Pain* 2005; **16** (2): 58-63
25. Cansel TURKAY, Oguz Tekin, Ayse Kargılı , Mustafa Erbayark, Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for migraine ? A Case control study *Acta Neurol Belg* , 2004; **104** (4) :161-4.
26 Teresa Paiva ,André Batista , Paula Martins , António Martins. The relationship between headaches and sleep disturbances . . *J Head Face Pain* 2005 ; **35** (10) :540-546.
27. Rabbins , L: precipitating factors in migraine . A Retrospective Review of 494 patients . . *J Head Face Pain* 2005 ; **341** (4):214-216.
28. American Academy Of Neurology (2004, July 27). Migraines More Likely To Occur Around Menstruation, Medication May Prevent More Than Half. *ScienceDaily*. http://www.sciencedaily.com-/releases/2004/07/040727085303.htm.
29. American Academy Of Neurology (2000, December 1). Migraine Risk Highest During First Two Days Of Menstrual Cycle. *ScienceDaily*. http://www.sciencedaily.com /releases/2000/11/001128065747.htm
30. Gasbarrini A, Gabrielli M, Fiore G, Candelli G,Bartolozzi M, Luca De F, ***l** etal*. Association between *Helicobacter pylori* cytotoxic Type I Cag .A- positive strains and migraine with aura. *Cephalagia* 2001; **20**: 561-562.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۳۶-۳۱

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در مراکز آموزشی درمانی گرگان در سال ۸۸-۱۳۸۷

حمید واعظ[۱*]، کیومرث قاضی سعیدی[۱]، عبدالوهاب مرادی [۱]، علیجان تبرایی[۱]، بهناز خدابخشی[۲] ، مسعود بازوری[۱]، نسترن گلریز[۳] ، عزت ا.. قائمی[۱]

۱)گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۲) گروه عفونی ،دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۳) آزمایشگاه میکروب شناسی، بیمارستان ۵ آذر گرگان
نویسنده رابط: حمید واعظ ، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
همراه: ۰۹۱۲۷۲۳۰۲۲۵ Vaezhamid84@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۸/۴ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۲۳

چکیده:

زمینه و اهداف: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*= MRSA) از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی در دنیا است. درمان عفونت‌های ناشی از MRSA به دلیل مقاومت همزمان به سایر آنتی بیوتیک ها مشکل است . هدف ازاین مطالعه تعیین فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم* به متی سیلین و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن در مراکز آموزشی درمانی گرگان در سال ۸۷-۸۸ بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، در فاصله ماه‌های شهریور ۱۳۸۷ لغایت ۱۳۸۸، ۱۲۱ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی جدا شد. جهت تعیین مقاومت از روش دیسک دیفیوژن (طبق دستورالعمل CLSI) استفاده شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS پردازش شد و با آزمون chi square تجزیه و تحلیل گردید. در تمام موارد $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: از ۱۲۱ سویه مورد بررسی ۱۰۴سویه (۸۵/۹٪) به متی سیلین مقاوم بودند. فراوانی سویه‌های مقاوم به متی‌سلین در نمونه ادرار و زخم به ترتیب ۹۰/۴٪ (۳۸ نمونه) و ۸۹/۲٪ (۲۵ نمونه) بیشتر از سایر نمونه‌های بالینی بود. بیشترین مقاومت سویه‌های MRSA به ترتیب به پنی‌سیلین در ۱۰۴ سویه (۱۰۰٪)، کوآموکسی کلاو ۱۰۲ سویه (۹۷/۶٪)، سفوتاکسیم ۷۴ سویه (۷۱/۴٪) و در اریترومایسین ۶۷ سویه (۶۴/۳٪) بود .

نتیجه گیری : فراوانی سویه‌های MRSA در منطقه مورد مطالعه ۸۵/۹٪ است . مقاومت همزمان سویه‌های MRSA به سایر آنتی بیوتیک‌ها درمان را با محدودیت روبرو کرده است .

کلید واژه ها: MRSA ، مقاومت داروئی ، دیسک دیفیوژن

مقدمه:

محل اصلی کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus = S.aureus*) در انسان بینی ،پرینه و پوست است. این باکتری می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل پنومونی ،عفونت‌های پوستی ،استئومیلیت واندوکاردیت را ایجاد کند(۱) .

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*=MRSA)) از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی در دنیا است . اولین مورد MRSA در سال ۱۹۶۱ یعنی یک سال پس از استفاده از این آنتی بیوتیک گزارش شد (۲و۳). فراوانی MRSA در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی را نشان داده است. به عنوان مثال میزان مقاومت در آمریکا از ۲۳/۴٪ در سال ۱۹۹۷ به ۳۴/۴٪ در سال ۲۰۰۲ رسیده است. از طرفی به علت بروز مقاومت همزمان به سایر آنتی بیوتیک‌ها درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها پیچیده‌تر شده است (۳و۴). مقاومت به متی‌سیلین به‌وسیله یک قطعه کروموزومی تحت عنوان Sccmec ایجاد می‌شود که حاوی ژن (*mecA*) است. این ژن پروتئینی تولید می‌کند تحت عنوان PBP2a-(penicillin binding protein) که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد، و توسط این داروها مهار نمی‌شود . تا کنون ۵ تیپ مختلف از Sccmec شناسایی شده است (IوII و III وIV وV) که از ۲۰ kb تا ۶۸ kb متغیر هستند. خطرناک‌ترین آنها تیپ III است. زیرا، علاوه بر ژن مقاومت به متی‌سیلین حامل ژن‌های مقاومت به اریترومایسین ،استرپتومایسین ،جیوه و کادمیوم نیز است (۵ و۶) .بیان ژن مقاومت در شرایط آزمایشگاهی متغیر بوده و به عواملی مانند دما ،pH و مدت انکوباسیون بستگی دارد (۷ و۸). امروزه شناسایی سریع و دقیق عفونت‌هایMRSA برای شروع درمان موثر از اهمیت فوق العاده‌ای برخورداراست. از آنجایی که در منطقه گرگان اطلاعاتی از فراوانی سویه‌های MRSA و مقاومت داروئی آنها وجود ندارد هدف از این مطالعه تعیین فراوانی و الگوی مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم* به متی‌سیلین در مراکز آموزشی درمانی گرگان در سال ۸۸-۱۳۸۷ بود.

مواد و روش‌ها:

در فاصله شهریور ۱۳۸۷ لغایت شهریور ۱۳۸۸، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از کشت بیماران و یا محیط بیمارستان‌های آموزشی گرگان (۵ آذر ،طالقانی ودزیانی) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها شامل ۱۱۱ سویه بالینی و ۱۰ سویه محیطی بود. برای تمام بیماران پرسشنامه‌ای تهیه و اطلاعات مورد نیاز (سن ،جنس و محل عفونت) ثبت گردید. برای تعیین هویت *S.aureus* از روش‌های استاندارد شامل رنگ‌آمیزی گرم ،تست کاتالاز ،DNase وکواگولازبه‌روش‌های لام و لوله استفاده شد(۸) . تمام سویه‌ها پس از تعیین هویت در لوله‌های حاوی محیط کشت TSA (tryptone soya agar) کشت داده ودر یخچال نگهداری شدند. تعیین مقاومت به متی سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از متد دیسک دیفیوژن و راهنمای CLSI (clinical and laboratory standards institute) انجام شد(۷و۸) .دیسک‌های مورد استفاده عبارت بودند از:

پنی‌سیلین(۱۰ unit)- کواموکسی کلاو(۱۰μ g)- اریترومایسین(۱۵μ g)- جنتامایسین (۱۰μg)- کلرامفنیکل (۳۰μ g)- سفوتاکسیم (۳۰μ g)- ونکومایسین(۳۰μg)- اگزاسیلین (۱μ g)که از شرکت پادتن طب - ایران تهیه شده بودند.

برای انجام دیسک دیفیوژن سوسپانسیون باکتری باغلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک بر روی آن قرار داده شد. برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین ظرف پتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از آن قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (هاله بزرگ‌تر از ۱۳ میلی‌متر حساس ،۱۱-۱۲ میلی‌متر مقاوم نسبی و هاله کمتر از ۱۰ میلی‌متر به عنوان مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد)(۸ و۱۰). از *S.aureus* سویه col (Tax ID 93062 ، اهدایی دکتر پورمند ، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای ارزیابی مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها پس از قرائت هاله عدم رشد و با استفاده از جدول استاندارد دیسک‌ها نتایج به‌صورت حساس، حساس نسبی و مقاوم ثبت شد. نتایج با استفاده ار نرم افزار SPSS و آزمون chi square تجزیه و تحلیل شد .در تمام موارد P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها:

از ۱۲۱ سویه *S.aureus* کـه مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد،۴۲ (٪۳۴/۷) سویه از نمونه ادرار، ۲۸ (٪۲۳/۱) سویه از نمونه زخـم ۲۵، (٪۲۰/۷) سویه از کشت خون ، ۱۶ (٪۱۳/۲) سویه از سـایر نمونه‌ها (خلط، ،آبسه) و ۱۰ (٪۸/۳) سویه از محـیط بیمارسـتان جدا گردیده بود. میانگین سنی افراد مـورد بررسـی۲۴/۶ ±۲۹/۹ سال بـود. ایـن افـرا در سـه گـروه سـنی کمتـر از ۲۰ سـال ، ۴۵-۲۰سال و بیشتر از ۴۵ سال تقسیم بندی شـدند. از مجمـوع بیماران مورد بررسی ۵۹ نفر (٪۵۳/۲) مرد و ۵۲ نفـر(٪۴۶/۸) زن بودند .

در مجموع از ۱۱۱ سویه جدا شده از بیماران، ۹۷ سـویه(٪۸۷/۳) به متی‌سیلین مقاوم بودند. اخـتلاف آمـاری معنـی‌داری از نظـر توزیع MRSA بین سه گروه سنی دیده نشد(P>0.05). ۵۴ نفر (٪۹۱/۵)از مردان و ۴۵ نفر (٪۸۶/۵)از زنـان مـورد مطالعـه بـه متی‌سیلین مقاوم بودند. بـین دو گـروه مـذکر ومونـث اخـتلاف معنی‌داری در میزان شیوع عفونت‌های ناشی از MRSA مشاهده نشد. توزیع مقاومت برحسب محل جداسازی نمونه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در نمونه‌های ادرار ۹۰/۴٪ بود(جدول۱) .

جدول۱ : توزیع مقاومت به متی‌سیلین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به تفکیک نوع نمونه

نمونه	ادرار	زخم	خون	سایر(خلط آبسه)	محیط	جمع
تعداد (درصد مقاومت)	۳۸(٪۹۰/۴)	۲۵(٪۸۹/۲)	۲۲(٪۸۸)	۱۲(٪۷۵)	۷(٪۷۰)	۱۰۴ (٪۸۵/۹)

تفاوت معنی‌دار آماری بـین فراوانـی MRSA برحـسب محـل جداسازی مـشاهده نگردیـد (P>0.05). مقاومـت سـویه‌هـای MRSA به آنتی بیوتیک‌ها به شرح ذیـل بـود: ۱۰۴ (۱۰۰ ٪) از سویه‌های MRSA بـه پنـی سـیلین ، ۱۰۲ سـویه (٪۹۷/۶) بـه کو آموکسی کلاو ، ۷۴ سویه (٪۷۱/۴) به سفوتاکسیم ، ۶۷ سویه (&۶۴/۳) به اریترومایسین ، ۵۴ سویه (٪۵۲/۴) به جنتامایـسین و ۲۱ سویه (٪۲۰) به کلرامفنیکـل مقـاوم بودنـد(جـدول۲). هـیچ موردی از مقاومت به ونکومایسین دیـده نـشد. در ایـن مطالعـه رابطه معنی‌داری بین محل عفونـت و مقاومـت بـه سـایر آنتـی بیوتیک‌ها دیده نشد(P>0.05).

جدول ۲:مقاومت سویه‌های **MRSA** به آنتی بیوتیک‌ها به تفکیک نوع نمونه

نمونه / آنتی بیوتیک	ادرار	زخم	کشت خون	سایر(خلط-آبسه)	محیط	جمع
پنی سیلین	۳۸(٪۱۰۰)	۲۵(٪۱۰۰)	۲۲ (٪۱۰۰	۱۲(٪۱۰۰)	۷(٪۱۰۰)	۱۰۴(٪۱۰۰)
کوآموکسی کلاو	۳۶(٪۹۴/۷)	۲۵(٪۱۰۰)	۲۲(٪۱۰۰)	۱۲(٪۱۰۰)	۷(٪۱۰۰)	۱۰۲(٪۹۷/۶)
سفوتاکسیم	۲۷ (٪۷۱)	۱۷(٪۶۸)	۱۶(٪۷۳)	۹(٪۷۵)	۵(٪۷۱/۴)	۷۴(٪۷۱/۴)
اریترومایسین	۲۴(٪۶۳)	۱۸(٪۷۲)	۱۳(٪۶۰)	۸(٪۶۷)	۴(٪۵۷/۱)	۶۷(&۶۴/۳)
جنتامایسین	۲۲(٪۵۸)	۱۶(٪۶۴)	۱۰(٪۴۵)	۴(٪۳۳)	۲(٪۲۸/۵)	۵۴(٪۵۲/۴)
کلرامفنیکل	۴(٪۱۰)	۵(٪۲۰)	۴(٪۱۸)	۵(٪۴۰)	۳(٪۴۲/۸)	۲۱(٪۲۰)

بحث:

در این مطالعه ۸۵/۹٪ از سویه‌ها به عنوان MRSA شناخته شدند. این میزان بیشتر از مطالعات انجام شده در تهران ،مشهد و شیراز می باشد. به طور مثال در مطالعه‌ای که توسط محرز و همکاران در سال ۱۳۸۱ در بیمارستان امام خمینی تهران انجام شده از ۴۰۲ نمونه بررسی شده ۱۸۷ (۴۶/۵٪) مورد از بیماران مبتلا به عفونت‌های MRSA بوده‌اند(۱۱). در مطالعه دیگری که توسط عینی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در تهران انجام شد از ۳۳۸ سویه ۱۶۲(۴۸٪)سویه MRSA بوده است (۱۲). در مطالعه‌ای که توسط ژاپنی و همکاران در شیرازو نادری نسب و همکاران در مشهد انجام شد، میزان عفونت‌های ناشی از MRSA به ترتیب ۴۳٪ و۵۳/۵٪ بوده است (۱۳و۱۴) . میزان مقاومت در اروپا و کشورهای همسایه نظیر عربستان و کویت نیز کمتر از مطالعه ما می‌باشد. برای مثال در مطالعات انجام شده در اسپانیا در سال ۲۰۰۲ میزان عفونت‌های ناشی از ۲۴/۵٪ MRSA و در ایرلند ،ایتالیا و فرانسه به ترتیب ۴۱/۴٪،۴۰/۱٪و ۳۳/۱٪ بوده است (۴) .در مطالعات عربستان و کویت این میزان به ترتیب ۳۳٪ و ۳۲٪ گزارش شده‌است(۱۵و۱۶) .اما در بعضی از کشورها مانند آسیای جنوب شرقی میزان مقاومت نزدیک به مطالعه ما می‌باشد. مثلا در مطالعه‌ای که در تایوان انجام شده است میزان عفونت‌های MRSA ۷۷٪ گزارش شده است (۱۷).فراوانی بالای سویه‌های MRSA و همچنین مقاومت همزمان آنها به سایر آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند عواقب شدیدی داشته باشد زیرا گسترش این سویه‌ها به بخش‌هایی مانند نوزادان ،شیمی درمانی وICU هزینه‌های زیادی را در پی خواهد داشت .

در مطالعه ما رابطه معنی داری میان سن، جنسیت و عفونت‌های MRSA مشاهده نشد. درمطالعه محرز وهمکاران نیز رابطه معنی‌داری بین جنسیت و عفونت‌های ناشی از MRSA مشاهده نشده‌است (۱۱). در مطالعه Topeli از ۱۰۱ بیمار مورد بررسی ۴۶ نفر (۴۵/۵٪) زن و ۵۵ نفر(۵۴/۵٪) مرد بوده‌اند و اختلاف معنی‌داری در میزان شیوع عفونت‌های MRSA و جنس دیده نشده است (۱۸) .در مطالعه Lucieni و همکاران از ۱۳۶ بیمار مورد بررسی۸۴ بیمار مرد و ۵۲ بیمار زن بوده‌اند. اختلاف معنی‌داری در میزان شیوع عفونت‌های MRSA و جنس بیماران دیده نشده است (۱۹).

در مطالعه‌ای که توسط Jesus و همکاران در سال‌های ۲۰۰۲-۲۰۰۰ در اسپانیا انجام شده بیشترین میزان MRSA در افراد بالای ۶۴ سال مشاهده شده است (p<0001)(۴). در مطالعه‌ای

که بین سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۰در کره انجام شده نشان داده است که میزان عفونت‌های MRSA در افراد بالای۶۱ سال بیشتر بوده است(۲۰) .میزان عفونت بالا در افراد مسن می‌تواند ناشی از ضعف سیستم ایمنی در این افراد و یا مدت زمان زیاد مواجه با عامل عفونت باشد. در مطالعه Ronald و همکاران اختلاف معنی‌داری در میزان شیوع عفونت های MRSA و سن دیده نشده است که مشابه نتایج مطالعه ما می‌باشد(۲۱).

دراین مطالعه مقاومت همزمان سویه‌هایMRSA به پنی سیلین ،کوآموکسی کلاو ،اریترومایسین و سفوتاکسیم بیش از سایر آنتی بیوتیک‌ها بود. در مطالعه فتح ا.. زاده و همکاران مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نسبت به کواموکسی کلاو ۹۴ درصد، جنتامایسین۹۶ درصد واریترومایسین ۹۷ درصد گزارش شده است .در این مطالعه هیچ موردی از مقاومت به ونکومایسین دیده نشد، که مشابه نتایج مطالعه ما می‌باشد(۲۲) .ارزیابی مقاومت سویه‌های MRSA به سایر آنتی بیوتیک‌ها از جمله لینزولید ، موپیروسین و کوتریموکسازول در مطالعات آینده ضروری به نظر می رسد.

نتیجه‌گیری:

فراوانی سویه‌های MRSA در منطقه ما بالا است. مقاومت همزمان سویه‌هایMRSA به سایر آنتی بیوتیک‌ها درمان آنها را با محدودیت روبرو کرده است .

تقدیر وتشکر:

این طرح با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان اجرا شده است . در اجرای این طرح پرسنل آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان‌های ۵ آذر ،طالقانی و دزیانی گرگان به‌ویژه خانم‌ها گلریز ،شاه دهی وحاجی لری و آقای نادر صالحی از آزمایشگاه دانش گرگان همکاری صمیمانه‌ای اشته‌اند. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان و همه همکاران گرامی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید .

فهرست مراجع:

1. Martineau F, Picard FJ, Roy PH , Ouellette M, Bergeron M .Species- specific and ubiquitous-DNA–based assay for rapid identification of *S. aureus. J clin microbiol* 1998; **36**(3):618-623.

2 .Xue M X, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chong Tracool P, Vavra S, *et al*.Novel type of Staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus strains .Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**(4): 1147-1152.

3.Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin Resistatnt *Staphylococcus aureus* containing the panton valentine leukocidin in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 2007 ; **60**: 1258-1263 .

4.Oteo J,Baquero F, Vindel A, Campos J.Antibiotic resistance in 3113 blood isolate of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European antimicrobial resistance surveillance system .*J Antimicrob Chemother* 2004 ; **53**:1033-1038.

5.Martins A, Lourdes M, Cunha R. Methicillin Resistance In *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci*:* epidemiological and molecular aspect. *Microbial Immunol* 2007; **51**(9):787-795 .

6.Zhang K, Mcclure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **43**(10):5026-5033 .

7. Brown FJ, Edward D, Hawkey P, Morrison D, Ridgway G, Towner K, *et al*. Guideline for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**:1000-1018.

8.Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *bailey&scotts Diagnostic microbiology* .12th ed. USA;Elsevier. 2007; pp:172-213.

9.Krishnan P, Miles K, Shety N. Detection of Methicillin and Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated using conventional and molecular method: a descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA. *J Clin Pathol* 2002; **55:**745-748 .

10.Kohner P,Uhl J ,Kolbert C, Persing D, Cockerill F.Comparison of susceptibility testing method with mecA gene analysis for determining Oxacillin (Methicillin) resistance in clinical isolate of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococcus spp. *J clin microbiol* 1999; **37**(9):2952-2961.

۱۱.محرز م ،جنیدی ن ،رسولی نـژاد م ،برومنـد م ،علیقلـی م ،شاهسون ش.شیوع عفونـت‌هـای *استافیلوکوک اورئـوس* مقاوم به متی سیلین با روش تعیین MIC. *مجلـه دانـشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران* ۱۳۸۲،سال ۶۱ شماره ۳ ،صص ۱۸۲تا ۱۹۲ .

۱۲.علیقلی م،عینی م، هاشمی ف ،شاهسون ش ،جبـل عـاملی ف ،کـاظمی ب. تعیـین الگـوی مقـاومتی آنتـی بیـوتیکی سـویه‌هـای *استافیلوکوکوس اورئـوس* در نمونـه‌هـای بیمارستانی .*مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علـوم پزشـکی تهران* ۱۳۸۵ ،سال ۶۴ شماره ۹ ، صص ۲۶-۳۲.

13.Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B.Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin resistant staphylococci. *Iran Biomed J* 2004; **8**(3):161-165.

۱۴.نادری نسب م،افشاری ج،ناظم م ،فاتح منش پ ،فرامـرزی ح ،خدادوست م .تعیین *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین از طریق روش‌های فنوتیپیک .*مجله دانشکده پزشکی دانـشگاه علـوم پزشـکی مـشـهد* ۱۳۸۴،سـال ۴۸شـماره ۸۷،صص ۷-۱۶.

15.Udo EE, Al-Sweih R, Dahr TS, Dimitrov EM, Mokaddas M, Johny IA, *et al*. survaillance of antibacterial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Kuwaiti hospitals. *Med Prink Pract* 2008;**17**:71-75.

16.Mdani TA, Al-Abdollah NA,Al-Sanousi A. Methicillin –Resistant *Staphylococcus aureus* in two tertiary-care centers in Jaddah Saudi Arabia .*infect Control Hosp Epidemiol* 2001;**22**:211-216.

17.Hsueh PR, Teng LG, Chen WH, Pan HJ, Chen Ml, Chang S, *et al*. Increasing prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan from 1986to 2001. *J Antimicrob Chemother* 2004; **48**(4): 1361-4.

18. Arzu T,Serhat U,Akalin E.risk factors influencing clinical outcome in *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Agent* 2000;**14**:57-63.
19. Oliveria L,Wey S,Castelo A.risk factor for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia .*Infect Control Hos Epidemiol* 1998;**19**:32-37.
20..Heo ST, Peck KR, Ryu SY, Kwon KT, Ko KS, Sup W, *et al*. Analysis of Methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* blood isolate in an emergency department. *J Korea med* 2007; **22**: 682-686.
21. Ronald C.A Comparison of clinical virulence of nosocomially acquired methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a university hospital .*Infect Control Hosp Epidemiol*1992;**13**:587-593.
22. Fatholahzadeh B,Emaneini M,Gilbert G,Udo E, Aligholi M,Modarressi M H. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolets in Tehran ,iran .*Microbial Drug Resis*2008;**14**(3):217-220.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۴۵- ۳۷

مقایسه فراوانی تولید آنزیم β-لاکتاماز و الگوی حساسیت باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح در بیمارستان فوق تخصصی الزهرا-اصفهان

شیلا جلال پور[۱*] ، روحا کسری کرمانشاهی[۲] ، اشرف‌السادات نوحی[۳] ، حمید زرکش اصفهانی[۴]

۱) گروه صنایع غذایی، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا.اصفهان.
۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا.تهران.
۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران
۴) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
نویسنده رابط : شیلا جلال پور، گروه صنایع غذایی، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا.اصفهان.
تلفن: ۰۳۲۱۳۲۴۳۰۰۵ shilla.jalalpoor@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۷/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: سطوح بیمارستان منابع بالقوه باکتری‌های بیماری‌زا است ودست پرسنل بیمارستانی مهم‌ترین عامل انتشار باکتری‌ها در بیمارستان می‌باشد. شیوع آنزیم β-لاکتاماز در باکتری‌های موجود روی دست پرسنل و سطوح بیمارستان منجر به انتشار این آنزیم در باکتری‌ها و نهایتاً افزایش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد. هدف از این مطالعه مقایسه تولید آنزیم β-لاکتاماز و الگوی آنتی بیوگرام در باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح کم تماس و پر تماس بیمارستان فوق تخصصی الزهرااصفهان بود.

روش بررسی: این مطالعه آزمایشگاهی در سال‌های ۸۶-۱۳۸۴ در بیمارستان الزهرا اصفهان انجام شد. در مجموع ۲۷۴ نمونه (۱۹۴ نمونه از سطوح و ۸۰ نمونه از دست پرسنل) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های محیطی با استفاده از سوآب و محیط Nutrient Broth (NB) از سطوح بیمارستان و نمونه‌های دست پرسنل با روش Finger Print جمع آوری شدند. تعیین هویت گونه باکتری‌ها با روش‌های باکتری شناسی، تولید β-لاکتاماز با روش اسیدومتریک و الگوی آنتی بیوگرام با روش کربی بائر انجام گردید.

یافته ها: ۱۹۴ سویه جداسازی شده از سطوح بیمارستان عبارت بودند از : گونه‌های استافیلوکوکوس ۱۰۵ (۵۳/۷٪) سویه، گونه‌های باسیلوس ۴۷ (۲۴٪) سویه، انتروباکتریاسه ۲۱ (۱۰/۷٪) سویه، گونه‌های پسودوموناس ۹ (۴/۶٪) سویه ، گونه‌های استرپتوکوکوس ۲ (۱٪) سویه و سایر باسیل‌های گرم منفی ۱۰ (۵/۱۵٪) سویه. ۸۰ سویه جداسازی شده از دست پرسنل عبارت بودند از : گونه‌های باسیلوس ۴۸ (۶۰٪) سویه، گونه‌های استافیلوکوکوس ۲۸ (۳۵٪) سویه و انتروباکتریاسه ۴ (۰/۵٪) سویه. میزان مقاومت سویه‌های جدا شده از هر دو منبع، گاهی به ۱۰۰٪ می‌رسید. به ترتیب ۱۲۵ (۶۱/۵۴٪) و ۴۶ (۶۱/۸۵٪) سویه جداسازی شده از سطوح و دست پرسنل بیمارستان مولد آنزیم β-لاکتاماز بودند.

نتیجه گیری : نتایج مبین شیوع باکتری‌های مقاوم دربرابر آنتی بیوتیک‌ها و تولید آنزیم β-لاکتاماز در سویه‌های دست پرسنل و سطوح بیمارستان است.

کلید واژه ها: β-لاکتاماز، مقاومت آنتی بیوتیکی، سطوح بیمارستان، دست پرسنل

مقدمه:

سازمان جهانی بهداشت بیمارستان را محلی معرفی می‌کند که در آن بر سلامت بیشتر بیماران تکیه می‌شود. عفونت بیمارستانی به عفونتی اطلاق می‌شود که در زمان بستری شدن در بیمارستان ایجاد شود، بیمار عامل عفونت زا را از محیط بیمارستان کسب نماید، در هنگام پذیرش در بیمار وجود نداشته باشد و در حالت کمون نیز نبوده باشد. این عفونت‌ها حداقل ۴۸ ساعت پس از بستری آشکار می‌گردند. بر اساس آمار منتشره از طرف سازمان جهانی بهداشت در طی یک بررسی روی ۵۵ بیمارستان از ۱۴ کشور دنیا، به نمایندگی از چهار ناحیهٔ تحت پوشش سازمان بهداشت جهانی (اروپا، شرق مدیترانه، آسیای جنوب شرقی و منطقه غرب اقیانوس آرام) مشخص گردیده است بیشترین میزان عفونت‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های شرق مدیترانه و آسیای جنوب شرقی به ترتیب با شیوع ۱۱/۸٪ و ۱۰٪ و کمترین میزان عفونت در منطقه غرب اقیانوس آرام و اروپا به ترتیب با شیوع ۹٪ و ۷/۷٪ مشاهده شده است. بر اساس مطالعات سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۵ بیش از ۱/۴ میلیون نفر از مردم دنیا از عوارض عفونت‌های بیمارستانی رنج برده اند. میزان مرگ و میر ناشی از انواع عفونت‌های بیمارستان ۷۱٪-۱۴٪ متغیر می‌باشد (۱-٤).

دست پرسنل بیمارستان به عنوان مهم‌ترین عامل انتقال و انتشار باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها در بیمارستان، یکی از عوامل زنجیره عفونت محسوب می‌گردند. بنابر اهمیت دست پرسنل در انتشار باکتری‌ها در محیط بیمارستان و ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، مبحث کنترل عفونت در (معنای مدرن) توسط Ignaz Semmelweis در سال ۱۸۴۰ در پی اثبات اهمیت بهداشت دست پرسنل بیمارستان در کنترل عفونت‌های بیمارستانی مطرح گردید (۶-۴).

کنترل بهداشت دست پرسنل مراکز درمانی، مهم‌ترین عامل مهار انتشار باکتری‌های خطرناک و مقاوم دربرابر آنتی بیوتیک‌ها در میان پرسنل مراکز درمانی می‌باشد. به این ترتیب که با ارتقاء بهداشت دست پرسنل بیمارستان، عفونت‌های بیمارستانی ۴۰٪ کاهش می‌یابد (۷).

فلور باکتریایی پوست در مناطق مختلف بدن واجد مقادیر مختلفی از باکتری‌های هوازی می‌باشد. به طور مثال CFU/cm^2 ۱×۱۰^۶ باکتری روی پوست سر، CFU/cm^2 ۵×۱۰^۵ باکتری روی پوست زیر بغل، CFU/cm^2 ۴×۱۰^۴ باکتری روی پوست شکم و CFU/cm^2 ۱×۱۰^۴ باکتری روی پوست آرنج وجود دارد. باکتری‌های روی دست پرسنل مراکز درمانی در محدوده CFU/cm^2 $۳/۹\times۱۰^۴$-$۴/۶\times۱۰^۶$ قرار دارد. فلورباکتریایی موجود روی پوست دست به ۲ دسته فلورگذرا و پایدار طبقه بندی می‌شوند (۸).

سطوح بیمارستان از جمله عوامل چرخه عفونت محسوب می‌گردند. زیرا از توان بالقوه‌ای برای حفظ و نگهداری باکتری‌های بیماری زا و نهایتاً انتشار عوامل عفونی در بیمارستان برخوردار می‌باشند. این سطوح به طور کلی به دو دسته تقسیم می‌شوند: ۱- سطوح پرتماس که عبارتند از سطوحی که دست با آنها زیاد در تماس می‌باشد از جمله دستگیرهٔ در، تخت‌های متحرک، سوئیچ، لبهٔ پرده‌ها، دیواره‌های اطراف دستشویی، میز رایانه، میز کنار تخت ۲- سطوح کم تماس که عبارتند از سطوحی که دست با آنها کمتر در تماس می‌باشد، از جمله سقف و کف اتاق (۹،۴).

مسأله دیگری که به دنبال عفونت‌های بیمارستانی مطرح می گردد، گسترش و انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد. از آنجا که بیمارستان محیط مناسبی برای انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر یا از پرسنل به بیماران محسوب می‌شود، انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های موجود در بیمارستان از اهمیت خاصی برخوردار است. انتشار مقاومت در بیمارستان به دو علت عمده رخ می‌دهد: ۱- مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان‌ها ۲- انتشار سریع عفونت در بیمارستان (۱۰).

از جمله مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌های مصرفی در بیمارستان‌ها، آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام می‌باشند. زیرا هم طیف اثر گسترده‌ای دارند و هم اثرات جانبی کمی بر میزبان دارند. باکتری‌ها روش‌های گوناگونی برای مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام دارند. یکی از متداول‌ترین و در واقع مهم‌ترین این روش‌ها، تولید آنزیم‌های غیر فعال‌کنندهٔ حلقه β-لاکتام ، یعنی β -لاکتاماز می‌باشد (۱۰). آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام آنتی بیوتیک‌های انتخاب اول در درمان عفونت‌های ناشی گونه‌های پاتوژن استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، باسیلوس، انتروباکتریاسه (ازجمله انتروباکتر، *اشریشیاکلی*، کلبسیلا، پروتئوس) و... محسوب می‌شوند (۱۰).

بر اساس مطالعات انجام شده در ایران و جهان، اکثر گونه‌های بیماری‌زای عامل عفونت‌های بیمارستانی حداقل در برابر یک خانواده آنتی بیوتیکی مقاوم شده‌اند و عمدتاً واجد توانایی تولید آنزیم β-لاکتاماز می‌باشند. از جمله این موارد می‌توان به انتشار

و گسترش عفونت‌های بیمارستانی ناشی از انتروباکتریاسه با مقاومت چند گانه اشاره نمود. در بسیاری از کشورهای جهان بیش از ۱۰٪ باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاومت نشان می‌دهند و در این میان بخش‌های مراقبت ویژه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. حدود ۳۰٪ از باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی مقاوم در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم از بخش‌های مراقبت ویژه جداسازی می‌شوند و ۶۷٪ از باکتری‌های جداسازی شده از عفونت‌های بیمارستانی واجد توانایی تولید آنزیم β-لاکتاماز می‌باشند (۱۱،۱۰).

این مطالعه با هدف مقایسه فراوانی تولید آنزیم β-لاکتاماز و الگوی حساسیت باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح در بیمارستان فوق تخصصی الزهرااصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه آزمایشگاهی در سال‌های ۱۳۸۶- ۱۳۸۴ در بیمارستان فوق تخصصی‌الزهرا اصفهان انجام گرفت. بر اساس برآورد حجم نمونه، ۱۹۴ نمونه از سطوح بیمارستان و ۸۰ نمونه از دست پرسنل بررسی شد.

جداسازی نمونه از دست پرسنل با استفاده از روش Fingerprint Technique انجام گردید (۱۲،۱۰). برای این منظور نمونه‌ها با تماس مستقیم سرانگشتان دست پرسنل، هم زمان روی محیط‌های Blood agar و EMB (Eosin Methylene Blue Agar) (شرکت Merck) جمع آوری گردیدند. نمونه‌های محیطی از سطوح کم تماس و پرتماس بیمارستان شامل صندلی، میز کنار تخت، کف اتاق، تشک پلاستیکی و لبه کنار پنجره اتاق بیماران بستری در بخش‌های؛ اطفال، جراحی، عفونی، داخلی، زنان، CCU ، ICU جمع‌آوری گردیدند (۱۰، ۱۳). جداسازی نمونه از سطوح بیمارستان با استفاده از روش جمع‌آوری نمونه‌های محیطی با سوآب و محیط NB (Nutrient Broth) (شرکت Merck) انجام گردید. هر نمونه روی محیط‌های Blood Agar و EMB به روش خطی کشت داده شد. ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌ها جداسازی و خالص‌سازی گردیدند جنس و گونه باکتری‌ها با انجام روش‌های باکتری شناسی انجام گردید: رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های؛ TSI (Triple Sugar Iron Agar) ، DNase، IMViC، کاتالاز، اکسیداز و استفاده از محیط های بلادآگار، نوترینت براث، مک کانکی آگار، ائوزین متیلن بلو آگار، سالمونلا-شیگلا آگار(ساخت شرکت Merck). (۱۴،۱۰).

بررسی حضور آنزیم β-لاکتاماز با روش اسیدومتریک انجام گردید. در این روش باکتری به محلولی که حاوی یکی از مشتقات پنی‌سیلین و یک معرف pH است (فنل رد) اضافه می‌گردد. محلول فوق الذکر بنفش رنگ است و در صورت تولید β-لاکتاماز، پنی‌سیلین به پنی‌سیلونیک اسید شکسته می‌شود و رنگ محلول از بنفش به زرد تغییر می‌یابد (۱۷-۱۵).

در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فنل رد ۰/۵٪ ، به ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. سپس محلول به یک ویال حاوی پودر پنی سیلین جی ۵ میلیون واحدی (شرکت پادتن طب) افزوده شد. پس ازحل شدن پنی سیلین جی به آرامی و قطره قطره، محلول سود ۱ مولار به ویال اضافه گردید تا رنگ بنفش تولید شود. در این حالت pH محلول ۸/۵ می‌باشد. سپس یک لوله موئینه به قطر ۰/۲ - ۱ میلی متر وارد ویال شد که پس از بالا آمدن محلول در لوله، بلافاصله روی سطح کلنی باکتری کشیده می‌شد، تا انتهای لوله توسّط باکتری کاملاً مسدود گردد. نتیجه آزمایش بعد از ۱۵-۵ دقیقه قرائت می‌شد(۱۷-۱۵).

بررسی الگوی حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، وانکومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، کلیندامایسین، سفوتاکسیم و پنی سیلین (شرکت پادتن طب) بر اساس روش کربی بائر انجام گردید. تحت شرایط استریل، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند از باکتری با استفاده از سوآب در سطح محیط Mueller-Hinton Agar (MHA) (شرکت Merck) پخش می‌شد. سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک روی محیط قرار داده می‌شد. نتایج پس از ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد خوانده می‌شد (۱۸،۱۰). سپس اطلاعات وارد رایانه شده و توسط نرم‌افزار SPSS (V:14) و آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها:

۸۰ سویه جداسازی شده از دست پرسنل شامل ارگانیسم‌های ذیل بود: ۲۴ (۳۰٪) سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۴ (۵٪) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۳ (۱۶/۲۵٪) سویه *باسیلوس سرئوس*، ۳۵ (۴۳/۷۵٪) سویه از سایر گونه‌های باسیلوس، ۲ (۲/۵٪) سویه *اشرشیاکلی* و ۲ (۲/۵٪) سویه *کلبسیلا پنمونیه*. ۱۹۴ سویه جداسازی شده از سطوح بیمارستان (۴۲٪ از سویه‌ها از سطوح کم تماس و ۵۸٪ از سویه‌ها از سطوح پر تماس جداسازی شدند) شامل ارگانیسم‌های ذیل بود: ۸۸ (۴۵٪) سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۱۳ (۶/۷٪) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۴ (۲٪) سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۸ (۴٪) سویه *باسیلوس سرئوس*، ۳۹ (۲۰٪) سویه از سایر گونه‌های باسیلوس، ۸ (۴٪) سویه *اشرشیاکلی* ، ۱۳ (۶/۷٪) سویه *کلبسیلا پنمونیه*، ۹ (۴/۶٪) سویه پسودوموناس، ۱۰ (۵/۱۵٪) سویه از سایر باسیل‌های گرم منفی (۴ (۲/۰۶٪) سویه آلکالی ژنز، ۴ (۲/۰۶٪) سویه آسینتوباکتر، ۲ (۱/۰۳٪) هافنیا) و ۲ (۱٪) سویه استرپتوکوکوس (جدول‌های ۱و ۲).

جدول ۱: توزیع فراوانی باکتری‌های جدا شده از دست پرسنل بیمارستان و تولید β-لاکتاماز در آنها

گونه	Staphylococcus spp.				Bacillus spp.				Enterobacteriaceae			
	N		%		N		%		N		%	
	۲۸		٪۳۵		۴۸		٪۶۰		۴		٪۵	
جنس	*S.epidermidis*		*S.aureus*		Bacillus spp.		*B.cereus*		*E.coli*		*K.pnemonieae*	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	۲۴	٪۳۰	۴	٪۵	۳۵	۴۳/۷۵	۱۳	۱۶/۲۵	۲	٪۲/۵	۲	٪۲/۵
تولید β-لاکتاماز	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	۱۶	٪۶۶/۶۶	۳	٪۷۵	۱۳	٪۳۷/۱۴	۱۲	٪۹۲/۳	۱	٪۵۰	۱	٪۵۰

نتایج حاصل از تست اسیدومتریک نشان داد ۴۶ (٪۶۱/۸۵) سویه جداسازی شده از دست پرسنل و ۱۲۵ (٪۶۱/۵۴) سویه جداسازی شده از سطوح، به شرح ذیل بودند مولد آنزیم β-لاکتاماز بودند: ۱۱ (٪۸۴/۶) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۶۲ (٪۷۰/۴۵)، سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۳ (٪۷۵) سویه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، ۱۴ (٪۳۵/۹) سویه باسیلوس، ۸ (٪۱۰۰) سویه *باسیلوس سرئوس*، ۷ (٪۸۵/۷) سویه *اشرشیاکلی*، ۱۰ (٪۷۷) سویه *کلبسیلا پنمونیه*، ۳ (٪۳۳/۳) سویه پسودوموناس، ۶ (٪۶۰) سویه سایر باسیل‌های گرم منفی (۳ سویه آلکالی ژنز، ۲ سویه آسینتوباکتر، ۱ سویه هافنیا) و ۱ (٪۵۰) سویه استرپتوکوکوس از سطوح بیمارستان و ۱۶ (٪۶۶/۶۶) سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۳ (٪۷۵) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۳ (٪۳۷/۱۴) سویه باسیلوس، ۱۲(٪۹۲/۳) سویه *باسیلوس سرئوس*، ۱ (٪۵۰) سویه *اشرشیاکلی* و ۱ (٪۵۰) سویه *کلبسیلا پنمونیه* از دست پرسنل (جدول ۱و ۲).

نتایج حساسیت سویه‌های جدا شده از دست پرسنل و سطوح به آنتی بیوتیک‌ها به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ ارائه شده‌اند.

جدول ۲: توزیع فراوانی باکتری‌های جداسازی شده از سطوح بیمارستان و تولیدβ-لاکتاماز

جنس	Staphylococcus spp.						Bacillus spp.				Enterobacteriaceae			
تعداد / درصد	N			%			N		%		N		%	
	۱۰۵			٪۵۳/۷			۴۷		٪۲۴		۲۱		٪۱۰/۷	
گونه	*S.epidermidis*		*S.aureus*		*S.saprophyticus*		*Bacillus spp.*		*B.cereus*		*E.coli*		*K.pneumoniae*	
تعداد / درصد	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	۸۸	٪۴۵	۱۳	٪۶/۷	۴	٪۲	۳۹	٪۲۰	۸	٪۴	۸	٪۴	۱۳	٪۶/۷
تولید β-لاکتاماز	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	۶۲	٪۷۰/۴۵	۱۱	٪۸۴/۶	۳	٪۷۵	۱۴	٪۳۵/۹	۸	٪۱۰۰	۷	٪۸۵/۷	۱۰	٪۷۷

جنس	Pseudomonas spp.		Other Gram - Bacillus		Streptococcus spp.	
	N	%	N	%	N	%
تعداد / درصد	۹	٪۴/۶	۱۰	٪۵/۱۵	۲	٪۱
	N	%	N	%	N	%
تولید β-لاکتاماز	۳	٪۳۳/۳	۶	٪۶۰	۱	٪۵۰

جدول ۳: درصد حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل بیمارستان

آنتی بیوتیک / باکتری	جنتامایسین		تتراسایکلین		اریترومایسین		آمپی سیلین		تریمتروپریم-سولفامتوکسازول		کلیندامایسین		سفوتاکسیم		پنی سیلین	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Bacillus spp.	۲۹	٪۱۰۰	۳۱	٪۹۶	۲۶	٪۸۹	۲۵	٪۸۰	۲۲	٪۷۳	۲۲	٪۶۸	۱۹	٪۶۱	۱۷	٪۵۶
B.cereus	۶	٪۱۰۰	۷	٪۱۰۰	۴	٪۶۶	۳	٪۵۰	۴	٪۵۷	۷	٪۸۷	۰	٪۰	۰	٪۰
S.aureus	۱	٪۵۰	۲	٪۶۶	۲	٪۵۰	۲	٪۵۱	۱	٪۲۵	۲	٪۶۶	۱	٪۵۰	۰	٪۰
S.epidermidis	۱۵	٪۷۸	۲۰	٪۹۰	۸	٪۵۰	۲۰	٪۹۰	۱۲	٪۵۷	۱۷	٪۷۳	۱۶	٪۶۹	۸	٪۳۳

جدول ۴: درصد حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده از سطوح بیمارستان

آنتی بیوتیک / باکتری	جنتامایسین		تتراسایکلین		اریترومایسین		آمپی سیلین		تریمتروپریم-سولفامتوکسازول		کلیندامایسین		سفوتاکسیم		پنی سیلین	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S.aureus	۷	٪۷۸	۳	٪۵۰	۶	٪۶۶	۷	٪۱۰۰	۲	٪۲۰	۶	٪۶۷	۹	٪۷۵	۳	٪۱۹
S.epidermidis	۴۵	۷۷	۴۵	٪۷۱	۲۹	٪۴۷	۴۳	٪۷۰	۳۹	٪۵۹	۵۱	٪۷۷	۴۵	٪۶۷	۸	٪۲۲
Bacillus spp.	۳۰	٪۸۶	۳۳	٪۸۲	۳۳	٪۸۲	۲۷	٪۸۲	۳۱	٪۶۸	۱۹	٪۴۱	۲۵	٪۵۷	۲۷	٪۶۴
B.cereus	۱	٪۱۰۰	۱۱	٪۹۲	۹	٪۸۲	۶	٪۶۰	۱	٪۳۳	۹	٪۷۵	۸	٪۶۶	۰	٪۰
K.pneumoniae	۳	٪۱۰۰	۲	٪۶۶	–	–	۴	٪۸۰	۴	٪۱۰۰	۰	٪۰	۵	٪۷۱	۲	٪۲۰
E.coli	۶	٪۸۸	۵	٪۶۲/۵	–	–	۴	٪۵۰	۵	٪۵۵/۵	۱	٪۱۲/۵	۷	٪۷۸	۳	٪۳۳

بحث:

نتایج این مطالعه نشان داد گونه‌های استافیلوکوکوس و باسیلوس به ترتیب با فراوانی ۵۳/۷٪ و ۲۴٪ بیشترین باکتری‌های جدا شده از سطوح بیمارستان و گونه‌های باسیلوس و استافیلوکوکوس به ترتیب با فراوانی ۶۰٪ و ۳۵٪ بیشترین باکتری‌های جدا شده از دست پرسنل بیمارستان هستند. نتایج بیانگر تشابه نسبی توزیع کمی وکیفی باکتری‌ها در سطوح و دست پرسنل بیمارستان می‌باشد.این امر مؤید تبادل باکتری‌ها در منابع مزبور است.

نتایج مطالعات مشابه در خصوص اپیدمیولوژی باکتری‌ها در دست پرسنل و سطوح بیمارستان مشخص گردیده است گونه‌های استافیلوکوکوس و باسیلوس بیشترین باکتری‌های جداسازی شده از محیط بیمارستان و گونه‌های باسیلوس بیشترین باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل بیمارستان هستند (۲۰،۱۹،۱۰).

فراوانی تولید آنزیم β-لاکتاماز در باکتری‌های جداسازی شده از سطوح بیمارستان و دست پرسنل حاکی از شیوع قابل ملاحظه آن است. بیشترین شیوع آنزیم β-لاکتاماز در سویه‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. به این ترتیب که ۸۴/۶٪ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۱۰۰٪ سویه‌های *باسیلوس سرئوس* از سطوح و ۷۵٪ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و۹۲/۱۲٪ سویه‌های *باسیلوس سرئوس* از دست پرسنل، مولد آنزیم β-لاکتاماز بودند. نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد ۵۸/۸٪ از باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل، ۶۷٪ از نمونه‌های مرضی، ۷۰/۱٪ از سطوح بیمارستان، ۸۵٪ از محیط ،۷۶/۵۶٪ از گونه‌های استافیلوکوکوس، ۲۵٪ از گونه‌های پسودوموناس، ۷۶/۷۴٪ از گونه‌های کلبسیلا، ۶۰/۶۰٪ از سویه‌های *اشرشیاکلی*،۵۰٪ از گونه‌های پروتئوس و ۵۴٪ از گونه‌های سیتروباکتر مولد آنزیم β-لاکتاماز بوده‌اند (۲۱،۱۰).

به ترتیب ۲۸٪ و ۱۶/۵٪ از گونه‌های باسیلوس و استافیلوکوکوس جدا شده از دست پرسنل ، ۳۲٪ و ۲۰/۵٪ از گونه‌های باسیلوس و استافیلوکوکوس جداسازی شده از سطوح بیمارستان و ۲۶/۵٪ از گونه‌های انتروباکتریاسه جداسازی شده از سطوح بیمارستان در برابر پنی سیلین حساس بودند. این امر به دلیل انتشار گسترده آنزیم β-لاکتاماز در باکتری‌های مزبور و مؤید شیوع مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های β-لاکتام در جنس‌های گوناگون باکتری‌ها می‌باشد. نتایج حاصل در مطالعه حاضر و سایر مطالعات (۲۰،۱۹،۱۰) مبین انتشار گسترده گونه‌های استافیلوکوکوس و باسیلوس در سطوح بیمارستانی و هم‌چنین شیوع قابل ملاحظه آنزیم β-لاکتاماز در باکتری‌های جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح بیمارستان می‌باشد (۲۱،۱۰).

نتایج نشان‌دهنده مقاومت سویه‌ها در برابر پنی سیلین و حساسیت آنها در برابر تتراسایکلین و جنتامایسن است. نتایج بررسی‌های دیگر نیز حاکی از مقاومت سویه‌های جدا از نمونه‌های بالینی و محیطی بیمارستان در برابر آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتامام است.(۲۳،۲۲،۱۰).

یکی از مهم‌ترین دلایلی که منجر به انتشار و انتقال ژن‌های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها (پلاسمید های R) می‌گردد، تراکم و مجاورت باکتری‌های مقاوم درکنار باکتری‌های حساس و انتقال مستقیم پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت است. کنترل تراکم باکتری‌ها منجر به کنترل انتقال ژن‌های پلاسمیدی و کاهش ایجاد سویه‌های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد. حفظ بهداشت فردی (لباس، مو، ناخن، و استفاده از ابزار حفاظتی و کنترلی از جمله ماسک، دستکش، لباس مخصوص و...) و به خصوص حفظ بهداشت دست پرسنل منجر به کاهش عفونت‌های بیمارستانی می‌گردد. با توجه به نقش دست پرسنل بیمارستان و ارتباط مستقیم پرسنل با بیماران و ابزار پزشکی و غیر پزشکی، پیشنهاد می‌گردد؛ ضمن کنترل بیشتر و دقیق‌تر میکروبی سطوح بیمارستان، افزایش ارتقاء مواد ضدعفونی‌کننده سطحی، کیفیت مایع دست‌شویی در بیمارستان‌ها نیز ارتقاء یابد.هم چنین طریقه استفاده مناسب و موثر از این مواد نیز به پرسنل آموزش داده شود (۱۰، ۳۰-۲۴).

نتیجه‌گیری:

نتایج مؤید انتشار وسیع گونه‌های استافیلوکوکوس، باسیلوس و انتروباکتریاسه مولد آنزیم β-لاکتاماز و مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها در سطوح و دست پرسنل بیمارستان است.

تقدیر وتشکر:

کمال تشکر و قدردانی خود را از مدیریت بیمارستان فوق تخصصی الزهرا، مدیریت آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم

دانشگاه اصفهان، مدیریت بخش مجلات دانشگاه علـوم پزشـکی اصفهان، کمیته کنترل عفونت بیمارستان الزهرا، خانم‌ها و آقایـان دکتر اردشـیر طـالبی، دکتـر مهـرداد معمـارزاده، دکتـر کامیـار مصطفوی زاده، سینا مباشری زاده، فریبرز کیانپور، محسن حسینی بالام، کبری مقصودی، مهندس علی مهرابی و تمامی عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یارای ما بودند، اعلام می‌نمایم.

فهرست مراجع:

1. Kim JM. Multicentre surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. *Am J Infect Control*. 2000;**28**:454–8.
2. Stone P,Larson E, Kawar L. A systematic audit of economic evidence linking nosocomial infections and infection control interventions: 1990-2000. *Ame J Infect Cont*. 2002;**30**:145-52
3. Vasque J, Rossello J, Arribas JL. Prevalence of nosocomial infections in Spain: EPINE study 1990–1997.EPINE Working Group. *J Hosp Infect* ,1999;**43** Suppl: S105–S111.
4. Girard R ,Perraud M, Pruss A ,Savey A, Tikhomirov E, Thuriaux M, Vanhems P. Prevention of hospital-acquired infections, A practical guide, Department of Communicable Disease,Surveillance and Response, Editors; Ducel G, Fabry j, Nicolle L, 2nd edition.2002.Available at WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12.
5. Raymond J, Aujard Y, European Study Group. Nosocomial Infections in Pediatric Patients: A European,Multicenter Prospective Study. *Infect Control Hosp Epidemiol*.2000;**21**:260–63.
6. Pratt RJ.The epic project: Developing national evidence-based guidelines for preventing healthcare associated infections.Phase I : Guidelines for preventing hospital- acquired infections.*J Hosp Infect* .2001;**47** (Supplement) : S3–S4.
7. Dier P, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *The Lancet*.2000;**35**:1307-11.
8. Boyce J.M, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. 2002;**51**/RR-16.
9. Sehulster L, Raymond Y.W.Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. U.S.Department of Health and Human Services Centers for Disiase Control and Prevention (CDC).2003,Atlanta GA 30333.
10. Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R, Noohi A, Zarkesh H. Study of β-lactamase and S-layer Production in some of Isolated Pathogen Bacteria From Clinical and Environmental Hospital Samples. MSc thesis,Iran, Tehran, Islamic Azad University Science and Research Branch Tehran .1386:169-207.
11. Endimiani A ,Paterson D.L. Optimizing therapy for infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Semin Respir Crit Care Med* .2007;**28**(6):646-55.
12. Estes R. Food, Hands and Bacteria.2000. Available at http://pubs.caes.uga.edu/ caespubs/pubcd/B693.htm#Wash.Accessed july 8,2006.
13. Poletti L, Pasquarella C, Pitzurra M, Savino A.Comparative efficiency of nitrocellulose membranes versus RODAC plates in microbial sampling on surface.*J Hosp Infect*.1999;**41**:195-201.
14. Washington C, Stephen A, Janda W, Koneman E, Procop G,Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6 ed .USA: Lippincott wiiliams and wilkins. 2006:775-9.
15. β-lacatamase testing for beta lactamase production.2006.Available at www.Aecom .yu.edu/home/id/idmicro/betalactamase.htm.2006.Accessed 9.5.2006.
16. Wikler M.A, Cockerill F.R, Craig W.A, Dudley M.N Eliopoulos G.M, Hecht D.W,*et al*. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute,2009;**29**(3):21.
17. Thornsberry C, Kirven L.A. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* .1974;**6**(5):653-4.
18. Wikler M.A, Cockerill F.R, Craig W.A, Dudley M.N Eliopoulos G.M, Hecht D.W,*et al*. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute,2009;**29**(3):32-44.
19. Jalalpoor Sh,Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Study to Spreading Bacteria in How and Low Contact Surfaces in Hospital.9 th Iranian Congress of Microbiology ,Iran, kerman.4-6 March.2008:p.208.

20.Jalalpoor Sh,Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Survey and Comparative Bacterial Spread Pattern in Staff Hands and High and Low Contact Hospital Surfaces. Third Iranian Congress of Clinical Microbiology;Iran, shiraz.2009:184.
21.Jalalpoor Sh,Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Survey Frequence beta Lactamase in Bacterial Isolated of Staff Hands.2nd International Biology Congress.Iran,Tehran. 1386:38.
22.Jalalpoor Sh,Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Antibiotic Resistance in *B.cereus* st. Isolated from Staff Hands and Hospital Surfaces. Third Iranian Congress of Clinical Microbiology.Iran,shiraz.2009:184.
23.Jalalpoor Sh,Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Survey Prevalence of Multi Drug Resistance Organisms Isolated Bacteria from Clinical and Environmental Samples in Alzahra Hospital. 10 th Iranian Congress of Microbiology.Iran,Ilam.2009:51.
24.Shlaes D.M, Gerding D.N, John IfJr,Craig W.A, Bornstein D.L, Duncan R.A, *et al*. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*.1997;**18**(4):275–91.
25.Struelens M.J. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ*. 1998 ;317(**7159**):652–4.
26.Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Hospital antibiotic control measures in the UK. *J Antimicrob Chemother* .1994;**34**:21–42.
27.Scheckler W.E, Brimhall D, Buck A.S, Farr B.M, Friedman C, Garibaldi R.A, *et al*. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: a consensus panel report.Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Conrolt Hosp Epidemiol*. 1998;**19**(2):114-24.
28.Tenover F.C, Arbeit R.D, Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* .1997;**18**(6):426-39.
29.World Health Organization. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Original: English, Distribution: General .2001.2.Available at WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2**.**Accessed 3.6.2007.
30.Widmer A.F .Replace hand washing with use of a waterless alcohol hand rub. *Clin Infect Dis* .2000;**31**(1):136-43.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۵۲- ۴۶

بررسی مولکولی فراوانی ویروس *هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۸

پیام قاسمی دهکردی[۱]، حسن ممتاز[۲*]، عباسعلی رضائیان[۱]، رامین یعقوبی[۳]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
۳) مرکز تحقیقات پیوند اعضاء، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
نویسنده رابط: حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
همراه: ۰۹۱۳۳۸۱۲۵۷۴ hamomtaz@iaushk.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۲۵

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت ناشی از *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* (*HSV-2*) اغلب سبب ایجاد هرپس تناسلی در زنان و مردان، هرپس نوزادی و مننژیت غیر چرکی می‌گردد. ایجاد این بیماری‌ها در ارتباط با بیماری ناشی از *HIV* است و امکان انتقال آن از مادر به نوزاد وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین شیوع عفونت ناشی از *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در مراجعه کنندگان به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و پاتولوژی استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری به روش PCR صورت گرفت.

روش بررسی: ۱۰۰ نمونه سرم با میزان IgG و IgM بالا از بیماران مشکوک جمع‌آوری شد. در مجموع ۸۲ نمونه (۸۲٪) از استان اصفهان و ۱۸ نمونه (۱۸٪) از استان چهارمحال و بختیاری به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. DNA ویروس استخراج و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت ردیابی ژن *gD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* انجام شد.

یافته ها: ۱۰۰ نمونه متعلق به بیماران مشکوک با محدوده سنی ۱ ماه تا ۶۵ سال بررسی شد. از این تعداد، ۸ نمونه (۸ ٪)، واجد قطعه ۱۰۱۳ جفت بازی مربوط به ژن *gD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* بودند. در این میان ۵ نمونه (۶/۰۹ ٪) مربوط به استان اصفهان و ۳ نمونه (۶۶/ ۱۶٪) مربوط به استان چهارمحال و بختیاری بود.

نتیجه‌گیری: فراوانی *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* مشابه دیگر نقاط جهان است. آزمایش PCR برای تشخیص DNA ویروس در نمونه‌های سرمی مفید و می‌تواند برای تشخیص *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در بیماران استفاده شود.

کلید واژه ها: *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* (*HSV-2*) ، PCR، ژن *gD*، استان اصفهان، استان چهارمحال و بختیاری

مقدمه:

هرپس تناسلی اغلب به میزان بالایی ناشی از *هرپس ویروس تیپ ۲* انسان (*HHV-2*) یا *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* (*HSV-2*) است و از طریق تماس جنسی انتشار می‌یابد. در حالی که *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱* (*HSV-1*) بیشتر سبب هرپس لبی (تبخال) شده و از راه بوسیدن در انسان ایجاد می‌شود. *HSV-2* از خانواده *هرپس ویریده* و زیر خانواده *آلفا هرپس ویرینه* است. ژنوم آن DNA بزرگ دو رشته‌ای خطی به اندازه kbp ۲۲۹- ۱۲۵ است. عفونت اولیه ناشی از *HSV-2* در زنان معمولاً شامل عفونت فرج، واژن و سرویکس می‌باشد. در مردان آسیب پوستی ناشی از عفونت مربوط به نوک پنیس، پوست ختنه گاه (Prepuce) یا بدنه آلت تناسلی است. به طور اختصاصی در هر دو جنس، بیماری اولیه همراه با تب، بی‌قراری، بی‌اشتهایی و آسیب دو طرفه غدد کشاله ران می‌باشد. همچنین در زنان سوزش ادرار و مشکل در نگهداری ادرار مشاهده می‌شود. انتقال بیماری از مادر به نوزاد (هرپس نوزادی) در حین زایمان روی می‌دهد که سبب؛ آسیب چشمی، درگیری پوست، دهان، آسیب دستگاه اعصاب مرکزی (CNS)، دیگر اعضای داخلی، محدودیت رشد جنین و حتی مرگ در نوزاد می‌گردد. حدود ۱۰ درصد از بیماران دچار منژیت پیشرفته می‌شوند. *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* توانایی بالا رفتن و نفوذ به ریشه گانگلیای اعصاب پشتی (DRG) را دارد و به حالت نهفته در این قسمت باقی می‌ماند. التهاب ریشه اعصاب نخاعی در هر دو جنس زن و مرد مشاهده می‌شود که در نتیجه درد عصبی و مشکل در نگهداری ادرار ایجاد می‌گردد. التیام کامل عفونت اولیه ممکن است چندین هفته طول بکشد (۱، ۲).

ویروس نهفته ممکن است مجدداً فعال شده و وارد مرحله تکثیر شود. فعالیت مجدد ویروس نهفته یکی از پدیده‌های شناخته شده زیستی است. اما، از نقطه نظر بیوشیمیایی و ژنتیکی ناشناخته است. Stimuli ارتباط بین فعال شدن *ویروس هرپس سیمپلکس* نهفته را در حالت استرس، قاعدگی و قرار گرفتن در معرض نور ماوراء بنفش گزارش کرد (۱، ۳).

مطالعات سرواپیدمیولوژی در آمریکا در سال ۱۹۸۸ پادتن‌های اختصاصی ضد *HSV-2* را بین ۲۵ ٪ تا ۶۵ ٪ نشان داد (۴). در حالی که در سال ۲۰۰۵ با بهبود وضعیت بهداشت و اطلاع رسانی مردم این میزان به ۲۰ ٪ کاهش یافت. مشخص شد شیوع پادتن بستگی به تعداد شریک‌های جنسی دارد (۴، ۵). شیوع سرمی *هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در اهداءکنندگان خون در شهر کرمان در سال ۱۳۸۰، ۲/۷ ٪ برآورد گردید (۵). مطالعه دیگری در شهر گرگان در سال ۱۳۸۵ شیوع ۴/۹ ٪ از این آلودگی را نشان داد (۴).

آلودگی جنین به وسیله *ویروس هرپس سیمپلکس* به طور تخمینی ۱ در ۳۰۰۰ در هر سال در ایالات متحده گزارش شده است. تقریباً ۷۰ ٪ از این موارد ناشی از *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* بوده که در نتیجه تماس جنین با ترشحات واژن و ناحیه تناسلی می‌باشد (۶).

آگاهی مردم از روش‌های سرایت و راه‌های پیشگیری و درمان این بیماری مهم است. با توجه به نبود واکسن مناسب برای پیشگیری از آن و ارتباط این بیماری با افراد مبتلا به ایدز، اطلاع رسانی دقیق عموم جامعه از طریق مراکز بهداشتی و گزارش میزان شیوع آن در کشور ضروری است. طبق اطلاعات موجودتاکنون درباره فراوانی *HSV-2* در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در منطقه جنوب غربی کشور مطالعه‌ای انجام نشده است. از طرفی بیشتر مطالعات انجام شده در خصوص این بیماری در کشور به روش سرولوژی می‌باشد. لذا، مطالعه حاضر جهت ردیابی ژن *gD* ویروس *HSV-2* و تشخیص دقیق آلودگی با این ویروس به روش PCR در دو استان مذکور و ارتباط آلودگی با سن و جنس افراد مورد مطالعه انجام شد. همچنین با توجه به نبود اطلاعات دقیق در این دو استان درباره محدوده سنی در معرض خطر و میزان شیوع آن در نوزادان این مطالعه صورت پذیرفت، تا از طریق آگاهی مردم و زنان باردار به وسیله مراکز بهداشتی و درمانی و متخصصین زنان و زایمان از شیوع عفونت ناشی از ویروس *HSV-2* جلوگیری به عمل آید.

مواد و روش‌ها:

۱- جمع‌آوری نمونه: ابتدا با آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و پاتولوژی دولتی و خصوصی و مراکز بهداشتی در سطح دو استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری هماهنگی شد. ضمن کسب رضایت از بیماران، تعداد ۱۰۰ نمونه سرم (به دلیل شیوع پایین) از بیماران مشکوک به *ویروس هرپس سیمپلکس*، با میزان IgG و IgM بالا (IgG>۱۲ و IgM>۱/۱) جمع آوری شد.

نمونه‌ها شامل ۸۲ نمونه (۸۲٪)از استان اصفهان و ۱۸ نمونه (۱۸٪)از استان چهارمحال و بختیاری بودند. به دلیل مراجعه کمتر بیماران به آزمایشگاه‌ها در سطح استان چهارمحال و بختیاری و مراجعه آنها به مراکز بهداشتی و درمانی استان‌های همجوار، از جمله استان اصفهان، از یک سو و شیوع پایین عفونت ناشی از این ویروس از سوی دیگر، باعث شد تعداد نمونه کمتری از استان چهارمحال و بختیاری در مقایسه با استان اصفهان جمع آوری گردد.

نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. همراه هر نمونه اطلاعات مورد نیاز (سن، جنس، سابقه سقط جنین در خانم‌ها، بیماری‌های قبلی از قبیل *ایدز* وسابقه زخم‌های ناحیه تناسلی) نیز جمع آوری شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۲- استخراج **DNA** : جهت استخراج DNA از نمونه سرم، از کیت Viral DNA Isolation Kit from Serum & DNA ساخت شرکت Rima (Trif Ara Farayand Co., Tehran-Iran)و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت استفاده شد.

۳- آزمایش **PCR** : جهت انجام PCR از زوج پرایمرهای اختصاصی ژن *gD* استفاده شد که توالی آن ها در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر از دستگاه Master cycler Gradient (Eppendorf Co.) با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۲ میلی مول $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱ میکرو مول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم (Roche Applied Science, Germany) Taq DNA Polymerase و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه استفاده گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از : یک سیکل ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۶ دقیقه.

جهت تأیید وجود قطعه ژنی تکثیر یافته ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱ کیلو بازی DNA (Fermentas Co., Germany) در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. مشاهده باند ۱۰۱۳ جفت بازی DNA پس از تابش نور UV به عنوان نمونه مثبت قلمداد شد (۷).

۴- تجزیه و تحلیل آماری : نتایج حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 و مدل آماری مربع کای و T test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

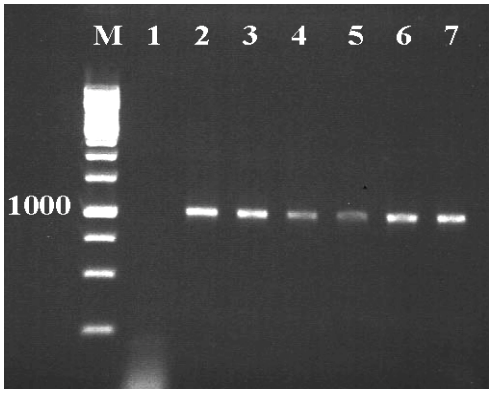
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *gD* ویروس *HSV-2*

پرایمر	توالی پرایمر (5´-3´)	اندازه محصول bp	شماره دسترسی
HSV-2-F	AAATACGCCTTAGCAGACC	1013	EU445527

یافته‌ها:

از مجموع ۱۰۰ نمونه، تعداد ۸ نمونه (۸ ٪) واجد قطعه ۱۰۱۳ جفت بازی در آزمایش PCR بودند (شکل ۱).

۱۰۰ نمونه مورد مطالعه متعلق به ۲۵ نفر (۲۵٪) مرد و ۷۵ نفر (۷۵٪) زن بود. از ۲۵ نمونه مرد ۲ نمونه (۸ ٪) و از ۷۵ نمونه زن ۶ نمونه (۸ ٪) مثبت بودند. بین فراوانی آلودگی در دو جنس زن و اختلاف معنی دار ($P<0.01$) مشاهده گردید(جدول ۲).



شکل ۱: ژل الکتروفورز حاصل از PCR نمونه‌های سرم

ستون M - مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون ۱- نمونه شاهد منفی، ستون‌های ۲ تا ۷- نمونه‌های بیماران.

جدول ۲: فراوانی *HSV-2* به تفکیک جنس در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری

نام استان	جنسیت				کل استان	
	زن		مرد			
	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد مثبت	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد مثبت	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد مثبت
استان چهارمحال و بختیاری	۱۲	۲ (٪۱۶/۶۶)	۶	۱ (٪۱۶/۶۶)	۱۸	۳ (٪۱۶/۶۶)
استان اصفهان	۶۳	۴ (٪۶/۳۴)	۱۹	۱ (٪۵/۲۶)	۸۲	۵ (٪۶/۰۹)
کل	۷۵	۶ (٪۸)	۲۵	۲ (٪۸)	۱۰۰	۸ (٪۸)

نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به گروه‌های سنی ۱ ماه تا ۶۵ سال بود. فراوانی آلودگی در گروه‌های سنی مختلف و ارتباط آن با میزان IgG و IgM در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین میزان آلودگی در گروه‌های سنی زیر ۱ سال (۲۵ ٪) و ۴۰-۱۹ سال (٪۷/۱۴) و کمترین آن در گروه‌های سنی ۱۸-۱ سال و ۴۱ سال به بالا با صفر درصد برآورد گردید. بین فراوانی آلودگی و متغیر سن اختلاف معنی‌دار ($P<0.01$) وجود داشت.

فراوانی آلودگی در استان چهارمحال و بختیاری ۱۶/۶۶ ٪ (تعداد ۳ مورد) و در استان اصفهان ۶/۰۹ ٪ (تعداد ۵ مورد) بود. بین فراوانی آلودگی در دو استان اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0.01$).

جدول ۳: فراوانی *HSV-2* در گروه‌های سنی مختلف و ارتباط آن با سطح IgG و IgM سرم

گروه سنی (سال)	تعداد نمونه	میانگین سطح IgG (IU/ml)	میانگین سطح IgM (IU/ml)	تعداد و درصد موارد مثبت
۱ <	۸	۶۳/۸	۱/۳۷۵	(٪۲۵)۲
۱-۱۸	۵	۲۳/۸۸	۰/۲۹۴	(٪۰)۰
۱۹-۴۰	۸۰	۱۰۲/۹۳	۶/۲۹	(٪۷/۱۴)۶
۴۱-۶۵	۷	۱۵۱/۴۴	۶/۲۵	(٪۰)۰
جمع کل	۱۰۰	۸۵/۵۱	۳/۵۵	(٪۸)۸

بحث:

در این مطالعه شیوع بیماری در استان اصفهان ۶/۰۹ درصد و در استان چهارمحال و بختیاری ۱۶/۶۶درصد است که اختلاف معنی‌داری دارد. این اختلاف با توجه به جمعیت کم استان چهارمحال و بختیاری و مراجعه کمتر بیماران به آزمایشگاه‌های این استان در مقایسه با استان اصفهان منطقی به نظر می‌رسد. در ۱۰ کشور پیشرفته دنیا شامل ایالات متحده آمریکا، کانادا، ژاپن، آلمان، انگلستان، بلژیک، فرانسه، ایتالیا، اسپانیا و استرالیا حدود ۱۰۷ میلیون نفر از لحاظ سرمی از نظر *HSV-2* مثبت هستند. از این میان ۸۶ میلیون نفر (۸۰/۳۷ درصد) دارای علائم بیماری هستند. اما، فقط ۲۱/۴ میلیون نفر (۲۰ ٪) دارای هرپس تناسلی هستند (۸). در آمریکای مرکزی و جنوبی، بیماری ۲۰ تا ۴۰ درصد زنان را درگیر کرده‌است. به‌عنوان مثال، در کاستاریکا ۳۹/۴ درصد آلوده هستند (۹). یک پنجم افراد بالای ۱۲ سال در آمریکا به این ویروس آلوده‌اند که تقریباً ۹۵ درصد آن‌ها از ابتلاء خود اطلاع ندارند (۵، ۸). شیوع آلودگی در کشورهای اروپایی ازجمله آلمان ۱۳ درصد، فنلاند ۱۶ درصد، ایتالیا ۱۸ درصد و در انگلستان ۲۰ درصد گزارش شده است (۱۰). در منطقه جنوب صحرای بزرگ آفریقا، شیوع بیماری از ۳۰ تا ۸۰ درصد در زنان و ۱۰ تا ۵۰ درصد در مردان متغیر است (۱۱). این میزان در تانزانیا ۳۹ درصد (۱۱) و در استرالیا ۱۸ درصد (۱۲) گزارش شده است. در کشورهای آسیایی ازجمله بنگلادش ۱۲ درصد (۱۳)، ژاپن ۷ درصد (۴)، کره ۲/۸ درصد (۱۴)، فیلیپین ۹ درصد (۳) و هند ۱۴ درصد (۵) شیوع دارد. به نظر می‌رسد در کشورهای آسیایی در حال توسعه شیوع بیماری، کمتر و بین ۱۰ تا ۳۰ درصد متغیر است. در ایران به دلیل رعایت سلامت خانواده و وضعیت فرهنگی میزان شیوع کمتر است (۱۵). در مطالعه‌ای در ترکیه میزان پادتن‌های IgG و IgM ضد *HSV-2* در ۱۳۰ زن باردار به ترتیب در ۸۲ (۶۳/۱ درصد) و ۱۸ (۱۱/۳ درصد) نفر مشاهده شد. همچنین در این میان آنتی ژن‌های خاص تیپ‌های *HSV-2* در ۲۲ (۱۶/۹ درصد) زن باردار به‌وسیله تست IFA شناسایی شد. از این میان ۱۷ نفر (۱۳/۱ درصد) دارای پادتن‌های IgM ضد *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* بودند و ویروس *HSV-2* فقط از ۳ زن (۲/۳ درصد) جدا شد (۶).

در ایران، هرپس تناسلی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. لذا، مطالعات در زمینه بیماری محدود است. در سال ۱۳۸۰، در مطالعه‌ای که روی اهداء کنندگان خون در شهر کرمان انجام شد، شیوع بیماری ۲/۷ درصد گزارش شد (۵). در سال ۱۳۷۵، در یکی از درمانگاه‌های تهران شیوع بیماری‌ها منتقله از راه جنسی بررسی شد که ۶ درصد گزارش گردید. همچنین، طبق بررسی دیگری در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران در تهران، شیوعی معادل ۱۱/۴۳ درصد تخمین زده شد (۴).

در مطالعه ما فراوانی *حضور ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در زنان بیشتر از مردان بود، که اختلاف معنی دار بین آلودگی دو جنس مشاهده گردید. همچنین مطالعه ما احتمال سرایت هرپس نوزادی را از مادر به نوزاد نشان داد که شیوعی برابر ۲۵ درصد داشت. در گروه‌های سنی مختلف اختلاف آماری معنی داری بین میزان آلودگی با سطح IgG و IgM سرم مشاهده شد. برخی از متخصصان معتقدند، به منظور پیشگیری از انتقال عفونت از مادر به جنین، بهتر است زایمان این زنان به صورت سزارین باشد. در صورت ابتلاء مادر در سه ماهه آخر بارداری، احتمال انتقال آلودگی به جنین بسیار افزایش می‌یابد.

افراد مبتلا به عفونت *HSV-2* ممکن است به احتمال زیاد ناقل ویروس ایدز نیز باشند. با توجه به مشکلات موجود در جامعه، امکان تعیین دقیق میزان موارد عفونت *HSV-2* توأم با *HIV*، در

بیماران امکان پذیر نبود. همچنین بسیاری از افراد آلوده به عفونت *HSV-2* ، از جمله زنان باردار به دلیل مزمن بودن ویروس و سهل انگاری، از بیماری خود اطلاع کافی ندارند. لذا، به پزشک و مراکز بهداشتی و در نهایت برای تشخیص به آزمایشگاه‌ها مراجعه نمی‌کنند. همین امر سبب می‌شود که این افراد در جامعه آماری قرار نگیرند، نمونه گیری از این افراد صورت نپذیرد و این افراد به عنوان مخزنی برای عفونت به حساب آیند.

نتیجه‌گیری:

بیشترین میزان آلودگی به عفونت *HSV-2* در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در گروه‌های سنی زیر ۱ سال و ۴۰-۱۹ سال و کمترین آن در گروه های سنی ۱۸-۱ سال و ۴۱ سال به بالا وجود داشت. بنابراین محدوده خطر برای این عفونت در گروه سنی نوزادان و افراد فعال از نظر جنسی می‌باشد. لذا، باید آگاهی های لازم در این زمینه به مادران باردار و جوانان داده شود. تا از ابتلاء این افراد به عوارض ناشی از عفونت با این ویروس جلوگیری شود. با توجه به حجم کمتر نمونه گیری و کمبود امکانات بهداشتی در استان چهارمحال و بختیاری نسبت به استان اصفهان، شیوع بیشتر عفونت در استان چهارمحال و بختیاری منطقی به نظر می‌رسد.

به دلیل رعایت نکات اخلاقی و بهداشتی در ایران، نتایج بدست آمده از شیوع عفونت ناشی از *HSV-2* در این دو استان، مشابه سایر مناطق کشور می‌باشد. با توجه به افزایش بیماری‌های منتقله جنسی، از قبیل هرپس تناسلی ، و ارتباط آنها با عفونت ناشی از *HIV*، آموزش‌های بهداشتی به مردم از طریق مراکز بهداشتی و درمانی در سطح کشور و نیز استفاده از کاندوم باید در اولویت قرار گیرد. هرپس تناسلی به عنوان یک عامل افزایش دهنده خطر در بیماران مبتلا به ایدز مهم است. میزان شیوع پایین این ویروس در این منطقه از جنوب غربی کشور، ممکن است نشان‌دهنده شیوع پایین عفونت ناشی از *HIV* در این دو استان نسبت به دیگر مناطق کشور هم باشد.

تقدیر وتشکر:

بدین‌وسیله از زحمات اساتید ارجمند جناب آقای دکتر عباس دوستی، سرکار خانم دکتر الهه تاجبخش، جناب آقای دکتر حسین مقصودی و جناب آقای منوچهر مؤمنی و همچنین مسؤلین محترم آزمایشگاه‌های تشخیص طبی المهدی و مهر در شهرکرد و آزمایشگاه‌های دکتر برادران، میلاد و دکتر شریفی در اصفهان تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست مراجع:

۵. عرب زاده ع م، فکری ع، شمس الدینی س، ظهور ع. شیوع سرمی آنتی بادی هرپس ۲ در اهداکنندگان خون شهر کرمان در سال ۱۳۸۰. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان* ۱۳۸۱، دوره دهم، شماره ۱، صص ۵۳ تا ۵۹.

6. Duran N, Yarkin F, Evruke C , Koksal F. Asymptomatic *herpes simplex virus type 2* (*HSV-2*) infection among pregnant women in Turkey. *Indian J Med Res* 2004; **120**(2):106-110.

7. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning :a laboratory manual*. 3th ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; PP:1.35-1.37

8. Chan W. Genital Herpes. *JTUA* 2007; **18**(3):117-122.

9. Rodriguez AC, Castle PE, Smith JS, Bratti C, Hildesheim A, Schiffman M, *et al*. A population based study of *herpes simplex virus 2*

1. Carter JB, Saunders VA. *Virology Principles and Applications*. 1th ed. Chichester; John Wiley & Sons Ltd. 2007; PP: 121-135.

2. Qutub M, Klapper P, Vallely P, Cleator G. Genital herpes in pregnancy: is screening cost-effective?. *Int J STD & AIDS* 2001; **12**(1):14-16.

۳. بروکس جی اف، کارول کا سی، بوتل جی اس، مورس اس آ. *میکروب شناسی پزشکی جاوتز ملنیک آدلبرگز*. ترجمه رحیمی م ک، اطهری ع. چاپ بیست و چهارم، تهران، انتشارات آییژ، ۱۳۸۷، صص ۵۲۳ تا ۵۵۳.

۴. مفیدی م، سعیدی م، بهنام پور ن. سرو اپیدمیولوژی *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در شهر گرگان سال ۱۳۸۵. *مجله علوم آزمایشگاهی* ۱۳۸۶، دوره اول، شماره ۲، صص ۱۴ تا ۱۹.

seroprevalence in rural Costa Rica. *Sex Transm Infect* 2003; **79**:460-465.
10. Qutub M, Akhter J. Epidemiology of genital herpes (*HSV-2*) among brothel based female sex workers in Bangladesh. *European J Epidemiol* 2003; **18**(9):903-905.
11. Kasubi MJ, Nilsen A, Marsden HS, Bergstrom T, Langeland N, Haarr L. Prevalence of antibodies against *Herpes Simplex Virus Types 1* and 2 in children and young people in an urban region in Tanzania. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(8):2801-2807.
12. Cunningham1 AL, Taylor R, Taylor J, Marks C, Shaw J, Mindel A. Prevalence of infection with *herpes simplex virus types 1* and 2 in Australia: a nationwide population based survey. *Sex Transm Infect* 2006; **82**:164-168.
13. Bogaerts J, Ahmed J, Akhter N, Begum N, Rahman M, Nahar S, *et al*. Sexually transmitted infections among married women in Dhaka, Bangladesh: unexpected high prevalence of *herpes simplex type 2* infection. *Sex Transm Infect* 2001; **77**(2):114-119.
14. Shin H, Park J, Chu C, Song H, Cho K, Lee J, *et al*. *Herpes Simplex Virus Type 2* seroprevalence in Korea: Rapid increase of *HSV-2* seroprevalence in the 30s in the Southern Part. *J Korean Med Sci* 2007; **22**(6):957-962.
15. Bhosale U, Devi V, Jain N**.** *Hsv* infections in aids patients: need for awareness!!!**.** *Int J Pharm Tech Res* 2009; **1**(1):101-110.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۶۰- ۵۳

فرایند جداسازی دو ژن *wsp* و *16S rRNA* باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* در پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران

پرویز پرویزی [۱*]، فرزانه فردید [۲]، عارف امیرخانی [۳]

۱) آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی ، انستیتو پاستور ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
۳) بخش اپیدمیولوژی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: پرویز پرویزی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران- تهران، ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱ – ایران
تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۵- ۰۲۱ parp@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* از جمله باکتری‌های *ریکتزیایی* است. ژن این باکتری در حشرات به‌صورت مادرزادی به ارث می‌رسد و می‌تواند عامل ایجاد ناسازگاری‌های سیتوپلاسمی باشد. این باکتری به‌طور بالقوه می‌تواند در دستکاری‌های ژنتیکی جمعیت و کنترل ناقلین برخی بیماری‌ها مفید باشد. در این مطالعه *W. pipientis* با استفاده از روش PCR در پشه خاکی گونه *فلبوتوموس پاپاتاسی* ، ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران ، ردیابی و مشخص شد. برای این منظور از ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp* gene) استفاده گردید.

روش بررسی: برای تشخیص و ردیابی باکتری *W. pipientis* از ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp* gene) استفاده شد. با استفاده از روش PCR، از دو جفت پرایمر اختصاصی (wsp 691R/81F) و (16S 994R/99F) استفاده گردید. توالی‌های بدست آمده با نرم افزار Sequencher TM v.3.1 ویراستاری و مقایسه شدند . جهت مشخص کردن هاپلوتایپ‌های *W. pipientis* و آنالیز و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن از نرم افزار PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) استفاده شد.

یافته ها: از ۱۶۵ عدد پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی*، قطعه ژنی *wsp* در ۱۲۴ (۷۵/۲٪) و قطعه ژنی 16s rDNA در ۱۲۳ (۷۴/۵٪)، پشه خاکی تکثیر و تعیین توالی شد . برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

نتیجه گیری : استفاده از یک سویه ژنتیکی تعریف شده برای *W. pipientis* در استفاده از ترانسژن‌ها، امکان انتقال *Leishmania major* را توسط پشه خاکی، به منظور جلوگیری از انتشار آن، افزایش می‌دهد. سویه‌های ژنتیکی این باکتری می‌توانند فنوتیپ ناسازگاری سیتوپلاسمی را در جمعیت پشه خاکی *گونه فلبوتوموس پاپاتاسی* نشان دهند. با توجه به وجود آلودگی طبیعی *ولباکیا* در پشه خاکی‌ها و ناسازگاری سیتوپلاسمی، امکان استفاده از *ولباکیا* به‌عنوان ترانسژن ژن‌های هدف در بین جمعیت پشه خاکی‌ها مورد نظر، می توان جمعیت ناقلین را تحت کنترل در آورد و با گسترش بیماری لیشمانیوز مقابله کرد.

کلید واژه‌ها: *Wolbachia pipientis*، *فلبوتوموس پاپاتاسی*، ژن RNAی ریبوزومی(16 s rRNA)، ژن پروتئین سطحی (*wsp* gene) ، ایران

مقدمه:

باکتری داخل سلولی *ولباکیا* اولین بار درون بافت‌های تولید مثل پشه *Culex pipiens* توسط Hertig & Wolbach در سال ۱۹۲۴ گزارش شد. و این *ریکتزیا* بعد از آن *Wolbachia pipientis* نام گرفت. این دسته از باکتری‌های گرم منفی، *ریکتزیا* هستند که از طریق سیتوپلاسم انتقال پیدا می‌کنند و باعث ایجاد عفونت‌های داخل سلولی توارثی در بسیاری از میزبانان بی مهره می‌شوند. این باکتری‌ها در بافت‌های تولید مثل (تخمدان و بیضه‌ها) طیف وسیعی از بندپایان یافت می‌شوند(۱). این باکتری‌ها باعث ایجاد شماری تغییرات تولید مثلی در میزبانانشان می‌شوند. تغییرات شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی (Cytoplasmic incompatibility=CI) بین سویه‌ها و گونه‌های مرتبط، القاء پارتنوژنز و مؤنث‌سازی ژنتیکی نرها، (شکل۱) است. این حالت زمانی رخ می‌دهد که نرهای آلوده با ماده‌های سالم جفت‌گیری کنند، یا ماده‌ها سویه متفاوتی از *W. pipientis* را حمل نمایند. *W. pipientis* به‌وسیله این مکانیسم می‌تواند بین جمعیت‌های میزبان، بدون نیاز به انتقال عرضی ، انتشار یابد. در چنین حالتی، ممکن است از این باکتری‌ها به منظور حمل ترانس‌ژن‌ها بین جمعیت‌های حشراتی که اهمیت پزشکی دارند، به منظور ایجاد تداخل وهمچنین کنترل انتقال انگل، استفاده شود (۳،۲).

این توصیفات و تغییرات تولید مثلی میزبان باعث بهره‌مندی باکتری از مزایای انتخابی می‌شود. ولباکیاها بسیار وسیع الطیف هستند (۳،۱). طی مطالعات اخیر این باکتری در بیش از ۲۰٪ گونه‌های حشرات، از جمله در پشه خاکی‌های ناقل بیماری لیشمانیوز، به‌طور طبیعی پیدا شده است (۵،۴).

پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل *لیشمانیا* میجر (*Leishmania major*) ، عامل لیشمانیوز جلدی روستائی در انسان است. این پشه خاکی چندین آربوویروس را هم در نواحی خشک آفریقای شمالی و آسیای غربی از مدیترانه غربی تا بنگلادش انتقال می‌دهد (۷،۶). محققین باکتری داخل سلولی شبه ریکتزیایی *W. Pipientis* را در پشه خاکی‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و با تکثیر قطعات ژن RNAی ریبوزومی 16s (16s rDNA) و نیز ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp*)، شناسایی کرده‌اند (۱۰-۷).

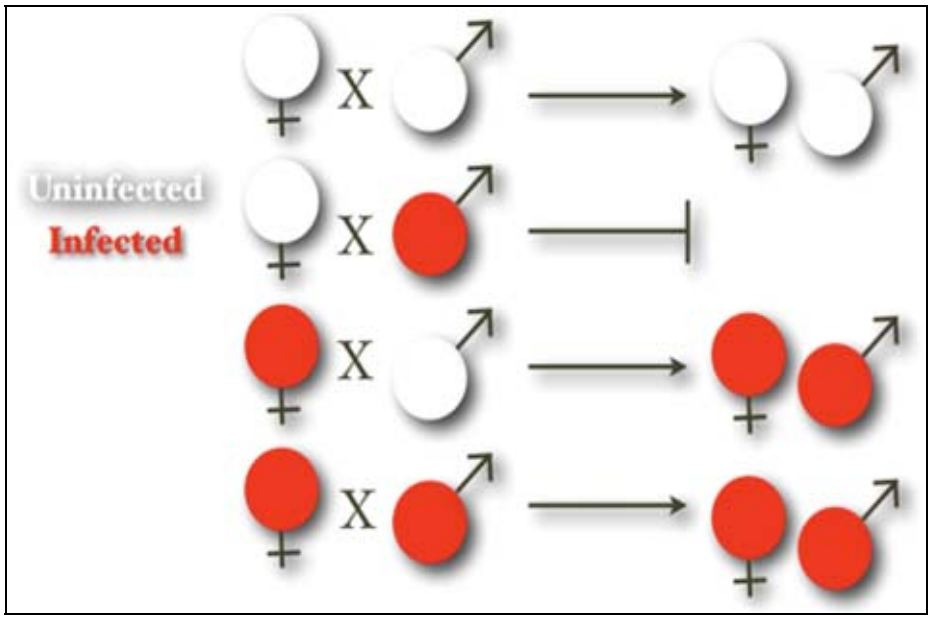
مواد و روش‌ها:

پشه خاکی‌ها از مناطق تحت مطالعه با استفاده از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و آسپیراتور صید و جمع‌آوری شدند (شکل ۲ نقشه مناطق مورد مطالعه) (۷). پشه خاکی‌ها به‌وسیله دود سیگار و یا قرار دادن در فریزر کشته شده و سپس در الکل ۹۶٪ قرار گرفتند. نمونه‌ها جهت آزمایش‌های مولکولی ابتدا در یخچال ۴+ درجه و سپس درفریزر۲۰- درجه نگهداری شدند. پشه خاکی‌ها از داخل لوله‌ها به داخل یخ در ظروف پتری شیشه‌ای، حاوی ۱٪ مایع ظرفشوئی در آب استریل، منتقل شده و به مدت دو دقیقه در این حالت نگه‌داری می‌شدند. سپس با سمپلر مایع ظرفشوئی ۱٪ در آب استریل را خالی نموده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدت پنج دقیقه در آب استریل برای مرحله دوم شستشو می‌شدند. هر پشه خاکی روی یک قطره 1 x TE در روی الام تمیز زیر لوپ بررسی می‌شد. سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا و مابقی جهت جدا کردن DNA تشریح می‌شدند (۱۱،۷، ۱۲).

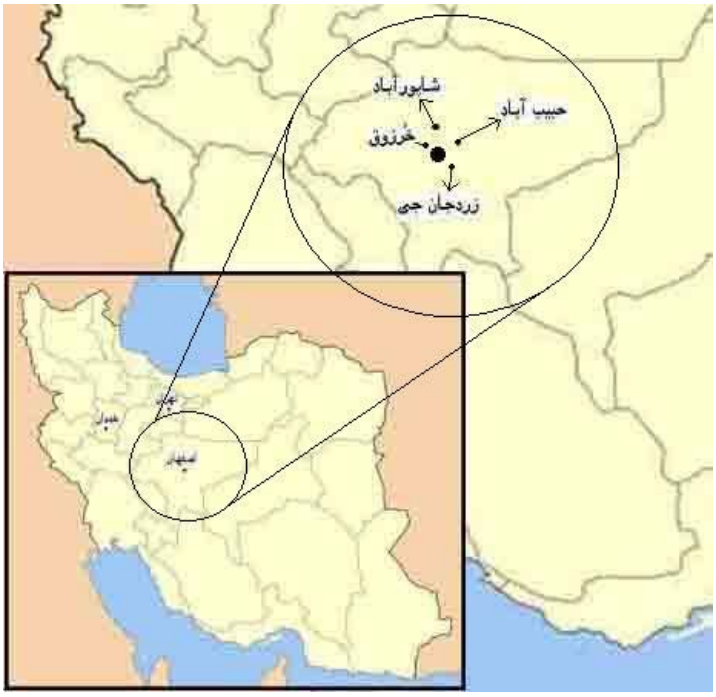
extraction (جداسازی و خالص‌سازی DNA) پشه خاکی‌ها با استفاده از روش Ready و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت (۱۳).

میکروتیوب‌های حاوی بدن پشه خاکی (به غیر از سر و دو بند انتهایی شکم) داخل فریزر $-20°C$ به دمای آزمایشگاه منتقل می‌شد. این عمل به‌منظور ایجاد شوک فیزیکی جهت بهتر له شدن بدن پشه خاکی ۲ بار تکرار می‌شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول Grinding Mix داخل میکروتیوب ریخته و با نوک سرسمپلر بدن پشه خاکی کاملاً له می‌شد. سپس ۵۰ میکرولیتر مابقی از محلول G.M (در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر) در میکروتیوب ریخته می‌شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول SDS mix به هر میکروتیوب اضافه می‌گردید. تمامی میکروتیوب‌ها ورتکس می‌شد و به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ می‌گردید short spin) . تمامی میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده می‌شد. به منظور کاهش دمای نمونه‌ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند و بعد ۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (KOAC) ۸ مولار به آنها اضافه می‌شد. مجدداً میکروتیوب‌ها به‌ترتیب ورتکس و سانتریفوژ کوتاه می‌شدند، سپس به‌مدت ۱۲۰-۴۵

دقیقه داخل یخ خرد شده قرار می‌گرفتند. نمونه‌ها با دور rpm ۱۳۰۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. محلول روئی با استفاده از سمپلر جدا می‌شد و به میکروتیوب‌های جدید و کدگذاری شده، منتقل می‌گردیدند. ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ سرد (درون فریزر نگهداری می‌شود) به میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. نمونه‌ها در تمام طول شب (over night) در فریزر $-20°C$ نگهداری می‌شدند. صبح روز بعد نمونه‌ها از فریزر خارج می‌شد تا از سرمای آن کاسته شود. میکروتیوب‌ها با دور rpm ۱۳۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. محلول رویی میکروتیوب‌ها با کج کردن، دور ریخته می‌شد و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب DNA موجود در ته میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. میکروتیوب‌ها را تکان مختصری داده و با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. مجدداً الکل رویی موجود در میکروتیوب‌ها با کج کردن خارج می‌شدند. سپس میکروتیوب‌ها را به‌صورت وارونه بر روی کاغذ خشک کن یا دستمال کاغذی کشیده می‌شد تا هیچگونه الکلی در آنها باقی نماند. این مراحل ۳ بار تکرار می‌شد. در تمام میکروتیوب‌ها باز و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفت تا داخل آنها خشک شود و الکل موجود در آنها کاملا تبخیر گردد. به منظور جلوگیری از قرارگرفتن گرد و غبار درون میکروتیوب‌ها یک دستمال کاغذی بر روی آنها قرار داده می‌شد. پس از کسب اطمینان از تبخیر شدن کامل الکل، ۱۵ میکرولیتر 1X TE buffer به تمام آنها اضافه می‌شد. به تک تک میکروتیوب‌ها تکان مختصری داده و سپس سانتریفوژ کوتاه می‌شدند (۴ بار این عمل تکرار می‌شد). میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفت و بعد برای استفاده کوتاه مدت، نمونه‌ها در یخچال $4°C$ و برای استفاده بلند مدت در فریزر $-20°C$ نگهداری می شدند.



شکل ۱: ناسازگاری سیتوپلاسمی القائی *ولباکیا* در بندپایان



شکل ۲: مناطق مورد مطالعه پشه خاکی‌های جمع‌آوری شده جهت تعیین آلودگی *ولباکیا*

برای تعیین وجود باکتری *ولباکیا* در پشه خاکی‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی *wsp* به‌نام *81F* (forward) با نوکلئوئیدهای (5´TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 3´) و نیز پرایمر *691R* (reverse) با نوکلئوئیدهای (5´ AAAAATTAAACGCTACTCCA 3´)یک قطعه که حدود ۵۵۰ (base pair)، بدون احتساب پرایمرها می‌باشد، تکثیر یافتند. برای ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA)، از پرایمری به‌نام 99F (forward) با نوکلئوئیدهای (5´TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT 3´) و نیز پرایمر 994R (reverse) با نوکلئوئیدهای (5´GAATAGGTATGATTTTCATGT 3´) استفاده شد (۹،۵). جهت اطمینان از کارکرد درست PCR از کنترل مثبت (نمونه پشه خاکی‌هایی که توسط پرویزی و همکاران در بررسی‌ها و مطالعات قبلی در Natural History Museum انگلستان انجام گرفته است. این نمونه‌ها دارای میزان بالای ژن *wsp* هستند که به‌عنوان کنترل مثبت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند) و اطمینان از عدم آلودگی PCR از کنترل منفی (آب مقطر) استفاده می‌شد. محصول PCR بدون کلون کردن و به‌طور مستقیم تعیین توالی گردید.

یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسید آمینه با کیت BI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه 373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها و تنظیم توالی و مطابقت کردن نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار SequencherTm 3.1.1 software (Gene Codes Corporation). استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic Analysis Using Parsimony و یا PAUP× استفاده شد (۱۵).

یافته‌ها:

باکتری *ولباکیا* در پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* و در جمعیت‌های متفاوت، از نظر زیستگاه طبیعی و مناطق مختلف ایران ، بررسی شد. با استفاده از فناوری‌های مولکولی ، این باکتری جدا شد (شکل ۲ مناطق مورد مطالعه). با استفاده از فناوری PCR ژن‌های 16s rDNA و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp*) در پشه مذکور تکثیر یافت و آلودگی به *W. Pipientis* بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد در مناطق مورد مطالعه

مشخص شد. آلودگی به *ولباکیا* هم در مناطق اندمیک بیماری لیشمانیوز در ۴ روستا در اصفهان و نیز مناطق غیر اندمیک بیماری در همدان و کرج یافت شد (جدول ۱). پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* که بر اساس تکثیر قطعه ژن *wsp* *ولباکیا* مثبت بود، با استفاده از پرایمرهای 16s rDNA، برای این ژن نیز مثبت بود. فقط یک پشه برای قطعه ژن 16s rDNA مثبت بود اما برای قطعه ژن *wsp* مثبت نبود.

یک نوع هاپلوتایپ در پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* صید شده از ایران، مستقل از منشاء ژئوگرافی و از نظر زیستگاه طبیعی مناطق مختلف مورد مطالعه در ایران، تشخیص داده شد. همه‌ی ۱۲۴ قطعهٔ ژنی *wsp* تکثیر یافته از پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* مستقیماً تعیین توالی شدند و فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد. با تعیین توالی مستقیم همه ۱۲۳ توالی 16s rDNA تکثیر شده از *فلبوتوموس پاپاتاسی‌های* ایرانی، یک هاپلوتایپ منفرد با توجه به منشاء ژئوگرافیک و زیستگاه بدست آمد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژن). توالی‌های هر دو ژن نیز در بانک جهانی ژن به ثبت رسید و شماره دسترسی EU780684 در بانک جهانی ژن برای ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp*)، و شماره دسترسی EU780683 در این بانک برای ژن 16s rDNA ثبت گردید.

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی *W. pipientis* *جدا شده با دو روش مولکولی در* پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* صید شده به تفکیک مناطق مختلف ایران

نواحی مورد بررسی		تعداد موارد بررسی با روش *(wsp)PCR*	موارد مثبت *wsp*	درصد موارد مثبت *wsp*	کل موارد بررسی با روش *16s)PCR (rDNA*	موارد مثبت *16s rDNA*	درصد موارد مثبت *16s rDNA*
استان	منطقه						
اصفهان	شاپورآباد	۳۴	۲۷	۷۹/۴	۳۴	۲۷	۷۹/۴
اصفهان	حبیب آباد	۵۸	۴۱	۷۰/۷	۵۸	۴۰	۶۸/۲
اصفهان	خُرزوق	۳۲	۲۴	۷۵/۰	۳۲	۲۴	۷۵/۰
اصفهان	زردجان جی	۲۲	۱۵	۶۸/۲	۲۲	۱۵	۶۸/۲
همدان	همدان	۱۶	۱۴	۸۷/۵	۱۶	۱۴	۸۷/۵
تهران	کرج	۳	۳	۱۰۰/۰	۳	۳	۱۰۰/۰
	جمع	۱۶۵	۱۲۴	۷۵/۲	۱۶۵	۱۲۳	۷۴/۵

بحث:

قطعات ژنی wsp و 16s rDNA به ترتیب از ۷۵/۲درصد و ۷۴/۵ درصد از پشه خاکی‌های *فلبوتوموس پاپاتاسی* تکثیر و تعیین توالی شدند. برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

هاپلوتایپ ژن *wsp* 546 bp‌ی (بدون احتساب پرایمرها) (با شماره دسترسی EU7800683 در بانک ژن) که غیر قابل تشخیص از گروه A سویه *W. pipientis* (*wPap*) است، پیش از این از *فلبوتوموس پاپاتاسی* از کرانه باختری رود اردن (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237883) و هند (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237882)، بدست آمده است. این نتیجه پس از مقایسه با همه‌ی پشه خاکی‌های موجود از اسپانیا و ایران و همچنین مجموعه‌ای از دو تا سه دسته از پشه خاکی‌هایی که توالی شماره دسترسی در بانک ژن AF237883 را داده

بودند بدست آمد (۶،۷و۹). سایر توالی‌ها از *فلبوتوموس پاپاتاسی*هایی جدا شد که در کلونی‌های آزمایشگاهی پرورش داده شده بودند. با استفاده از پرایمرهای ژن *wsp* مشابه، Cui و همکارانش قطعه‌ای حدوداً 600 bp‌ی را از *فلبوتوموس پاپاتاسی*های جمع‌آوری شده از کرانه باختری رود اردن، شمال صحرای سینا در مصر، و عربستان صعودی تکثیر کردند. البته آن‌ها هیچ توالی جدیدی را گزارش نکردند. در اصل این طور گزارش شد که هاپلوتایپ *wPap* یک باز مبهم (C/T) در موقعیت نوکلئوتید ۱۰۲ دارد(شماره دسترسی در بانک ژنیAF020082)(۴). اما، یک باز C در این موقعیت در کار حاضر و همچنین در تمام بررسی‌های دیگر یافت شد. توالی 16s rDNA هاپلوتایپ ما با 854 bp (بدون احتساب پرایمرها) (شماره دسترسی EU780683 در بانک ژنی) به واسطه چهار جهش نقطه‌ای و وقوع سه جهش حذف- جایگزینی از آن چه که قبلاً توسط O'Neill و همکارانش یافت شده بود، متفاوت بود (۱۸،۳). توالی جدید با توالی‌های 16s rDNA‌ی *ولباکیا* بدست آمده از سایر حشرات مقایسه شد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژنی). ارتباطات فیلوژنتیکی را می‌توان با استفاده از الگوریتم‌های قرابتی و نیز استفاده ازPAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) تائید کرد (۱۵). فیلوگرام بدست آمده توسط یک آنالیز، الحاق مجاور در دو توالی از *فلبوتوموس پاپاتاسی* را روی شاخه انتهایی، مشابه گروه A سویه های *W. pipientis*، جایگزین کرده است.

مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از 16s rDNA نشان داد که سویه‌های *W. pipientis* از میزبان‌های بسیار واگرا (دور از نظر قرابت ژنتیکی) از دسته مونوفیلتیک، مرتبط با دسته Ehrlichia در زیر شاخه α از Proteobacteria می‌باشد (۸،۵). ژن 16s rDNA توالی حفاظت شده‌ای است که نه تنها جایگزاری فیلوژنتیکی گونه‌های باکتریایی را مجاز می‌کند بلکه باعث افتراق فیلوژنتیکی *W. pipientis* به دو گروه A و B می‌شود (۳،۲). به تازگی به دلیل دسترسی سریع‌تر به ژن *wsp*، جهت بهبود افتراق فیلوژنتیک بین دسته گونه‌های *W. pipientis* استفاده شده است. ار این نظر به چهار گروه (A-D) و ۱۲ زیرگروه تقسیم شده است (۳، ۸ ،۱۶). گروه‌های A و B مشابه آن‌هایی هستند که به‌وسیله 16s rDNA‌ی سویه‌های *W. pipientis* بدست آمده از حشرات، مایت‌ها و سخت پوستان شناسایی شده بود. در حالیکه گروه‌های C و D مربوط به سویه‌های بدست آمده از نماتودهای فیلاریال است. پیش از این، یک سویه ژنتیکی منفرد از *W. pipientis* با هدف قرار دادن ژن *wsp* در *فلبوتوموس پاپاتاسی*های وحشی ایران و اسپانیا شناسایی شد. اما این احتمال که اگر یک یا هر دو پرایمرهایPCR، هاپلوتایپ‌های اختصاصی را ابراز کنند، سایر سویه‌ها ممکن است از بین بروند، وجود داشت و باقی ماند (۱۷،۱۶). در موقعیت‌های مشابه، تکثیر 16s rDNA یا سایر قطعات ژنی گاهی اوقات امکان شناسایی آلودگی‌های دو گانه را ایجاد می‌کند (۳). بنابراین، ما در گزارش حاضر آلودگی‌های *W. pipientis* در پشه خاکی‌های وحشی *فلبوتوموس پاپاتاسی* را از طریق هدف‌گیری ژن 16s rDNA بعلاوهٔ ژن *wsp* جستجو کردیم. جمعیت‌های *فلبوتوموس پاپاتاسی* از ایران مجدداً بررسی شدند، که فقط یک هاپلوتایپ برای هر ژن بدست آمد. ما این طور استنباط کردیم و حدس می‌زنیم که قطعات 16s rDNA از منشاء باکتریایی مشابه هستند، مثل قطعات ژن *wsp* ، و بنابراین نتیجه گیری می‌شود که با وجود طیف بسیار وسیع آن، فقط یک سویه گروه A از *W. pipientis* در گونه‌های پشه خاکی یافت می‌شود. برای یک کلونی آزمایشگاهی *فلبوتوموس پاپاتاسی* بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، توالی متفاوتی از 16s rDNA توسط O'Neill و همکارانش گزارش شد (۳) و یک هاپلوتایپ متفاوت از ژن *wsp* نیز توسط Zhou و همکارانش گزارش شد (۸). این ممکن است یک سویه ثانویه ای از *W. pipientis* یافت شده در خاورمیانه را نشان دهد، اما توالی‌ها ممکن است حقیقی نباشند (مصنوعی باشند).به این دلیل که نه تنها از یک کلونی آزمایشگاهی فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده‌اند بلکه آن‌ها فقط یکبار تعیین توالی شده‌اند. هیچ تنوع ژنتیکی سویه *W. pipientis* در *فلبوتوموس پاپاتاسی*های وحشی یافت نشد حتی برای ژن *wsp* ، که اغلب پلی مورفیک است (۴). این با یافته‌های جمعیت پشه خاکی‌ها سازگار بوده و مغایر نمی‌باشد.

Cui و همکارانش آلودگی‌های *ولباکیا* را در سه دسته کلونی آزمایشگاهی *فلبوتوموس پاپاتاسی* بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، مصر و عربستان صعودی پیدا کردند. اما در یک کلونی جمع‌آوری شده از اردن یافت نشد (۴). Kassem و همکارانش دو کلونی *فلبوتوموس پاپاتاسی* بدست آمده از مصر را برای ولباکیا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که پشه‌های جمع‌آوری شده از شمال صحرای سینای مصر آلودگی *ولباکیایی* را در خود جای داده‌اند، در حالیکه پشه بدست آمده از اسکندریه (Alexandria) این آلودگی را نداشت (۱۰).

نتیجه‌گیری شد که برخی جمعیت‌های این پشه خاکی به‌طور جغرافیائی ایزوله شده‌اند.

البته وجود *W. pipientis* به‌طور اکید در ارتباط با اندمیک بودن ZCL (بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی) نیست. به این دلیل که این باکتری در جمعیت‌های *فلبوتوموس پاپاتاسی* بدست آمده از نواحی غیر اندمیک ایران نیز یافت شده است (۷). آلودگی بالای *فلبوتوموس پاپاتاسی* به باکتری *ولباکیا* می‌تواند به دلیل خصوصیات فیزیولوزیک و اکولوزیک این پشه در توانایی حفظ و نگهداری این باکتری و انتقال به نسل‌های بعدی این پشه خاکی باشد. زیرا در گونه‌های دیگر پشه خاکی یا اصلا آلودگی باکتری *ولباکیا* دیده نشده و یا موارد بسیار کمتر بوده است. ما در پروژه تحقیقاتی اخیر این موارد را مشاهده نمودیم . همچنین علی رغم تحقیقات گسترده در سطح جهان تاکنون در پشه های آنوفل(ناقلین بیماری مالاریا)باکتری *ولباکیا* را نتوانسته‌اند بیابند. آلودگی بالای *فلبوتوموس‌پاپاتاسی* به باکتری*ولباکیا* در گزارشات محققین در دیگر نقاط جهان نیز دیده شده است (۹،۱۰).

نتیجه‌گیری:

با توجه به هاپلوتایپ میتوکندریایی، زیستگاه و منشاء ژئوگرافیکی، مشخص شده که *فلبوتوموس پاپاتاسی* می‌تواند به *W. pipientis* آلوده نباشد. در غیر اینصورت با یک سویه وسیع الطیف معمول آلوده باشد. این امر به نوبه خود، احتمال استفاده از فقط یک سویه تعریف شدهٔ ژنتیکی *W. pipientis* را جهت حمل ژن (ترانسژن)هایی برای ایجاد تداخل در انتقال *لیشمانیا* در میان جمعیت‌های پشه خاکی، بالا می برد. برپایه تئوری کلی، این سویه تعریف شدهٔ ژنتیکی مجبور است فنوتیپ CI (ناسازگاری سیتوپلاسمی) را به منظور انتشار سریع بین جمعیت‌های پشه خاکی وحشی، در *فلبوتوموس پاپاتاسی‌ها* نشان دهد. همچنین پشه‌ها همانطور که گفته شد مجبورند با نوع وحشی سویه *W. pipientis* آلوده شوند اگر چه باید CI ناسازگاری سیتوپلاسمی نشان دهند.

می‌توان از *ولباکیا* به‌عنوان یک سیستم انتقال دهندهٔ ژن یا ترانسژن حشرات (پشه‌ها) استفاده کرد. بدین صورت که ژن‌های هدف را توسط علم مهندسی ژنتیک طراحی و سنتز نمود و سپس به داخل ژنوم *ولباکیا* منتقل کرد، و آن را به داخل جمعیت حشره وارد کرد. این کار در جهت کنترل بیولوژیک و مبارزه با انواع انگل‌ها و ویروس‌های منتقله توسط بندپایان بسیار مفید و مؤثر خواهد بود. (۱۳، ۱۹).

تقدیر وتشکر:

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه آقای مهدی باغبان و همچنین از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی که در جمع آوری نمونه کمک شایانی نموده‌اند، تشکر می‌نمایند. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتوپاستور ایران به طرح مصوب ۳۶۶ دکتر پرویزی تامین گردیده است.

فهرست مراجع:

1. Rousset F, Solignac M. Evolution of single and double Wolbachia symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 6389-6393.
2. Braig HK, Zhou W, Dobson SL, O'neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2373-2378.
3. O' Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplamic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 2699-2702.
4. Cui L, Chang SH, Stickman D & Rowton E. Frequency of Wolbachia infection in laboratory and field sand fly Diptera Psychodidae populationsn. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; **15**: 571-572.
5. Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C, O'neill SL. Wolbachia infections of phlebotomine sand flies Diptera Psychodidae. *J Med Entomol* 2001; **38**: 237-241.
6. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; **95**: 239-243.
7. Parvizi P, Benlarbi M, Ready PD. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi* little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province Iran. *Med Vet Entomol* 2003; **17**: 351-362.
8. Zhou W, Rousset F, O'neill S. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains

using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci* 1998; **265**: 509-515.
9. Benlarbi M, Ready PD. Host specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* Diptera Psychodidae and prospects for driving genes into these vectors of Leishmania. *Bull Entomol Res* 2003; **93**: 383-391.
10. Kassem HA , Hassan AN, Abdel Hamed I, Osman G, El Khalab EM, Madkour MA. Wolbachia infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies Diptera Psychodidae from Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; **97**: 639-644.
11. Parvizi P& Ready PD . Nested PCRs of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sanflies from Iranian Foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med & Int Health* 2008; **13**: 1159-1171.
12. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus Phlebotomus Diptera Psychodidae. *Bull Br Mus* 1982; **45**: 121-209.
13. Ready PD , Lainson R , Shaw JJ, Souza AA. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* Diptera Psychodidae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; **86**: 41-49.
14. Testa JM, Montoya Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD**.** Molecular identification of vectors of Leishmania in Colombia mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop* 2002; **84**, 205-218.
15. Swofford DL. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. version 40 Sinauer Associates Sunderland Massachusetts 2002.
16. Weeks AR , Reynolds KT, Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics what has and has not been demonstrated. *Trends Ecol Evol* 2002; **17**: 257-262.
17. Curtis CF, Sinkins SP. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parazitol* 1998**; 116**: S111-115.
18. Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M. Two novel strains of Wolbachia coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Mol Biol* 2002; **11**: 577-584.
19. Turelli M, Hoffmann AA. Microbe induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Mol Biol* 1999; **8** : 243-255.

واژه‌گزینی در میکروب‌شناسی

زبان فارسی

به منظور تبیین مقوله واژه گزینی، مطالبی در مجله میکروب‌شناسی ایران درج می‌گردد. امید است همکاران ارجمند و دانش پژوهان برومند با پیگیری آن، ما را در این مهم یاری کنند. آنچه در این بخش ارائه می‌شود برگرفته از منابع گروه واژه‌گزینی فرهنگستان زبان و ادب فارسی است.

زبان فارسی از خانواده زبان‌های هند و اروپایی است. این زبان‌ها از حدود هزاره اول پیش از میلاد مسیح در بخش بزرگی از اروپا و جنوب و جنوب غربی آسیا رایج بوده‌اند و از نیمه دوم سده پانزدهم میلادی در امریکا و افریقا و اقیانوسیه هم رواج یافته‌اند. گروه هندی و ایرانی دو شاخه هندی و ایرانی دارد. شاخه ایرانی در هزاره‌ی اول پیش از میلاد مسیح در ایران و افغانستان کنونی و در شمال در منطقه میان مجارستان و ترکستان چین رایج بوده است.

قدیمی‌ترین گونه‌های این شاخه ، اوستایی و فارسی باستان است. فارسی باستان زبان رسمی هخامنشیان و زبان قوم پارس بوده است. دوره میانه زبان‌های ایرانی را از سال ۳۳۱ قبل از میلاد تا ۸۶۷ میلادی می‌دانند. یعنی تا سال ۲۵۴ هجری‌قمری که یعقوب لیث صفاری به حکومت رسید و زبان فارسی دری رسمیت یافت. فارسی دری دنباله فارسی میانه زردشتی است که به تدریج جانشین دیگر زبان‌های ایرانی یعنی سغدی و سکایی و خوارزمی و بلخی شد و در منطقه وسیعی از جهان ، از هندوستان تا اروپا و از دریای خوارزم تا خلیج فارس ، رایج گردید.

در فاصله میان سقوط ساسانیان تا روی کار آمدن صفاریان ، زبان علمی زردشتیان ایران فارسی میانه زردشتی و زبان علمی مانویان فارسی میانه مانوی و پهلوی اشکانی مانوی و سغدی مانوی و زبان علمی ایرانیان مسلمان عربی بود.

زبان فارسی در دربار مغولی هند زبان رسمی بود. سلجوقیان زبان فارسی را در آسیای صغیر رواج دادند و در دربار عثمانی زبان فارسی رواج داشت. تسلط استعمار بر کشورهای شرق سبب گردید از رواج زبان فارسی کاسته شود. فارسی دری امروز در ایران و افغانستان و تاجیکستان رایج است. زبان فارسی در این سه کشور از اوایل قرن بیستم میلادی به تدریج از یکدیگر دور شد. فارسی تاجیکی از زبان روسی تاثیر پذیرفت و واژگان بسیاری از آن به وام گرفت. در افغانستان واژه‌های پشتو به زبان فارسی دری راه یافت و در ایران واژه‌های روسی و فرانسوی و در سال‌های اخیر واژه‌های انگلیسی وارد زبان فارسی شد. در هر یک از این کشورها برای مفاهیم تازه واژه‌های جدیدی ساخته شد که غالبا با یکدیگر تفاوت دارند.

زبان فارسی در جریان گسترش خود بسیاری از عناصر زبان‌های ایرانی شمالی و شرقی، به ویژه پارتی و سغدی را وام گرفته است و در عین حال به گونه‌های محلی بسیاری نیز تقسیم شده است. در ایران و تاجیکستان و افغانستان صورت‌های کمابیش متفاوتی از این زبان مشترک متداول است که در برخی موارد مشخصات واژگانی و آوایی و دستوری خاص خود را دارند.

از زبان فارسی دری ، حدودا از قرن سوم هجری به بعد ، متون فراوانی به نظم و نثر باقی مانده است. این متون علی رغم تغییراتی که در نظام آوایی و واژگان و دستور زبان فارسی پدید آمده است، غالبا برای عموم تحصیل کردگان قابل فهم‌اند.

در صد سال اخیر، با گسترش سواد در میان عموم مردم و با پیدایش مطبوعات و رسانه‌های فراگیر صدا و سیما ، زبان فارسی رسمی، که در واقع زبان رایج در میان تحصیل کردگان است، در سراسر ایران در میان عموم مردم ، و از جمله در میان مردمی که با زبان‌ها و گویش‌های محلی خود تکلم می‌کنند، بسط یافته است.

زبان فارسی مانند هر زبان دارای قدمت دیرینه و صاحب ادبیات گسترده از زبان‌های مختلف واژه به وام گرفته است. وام واژه‌های فارسی عمدتا به زبان‌های زیر تعلق دارند: عربی، ترکی، مغولی، هندی، اروپایی (عمدتا شامل فرانسوی ، انگلیسی، روسی). در برابر همه واژه‌های دخیل نمی‌توان رویکرد واحدی اختیار کرد، زیرا نقش و تاثیر همه آنها در فارسی امروز یکسان نیست.

زبان عربی در طول چهارده قرن با زبان و ادبیات فارسی عمیقا درآمیخته است و کلمه‌های بسیاری از این زبان وارد فارسی شده و بر غنای آن افزوده است. اما ورود همه واژه‌های عربی در اثر نیاز نبوده است و به قول استاد محمد تقی بهار (ملک الشعرا) " از قرن پنجم به بعد ، تفنن در تقلید ادبای ایرانی از تازی زیادتر از اندازه و حد طبیعی رواج گرفت... این معنا باعث شد که نثر فارسی که در قرن چهارم و نیمه اول قرن پنجم صدی پنج لغت تازی بیش نداشت، در نیمه دوم قرن پنجم (شمار لغات تازی‌اش) از صدی پنجاه نیز تجاوز کرد." به همین دلیل ، در اصول و ضوابط حاضر برای فارسی تلقی کردن واژه‌های عربی یکی از این دو شرط را قائل شده‌ایم: یا در فارسی امروز تداول داشته باشند، یا در چند متن معتبر نظم و نثر فارسی تا اواخر قرن پنجم به کار رفته باشند.

استفاده از واژه‌هایی که فارسی از هندی (مانند جنگل، نیلوفر ،نارگیل) و ترکی (مانند، اتاق، سنجاق، یونجه) و مغولی (آقا، اردو، سوغات) به وام گرفته است و اکنون در فارسی رواج دارند ، آسیبی به زبان فارسی وارد نمی‌کند، زیرا از یک سو به دلیل قدمت دیرینه‌شان به صورت طبیعی در بدنه واژگان فارسی جای گرفته‌اند و از سوی دیگر اکنون وام گیری از این زبان‌ها به کلی متوقف شده است.

وضعیت لغات اروپایی به سه دلیل با دو گروه بالا متفاوت است:

۱- قدمت بخش اعظم این لغات چندان نیست و حداکثر به یک قرن می‌رسد.

۲- وام‌گیری از این زبان‌ها ، به ویژه زبان انگلیسی ، همچنان با قوت ادامه دارد و چنانچه تلاش جدی در زمینه معادل‌یابی برای واژه‌های علمی و فنی این زبان‌ها صورت نگیرد، چهره زبان فارسی در چند دهه آینده به کلی تغییر می‌کند.

۳- برخی واژه‌های اروپایی، به صورت خوشه‌ای وارد فارسی می‌شوند و فرایندهای واژه‌سازی فارسی را مختل می‌کنند. مثلا همراه با "والیبال" " والیبالیست" و همراه با "پیانو" " پیانیست" هم وارد شده است.

با توجه به دلایل بالا برای فارسی تلقی کردن لغات اروپایی ، علاوه بر تداول در زبان ، دو شرط دیگر نیز باید قائل شد:

نخست اینکه واژه‌های محل بحث در زبان مبداء واژه‌های بسیط باشند و اگر هم بسیط نیستند ساختمان صرفی‌شان چنان باشد که بتوان فرایندهای واژه‌سازی فارسی را بر روی آنها اعمال کرد. مثلا با واژه "یون" که بسیط است می‌توان واژه‌های "یونیده" و "یونش" و " یونش پذیر" را ساخت، و نیز با واژه "تلفن" ، علی رغم ایمکه در زبان مبداء بسیط نیست ، لغات "تلفنی" و "تلفنچی" و "تلفن‌خانه" ساخته شده است.

دوم اینکه عموم صاحب نظران معادل‌یابی برای آن را ضروری ندانند، مانند اتم و الکترون و پروتون.

واژه‌های اروپایی که هنوز در مورد معادل مشخصی برای آنها اجماع نظر حاصل نشده ، اما چندین معادل برایشان پیشنهاد شده است (مانند اتوپیا که از جمله معادل‌های ناکجاآباد، آرمانشهر، مدینه فاضله در برابر آن به کار رفته است) شایسته نیست فارسی به شمار آیند، زیرا مشخص است که صاحب نظران معادل‌یابی برای آنها را لازم می‌دانند.

دکتر مسعود شریفی

مدیر گروه واژه‌گزینی انجمن علمی میکروب شناسی ایران

نماینده تام الاختیار انجمن علمی میکروب شناسی ایران در فرهنگستان زبان و ادب فارسی

فراخوان

همکار گرامی

باسلام

احتراما، به استحضار می‌رساند انجمن علمی میکروب شناسی ایران ، در نظر دارد تا به حول و قوه الهی مجموعه‌ای تحت عنوان " تاریخچه میکروب شناسی ایران" را تهیه نماید. این مجموعه شامل اطلاعات مربوط به کلیه همکاران محترمی است که به هر نحوی از انحاء در عرصه‌های آموزشی ، پژوهشی، خدمت رسانی و تعالی علم میکروب شناسی در سراسر کشور اهتمام ورزیده‌اند. بدیهی است این تلاش ملی فقط در سایه یاری کلیه میکروب شناسان میسر خواهد شد.

بنابراین ، هر نوع اطلاعات اعم از آدرس، شماره تلفن، پست الکترونیک و ... که در جهت تماس با اساتید و همکارانی که به درجه بازنشستگی نائل شده‌اند و یا در خارج از کشور بسر می‌برند ما را در اجرای این مهم یاری خواهد کرد. به علاوه ، هر نوع اطلاعات مکتوب درباره اساتید و همکاران درگذشته ، مزید امتنان خواهد بود و در صورت تایید با ذکر مشخصات ارسال کننده در این مجموعه گنجانده خواهد شد.

لذا ،خواهشمنداست با عنایت به راهنمای تهیه کارنامک ، اطلاعات مربوط به خود را به صورت تایپ شده و یا در لوح فشرده آماده نمایید. اطلاعات را یا به آدرس جدید انجمن علمی میکروب شناسی ایران (تهران- خیابان گارگر شمالی- جنب بیمارستان قلب شریعتی- کوچه شهریور - پلاک ۶ - واحد ۱)و یا از طریق پست الکترونیک (microbiologyhistory@yahoo.com و microbiologyhistory@gmail.com) ارسال فرمایید. در صورت لزوم با شماره همراه ۰۹۱۲۳۸۱۹۰۵۴ (آقای دکترمسعود شریفی) تماس بگیرید.

امید است با عنایت کلیه همکاران محترم دراقصی نقاط کشور ، این مجموعه ارزشمند به صورت هر چه جامع‌تر به جامعه علمی کشور تقدیم گردد.

با تشکر

دکتر غلامرضا ایراجیان

رئیس انجمن علمی میکروب شناسی ایران

راهنمای تهیه کارنامک

۱. کارنامک باید گویا، مختصر و مفید بوده و به خوبی سازماندهی شده باشد.

۲. کارنامک باید شامل بخش‌های زیر باشد:

- بیوگرافی (تولد، تحصیل، خانواده)
- فعالیت‌های اجرائی
- فعالیت‌های آموزشی
- فعالیت‌های پژوهشی
- عضویت در سازمان‌ها و مجامع داخلی و بین المللی
- ثبت اختراع
- جوایز
- کتاب‌های علمی
- خلاصه مقالات در مجامع علمی (همایش‌ها و کنگره‌ها)
- مقالات چاپ شده درمجلات علمی پژوهشی ایران
- مقالات چاپ شده درمجلات علمی پژوهشی خارجی
- زمینه کارهای تحقیقاتی

۳. برای نگارش کارنامک، به نکات ذیل توجه فرمائید :

- کلیه پاراگراف‌ها از سمت راست و چپ تراز شوند .
- برای نگارش متن حتماً در هر مورد از قلم پیشنهادی استفاده گردد.
- کارنامک حتماً باید مطابق فایل موجود در سایت انجمن تهیه گردد.
- متن کارنامک باید با قلم B Yaghut،اندازه ۱۴ (سر تیترها باید Bold باشند)تحریر شود.
- مکان عکس در هر قسمت از کارنامک در مرکز صفحه (بعد از کپی نمودن عکس در فایل Word و کلیک راست ماوس، انتخاب فیلدهای مربوطه مقابل، Format picture- Lay out- In front of text- Other و سایز Height: 7.93cm و Width: 6.4cm) تنظیم گردد.
- تمامی عکس‌ها و تصاویر باید با رزولوشن بالا (300 dpi) و اندازهٔ ۳۰۰-۲۰ کیلو بایت ارسال گردد.
- علاوه بر افزودن عکس در فایل Word، فایل اسکن شدهٔ عکس نیز جداگانه ارسال گردد.

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

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

Isolation process of two genes of *wsp* and *16S rRNA* in the intracellular bacterium; *Wolbachia pipientis* in *Phlebotomus papatasi* sandfly vector of Zoonotic Cutaneous leishmaniasis in Iran

Parvizi P[1]*, Fardid, F[2], Amirkhani A[3]

1)Molecular Systematics Laboratoy, Pasteur Institute of Iran,Tehran,Iran.
2) Department of Microbiology, Islamic Azad University of Qom,Qom,Iran.
3) Department of Epidemiology, Pasteur Institute of Iran,Tehran,Iran.

Corresponding author : Parvizi P, Molecular Systematics Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran 13164, Iran.
T e l : +98(21)66968855 E.mail: parp@pasteur.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: The intracellular *Wolbachia pipientis* is a *Rickettsia*-like bacterium. The gene of *W. pipientis* is usually congenitally-inherited in insects and can cause cytoplasmic incompatibility (CI), which is potentially useful for driving genes through populations.

In present study, *W. pipientis* has been detected in *Phlebotomus papatasi*, the vector of rural cutaneous leishmaniosis in Iran by using PCR to amplify fragments either of the *16S ribosomal RNA* gene (16S rRNA) or of the major *Wolbachia* surface protein gene *wsp*.

Materials and Methods: sandflies were screened for the presence of *W. pipientis* by PCR using the non-strain specific primers *wsp* 81F with 691R and 16S 99F with 994R. The sequences obtained were edited and aligned using Sequencher™ v. 3.1 to identify *W. pipientis* haplotypes, which were analysed phylogenetically using PAUP* software.

Results: from 165 Individual wild-caught *P. papatasi* from Iran, the gene fragment of *wsp* was found in 124 cases (75.2%), and 16s RNA gene fragment was identified in 123 cases (74.5%). Only one haplotype was obtained for each gene, from which it is inferred that only one A-group genetic strain of *W. pipientis* occurs in *P. papatasi* throughout much of this sandfly's range.

Conclusion: based on the results of this study there is possibility of using just one genetically modified strain of *W. pipientis* to drive through wild sandfly populations transgenes for intervening in the transmission of *L. major* by *P. papatasi*. This genetically modified strain would have to show a CI phenotype in *P. papatasi*, in order to be spread quickly through wild sandfly populations. Due to natural infection of *Wolbachia* in sandflies and for their behavior of Cytoplasmic Incompatibility(CI) , *Wolbachia* can be used as a transferring gene in populations of sandflies to control Leishmaniasis.

KEY WORDS: *Wolbachia pipientis, Phlebotomus papatasi,* wsp gene, 16S rRNA gene, Iran.

Molecular study of frequency of *Herpes simplex virus type 2* in Esfahan and Chaharmahal-va-Bakhtiari provinces in year 1388

Ghasemi Dehkordi P [1], Momtaz H [*2], Rezaeian A [1], Yaghobi R [3]

1) Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom - Iran.
2) Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord - Iran.
3) Shiraz Transplant Research Center, Namazee Hospital, University of Medical Sciences, Shiraz - Iran.

Corresponding author: Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord - Iran.
Mobile: 09133812574 E.mail: hamomtaz@iaushk.ac.ir

ABSTRACT
Background and Objectives: Infections due to *Herpes simlex virus type 2* (*HSV-2*) often causes genital herpes in men and women, infant herpes and nonsupporative meningitis. These diseases are caused in relation to HIV infection, and might be transfected from mother to baby.
In this study the prevalence of *HSV-2* was determined for the first time by PCR method in clinical samples collected from Isfahan and Chaharmahal-va-Bakhtiari provinces.
Materials and Methods: One hundred *HSV-2* infected sera with high titer of IgG and IgM were collected from suspected patients. In total 82 samples from Isfahan province and 18 samples from Chaharmahal-va-Bakhtiari province were collected. Viral DNA was extracted and PCR was performed by using specific primers for *gD* gene of *HSV-2*.
Results: The positive results of *HSV*-PCR and the 1013 bp segment of *HSV-2 gD* gene was detected in 8 of 100 (8%) of serum samples. In Isfahan province 6.09 % and in Chaharmahal-va-Bakhtiari province 16.66 % were positive for *HSV-2*.
Conclusion: The results of this study demonstrated the prevalence of *HSV-2* in studied region similar to other regions of the world. Besides, PCR method is presented as a useful procedure for detection of *HSV-2* in infected sera.
Key words: *Herpes simplex virus type 2* (*HSV-2*), PCR, *gD* gene, Chaharmahal-va-Bakhtiari province, Isfahan province

The comparative frequency of β-lactamase production and antibiotic susceptibility pattern of bacterial strains isolated from staff hands and hospital surfaces in Alzahra Hospital–Isfahan

Jalalpoor S*[1], Kermanshahi RK [2], Noohi AS [3], Zarkesh Isfahani H [4]

1)Department of Food Industries, Islamic Azad University -Shahraza Branch , Iran
2) Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Alzahra , Tehran, Iran
3) Departmen of Biology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran
4) Departmen of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding author : Shilla Jalalpour, Department of Food Industries, Islamic Azad University- Shahraza Branch, Iran.
Tel:+98 (321) 3243005 E.mail: shilla.jalalpoor@yahoo.com.

ABSTRACT
Background and objectives: Hospital surfaces can serve as reservoirs of potential pathogenic bacteria**.** Staff hands are the main source of bacterial transmission in hospital. The prevalence of bacteria harboring β–lactamase enzyme in staff hands and hospital surfaces, leads to spread of β–lactamase producing bacteria and ultimate increase of antibiotic resistance nosocomial infections. The aim of this study was to investigate the frequency of β-lactamase producing bacteria and susceptibility pattern of isolated bacteria from staff hands and high and low contact hospital surfaces of Alzahra hospital in Isfahan, Iran.
Material and Methods: This laboratory-based study was performed in Alzahra hospital in Isfahan during 2005-2007 years. Overally, 274 samples (194 strains from surfaces and 80 strains from staff hands) were screened during the study. Environmental samples were collected by using swabs in Nutrient Broth (NB) and samples from staff hands were collected with Finger Print method. Bacterial identification was performed by conventional biochemical identification tests. For determination of β–lactamase production, acidometric method was used, and antibiotic susceptibility testing was performed by Kirby Bauer method.
Results: the 194 isolated strains from hospital surfaces were: *Staphylococcus* spp. 105 (53.7%), *Bacillus* spp. 74 (24%) *Enterobacteriaceae* 21 (10.7%), *Pseudomonas* spp . 9 (4.6%), *Streptococcus* spp. 2 (1%), other gram negative bacilli 10 (5.15%), and the 80 strains isolated from staff hands were: *Bacillus* spp. 48 (60%), *Staphylococcus* spp. 28 (35%), *Enterobacteriaceae* 4 (0.5%). The isolated bacteria from both sources were highly resistant to tested antibiotics. According to the results from acidometric test, 125 (61.54%) strains isolated from hospital surfaces and 46 (61.85%) strains isolated from staff hands, were β-lactamase producers.
Conclusion: The results show the high frequency of antibiotic resistant and β–lactamase producing bacterial strains on staff hands and hospital surfaces in present study.
Key Words: β–lactamase, Antibiotic Resistance, Hospital Surfaces, Staff Hands.

Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009

Vaez H [1], Ghazi Saeidi K [1], Moradi A[1], Tabaraei A [1], Khodabakhshi B [2], Bazouri M [1], Golriz N [3] ,Ghaemi E A[1]

1) Department of microbiology , Golestan university of medical science
2) Department of infection disease , Golestan university of medical science
3) 5 Azar hospital , microbiology laboratory

Corresponding author : Hamid vaez, Department of Microbiology ,Golestan university of medical science.
Mobile: 09127230225 E.mail: vaezhamid84@gmail.com

ABSTRACT

Background and objective: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a main cause of nosocomial infections worldwide. Multidrug resistance property of strains causes difficulties in treatment of their infection. The aim of this study was to determine the frequency of MRSA and their resistance pattern to commonly used antibiotics in Health-educational centers of Gorgan.

Material and Methods: In this descriptive study, 121 clinical isolates of *Staphylorcoccus aureus* collected from different infections from September 2008 to August 2009. After confirmatory identification tests, the antibiotic susceptibility testing was performed by using disk diffusion method as per *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) guideline. Data analyzed by Chi-square test and SPSS soft ware. P value of <0.05 was determined as significant.

Results: Of 121 tested *S.aureus* , 104(85.9%)strains were MRSA. The highest resistance was demonstrated as:100% to Penicillin, 97.6% to CO- Amoxyclav ,71.4% to Cephotaxime and64.3% to Erythromycin. Our finding showed more MRSA isolates in urine (90.4%) and wound (89.2%) specimens.

Conclusion: Prevalence of MRSA strains in our region was 85.9% .This is higher than other studies performed in major cities such as Tehtan,Mashhad and Shiraz . The treatment of infections caused by MRSA is difficult due to simultaneous multidrug resistance among the strains.

Key words: MRSA , Antimicrobial resistant , Disk diffusion

Helicobacter pylori Antibody titer in Migraine patients in Ilam

Hosseinzadeh M [1] , Khosravi A[*1], Kaikhavani S[1], Malekshahi S[2] , Khorasani R[3]

1)Department of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Iran.
2)Department of Psycology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Iran.
3) Public Health Center, Ilam, Iran.

Corresponding author: Afra Khosravi, Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Iran.
Tel: +98(841)227140 E. mail: afrakhosravi@yahoo.co.uk

ABSTRACT

Background and Objectives: Migraine is the most common headache in different communities and approximately 12-15% of individuals are suffering worldwide. Recent studies have revealed a relationship between *Helicobacter pylori* infection and migraine. The aim of presend study was to evaluate the antibody titer against *H.pylori* in patients with migraine and comparison to healthy subjects.

Material & Methods: This case – control randomized study was carried out in patients whose migraine has already been diagnosed referred to University neurology clinic and private medical sectors in Ilam, Iran. Seventy migraine patients as the case group and 70 healthy individuals as control group were participated in this study. The demographic criteria of both groups were identical. Blood samples were taken from all subjects and was used for evaluation of IgG antibody titer against *H.pylori* by using ELISA method. The mean antibody titer were compared in both groups.

Results: Household women had the highest prevalence of migraine (40%), which showed a correlation with menstruation in 21 women (45.7%). Fifty three patients with migraine (75.7%) had gastrointestinal disorders, which in 48 patients (68.6%), this was in correlation with certain nutritional habits. Stress was reported as the most important cause of migraine in 15 patients (21.4%) that in 91.4% of them, headache was followed by anxiety. In 51 patients (72.9%), sleep disorder was seen. The mean OD value of antibody titre against *H.pylori* was 60.08 in case group and 21.82 in control group, which the difference was significant ($P<0.05$).

Conclusion: The significant difference for the mean OD value to *H.pylori* among case and control groups in present study, shows the importance of investigation of *H. pylori* infection in patients with classic migraine, which needs more complementary tests. It is suggested that treatment of *H.pylori* infection may affect the disease and probably cure the headache partially.

Key worlds: Migraine, *Helicobacter pylori* ,Antibody titer

Study of TNF-α & IFN-γ concentratin levels of serum in TB patients & control healthy groups by ELISA & evaluation of their polymorphisms by PCR-RFLP

Bayat M [1,2]*, Nowroozi j [2], Pakzad P [2], Farnia P[1], Anoosheh S [1], Marashian SM[1], Varahram M [1], Kazempour M [1], Masjedi MR [1], Velayati AA [1]

1) Department of Microbiology ,Islamic Azad University, Tehran North Branch,
2) Mycobacterium Research Center (MRC), National Research Institute Of Tuberculosis and Lung Diasease (NRITLD), Darabad, Tehran

Corresponding author : Mahdiye Bayat, Department of Microbiology ,Islamic Azad University, Tehran North Branch, Mobile :09122838255 E.mail: kavoshgroup597@yahoo.com

ABSTRACT

Background & Objectives: Cellular resistance to tuberculosis (TB) infection depends on signals from *mycobacterium tuberculosis*-specific T lymphocytes activating mycobacterial killing mechanisms in infected macrophages. The network of soluble factors, or cytokines, responsible for these cellular communications has been progressively unraveled over the last 3 decades; however, new regulatory and effectors cytokines continue to be discovered. Infection of a host with a pathogen first result in activation of cells of the innate immune response including effectors molecules including cytokines such as TNF-α & IFN-γ . The aim of this study was to investigate the frequency of TNF-α , IFN-γ alleles , evaluating serum concentration of TNF-α and IFN-γ and relationship of between susceptibility to TB and TNF-α and IFN-γ gene variations.

Material & Methods: In this prospective case-control study, 93 patients with smear positive tuberculosis selected from Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran. They were matched with 103 controls without any history TB. Genotype of 5 regions of TNF-α and 1 region of IFN-γ were distinguished by PCR-RFLP method, and level of serum concentration between case & control groups were evaluated by ELISA method. Data were analyzed with Mann-Whitney U & earning the cut off analyzed with ROC curve for ELISA method and the results of PCR-RFLP method were analyzed by SPSS, Fisher exact and X2.

Results: In PCR-RFLP method, the results showed a significant difference at TNF-308 and TNF-857 between two groups of control and patient ($P < 0.05$). In ELISA method, a significant difference in IFN-γ was observed between the groups of control and patient ($P < 0.05$). Also a cut off point as a serologic marker between the positive and negative states, for rapid TB examination about IFN-γ was found; the cut off for IFN-γ was 0.19.

Conclusion: Mutation in TNF-308 and TNF-857 regions were identified significantly, but it was not observed in other TNF-α and IFN-γ regions. In this study, ELISA method suggest that mycobacterial pathogens are frequently associated with production of cytokines such as IFN-γ and serologic tests considering the cut off patients, help us to detect TB in cases that we want to earn results rapidly.

Key Words: Cytokine, Tuberculosis, IFN-γ, TNF-α, PCR-RFLP, ELISA test

RNA extraction from *Streptococcus mutans* biofilms

Tahmourespour A[*1], Salehi R [2], kermanshahi Rk [3], Eslami G [4]

1) Department of Microbiology , Basic medical science faculty ,Islamic Azad University, Khorasgan branch, Isfahan
2) Department of Genetics , Basic medical science faculty , Isfahan University of Medical Sciences
3) Department of Microbiology , Biology faculty, Alzahra University, Tehran
4) Department of Parasitoligy , Basic medical science faculty -Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd

Corresponding author : Tahmourespour A, Department of Microbiology , Basic medical science faculty ,Islamic Azad University, Khorasgan branch, Isfahan
Tel:+98(311)6278314 E.mail: arezootahmourespour@gmail.com

ABSTRACT

Background: RNA extraction with efficient quality and quantity is very important for RT PCR, hybridization on northern blotting and gene expression analysis by real time PCR. Soluble and insoluble extracellular polysaccharides in *Streptococcus mutans* biofilm cells interfere with RNA extraction procedures. Therefore, finding efficient methods for polysaccharide removal, RNA extraction and purification is necessary for RNA based molecular research. The aim of present study was to evaluate the efficary of a few methods in RNA extraction from *Streptococcus mutans.*

Methods: In this research we used *Streptococcus mutans* ATCC 35668 and one clinical isolate of *S. mutans* from dental plaque. RNA extraction was carried out from biofilms form in 24 well polystyrene microtiter plate using 3 methods. 1: Routine method for RNA extraction from planktonic cells with RNX-Plus solution (Cinagen), 2: Using HYBAID ribolyser Kit, instrument and tubes containing pearls. 3: Using HYBAID ribolyser instrument and RNX-Plus solution. Finally, determination of the isolated RNA purity and integrity was done.

Results: The results showed that RNA extraction from biofilm cells of *S. mutans* is challenging because of extracellular polysaccharides and the current RNA isolation protocols from planktonic cells (eg. protocol 1) are not suitable for biofilm cells. For this reason, we used HYBAID ribolyser instrument and tubes containing glass and plastic pearls with different size and shapes for maximum cell lysis without disturbing the RNA.The mean photo absorbtion from extracted RNA in latter methods showed statistical significant difference compared to current in-use method ($P< 0.05$).

Conclusion: RNA extraction from *S.mutans* biofilm cells needs techniques with maximum Polysaccharide removal and maximum cell lysis without disturbing the RNA. The 2nd and 3rd methods were more effective than 1st one.The 3rd protocol is recommended due to it`s lower cost.

Key words: RNA extraction, *Streptococcus mutans*, biofilm

Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9).

Fazeli H [1], Moslehi T Z [2], Irajian GR[*2], Salehi M [3]

1) Department of Microbiology, School of Medicine ,Esfehan University of Medical Sciences.
2) Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences.
3) Department of Genetic, School of Medicine ,Esfehan University of Medical Sciences.

Corresponding author: Irajian GR. Department of Microbiolgy, School of Medicine. Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: + 98(21) 88058649 E. mail: girajian@yahoo.com

ABSTRACT

Background and abjectives*:* *Pseudomonas aeruginosa* is the most common cause of burn wound infections in many centers. This bacterium shows high resistance to majority of antibiotics including β-lactams. The frequency of beta-lactam resistant *P.aeruginosa* is increasing in many countries due to production of Metallo beta lactamase enzymes. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections and to identify bla-VIM gene by application of phenotypic and genotypic methods.

Material and Method: 79 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were recovered from 111 burn patients using microbiological methods. For all the isolates, antibiotic susceptibility tests were performed by Kirby–Bauer disc diffusion method. All imipenem resistant isolates were screened for MBLs production by IPM-EDTA disk and in order to detect blaVIM gene, PCR analysis was performed.

Results: Resistance rate of the isolated strains were as fallows: imipenem 94.9% pipracilin 97.4% ciprofloxacin 98.7% tobramycin 95% ceftazidim and ticarcilin 100%. IPM-EDTA disk method showed that 41 out of 74 (55.4%) of imipenem resistant isolates of *P. aeruginosa*, were metallo-β-lactamase producers. The PCR method showed that 34 out of 79 *P. aeruginosa* isolates were positive for blaVIM.

Conclusion: The results demonstrated that incidence of MBLs producing *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients is higher than expected. Therefore detection of antibiotic resistance patterns of bacteria as well as detection of MBLs enzyme producing isolates are of great importance in prevention and control of these infections.

Keywords: Metallo-β-lactamase, *P. aeruginosa*, Antibiotic susceptibility test,VIM gene, burn wound.

Table of Contents

Bacteriology

Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). I
Fazeli H , Moslehi T Z , Irajian GR , Salehi M

RNA extraction from *Streptococcus mutans* biofilms II
Tahmourespour A , Salehi R , kermanshahi Rk , Eslami G

Study of TNF-α & IFN-γ concentratin levels of serum in TB patients & control healthy groups by ELISA & evaluation of their polymorphisms by PCR-RFLP III
Bayat M , Nowroozi j , Pakzad P , Farnia P , Anoosheh S , Marashian SM , Varahram M , Kazempour M , Masjedi MR , Velayati AA

***Helicobacter pylori* Antibody titer in Migraine patients in Ilam** IV
Hosseinzadeh M , Khosravi A , Kaikhavani S , Malekshahi S , Khorasani R

Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009 V
Vaez H , Ghazi Saeidi K , Moradi A , Tabaraei A , Khodabakhshi B , Bazouri M , Golriz N ,Ghaemi E A

Health-care associated infections

The comparative frequency of β-lactamase production and antibiotic susceptibility pattern of bacterial strains isolated from staff hands and hospital surfaces in Alzahra Hospital–Isfahan VI
Jalalpoor S , Kermanshahi RK , Noohi AS , Zarkesh Isfahani H

Virology

Molecular study of frequency of *Herpes simplex virus type 2* in Esfahan and Chaharmahal-va-Bakhtiari provinces in year 1388 VII
Ghasemi Dehkordi P , Momtaz H , Rezaeian A , Yaghobi R

Protozoology

Isolation process of two genes of *wsp* and *16S rRNA* in the intracellular bacterium; *Wolbachia pipientis* in *Phlebotomus papatasi* sandfly vector of Zoonotic Cutaneous leishmaniasis in Iran VIII
Parvizi P, Fardid, F , Amirkhani A

In the name of God

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

Volume 3, Number 4, Winter 2010

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
English 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:
Ahmadi, Hojat Ph.D- Behroozikhah, Ali Mohammad Ph.D
bouzari, saeid Ph.D- Eftekhar, Fereshteh Ph.D
Farnia, Parissa Ph.D- Farshad, Shohreh Ph.D
Feizabadi, Mohammad Mehdi Ph.D- Haghshenas, Mohammad Reza Ph.D
Hamkar, Rasool Ph.D- Irajian, Gholam Reza Ph.D
Kokhaei, Parviz Ph.D- Modarres, Shahab Ph.D
Mohebali, Mehdi Ph.D- Mojtahedi, Ali Ph.D
Moosavian, Mojtaba Ph.D- Naderi nasab, Mahbobeh Ph.D
Nahaee, Mohammad Reza Ph.D- Rahbar, Mohammad Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D- Shahcheraghi, Fereshteh Ph.D
Sharifi, Massoud Ph.D- Tabaraie, Bahman Ph.D
Taherkhani, Heshmatollah Ph.D- Valizadeh, Saeid 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