



مدیر اجرایی :
دکتر رضا رنجبر
مدیر امور مالی :
دکتر محمد نیاکان
ویراستار :
دکتر آذر دخت خسروی

صاحب امتیاز :
انجمن علمی میکروب شناسی پزشکی ایران
مدیر مسئول :
دکتر غلامرضا ایراجیان
سر دبیر :
دکتر مسعود شریفی

هیات تحریریه (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 محبوبه حاجی عبدالباقی، دانشگاه علوم پزشکی تهران - 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 عبدالمهدی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دکتر رمضانعلی عطائی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله - دکتر فاطمه فلاح، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر کیومرث قاضی سعیدی، دانشگاه علوم پزشکی تهران - دکتر عبدالله کریمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر علی مهرابی توانا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله - دکتر اکبر میر صالحیان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمدرضا نهائی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز - دکتر محمد نیاکان، دانشگاه شاهد

داوران این شماره (به ترتیب حروف الفبا) :

دکتر غلامرضا ایراجیان، دکتر سعید بوذری،
دکتر محمدرضا پورشفیع، دکتر محمدرضا پورمند،
دکتر بهمن تبرائی، دکتر اکبر توکلی،
دکتر آذر دخت خسروی، دکتر رضا رنجبر،
دکتر محمد رهبر، دکتر محمد مهدی سلطان دلال،
دکتر مسعود شریفی، دکتر رمضانعلی عطائی،
دکتر محمد یوسف علیخانی، دکتر فاطمه فلاح،
دکتر محمد مهدی فیض آبادی، دکتر اشرف مبارز،
دکتر اکبر میر صالحیان، دکتر علیرضا ناطقیان،
دکتر محمدرضا نهائی، دکتر محمد نیاکان

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

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

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

فهرست مندرجات

باکتری شناسی

- ۱ طراحی و ساخت BCG نو ترکیب حاوی ژن سیتوزین دامیناز به منظور ارتقاء کارایی BCG اینتراویکال در درمان سرطان مثانه
آیدا فیض برازنده، حسین خان احمد، غلامحسین ابراهیمی پور، محمد ابوالحسنی، حسام الدین موقت، طیبه سهرابی
- ۹ بررسی مولکولی ژن بتالاکتامازطیف گسترده تیپ SHV در ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنمونیه در نمونه های بالینی جدا شده از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز
علیرضا مباشر کار جدی، محمد رضا نهائی، هایده مبین، مجید پرنور، جاوید صادقی
- ۱۹ شناسایی سویه های *Enterogastric Escherichia coli* در اسهال کودکان توسط Multiplex PCR و مطالعه قابلیت چسبندگی آن ها به سلول اپی تلیال
ابوالفضل داوودآبادی، مریم عباس زاده، ماناعلوی، انیس جعفری، سعیدبوذری
- ۲۵ ارزیابی پاسخ آنتی بادی به پروتئین های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به روش ELISA
سحر کرمی، سید داور سیادت، بهمن تیرائی، داریوش نوروزیان، ناصر هرزندی، محمدرضا آقا صادقی، جلال ایزدی مبارکه، محمد رضا رضوی، مریم خیر اندیش، سید مهدی سادات، مهدی نجاتی، علی شریفیات سلمانی
- ۳۱ ارزیابی اپیدمیولوژیک ژن های ویروالانس *pap, sfa, cnf-1, hly* در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری
شهره فرشاد، فاطمه امام قریشی، مانلی امین شهیدی
- ۳۹ ارزیابی آزمون حساسیت به نالیدیسیک اسید جهت غربالگری سویه های بالینی سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین
نگین ایرانشاهی، رضارنجبر، سید داور سیادت، مهدی نجاتی، ناصر هرزندی، داریوش نوروزیان، علی ناغونی، سعید مروتی، زهرا سفیری، سهیلا یوسفی، بهمن تیرائی
- ۴۷ بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در گونه های انتروکوک جدا شده از افراد سالم در شهر تهران ۸۷-۱۳۸۶
نسرین نوحی، ملیحه طالبی، غلامحسین ابراهیمی پور، محمدرضا پورشفیع
- ۵۳ بررسی فاکتورهای ویروالانس/انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه های ادرار
احمد قاسمی، رضوان منیری، احمد خورشیدی، سید غلامعباس موسوی
- ۵۹ تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سر و گروه های اشریشیاکلی/انتروپاتوژن، جدا شده از مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال در تهران ۷-۱۳۸۶
محمد حسن شیرازی، ابوالفضل اکبری، محمد کاظم شریفی یزدی، مصطفی حسینی، فاطمه فرد صانعی، روناک بختیاری، محمد مهدی سلطان دلال

۶۷

سروتایپینگ سویه های *Streptococcus pneumoniae* جدا شده از عفونت های مختلف

در تهران در سال ۱۳۸۷

علی مهرابی توانا ، رمضانعلی عطائی ، اسمعیل حسین نجدگرمی ، محمد مهدی گویا، محمد رهبر

هیپکروپ شناسی مواد غذایی

۷۳

ارزیابی آلودگی بستنی سنتی به اشرفیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در شهرستان

سمنان سال ۱۳۸۶-۷

وحیده افراز، علی جزایری مقدس ، غلامرضا ایراجیان

عفونت های بیمارستانی

۷۹

شیوع کلنیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بینی کودکان بستری و

برخی عوامل خطر موثر بر آن

مسعود شریفی، مهشید سررشته داری ، فرناز حسنی ، بهاره رئیسی ، محمود علیپور حیدری

شرایط تهیه و ارسال مقاله

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

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

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

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

ABSTRACT (English)	اصل مقاله (فارسی)
Title : Times New Roman 14 (Bold)	عنوان مقاله : یاقوت ۱۶ (بولد)
Author: Times New Roman 10 (Bold)	نام نویسندگان : یاقوت ۱۲
	چکیده : یاقوت ۱۴ (بولد)
Address: Times New Roman 10 (Bold)	عنوان چکیده : یاقوت ۱۱ (بولد)
Text: Times New Roman 11	متن چکیده : یاقوت ۱۱
	متن مقاله : لوتوس ۱۱
	عناوین متن مقاله : یاقوت ۱۴ (بولد)

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

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

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

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

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

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

مثال انگلیسی :

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

مثال فارسی :

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

۵-۲) سازمان به عنوان مؤلف ؛ مثال :

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

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

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

۵-۵) مجله همراه با ضمیمه تکمیلی :

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

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

مثال فارسی :

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

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

مثال انگلیسی :

Kastner DL. Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. In: Koopman W J, ed. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 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 ۶۱ .

۵-۸) رفرانس الکترونیک (مقاله) :

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

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

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

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

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

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

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

طراحی و ساخت BCG نو ترکیب حاوی ژن سیتوزین دآمیناز به منظور ارتقاء کارایی BCG اینتراویکال در درمان سرطان مثانه

آیدا فیض برارنده^۱، حسین خان احمد^{۲*}، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، محمد ابوالحسنی^۲،
حسام الدین موثق^۲، طیبه سهرابی^۲

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی
۲) بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: حسین خان احمد، بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
همراه: ۰۹۱۳۱۲۱۴۰۳۱ hossein_khanahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه ادراری- تناسلی در جهان است. ایمونوتراپی با BCG درمان انتخابی این سرطان می باشد. روش دیگر، ژن درمانی سرطان مثانه با سیستم CD/5-FC (Cytosine Deaminase/5- Fluorocytosine) است. هدف از ساخت شاتل وکتور مایکوباکتریال، انتقال ژن سیتوزین دآمیناز (CD) به BCG با روش الکتروپوریشن بود تا با تبدیل 5-FC به 5-Fluorouracil (5-FU) توسط آنزیم CD، سلول های توموری بیشتری نابود شوند. **روش بررسی:** قطعات ژنی شاتل وکتور مایکوباکتریال شامل، پروموتور hsp60، توالی سیگنال آلفا آنتی ژن و ژن CD مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) پس از تکثیر با PCR و هضم آنزیمی و با استفاده از فناوری های کلونینگ در پلاسمید pBGGT و pVN2 به ترتیب کلون و ساب کلون شدند. پلاسمید نهائی با روش الکتروپوریشن به داخل BCG هدایت گردید و وجود آن در BCG بررسی شد.

یافته ها: نتایج تعیین توالی وکتور نهائی صحت آن را تأیید و وکتور pHARA نامگذاری شد. سلول هائی که pHARA را دریافت کردند پس از ۱۷ روز روی محیط میدل بروک H₁₀ ۷ حاوی غلظت نهائی ۲۰ µg/ml کانامایسین، کلنی تشکیل دادند. **نتیجه گیری:** BCG نو ترکیب فوق علاوه بر فراخوانی موضعی سیستم ایمنی، با تبدیل داروی 5-FC به 5-FU توسط آنزیم CD، می تواند سلول های توموری بیشتری را نابود نماید.

کلید واژه ها: BCG، سرطان مثانه، ایمونوتراپی، ژن درمانی، الکتروپوریشن

مقدمه:

سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه ادراری- تناسلی در جهان است (۱). ۷۰ تا ۸۰٪ سرطان های مثانه تحت عنوان سرطان سطحی مثانه (Superficial Bladder Cancer) طبقه بندی می شوند (۲). اولین روش برای درمان سرطان سطحی مثانه، برش تومور از طریق مجرای ادراری یا TUR (Transurethral Resection) است. از دیگر روش ها، درمان اینتراوزیکال می باشد که به صورت تجویز مستقیم دارو شامل ترکیبات شیمی درمانی یا Bacillus of Calmette and Guérin (BCG) به داخل مثانه است (۳). درمان اینتراوزیکال با BCG یا ایمونوتراپی، درمان انتخابی کارسینومای درجا (Carcinoma in situ) برای سرطان سطحی مثانه به شمار می رود (۴). BCG به عنوان دهنده پاسخ بیولوژیک، سیستم ایمنی بدن را به سوی پاسخ ایمنی T helper 1 (Th1) و مهار تومور هدایت می نماید. لذا، وجود یک سیستم ایمنی سالم و کامل برای اثرات ضد توموری BCG حائز اهمیت می باشد (۵). ژن درمانی از دیگر روش هایی است که برای درمان سرطان مثانه مورد استفاده قرار می گیرد (۶). از میان روش های اخیر، راهکار آنزیم - پیش دارو با نابودی انتخابی سلول های توموری، حداقل آسیب را به بافت های سالم وارد می آورد (۷). از جمله ترکیبات آنزیم - پیش دارو که در تحقیق حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفته است، سیستم 5-Cytosine Deaminase/5-Fluorocytosine (CD/5-FU) می باشد. در این سیستم از محصول ژن سیتوزین دامیناز Cytosine Deaminase (CD) مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای تبدیل پیش داروی غیر سمی 5-FU به متابولیت سمی 5-Fluorouracil (5-FU) استفاده می گردد. آنزیم CD تنها در باکتری ها و قارچ ها وجود دارد و در پستانداران موجود نیست (۸ و ۹).

اگرچه BCG اینتراوزیکال استاندارد طلائی و مورد قبول درمان سرطان سطحی مثانه در طول ۳۰ سال گذشته است، اما این درمان در ۳۰٪ از افراد بی نتیجه مانده و در ۵٪ عوارض جانبی ایجاد می کند. به علاوه، ۳۰ الی ۴۰٪ از بیماران در طی ۵ سال پس از این درمان دچار عود مجدد تومورها می گردند (۱۰ و ۱۱). بنابراین، می بایست به دنبال یافتن روشی در جهت کاهش دوز BCG اینتراوزیکال به منظور پیشگیری از عوارض جانبی و راهی برای افزایش پتانسیل درمانی آن بود. در این

تحقیق شاتل وکتور مایکوباکتریال بیانی- ترشچی حاوی پروموتور (hsp ۶۰) Heat Shok Protein (۱۲)، ژن CD و سیگنال ترشچی آلفا آنتی ژن مایکوباکتریوم (۱۳) طراحی و ساخته شد و با روش الکتروپوریشن به BCG منتقل گردید. بدین ترتیب سعی شده است تا برای اولین بار با ترکیب ایمونوتراپی و ژن درمانی علاوه بر استفاده از خاصیت ادجوانتی BCG و تحریک پاسخ های ایمنی، از راهکار ژن درمانی آنزیم- پیش دارو در جهت نابودی هر چه بیشتر سلول های توموری مثانه استفاده گردد.

مواد و روش ها:

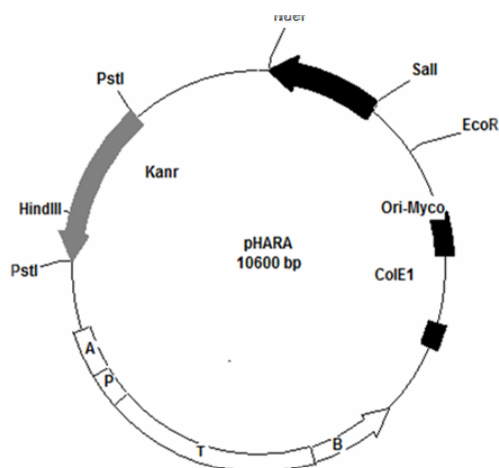
سویه های باکتری و مخمر، پرایمرها و وکتورها :

سویه های باکتری استفاده شده در این تحقیق عبارتند از: سویه *Saccharomyces* ، *E. coli* Top10F⁺ Code: BEC 009 *cerevisiae* INVSc1 Code: YSC 006 دریافت شده از بانک پلاسمید و میزبان انستیتو پاستور و *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 دریافت شده از بخش BCG انستیتو پاستور. پرایمرهای مورد استفاده به منظور جداسازی و تکثیر ژن های مورد نظر از ژنوم BCG و تکثیر سازه ژنتیکی حاوی پروموتور hsp ۶۰، سیگنال ترشچی آلفا آنتی ژن و ژن CD از وکتور pBGGT در جدول ۱ خلاصه شده است. این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner و توالی ژن های مورد نظر در NCBI طراحی گردید. به منظور کلونینگ این قطعات در Multiple Cloning Site (MCS) وکتور pBGGT از سایت های آنزیمی موجود در MCS این وکتور در انتهای ۵' پرایمرها استفاده شد. وکتورهای مورد استفاده عبارتند از: وکتور pBGGT تهیه شده از بانک پلاسمید انستیتو پاستور ایران، pTZ57T/A شرکت Fermentas و وکتور pVN2 از انستیتو پاستور پاریس.

استخراج DNA ژنومیک BCG ، *S. cerevisiae* و پلاسمید: جهت استخراج DNA ژنومیک BCG از ۲۰۰ mg کیک تازه BCG استفاده گردید. پس از ورتکس شدید کیک BCG با گلوله های شیشه ای و سانتریفوژ در دور ۸۰۰۰ rpm ، رسوب باقی مانده در آب دوبار تقطیر به صورت تعلیق در آمده و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و مجدداً در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مراحل بعدی جهت لیزبakterی از بافر لیز و برای جداسازی DNA و رسوب پروتئین ها

از فنل و کلروفورم با نسبت برابر استفاده گردید. پس از افزودن ایزوپروپانول به مایع روئی حاصل از سانتریفیوژ مرحله قبل در دور 12000 rpm و 3 ساعت انکوباسیون در 20°C - درجه سانتی گراد، مجدداً 10 دقیقه سانتریفیوژ در دور 12000 rpm انجام شد. طی دو مرحله از اتانول 96% و 70% و سانتریفیوژ در دور 12000 rpm جهت تخلیص DNA و شستشوی آن استفاده شد. پس از تبخیر اتانول، رسوب باقی مانده در آب مقطر استریل حل گردید. به منظور استخراج DNA ژنومیک *S. cerevisiae* از مخمر رشد داده شده در محیط Soybean Digested Casein Broth و از کیت QIAamp[®] DNA Mini Kit شرکت QIAGEN استفاده شد. در هر یک از مراحل کلونینگ، جهت تخلیص پلاسمید از کلون های مورد نظر، کیت استخراج پلاسمید Gene JET[™] Plasmid Miniprep Kit شرکت Fermentas مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال pHARA به BCG از طریق الکتروپوریشن: حدود $1\ \mu\text{g}$ پلاسمید عاری از نمک pHARA ($5\ \mu\text{l}$) به $0.4\ \text{ml}$ سوسپانسیون BCG اضافه و 10 دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس سوسپانسیون BCG و pHARA به کووت $0.2\ \text{cm}$ مخصوص الکتروپوریشن که 10 دقیقه بر روی یخ انکوبه شده بود منتقل گردید. پس از تنظیم دستگاه الکتروپوریشن بر روی برنامه $2/5\ \text{kV}$ ، $25\ \mu\text{F}$ و $1000\ \Omega$ ، پالس از کووت عبور داده شد. پس از 10 دقیقه انکوباسون کووت بر روی یخ، سوسپانسیون به یک لوله استریل حاوی $5\ \text{ml}$ محیط مایع $\text{vH}9$ غنی شده با OADC و Tween-80 منتقل شد و به مدت 3 ساعت به انکوباتور 37°C درجه انتقال یافت. پس از این مدت، سلول ها 10 دقیقه در دور $4000\ \text{rpm}$ سانتریفیوژ شدند. مایع روئی دور ریخته شد و سلول های باقی مانده به پلیت های حاوی محیط جامد $\text{vH}10$ حاوی غلظت نهائی $20\ \mu\text{g/ml}$ کانامایسین غنی شده با OADC $10\% \text{ v/v}$ منتقل شد و به مدت 2 الی 4 هفته در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد قرار داده شدند.



شکل ۱: تصویر شماتیک وکتور pHARA

تکثیر و کلونینگ ژن های پروموتور $hsp60$ ، آلفا آنتی ژن از ژنوم BCG و ژن *CD* از ژنوم *S. cerevisiae* با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ قطعات $hsp60$ و آلفا آنتی ژن از روی ژنوم BCG و ژن *CD* از روی ژنوم *S. cerevisiae* جداسازی و تکثیر شدند. قطعات $hsp60$ و *CD* ابتدا در وکتور pTA57T/A کلون شدند، سپس در وکتور pBGGT به ترتیب در جایگاه های آنزیمی *AflIII/XhoI* و *BglIII/SacI* ساب کلون گردیدند. قطعه آلفا آنتی ژن به طور مستقیم در جایگاه آنزیمی *SacI/AflIII* کلون شد.

ساب کلونینگ سازه ژنتیکی در وکتور pVN2: پس از تکثیر سازه ژنی با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه های آنزیمی *Sall* و *NdeI*، محصول PCR در جایگاه های آنزیمی *Sall/NdeI* و وکتور pVN2 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین، Ori M (pAL5000) و Ori ColeI می باشد ساب کلون شدند. وکتور حاصل pHARA نام گذاری شد. (شکل ۱)

آماده سازی سلول های مستعد الکتروپوریشن: حدود $1\ \text{mg}$ یک تازه BCG در $5\ \text{ml}$ محیط مایع $\text{vH}9$ غنی شده با $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80 و OADC $10\% \text{ v/v}$ کشت داده شد و به مدت 1 هفته در انکوباتور شیکردار 37°C درجه سانتی گراد و دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفت. در هفته های دوم و سوم پس از کشت اولیه، حجم محیط کشت $\text{vH}9$ با فاصله یک هفته به $15\ \text{ml}$ و $30\ \text{ml}$ رسانده شد و لوله ها به ترتیب 1 و 3 هفته در انکوباتور 37°C درجه با دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفتند. در هر یک از مراحل Scale-up، به تناسب حجم $\text{vH}9$ اضافه شده، $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80

و $10\% \text{ v/v}$ OADC کشت داده شد و به مدت 1 هفته در انکوباتور شیکردار 37°C درجه سانتی گراد و دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفت. در هفته های دوم و سوم پس از کشت اولیه، حجم محیط کشت $\text{vH}9$ با فاصله یک هفته به $15\ \text{ml}$ و $30\ \text{ml}$ رسانده شد و لوله ها به ترتیب 1 و 3 هفته در انکوباتور 37°C درجه با دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفتند. در هر یک از مراحل Scale-up، به تناسب حجم $\text{vH}9$ اضافه شده، $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80

جدول ۱: فهرست پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر اختصاصی و تائید قطعات شاتل وکتور

نام پرایمر	توالی در جهت ۵' به ۳'	کاربرد
Phsp60-F	5' AGATCTGGTGACCACAACGACGC 3' <i>BglIII</i>	تکثیر <i>Phsp60</i> از ژنوم BCG
Phsp60-R	5' GAGCTCTGCGAAGTGATTCCTCCG 3' <i>SacI</i>	
M13-F	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	تائید کلونینگ
M13-R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	
CD-F	5' CTTAAGGTGACAGGGGGAATGGCA 3' <i>AflIII</i>	تکثیر <i>CD</i> از ژنوم <i>S. cerevisiae</i>
CD-R	5' CTCGAGCTACTACCAATATCTTCAAACCA 3' <i>XhoI</i>	
α Antigen-F1	5' CTCATGACAGACGTGAGCCGAAAGATTTCG 3' <i>SacI-</i>	تکثیر α Antigen از ژنوم BCG
α Antigen-R1	5' AAACCGCAGGTGAGTTGTTCCC 3'	
α Antigen-F2	5' ATTGAGCTCATGACAGACGTGAAGATTTCG 3' <i>- SacI</i>	تکثیر α Antigen از ژنوم BCG
α Antigen-R2	5' CTTAAGCGCGCCCGCGTTGC 3' <i>AflIII</i>	
Construct-F	5' ATTCATATGTCCCAGTCACGACGTTG 3' <i>NdeI</i>	تکثیر سازه از وکتور pBGGT
Construct-R	5' CAAGTCGACTTCACACAGGAAACA 3' <i>Sall</i>	

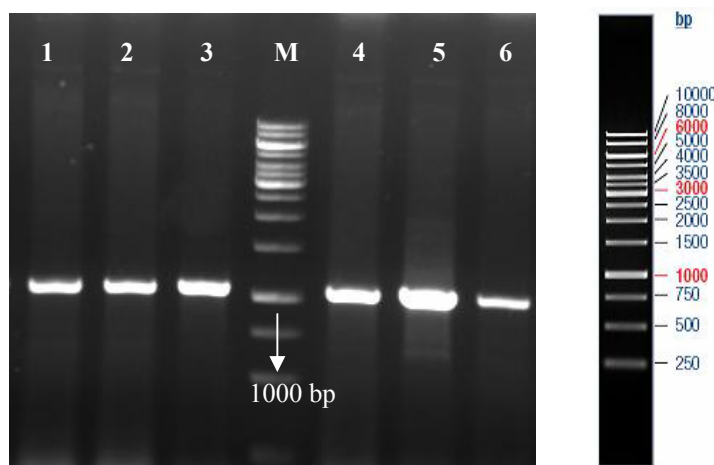
یافته ها:

اندازه و عدم وجود باندهای اضافی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تایید کلونینگ قطعات *hsp60* و *CD* در وکتور pTZ57T/A از روش های Colony PCR با پرایمرهای ۱۳ Universal M، Quick Check و برش های آنزیمی و مقایسه وکتور حاوی قطعه مورد نظر با وکتور pTZ57R استفاده شد. صحت کلونینگ قطعه آلفا آنتی ژن در وکتور pBGGT توسط هضم آنزیمی با آنزیم های *BglIII* و *AflIII* بررسی شد. اختلاف اندازه وکتور حاوی *hsp60* و آنتی ژن بود. پس از تکثیر و جداسازی سازه ژنتیکی با پرایمرهای دارای جایگاه های آنزیمی *Sall* و *NdeI*، قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل از PCR بر روی ژل ۱ درصد و همراه با مارکر ۱ kb

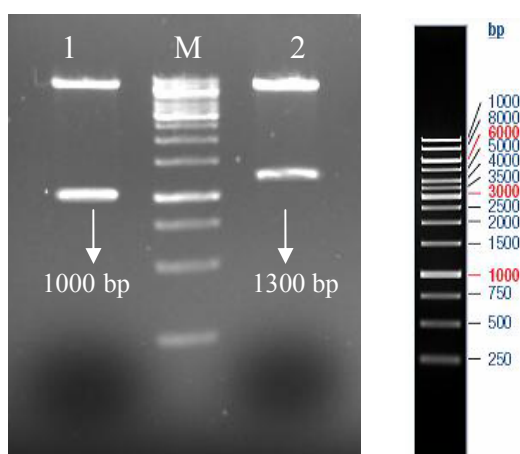
پس از استخراج ژنوم BCG و *S. cerevisiae*، برای تعیین میزان خلوص DNA و غلظت آن، جذب محلول حاوی DNA توسط اسپکتروفوتومتر و در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و نسبت آن تعیین شد. این نسبت برابر با ۱/۹ بود که دلالت بر خلوص مناسب محلول DNA و عدم آلودگی با پروتئین دارد. علاوه بر این، DNA ژنومیک و پلاسمیدی پس از استخراج، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و از لحاظ کمی مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه قطعه حاصل از PCR پرموتر *hsp60* با پرایمرهای اختصاصی ۴۰۰ bp، آلفا آنتی ژن ۱۲۰ bp و سیتوزین دامیناز ۴۷۷ bp بود. این قطعات همراه با مارکر ۱۰۰ bp از شرکت Fermentas بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و از نظر

از PCR و برش آنزیمی بیانگر وجود سازه در وکتور pVN2 می باشد. پس از گذشت ۱۷ روز از الکتروپوریشن BCG با شاتل وکتور pHARA، کلنی های نخودی رنگ و مقاوم به کانامایسین BCG بر روی محیط های H₁₀ ۷ ظاهر شدند. ظهور کلنی های نخودی رنگ و مقاوم به کانامایسین نشانگر انتقال پلاسمید کلون شده نهائی به سلول BCG است.

شرکت Fermentas الکتروفورز گردید. پس از ساب کلونینگ سازه ژنتیکی در وکتور pVN2 و ساخته شدن وکتور pHARA، جهت تایید حضور این قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی در pVN2 از PCR با پرایمرهای اختصاصی و برش آنزیمی pVN2 و pHARA با آنزیم های *NdeI* و *Sall* استفاده شد. (شکل های ۲ و ۳) قطعات حاصل از هضم آنزیمی با این دو آنزیم به ترتیب برابر با ۱۳۰۰ bp و ۱۰۰۰ bp بود. قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل



شکل ۲: PCR جهت تایید کلونینگ سازه ژنی در pVN2، ستون شماره ۱ تا ۶: قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی سازه ژنی پس از کلونینگ در pVN2
M: مارکر وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)



شکل ۳: برش pHARA و pVN2 با آنزیم های *Sall* و *NdeI*، ستون شماره ۱: قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل از برش آنزیمی pHARA
ستون شماره ۲: قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی حاصل از برش آنزیمی pVN2، M: مارکر وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)

بحث:

سرطان مثانه هشتمین سرطان شایع در میان مردان و چهارمین سرطان شایع در میان زنان می‌باشد. از جمله روش‌های درمان سرطان مثانه ایمونوتراپی یا به کارگیری سیستم ایمنی در درمان سرطان می‌باشد (۱). ویژگی‌های متعدد باکتری‌های زنده موجب استفاده از آنها به عنوان تحریک کننده‌های غیر اختصاصی سیستم ایمنی در ایمونوتراپی سرطان شده است. بهترین مورد شناخته شده که بیشترین مطالعات به عنوان تعدیل کننده سیستم ایمنی (Immunomodulator) بر روی آن انجام شده *BCG* می‌باشد *BCG* در طی سه دهه گذشته برای درمان تومورهای *High-grade* سرطان سطحی مثانه مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶). در سال ۱۹۷۶، Morales و همکاران برای اولین بار استفاده از *BCG* اینتراوزیکال را در درمان سرطان سطحی مثانه گزارش کردند و نشان دادند که عود سرطان سطحی مثانه در ۹ بیمار درمان شده با *BCG* داخل مثانه ای به میزان ۱۲ برابر کمتر از گروه شاهد است (۱۷). درمان اینتراوزیکال با *BCG* که به عنوان استاندارد طلایی و مورد قبول درمان سرطان سطحی مثانه در طول ۳۰ سال گذشته است، تنها با موفقیت ۶۰ الی ۷۰ درصدی روبرو بوده و در بیش از ۳۰ درصد از افراد بی نتیجه می‌ماند. این در حالی است که *BCG* در ۵ درصد از افراد تولید عوارض جانبی می‌کند که این عوارض در ۵/۰ درصد از موارد تهدید کننده زندگی افراد است. علاوه بر این ۳۰ الی ۴۰ درصد از بیماران در طی گذشت ۵ سال از این درمان دچار عود مجدد تومورها می‌گردند (۱۰ و ۱۱). ژن درمانی برای سرطان مثانه نیز از روش‌هایی است که به طور وسیعی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. امکان انتقال ژن‌های درمانی از جمله سیتوزین دآمیناز با استفاده از وکتورهای ویروسی و سایر روش‌ها در طی آزمایشات متعدد به اثبات رسیده است. اما، نتیجه حاصل از درمان با آنچه مورد انتظار است فاصله زیادی دارد. یکی از دلایل آن می‌تواند کرائی پایین انتقال ژن در *in vivo* باشد (۶ و ۱۸). بنابراین می‌بایست به دنبال یافتن روشی در جهت کاهش مقدار *BCG* اینتراوزیکال برای پیشگیری از ایجاد عوارض جانبی و راهکاری برای افزایش پتانسیل درمانی ایمونوتراپی و ژن درمانی آن بود.

ترکیب دو راهکار ژن درمانی و ایمونوتراپی اینتراوزیکال با *BCG* می‌تواند موجب تقویت بازده درمان گردد. در حالی که اثر بخشی راهکار ترکیب آنزیم-پیش دارو یا *Suicide Gene Therapy* و سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۱۲ طی مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۱۹)، اما تا کنون از *BCG* در این راهکار و برای

انتقال ژن‌های خودکشی کننده استفاده نشده است. در ایمونوتراپی اینتراوزیکال با *BCG* پس از اتصال *BCG* به فیبرونکتین سطح اپی تلیال مثانه و ترشح کموکاین‌های مختلف از سلول‌های اوروتیلیال و ماکروفاژها، سلول‌های *Th1* فعال می‌گردند. از سایتوکاین‌های کلیدی در پاسخ ایمنی *Th1*، اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما می‌باشند که نه تنها محرک تولید یکدیگر هستند، بلکه تولید سلول‌های فعال شده با *BCG* یا *BAK*، که سلول‌های توموری را به واسطه تولید پرفورین و مستقل از مسیر *Fas-Fas* از بین می‌برند، وابسته به حضور سایتوکاین‌های *Th1* یعنی اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما است (۲۰ و ۲۱). کارایی *BCG* اینتراوزیکال در درمان سرطان سطحی مثانه (۱۶)، پتانسیل درمانی بالای راهکار ژن درمانی *CD/5-FC* در از بین بردن سلول‌های توموری (۲۲)، سینتریزم میان *BCG* به عنوان عامل ترشح اینترلوکین ۱۲ و سیستم *CD/5-FC* (۲۴) و موقعیت خاص مثانه به عنوان اندامی قابل دسترس برای تزریق اینتراوزیکال و عدم نیاز به استعمال سیستمیک داروی سمی *5-FU* (۲۵) همگی امتیازات قابل توجهی هستند. وجود این امتیازات موجب شد تا در تحقیق حاضر شاتل وکتور مایکوباکتریال حاوی ژن خودکشی سیتوزین دآمیناز تحت کنترل پروموتور *hsp60* و سیگنال ترشیی آلفا آنتی ژن یا آنتی ژن *B 85* طراحی و ساخته شود. شاتل مذکور متعاقباً از طریق الکتروپوریشن به *BCG* منتقل شد. به این ترتیب با بهره گیری از روشی جدید در ایمونو - ژن درمانی، برای اولین بار از *BCG* به عنوان وکتور بیانی- ترشیی ژن *CD* مخمر *S. cerevisiae* و برای افزایش پتانسیل درمانی *BCG* در درمان سرطان مثانه استفاده گردد. در حالی که تولید داخل سلولی *5-FU* می‌تواند منجر به از بین رفتن *BCG* شود، ترشیی بودن آنزیم *CD* موجب تبدیل *5-FC* موجود در فضای بین سلولی به *5-FU* می‌گردد. *5-FU* دارای خاصیت بالقوه *Bystander Effect* است. بدین ترتیب *5-FU* مستقل از اتصالات بین سلولی *Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC)* که در اکثر سلول‌های سرطانی از میان می‌رود، قادر به انتشار در میان سلول‌های توموری می‌باشد که به دلیل عدم اتصال *BCG* به آنها ژن سیتوزین دآمیناز را بیان نمی‌نمایند (۲۶). امید است تا با استفاده هم زمان از دو راهکار ژن درمانی و ایمونوتراپی، علاوه بر مرتفع ساختن مشکل ایجاد عوارض جانبی توسط *BCG*، با نابود سازی هر چه بیشتر سلول‌های توموری از طریق تعامل پتانسیل‌های درمانی این دو روش، افراد مبتلا به سرطان سطحی مثانه از طول عمر بیشتر، کیفیت زندگی بالاتر و کاهش مواجهه با عود مجدد تومور برخوردار گردند.

نتیجه گیری:

بیشتری بر سلول‌های سرطانی مثانه خواهد داشت. این امر خود گامی مهم در جهت درمان موثرتر سرطان مثانه و کاهش اثرات جانبی مرتبط با مصرف BCG است.

BCG نو ترکیبی که در تحقیق حاضر طراحی و ساخته شد، علاوه بر دارا بودن خاصیت ادجوانتی و ایمنی موضعی که در جهت نابودی سلول‌های توموری در مثانه ایجاد می‌کند، با تبدیل داروی 5-FU به 5-FC توسط سیتوزین دامیناز، اثرات سیتوپاتولوژیکی

فهرست مراجع:

- Grossfeld GD, Carroll PR. Urothelial carcinoma: cancers of the bladder, ureter, and renal pelvis. In: Tanagho EA, McAnich JW, eds. *Smith's General Urology*. 16th ed. New York city; McGraw-Hill. 2004; PP: 324-345.
- Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc* 2004; **92**:258-294.
- Duque JL, Loughlin KR. An overview of the treatment of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; **27**: 125-135.
- Losa A, Hurel R, Lembo A. Low dose bacillus calmette-guerin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results. *J Urol* 2000; **163**: 68-71.
- Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG mediated antitumor activity. *J Urol* 1987; **137**: 155-158.
- Ardlet P, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer IV: Gene therapy of bladder cancer. *Eur Uro* 2002; **41**: 372-381.
- Pan CX, Koeneman KS. Anovel tumor-specific gene therapy for bladder cancer. *Med Hypotheses* 1999; **53**: 130-135.
- Kievit E, Bershad E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of Yeast over Bacterial Cytosine Deaminase for Enzyme/Prodrug Gene Therapy in Colon Cancer Xenografts. *Cancer Res* 1999; **59**: 1417-1421.
- Yergatian S, Lee JB, Geisow MJ, Ireson JC. Cytosine deaminase: structural modifications studies. *Experientia* 1977; **33**:1570-1571.
- Merz VW, Marth D, Kraft R, Ackermann DK, Zingg EJ, Studer UE. Analysis of early failures after intravesical instillation therapy with bacille Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder. *Br J Urol* 1995; **75**:180-184.
- Catalona WJ, Hudson MA, Gillen DP, Andriole GL, Ratliff TL. Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 1987; **137**:220-224.
- Batoni G, Maisetta G, Florio W, Freer G, Campa M, Senesi S. Analysis of the Mycobacterium bovis hsp60 promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **169**(1):117-24.
- Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular (alpha) antigen. *J Bacteriol* 1988; **170**:3847-3854.
- Warren R, deKock M, Engelke E. Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA Extraction method that does not compromise integrity. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 254-256.
- Guo B, Bi Y, Wang K, Neilan BA, Tillett D, Chen GJ. Cloning PCR Products. In: Chen BY, Janes HW. *PCR Cloning protocols*. 2nd ed. Totowa, New Jersey; Humana press. 2002; PP:111-140.
- O'Donnell MA, Aldovini A, Duda RB, Yang H, Szikvasi A, DeWolf WC. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. *I & I* 1994; **62**(6): 2508-2514.
- Lee SH, Cheung M, Irani V, Carroll JD, Inamine JM, Howe WR, Maslow JN. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis* 2002; **82**: 167-174.
- Wards BJ, Collins DM. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **145**: 101-105.
- Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; **411**: 380-384.
- Chabalgoity JA, Dougan G, Mastreoni P, Aspinall RJ. Live bacteria as the basis for

- immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2002; **1(4)**: 495-505.
21. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999; **353**: 1689-1694.
 22. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavity BCG in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; **116**: 180-183.
 23. Siemens DR, Crist S, Austin JC, Tartaglia J, Ratliff TL. Comparison of viral vectors: gene transfer efficiency and tissue specificity in a bladder cancer model. *J Urol* 2003; **170**: 979-984.
 24. Woo SL. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996; **56**: 3758-3762.
 25. Riemensberger J, Bohle A, Branda S. IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol* 2002; **127**: 20-26.
 26. Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL2) II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983; **130**: 988-992.
 27. Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res* 1993; **53**: 4619-4626.
 28. Schilsky RL. Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Oncology* 1998; **12**: 13-18.
 29. Hwang KS, Cho WK, Yoo J, Yun HJ, Kim S, Im DS. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene transfer combined with cytosine deaminase followed by 5-fluorocytosine treatment exerts potent antitumor activity in Renca tumor-bearing mice. *BMC Cancer* 2005; **5**: 51-62.
 30. Schenk-Braat AM, Bangma CH. Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005; **54**: 414-423.
 31. Theodore SL, Alnawaz R, Emily YN, Melinda W, James ET, Philip LS. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-Fluorocytosine. *Cancer Res* 1998; **58**: 2588-2593.

بررسی مولکولی ژن بتا لاکتاماز طیف گسترده تیپ SHV در ایزوله‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه در نمونه‌های بالینی جدا شده از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز

علیرضا مباشر کار جدی^۱، محمد رضا نهائی*^{۲،۳}، هایده مبین^۴، مجید پرنور^۱، جاوید صادقی^۲

۱) گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

۲) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۳) مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۴) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

نویسنده رابط: محمد رضا نهائی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی و آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

nahaeimr@tbzmed.ac.ir

تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۲۴

چکیده:

زمینه و اهداف: امروزه به دلیل استفاده گسترده از سفالوسپورین‌های نسل سوم، شاهد بروز انواع مقاومت دارویی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها هستیم. هدف از این مطالعه، تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن *bla*_{SHV} در ایزوله‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز (امام خمینی، سینا، شهدا و کودکان) بود.

روش بررسی: تعداد ۴۱ ایزوله *E. coli* و ۴۷ ایزوله *K. pneumoniae* از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها به روش Kirby-Bauer آزمایش شد و از روش Combined disk test جهت انجام تست تأییدی استفاده گردید. نتایج با استانداردهای (CLSI) *Clinical and laboratory standards institute* مقایسه و در نهایت ایزوله‌های ESBL مثبت، توسط روش PCR، از نظر ژن *bla*_{SHV} بررسی شدند.

یافته‌ها: از ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ترتیب ۳۳ (۸۰/۴۹٪) و ۴۳ (۹۱/۴۸٪) ایزوله به سفنازیدیم و ۳۲ (۷۸/۰۵٪) و ۴۲ (۸۹/۳۶٪) ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. در *E. coli* ۴۰ (۹۷/۵۶٪) ایزوله ESBL مثبت و ۷ (۱۷/۰۷٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند. از ۴۷ ایزوله *K. pneumoniae* ۴۶ (۹۷/۸۷٪) ایزوله ESBL مثبت و ۱۲ (۲۵/۵۳٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند. ۱۰۰٪ ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ایمی پنم حساس بودند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولید کننده ESBL، یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

کلید واژه‌ها: بتا لاکتاماز طیف گسترده، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنمونیه، واکنش زنجیره ای پلیمران، ژن *bla*_{SHV}

دیسک سفنازیدیم / کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید مشخص گردید.

جهت استخراج DNA و انجام PCR ابتدا کل DNA ایزوله‌ها با روش جوشانیدن (boiling) استخراج شد (۳۲). تست PCR برای شناسایی ژن های بتا لاکتامازی (*bla_{SHV}*) با اندازه ۴۷۱ bp تحت شرایط مندرج در جدول ۱ انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل بود:

5' - TCAGCGAAAAACACCTTG -3'

5' - TCCCGCAGATAAATCACC -3'

شایان ذکر است از سویه استاندارد *K. pneumoniae ATCC 700603* جهت کنترل در آزمون PCR استفاده گردید. از مارکر SMO323 (Ladder Fermentase) ۱۰۰bp جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده توسط PCR استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱٪ آگارز به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام پذیرفت. برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس نتایج توسط دستگاه Translominator یا geldocument با نور UV مشاهده شدند.

خون، ترشحات برونش، خلط، زخم، مایع پلور و مدفوع از ۴ مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی، شهدا، سینا و کودکان شهر تبریز در یک دوره ۶ ماهه به روش تصادفی ساده (Simple Random Sampling) جمع آوری شدند. ایزوله‌ها با انجام تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به وسیله روش دیسک دیفیوژن (Kirby&Bauer) انجام شد (۳۰). دیسک های مورد استفاده شامل: سفوتاکسیم (۳۰μg)، سفنازیدیم (۳۰μg)، آمیکاسین (۳۰μg)، ایمی پنم (۱۰μg)، آزترونام (۱۰μg)، سفوروکسیم (۳۰μg)، پیراسیلین / تازویاکتام (۳۰μg/۱۰۰μg) و سفپیم (۳۰μg) از شرکت Mast بودند.

برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده ESBLs از تست تأییدی استفاده شد (۳۱). دیسک‌های مورد آزمایش سفنازیدیم / کلاولانیک اسید (CAZ: 30μg/ CV:10μg) و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید (CTX : 30μg/CV:10μg) به همراه سفوتاکسیم و سفنازیدیم هر کدام ۳۰ μg محصول شرکت Mast بودند. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷° C، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف

جدول ۱: شرایط مورد استفاده در PCR

مراحل آزمایش	درجه حرارت (C°)	
	SHV	زمان
First denaturation	94	4 min
Denaturation	94	1 min
Anneling	53	45 S
Extention	72	1 min
Final extention	72	10 min
Cycle number	35	

یافته‌ها:

سفتریاکسون، ۴۳ ایزوله (۹۱/۴۸٪) مقاوم به سفنازیدیم، ۴۲ ایزوله (۸۹/۳۶٪) مقاوم به سفوتاکسیم، ۴۱ ایزوله (۸۷/۲۳٪) مقاوم به پیراسیلین / تازوباکتام و آزترونام بودند. ۳۹ ایزوله (۸۲/۹۸٪) مقاوم به سفپیم و همچنان ۵ ایزوله (۱۰/۶۴٪) به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله‌ها به ایمی پنم مقاومت نشان ندادند (جدول ۲). از ۴۷ ایزوله مورد آزمایش، ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷٪) ESBL مثبت بود (جدول ۳). همچنین مشخص شد که ۱۲ ایزوله (۲۵/۵۳٪) بعد از انجام آزمایش PCR حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (شکل ۱).

از ۴۱ ایزوله‌ی *E. coli*، ۳۶ ایزوله (۸۷/۸٪) مقاوم به آزترونام، ۳۳ ایزوله (۸۰/۴۹٪) مقاوم به پیراسیلین / تازوباکتام، ۳۲ ایزوله (۷۸/۰۵٪) مقاوم به سفوتاکسیم، سفوروکسیم و سفتریاکسون بودند. ۲۷ ایزوله (۶۵/۸۵٪) مقاوم به سفپیم و ۲ ایزوله (۴/۸۸٪) به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله‌ها به ایمی پنم مقاوم نبودند (جدول ۲). از ۴۱ ایزوله *E. coli*، ۴۰ ایزوله (۹۷/۵۶٪) ESBL مثبت بودند (جدول ۳) و ۷ ایزوله (۱۷/۰۷٪) حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (شکل ۱). لازم به ذکر است که یک ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} شناسایی گردید که آزمایش ESBL آن منفی بود.

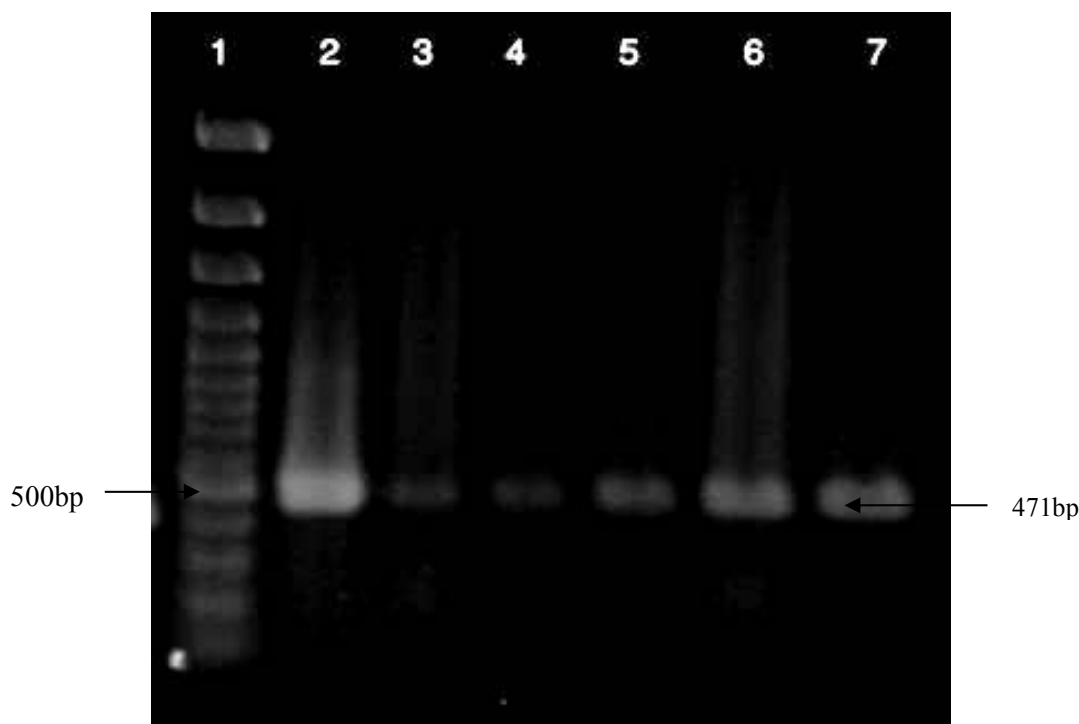
از بین ۴۷ ایزوله‌ی *K. pneumoniae*، ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷٪) مقاوم به سفوروکسیم، ۴۴ ایزوله (۹۳/۶۲٪) مقاوم به

جدول ۲: الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* (٪)

باکتری	حساسیت/مقاومت	پیراسیلین/تازوباکتام	ایمی پنم	آمیکاسین	سفپیم	سفوروکسیم	سفنازیدیم	سفتریاکسون	سفوتاکسیم	آزترونام
<i>E. coli</i>	حساس	۹/۷۶	۱۰۰	۸۷/۸۰	۱۴/۶۳	۴/۸۸	۱۹/۵۱	۲۱/۹۵	۱۷/۰۷	۴/۸۸
	حد واسط	۹/۷۵	۰	۷/۳۲	۱۹/۵۲	۱۷/۰۷	۰	۰	۴/۸۸	۷/۳۲
	مقاوم	۸۰/۴۹	۰	۴/۸۸	۶۵/۸۵	۷۸/۰۵	۸۰/۴۹	۷۸/۰۵	۷۸/۰۵	۸۷/۸۰
<i>K. pneumoniae</i>	حساس	۴/۲۶	۱۰۰	۷۲/۳۴	۸/۵۱	۰	۴/۲۶	۲/۵۰	۰	۲/۱۳
	حد واسط	۸/۵۱	۰	۱۷/۰۲	۸/۵۱	۲/۱۳	۴/۲۶	۴/۲۵	۱۰/۶۴	۱۰/۶۴
	مقاوم	۸۷/۲۳	۰	۱۰/۶۴	۸۲/۹۸	۹۷/۸۷	۹۱/۴۸	۹۳/۶۲	۸۹/۳۶	۸۷/۲۳

جدول ۳: نتایج تست تاییدی (Combined disk)

سفتوتاکسیم/کلاولانیک اسید (<i>K. pneumoniae</i>)	سفتنازیدیم/کلاولانیک اسید (<i>K. pneumoniae</i>)	سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (<i>E. coli</i>)	سفنازیدیم/کلاولانیک اسید (<i>E. coli</i>)	هاله ی توقف رشد
۹۳/۶۲	۹۳/۶۲	۸۲/۹۲	۹۲/۶۸	افزایش هاله
۶/۳۸	۶/۳۸	۱۷/۰۸	۷/۳۲	عدم افزایش هاله



شکل ۱: نمایش ایزوله‌های حاوی ژن bla_{SHV} (۴۷۱ bp) : ۱: مارکر

۲: کنترل مثبت ژن bla_{SHV} (ATCC 700603) ۷-۳: ایزوله های حاوی ژن bla_{SHV}

بحث:

نتایج حاکی از مقاومت قابل توجه به سفالوسپورین‌های نسل سوم، شیوع همه جانبه ESBLها، و حضور ژن bla_{SHV} در ایزوله‌های مورد بررسی است.

ESBLها مولکول‌های بتالاکتاماز کلاس A یا D می‌باشند که قادر به هیدرولیز اکسی‌ایمینو سفالوسپورین‌ها در اندازه‌ای برابر یا ۱۰ درصد بیشتر از بنزیل پنی‌سیلین‌ها هستند (۳۳ و ۳۴). تیپ‌های مختلف این آنزیم‌ها روز به روز در حال افزایش است، به نحوی که دسترسی به یافته‌های جدید از طریق یک سایت اینترنتی (www.Lahey.Org/studies/webt/stm) امکان پذیر شده است (۳۵). ESBLs علیه مونوباکتام‌ها و اکسی‌ایمینو سفالوسپورین‌ها، به استثناء سفامایسین، فعال هستند. اکثر سویه‌های تولید کننده ESBL به سفوکسیتین و سفوتان حساس می‌باشند (۱۳ و ۹). یکی از مهم‌ترین راهکارهای موفق در غلبه بر مقاومت بتالاکتامازها، استفاده از ممانعت کننده‌های آن‌ها است. این مکانیسم بر اساس فعالیت ممانعت کننده‌گی توسط اتصالات کووالانست به سایت فعال بتالاکتامازهای کلاس A صورت می‌پذیرد. تازوباکتام، سولباکتام و کلاولانیک‌اسید، ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز رایج مورد استفاده در بررسی‌های بالینی می‌باشند (۳۶). به علاوه، بزرگ شدن سایت فعال که منجر به افزایش

فعالیت علیه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌شود، ممکن است به افزایش حساسیت ESBLها به بازدارنده‌های بتالاکتاماز منجر شود. در این مطالعه ۲ باکتری گرم منفی که نقش اساسی را در تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ایفا می‌کنند بررسی شدند. مروری بر فراوانی سویه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز در ۲ دهه اخیر گسترش و پراکندگی این آنزیم‌ها را در نقاط مختلف جهان نمایان می‌سازد. مابین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۵ محققان در بیمارستان Prnicess Alexandera در استرالیا ۱۲ ایزوله کلبسیلا پنمونیه را یافتند که دارای توالی ژن‌های بتالاکتاماز تیپ SHV بودند (۳۷). هلند به عنوان کشوری است که با مصرف کم آنتی‌بیوتیک شناخته شده است. به‌طوریکه شیوع ایزوله‌های /شریشیا کلسی و کلبسیلا پنمونیه تولید کننده ESBL (ESBL های تیپ SHV و TEM) در ۱۹۹۷ در این کشور کمتر از درصد بود. ولی مطالعات اخیر نشان دهنده افزایش مقاومت و حتی شناسایی تیپ‌های جدید از جمله تیپ SHV-31 در کلبسیلا پنمونیه در این کشور می‌باشد (۳۸). در تحقیقی مشابه (۲۰۰۰) در شمال تایوان که بر روی ۱۱۳ ایزوله‌ی کلبسیلا پنمونیه از نمونه‌های خون در ۱۰ بیمارستان جمع‌آوری شده بود، ۵۰ درصد ایزوله‌ها را ESBL مثبت گزارش دادند. در بین این ایزوله‌ها ۲ تیپ جدید SHV-25 و SHV-26 شناسایی

بین نسل سوم در مقایسه با سفتازیدیم میزان جذب بالاتری به سفوتاکسیم دارد (۴۵). تفاوت در این عملکردها ممکن است ناشی از جایگزینی اسیدهای آمینه متفاوت در سایت فعال آنزیم باشد (۴۸-۴۶). روش های مولکولی مختلفی برای شناسایی و تعیین تیپ بتالاکتامازهای SHV پیشنهاد شده است، اما ترادف نوکلئوتیدی برای تعیین ژن های بتالاکتاماز در حال حاضر به عنوان یک استاندارد مطرح می باشد (۴۹).

نتیجه گیری :

بتالاکتامازهای وسیع الطیف شیوع روز افزون دارند و نتایج مطالعه حاضر هم نشان از مقاومت بیشتر ایزوله ها بر علیه سفالوسپورین های نسل سوم دارد. حساسیت همه ی ایزوله های مورد مطالعه به ایمی پنم (۱۰۰ درصد) و حساسیت اکثریت آن ها در برابر آمیکاسین (۸۷/۸ درصد) برای *E. coli* و ۷۲/۳ درصد برای *K. pneumoniae* و ارزشمند بودن این دارها ما را به توصیه های زیر رهنمون می سازد. در درمان عفونت باکتریال، با کمک متخصصین آزمایشگاه و به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق، از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده شود. بدین طریق از گسترش بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بین سویه های مختلف باکتریایی کاسته شده و از بسط عفونت های مقاوم، و نیز روز افزون شدن مرگ و میر در مراکز درمانی پیشگیری می شود. در ادامه این مطالعه تعیین دقیق تیپ های مختلف آنزیم SHV و سایر آنزیم های ESBL با روش های مولکولی دیگر از قبیل REP-PCR، PCR-RFLP و تعیین توالی (Sequencing) این ژن ها توصیه می شود.

گردید (۳۹). سه سال بعد (۲۰۰۳) در تحقیقی در اسپانیا، از ۵۱ ایزوله ی اشریشیاکلی که به آموکسی سیلین- کلاولانات مقاومت داشتند، ۴۰ ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. از آنها، ۶ ایزوله (۱۱ درصد) حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (۱۸). در همین سال Ryoo و همکاران در بررسی روی نمونه های جمع آوری شده از ۱۲ بیمارستان در کره، دریافتند که ۲۳/۱ درصد ایزوله های اشریشیاکلی و ۳۵/۹ درصد ایزوله های کلبسیلا پنمونیه، ESBL مثبت هستند (۴۰). در سال ۲۰۰۵، ۶ ایزوله کلبسیلا پنمونیه در یکی از مراکز درمانی تحت نظر دانشگاه های زهیچانگ چین مقاومت وسیع نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان دادند. در بررسی با روش PCR مشخص شد که هر ۶ ایزوله حامل ژن های SHV هستند (۴۱). در هندوستان (۲۰۰۷)، تحقیق Lal و همکاران فراوانی ژن SHV را، ۷۵/۷ درصد نشان داد (۱۹). جالب توجه است که در مالزی در سال ۲۰۰۸ از ۱۶ ایزوله ی اشریشیاکلی، ۲ ایزوله (۱۲/۵ درصد) حامل ژن *bla*_{SHV} گزارش شد (۲۰). در مطالعه ی حاضر بیشترین میزان مقاومت ایزوله های *E. coli* در برابر آزترونام (۸۷/۸ درصد) بود و بیشترین میزان مقاومت ایزوله های *K. pneumoniae* در برابر سفوروکسیم (۹۷/۸۷ درصد) بود. ضمناً، همه ایزوله ها در برابر ایمی پنم حساس بودند. مقاومت ایزوله های *K. pneumoniae* نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم قابل توجه بود که در مقایسه با مطالعات Nijssen (۴۲) و Jones (۴۳) که به ترتیب ۱۸/۷ درصد و ۱۰ درصد گزارش نمودند، بسیار بالاتر است. بیش از ۹۷ درصد ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنمونیه در مطالعه حاضر مولد آنزیم های ESBL هستند. همچنین به ترتیب ۱۷/۰۷ و ۲۵/۵۳ درصد حاوی ژن *bla*_{SHV} می باشند. مقایسه با نتایج مطالعات سایر کشورها نشان می دهد فراوانی و میزان شیوع ESBL ها در نقاط مختلف جهان یکسان نیست. پراکندگی آنها در کشورها و حتی در شهرهای مختلف، متفاوت است (۴۴).

بررسی پرونده بیماران نشان داد در بیشتر موارد از سه داروی سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون (به تنهایی و یا به صورت توأم) استفاده شده بود. این شرایط، نقش فشار انتخابی ناشی از مصرف زیاد و بدون محدودیت خاص را در ایجاد مقاومت به خوبی روشن می سازد. لازم به ذکر است که تمایل هر کدام از تیپ های SHV به آنتی بیوتیک ها متفاوت است. به طوریکه میزان گرایش SHV-55 و SHV-5 به پنی سیلین ها بیشتر از SHV-1 است. همچنین SHV-55 میزان گرایش بالایی، در مقایسه با SHV-1، به نسل های اول، دوم و سوم سفالوسپورین ها، مونوباکتام ها و در

فهرست مراجع:

1. Knot H, Shah P, Krcmery V, Natal M, Mitsuishi S. Transferable resistance to cefatoxime, cefoxitin, cefamandole and sefuroxime in clinical isolates of *K pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infect* 1983; **11**: 315 – 317.
 2. Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL_s): a global problem. *Kuwait Med Journal* 006; **38** (3): 171-185.
 3. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart A. *SHV-27*, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a brazilian hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 463-465.
 4. Live more DM. Beta – lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev* 1995; **8** (4): 557 – 584.
 5. Shahid M, Malik A. Plasmid mediated amikacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 2004; **22**(3): 182-184.
 6. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. *SHV-1* beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2856-2861.
 7. Miranda G, Castro N, Leanos B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing *SHV-5* extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clinical Microbiol* 2004; **42**: 30-35.
 8. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the *SHV* beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla_{SHV}* mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 69-75.
 9. Song JS, Lee JH, Lee J -H, Jeong B C, Lee W -K, Lee SH. Removal of contaminating *TEM-la* beta-lactamase gen from commercial Taq DNA polymerase. *J Microbiol* 2006; **44**: 126-128.
 10. Paterson DL, Ko W –C, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended- spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clinl Microbiol* 2001; **39**: 2206-2212.
 11. Pitout J DD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL_s) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 1-8.
 12. Nukaga M, Kumar S, Nukaga K, Pratt RF, Knox JR. Hydrolysis of third-generation cephalosporins by class C beta-lactamases. *J Biological Chemistry* 2004; **279**: 9344-9352.
 13. Bradford PA. Extended-spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; **14**, 933-951.
 14. Hammod DS, Schooneveldt J, Nimmo G, Huygens F, Giffard PM. *bla_{SHV}* genes in *Klebsiella pneumoniae*: Different allele distributions associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 256-263.
 15. Liu G, Ling B -D, Xie Y -E, Lin L, Zeng Y, Zhang X, Lei J. Characterization of CTX-M-22 and TEM-141 encoded by a single plasmid from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in china. *Japan J Infect Dis* 2007; **60**: 295-297.
 16. Medeiros AA. Nosocomial outbreak of multiresistant bacteria extended – spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *J Ann Inter Med* 1993; **119**: 428 -43.
 17. Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T et al. A new *TEM*-derived extended-spectrum beta-lactamase (*TEM-91*) with an R164C substitution at the Ω -loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2981-2983.
 18. Colom K, Perez J, Alonso R, Fernandez – Aranguiz A, Larino E, Cisterna R. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}* Genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* (2003); **223**:147 151.
 19. Lal p, Kapil A, Das KB, Sood S. Occurance *TEM* and *SHV* gene in extended-spectrum beta Lactamase (ESBL) producing *Klebseilla spp.* isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 2007; **125**: 173-178.
 20. Sekawi Z, Yusof R, Nor Shamsudin M. Extended-spectrum beta-lactamases- producing *Escherichia coli* from a tertiary hospital in Malaysia: Emergence of *CTX-M-type* beta-lactamases variation. *Research J Microbiol* 2008; 1-5.
۲۱. شاهچراغی ف، نیک بین و، شوریج ف. بررسی مولکولی

- بتالاکتامازهای SHV، VEB، PER و TEM در سویه های پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، زمستان ۱۳۸۶، سال ۱، شماره ۴، صص ۲۱ تا ۲۷.
۲۲. مبین ه، نهایی م ر، امیرمظفری ن، مودب س ر، مونسى ش، صفائیان ف و همکاران. آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) گروه CTX-M در سویه های بالینی کلبسیلا پنمونیه جدا شده از بخش مراقبت های ویژه در بیمارستان های آموزشی شهر تبریز. فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری، پائیز ۱۳۸۶، سال ۱۲، شماره ۳۸، صص ۲۱ تا ۲۵.
۲۳. زمان زاد ب، دیهم ب، نفیسی م ر، کریمی ع، فرخى ع. بررسی فراوانی ژن TEM-1 در سویه های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنمونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه های کلینیکی بیمارستان های آموزشی شهرکرد به روش PCR، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همادان، زمستان ۱۳۸۶، دوره ۱۴، شماره ۴، صص ۱۹ تا ۲۵.
24. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1697-1704.
25. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility pattern of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioter* 2003; **16**(2): 233-238.
26. Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**(4): 933-951.
27. Liu G, Ling B -D, Zeng Y, Lin L, Xie Y -E, Lei J. Molecular characterization of extended-spectrum beta- lactamases produced by clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from a teaching hospital in china. *Japan - Infect Dis* 2008; **61**: 286-289.
28. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family Entrobacteriaceae in a Warsaw Hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**(4): 489-99.
29. Magdalena T, Fritz H, Herbert H. Survey and Molecular Genetics of SHV betalactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**(5): 943-949.
30. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493-496.
31. Srisangkaew S, Vorachit M. The Optimum Agent for Screening and Confirmatory Tests for Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Ramathibodi Hospital, Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2004; **21**: 1-5.
32. Casali N, Preston A. Isolation of plasmids from *E. coli* by boiling lysis, methods in molecular biology. In: Ehrst S, Schnappinger D Totowa, NJ, eds. *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press Inc. 2003; pp: 79.
33. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant beta – lactamases (*SHV-10*) derived from an *SHV- 5* variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 838 -84.
34. Stürnburg E, Mack D. Extended – spectrum beta – lactamases implication for clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; **47**: 273 – 295.
35. Bush K, Jacoby GA & Medeiros AA. Afunctional classification scheme for beta – lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**(6) : 1211 -1233.
36. Pagan-Rodriguez D, Zhou X, Simmons R, Bethel CR, Hujer AM, Helfand MS et al. Tazobactam inactivation of *SHV-1* and the inhibitor-resistant ser¹³⁰ → Gly *SHV-1* beta-lactamase. *J Biological Chemistry* 2004; **279**: 19494-19501.
37. Harward C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing – based discrimination of *SHV* beta – lactamases in nosocomial infection – associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *J American Society for Microbiol* 2002; 659–664.
38. Mazzariol A, Roelofsen E, Koncan R, Voss A, Cornaglia G. Detection of a new *SHV*-type extended-spectrum beta-lactamase, *SHV-31*, in a *Klebsiella pneumoniae* strain causing a large nosocomial outbreak in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1082-1084.
39. Chang FY, Siu LK, Fung CP, Huang MH, Ho M. Diversity of *SHV* and *TEM* beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gen evolution in northern Taiwan and novel beta-lactamases, *SHV-25* and *SHV-26*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(9): 2407-2413.
40. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK et al. Dissemination of *SHV-12* and *CTX-*

- M-type* extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of *GES-3* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 698-702.
41. Zei – qing Wei, Ya – gang chen, Yung – Song Yu, Xin Lu and Lan – Juan Li. laboratory, therapy and infection control Extended – spectrum beta – lactamases implication for clinical microbiology. *J Medical Microbiol* 2005; **54**: 885-886.
42. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *Intern J Antimicrob Chemother* 2004; **24**(6): 585-591.
43. Jones RN, Biedenbach DJ, Gales AC Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum β - lactams (Carbapenems and Cefepim) against Enterobacter spp. And ESBL-producing *Klebsiella* spp. report of the Sentry antimicrobial surveillance program (USA, 1997-2000). *Intern J Antimicrob Chemother* 2003; **21**: 1-7
44. Nass T, Philippon L, Poirel L, Ronca E, Nordman P. An *SHV*- derived extended– spectrum beta– lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1281 – 1284.
45. Mendonca N, Manageiro V, Bonnet R, Canica M. Biochemical characterization of *SHV-55*, an extended-spectrum class A beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1897-1898.
46. Heffernan H, Woodhouse R, Blackmore T. Methods used in New Zealand diagnostic laboratories to identify and report extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae. *Institute of Environmental Science and Research Limited(ESR)* 2005; 1-38.
47. Heffernan H, Pope C, Carter P. Identification of extended-spectrum beta-lactamase types, plasmid-mediated AMPC beta-lactamases and strains among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* in New Zealand in 2006. *Institute of Environmental Science and Research Limited(ESR)* 2007; 1-28.
48. Arpin C, Labia R, Andre C, Frigo C, El Harrif Z, Quentin C. *SHV-16*, beta-lactamase with a pentapeptide duplication in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2480-2485.
49. Naiemi NA, Schipper K, Duim B, Bart A. Application of minimal sequence quality values prevents misidentification of the *bla_{SHV}* type in single bacterial isolates carrying different *SHV* extended-spectrum beta-lactamase genes. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1896-1898.

شناسایی سویه های *Enteropathogenic Escherichia coli* در اسهال کودکان توسط Multiplex PCR و مطالعه قابلیت چسبندگی آن ها به سلول اپی تلیال

ابوالفضل داوودآبادی، مریم عباس زاده، ماناعلوی، انیس جعفری، سعیدبوزاری*

بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: سعید بوزاری، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

تلفن: ۲۰-۶۶۹۵۳۳۱۱ داخلی ۲۲۲۳ saeidbouzari@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۳۱

چکیده:

زمینه و اهداف: *Enteropathogenic Escherichia coli* (EAEC) یک پاتوژن روده ای در حال ظهور است که باعث اسهال حاد و مزمن در کودکان می شود. مشخصه EAEC الگوی چسبندگی آجر مانند به سلول های HEp-2 یا HeLa است که برای تشخیص EAEC تست طلائی محسوب می شود. این چسبندگی متمایز از الگوی *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) و *Diffusely Adherent E. coli* (DAEC) است. در این مطالعه برای تشخیص سویه های EAEC از تست Multiplex PCR (mPCR) استفاده شد و نتایج با تست چسبندگی به سلول HeLa مقایسه گردید.

روش بررسی: سویه های *E. coli* از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در مرکز طبی کودکان تهران جدا و شناسایی آنها طبق روش های استاندارد انجام گرفت. غربالگری اولیه سویه های EAEC بر اساس تست چسبندگی به سلول انجام شد و ۱۷۰ سویه که به نوعی به سلول چسبندگی داشتند، انتخاب شدند. برای تشخیص سویه های EAEC از تست mPCR استفاده شد، این تست بر مبنای سه ژن پلاسمیدی *aggR*، *aaP* و *AA* طراحی شده است. سپس برای تعدادی از سویه های mPCR مثبت و منفی تست اتصال به سلول HeLa انجام گرفت.

یافته ها: بر اساس mPCR، ۱۱۴ سویه (۶۷٪) به عنوان EAEC تشخیص داده شدند. ژن های پلاسمیدی *aggR*، *aaP* و *AA* به ترتیب در ۱۱۴ (۱۰۰٪)، در ۱۱۰ (۹۶/۴٪) و در ۸۰ (۷۰٪) سویه دیده شدند. بر اساس تست چسبندگی به سلول ۵۳ (۸۶/۹٪) سویه mPCR مثبت و ۳ (۲۷/۲٪) سویه mPCR منفی نیز دارای الگوی چسبندگی آجرمانند بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که mPCR قادر است اکثر سویه های EAEC، که دارای الگوی چسبندگی آجرمانند هستند، را تشخیص دهد. این تست قادر است آن دسته از سویه های EAEC را که الگوی آجرمانند را هم نشان نمی دهند، تشخیص دهد. به نظر می رسد که mPCR یک تست سریع و با ویژگی خوب برای تشخیص سویه های EAEC باشد و به ویژه برای غربالگری تعداد زیاد ایزوله در موارد اپیدمی مناسب می باشد.

کلید واژه ها: EAEC, Multiplex PCR, HeLa cells، چسبندگی آجرمانند

مقدمه:

انترواگرگیتو/اشریشیاکلی (EAEC) یک پاتوژن روده ای در حال ظهور است که باعث اسهال مزمن و حاد در کودکان کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می شود (۱). در مطالعات سال‌های اخیر در بین پاتوتایپ‌های مولد اسهال در اشریشیاکلی، EAEC عامل اصلی اسهال بوده است (۲-۴). در مطالعه سلمان زاده و همکاران روی ۲۰۰ سویه/اشریشیاکلی بدست آمده از نمونه مدفوع کودکان در تهران مشخص شد که EAEC شایع‌ترین پاتوتایپ (۲۴٪) عامل اسهال در بین پاتوتایپ‌های مولد اسهال در اشریشیاکلی است (۵).

سه گروه از اشریشیاکلی‌های مولد اسهال؛

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), Diffusly Adherent *E. coli* (DAEC), و Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) توانایی اتصال به سلول‌های HEp-2 یا HeLa را دارند. الگوی چسبندگی EPEC به سلول به صورت چسبندگی موضعی (LA) و در DAEC به صورت منتشر (DA) می‌باشد. مشخصه EAEC الگوی چسبندگی اگرگیتو (AA) با آرایشی مانند آجرهای روی هم چیده شده است که هنوز تست طلایی در تشخیص این پاتوتایپ محسوب می‌شود (۶-۸).

حداقل در بعضی از سویه‌های EAEC ویژگی چسبندگی به سلول به وسیله پلاسمید ۶۵-۶۰ MDa (پلاسمید PAA) کد می‌شود. این پلاسمید چندین فاکتور ویروانس از جمله؛ یکی از پیل‌های چسبندگی (AAF/I, AAF/II, AAF/II)، پروتئین منتشر کننده (AaP)، توکسین کد شونده به وسیله پلاسمید (Pet) و انتروتوکسین ۱ مقاوم به حرارت EAEC (EAST-1) را کد می‌کند (۹، ۶).

ترشح پروتئین منتشر کننده (AaP) نیاز به حضور یک کمپلکس انتقالی ABC دارد که به وسیله پلاسمید PAA کد می‌شود. ژن‌های کد کننده این ترانسپورتر (کمپلکس Aat) در ارتباط با پروب AA می‌باشند. پروتئین AaP و کمپلکس Aat هر دو تحت کنترل *aggR* هستند (۱۰).

تشخیص عفونت ناشی از EAEC از طریق جداسازی/اشریشیاکلی از مدفوع بیماران و انجام تست‌های چسبندگی به سلول HEp-2 یا پروب‌های DNA (مانند پروب AA) صورت می‌پذیرد. روش‌های مولکولی مختلفی بر اساس تکثیر ژن‌های ویروانس برای تشخیص و خصوصیت بندی EAEC توصیف شده‌اند. یکی از

روش‌هایی که اخیراً مطرح شده آزمون Multiplex PCR (mPCR) می‌باشد که در آن از ژن‌های پلاسمیدی *aatA* (پروب AA)، *aggR* و *aaP* برای تشخیص سویه‌های EAEC استفاده می‌شود (۷).

در مطالعه بوذری و همکاران (۲۰۰۵) سویه‌های EAEC بر اساس آزمون mPCR به دو گروه تیپیک و آتیپیک تقسیم شدند. سویه‌های تیپیک هر سه ژن پلاسمیدی *aaP*, *aggR*, *AA* را با هم روی پلاسمید PAA دارند، در حالی که سویه‌های آتیپیک از این دسته ژن‌ها، یک یا دو ژن را دارند (۱۱).

هدف از این مطالعه استفاده از آزمون mPCR برای تشخیص سویه‌های EAEC و مقایسه نتایج آن با تست چسبندگی به سلول HeLa بود.

مواد و روش‌ها :

از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در مرکز طبی کودکان تهران ۱۷۰ سویه/اشریشیاکلی (که چسبندگی آنها در تست HeLa cell adherence تعیین شده بود) مورد مطالعه قرار گرفتند. این سویه‌ها در محیط کشت LB (Luria Broth) آگار به صورت Slant کشت داده شد و برای مطالعه بیشتر در یخچال (۴°C) نگهداری شدند.

Multiplex PCR:

تخلیص DNA پلاسمیدی از طریق پروتکل لیز قلیایی انجام گرفت (۱۲). برای تکثیر سه ژن پلاسمیدی *aaP*, *aggR*, *AA* از پرایمرهای شرح داده شده توسط Cerna و همکارانش استفاده شد (۷) (جدول ۱).

mPCR در حجم نهایی ۲۵ μl شامل؛ ۲ μl DNA پلاسمیدی، ۲/۵ μl PCR 10X (Kiagene)، ۱/۵ μl $MgCl_2$ ، ۲۰۰ μmol از هر یک از dNTPs، ۲۰ pmol جفت پرایمر AA، ۱۵ pmol جفت پرایمر *aggR*، ۱۰ pmol جفت پرایمر *aaP* و یک واحد آنزیم Taq (KiaGen) پلیمرز (KiaGen) صورت گرفت.

برنامه واکنش mPCR شامل؛ یک حرارت اولیه ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل متشکل از ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله پایانی ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر (ependorf) انجام گرفت. از سویه استاندارد EAEC 042 به عنوان کنترل مثبت و از سویه/اشریشیاکلی K۱۲ به عنوان کنترل

چاهک‌ها کشت داده شدند تا سلول‌های تک لایه HeLa حدود ۷۰٪ سطح لامل‌ها را بپوشانند. سپس محیط کشت RPMI با محیط DMEM دارای ۱٪ D-مانوز جایگزین شده و ۵۰ μl از کشت LB سویه‌ها به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۳ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از شستشوی سلول‌ها توسط بافر PBS 1X، سلول‌ها با ۱ ml از محلول ۳ به ۱ اتانول-اسید استیک فیکس شدند. بعد از رنگ آمیزی سلول‌ها توسط ۱ ml رنگ گیمسا، لامل‌ها بر روی لام‌ها فیکس شده و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. از سویه استاندارد EAEC 042 به عنوان کنترل مثبت و از سویه اشریشیاکلی K ۱۲ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

منفی استفاده شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. بعد از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید ۱ mg/ml، ژل توسط دستگاه ترانسلومیناتور (BioDoc) مشاهده و از آن عکس تهیه شد.

مطالعه چسبندگی سویه های باکتریایی به سلول HeLa.

برای ۶۱ سویه EAEC mPCR مثبت و ۱۱ سویه اشریشیاکلی mPCR منفی تست چسبندگی به سلول HeLa انجام گرفت. برای تست چسبندگی از روش شرح داده شده توسط Cravioto و همکارانش استفاده شد (۱۳). به طور خلاصه ابتدا لامل های استریل در کف چاهک‌های پلیت ۶ خانه (Greiner) گذاشته شدند. سپس سلول‌های HeLa در محیط RPMI در داخل این

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های ویروالانس پلاسمیدی

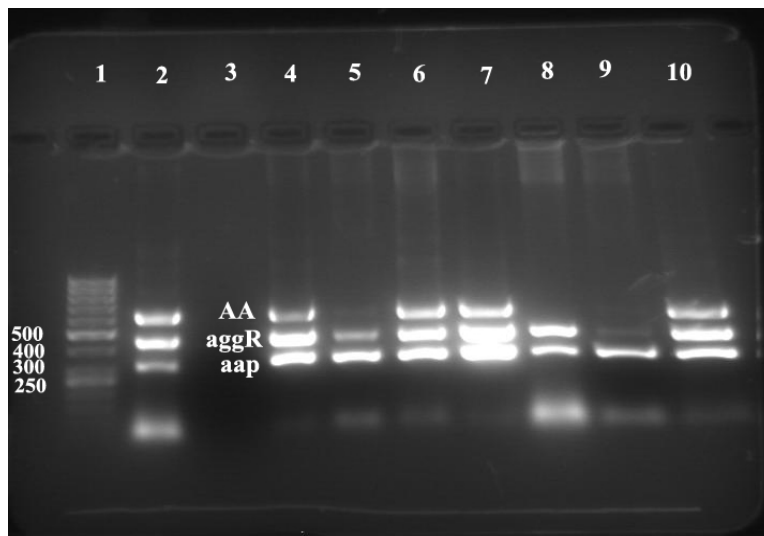
ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)
<i>aap</i>	F 5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3' R 5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC-3'	۳۱۰
<i>aggR</i>	F 5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3' R 5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3'	۴۵۷
<i>AatA</i>	F 5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' R 5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	۶۲۹

یافته‌ها:

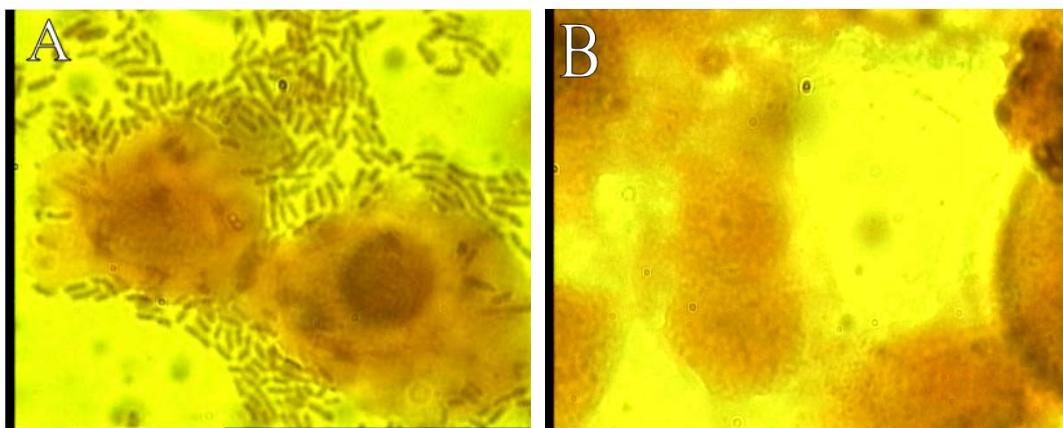
Multiplex PCR

چسبندگی سویه های mPCR مثبت و منفی به سلول HeLa از میان ۶۱ سویه mPCR مثبت که به عنوان EAEC شناخته شدند، ۵۳ سویه (۸۶/۹٪) دارای الگوی چسبندگی AA و ۸ سویه (۱۳/۱٪) هیچ گونه چسبندگی به سلول نداشتند (شکل ۲). همچنین در بین ۱۱ سویه اشریشیاکلی mPCR منفی ۳ سویه (۲۷/۲٪) دارای الگوی چسبندگی AA بوده و ۸ سویه (۷۲/۸٪) هیچ گونه چسبندگی به سلول نداشتند.

بر اساس mPCR از ۱۷۰ سویه اشریشیاکلی ۱۱۴ سویه (۶۷٪) به عنوان EAEC شناخته شدند (شکل ۱). در بین ۱۱۴ سویه مذکور، ۷۹ سویه (۶۹٪) دارای هر سه ژن بوده و به عنوان EAEC، تیپیک در نظر گرفته شدند. ۳۵ سویه دیگر (۳۱٪) هر کدام یک یا دو ژن پلاسمیدی داشتند که به عنوان EAEC آتیپیک منظور شدند. از نظر فراوانی ژن‌ها به ترتیب ژن *aap* در تمام ۱۱۴ سویه (۱۰۰٪)، ژن *aggR* در ۱۱۰ سویه (۹۶/۴٪) و ژن *AA* در ۸۰ سویه (۷۰٪) وجود داشت.



شکل ۱: آزمون mPCR برای تعدادی از سویه های EAEC. چاهک اول مربوط به مارکر ۵۰ bp، چاهک دوم مربوط به سویه کنترل مثبت 042، چاهک سوم مربوط به سویه کنترل منفی K12. چاهک های ۴، ۶، ۷ و ۱۰ مربوط به سویه های EAEC تیپیک و چاهک های ۵، ۸ و ۹ مربوط به سویه های EAEC آتیپیک می باشند



شکل ۲: الگوی اتصال سویه های EAEC به سلول HeLa، (A) الگوی اتصال آجرمانند سویه های EAEC به سلول HeLa (B) سویه های EAEC فاقد اتصال به سلول

بحث:

در مطالعه ما ۸۶/۹ درصد از سویه های mPCR مثبت دارای الگوی چسبندگی AA یا آجر مانند بودند، اما بقیه (۱۳/۱ درصد) هیچ گونه چسبندگی به سلول HeLa نداشتند. مطالعه ما مطابق با مطالعه Kahali و همکاران می باشد که در آن ۸۵/۱ درصد از سویه های mPCR مثبت دارای الگوی چسبندگی AA بوده و بقیه (۱۴/۹ درصد) فاقد چسبندگی به سلول HeLa بوده اند (۹). ولی در مطالعه Ana Carolina تمام سویه های mPCR مثبت الگوی چسبندگی AA را داشتند (۲). چون EAEC یک گروه غیر یکنواخت (هتروژن) است تمام سویه هایی که الگوی چسبندگی AA را نشان می دهند، پلاسمید PAA را حمل نمی کنند. این امر باعث می شود که آزمون mPCR، که ژن های موجود بر روی پلاسمید مذکور را هدف قرار می دهد، برای این دسته از سویه ها منفی باشد (۱۵).

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه تست چسبندگی به سلول برای تشخیص EAEC نیاز به مهارت خاص داشته و تنها در آزمایشگاه های مرجع انجام می شود، لذا استفاده از یک تست سریع و با ویژگی خوب می تواند در تشخیص این باکتری کمک کننده باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که mPCR قادر است اکثر سویه های EAEC را شناسایی کند. اگرچه تعدادی از سویه ها به دلیل نداشتن پلاسمید از لحاظ mPCR منفی می باشند. در کل به نظر می رسد که mPCR برای تشخیص سویه های EAEC یک تست سریع و با ویژگی خوب است و به خصوص برای غربالگری تعداد زیاد ایزوله در مواقع اپیدمی مناسب می باشد.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از آقای امیر دشتی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر می نمایم.

آزمون چسبندگی به سلول های HEp-2 یا HeLa هنوز تست طلایی برای تشخیص EAEC است. تست چسبندگی به سلول تنها در آزمایشگاه های مرجع انجام می شود و نیاز به مهارت و وسایل خاص داشته و همچنین وقت گیر است. بنابراین، استفاده از روش های آسان و سریع برای تشخیص این باکتری ضروری است. در مطالعه ما از لحاظ فراوانی ژن ها به ترتیب: ژن *aaP* در ۱۰۰ درصد، ژن *ggR* در ۹۶/۴ درصد، ژن *AA* در ۷۰ درصد سویه ها وجود داشت. در مطالعه بوذری و همکاران (۲۰۰۵) روی سویه های EAEC که الگوی AA را داشتند، ژن *aaP* در ۷۷ درصد، ژن *aggR* در ۶۶ درصد و ژن *AA* در ۵۸ درصد سویه ها دیده شده است (۱۱). فراوانی ژن های ویروالانس در مطالعه اخیر در مقایسه با مطالعه حاضر کمتر می باشد. زیرا در مطالعه حاضر ابتدا سویه های EAEC بر اساس چسبندگی به سلول شناسایی شده و سپس برای آنها mPCR گذاشته شده است. ولی با این حال ترتیب فراوانی ژن ها در هر دو مطالعه یکی است.

در مطالعه Amidous samine که همانند مطالعه ما ابتدا از mPCR برای تشخیص سویه های EAEC استفاده شده، ژن *aaP* در ۹۴ درصد، ژن *aggR* در ۷۹ درصد و ژن *AA* در ۶۹ درصد سویه ها دیده شده است (۱۴). در مطالعه Kahali و همکاران مشخص شده که ژن *aaP* بیشترین فراوانی (۷۶ درصد) را داشته و بعد از آن ژن *aggR* (۶۵/۳ درصد) بوده است (۹). در مطالعه ما ۲۷/۲ درصد از سویه های mPCR منفی دارای الگوی چسبندگی AA بوده اند. در مطالعه Ana Carolina هم ۴۰ درصد سویه های mPCR منفی دارای الگوی چسبندگی AA بوده اند (۲). همچنین در مطالعه Cerna و همکاران ۱۴ درصد و در مطالعه بوذری و همکاران ۱۸/۹ درصد از سویه های دارای چسبندگی AA از نظر آزمون mPCR منفی بوده اند (۷، ۱۱). این نتایج نشان می دهد که تعدادی از سویه های EAEC که الگوی چسبندگی AA را دارند فاقد سه ژن پلاسمیدی بوده و mPCR قادر به شناسایی آنها نمی باشد.

فهرست مراجع:

1. Bangar R, Ballal M. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. *Indian J Med Sci* 2008; 62(1): 8-12.
2. Moreno AC, Filho AF, Gomes TD, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, et al. Etiology of

- childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008. (Article in Press)
3. Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, *et al.* Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam ,Tanzania. *BMC Infect Dis* 2007; **7**: 92-99.
 4. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, *et al.* Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among E. coli strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(1): 133-9.
 5. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* 2007; **56**(Pt 1): 4-8.
 6. Okeke IN, Lamikanra A, Czczulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J Infect Dis* 2000; **181**(1): 252-60.
 7. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(5): 2138-40.
 8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**(1): 142-201.
 9. Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy RK, *et al.* Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(9): 4111-20.
 10. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**(1): 12-8.
 11. Bouzari S, Jafari A, Zarepour M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. *Infect Genet Evol* 2005; **5**(1): 79-83.
 12. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3th ed . New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; PP:1.35 - 1.37
 13. Cravioto J, Arrieta R. Stimulation and mental development of malnourished infants. *Lancet* 1979; **2**(8148): 899.
 14. Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77**(1): 142-50.
 15. Jenkins C, Tembo M, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Phillips AD, *et al.* Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2006; **55**(Pt 11): 1493-7.

ارزیابی پاسخ آنتی بادی به پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به روش ELISA

سحر کرمی^۱، سید داور سیادت^{۲*}، بهمن تبرائی^۲، داریوش نوروزیان^۲، ناصر هرزندی^۱،
محمد رضا آقا صادقی^۲، جلال ایزدی مبارکه^۲، محمد رضا رضوی^۲، مریم خیر اندیش^۴،
سید مهدی سادات^۲، مهدی نجاتی^۲، علی شریفیات سلمانی^۳

۱) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲) بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران

۳) گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران

۴) مرکز پژوهشی سازمان انتقال خون ایران

نویسنده رابط: سید داور سیادت، بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران

تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۰ d.siadat@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: به پروتئین‌های غشاء خارجی (OMP_s) بروسلا به عنوان ساختارهای ایمونوژنیک برای طراحی و تولید واکسن زیرواحد بروسلاز انسانی توجه شده است. OMPهای بروسلا آبورتوس همراه با سایر اجزاء باکتریایی در خرگوش، سنتز سطوح بالای مولکول‌های IgG ویژه علیه بروسلا را تحریک می‌کنند. هدف مطالعه ارزیابی پاسخ آنتی بادی به پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به روش الیزا بود.

روش بررسی: OMPها از گونه صاف بروسلا آبورتوس S99 با استخراج منظم سلول‌های سونیکه شده به وسیله اولتراسانتریفوژ و پیش هضم با لیزوزیم تخلیص شدند و با کروماتوگرافی تبادل یونی و ژل فیلتراسیون به طور خالص جداسازی شدند. میزان کل پروتئین تخلیص شده توسط دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر (ND-1000) به طور صحیح و دقیق اندازه گیری شد. با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS - PAGE)، پروفایلی از پروتئین‌های غشاء خارجی به دست آمد، که طبق آن پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیک شدند. با این روش دسته دوم از پروتئین‌ها که جزو پورین‌ها (Porins) هستند و در گونه بروسلا آبورتوس بیشترین گروه OMPها را تشکیل می‌دهند، تخلیص شدند. سپس سه دسته خرگوش سه تایی طبق یک برنامه ایمونیزاسیون به طور آزمایشگاهی با سه ترکیب مختلف شامل پروتئین‌های غشاء خارجی به تنهایی و همراه با لیپو پلی ساکارید (LPS) و ادجوانت کامل فروند (CFA) ایمونیزه شدند. طبق برنامه زمانبندی شده پس از خون گیری از حیوان، عیار پاسخ آنتی بادی اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان دادند ترکیبی از LPS+Porins و CFA+Porins به عنوان ایمونوژنیک ترین ترکیبات هستند و عیار بالاتری از آنتی بادی را در مدل حیوانی القاء می‌کنند. افزایش عیار آنتی بادی در دو گروه فوق در مقایسه با گروه ایمونیزه شده با پورین، معنی دار بود (P<0.05).

نتیجه گیری: مجموعه پورین‌ها و LPS بروسلا می‌تواند ایمنی حفاظتی و طولانی مدتی را علیه بروسلا ایجاد کند. این مجموعه احتمالاً می‌تواند برای واکسن زیر واحد جهت پیشگیری از بروسلاز انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: بروسلا آبورتوس S99، واکسن، پروتئین غشاء خارجی، لیپوپلی ساکارید، ELISA

مقدمه:

هیدروکلراید همراه با فنیل متان سولفونیل فلوراید حل شد و استخراج دترجنتی غشاء سیتوپلاسمی به وسیله استفاده از سدیم N - لوریل سارکوزینات انجام گرفت. محلول نهایی که حاوی OMPs است در مقابل بافر تریس در دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۷۲ ساعت دیالیز گردید. به منظور جداسازی پپتیدوگلیکان از پروتئین‌های غشاء خارجی، لیزوزیم اضافه شد و بعد از این مرحله دوباره نمونه در دور 10000 g اولتراسانتریفوژ گردید (۷ و ۸).

تعیین غلظت پروتئین:

غلظت پروتئین با استفاده از اسپکتروفتومتر ND-۱۰۰۰ در حد ۱ میکرولیتر با دقت و قدرت تکرار بالا اندازه گیری شد (۸).

ژل الکتروفورز:

سدیم دودسیل پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS - PAGE) با روش لاملی روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ انجام شد. سپس ژل به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید (۷ و ۸).

استخراج لیپوپلی ساکارید بروسلای آبورتوس S99:

لیپوپلی ساکارید بروسلای آبورتوس S99 با استفاده از روش بهینه سازی شده شریفیات سلمانی و همکاران (۲۰۰۸) استخراج گردید. به اختصار در این روش از فنل داغ در تخلیص LPS بروسلای آبورتوس استفاده شد. لیپوپلی ساکارید در مخلوط نهایی به وسیله متانول سرد ته نشین شده و در بافر تریس حل شده است. پروتئیناز k، DNase و RNase به منظور کاهش آلودگی پروتئین و اسید نوکلئیک اضافه شدند (۹-۱۱).

برنامه ایمونیزاسیون:

سه گروه مرکب از سه خرگوش سفید نیوزلندی ۴ ماهه به وزن ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم با سه ترکیب مختلف زیر به طور داخل عضلانی ایمونیزه شدند.

گروه ۱. $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs تخلیص شده

گروه ۲. ترکیبی از $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs و $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ LPS.

گروه ۳. ترکیبی از $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs و حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (CFA)

تزریقات در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ انجام شد. سرم حیوانات هیپرایمون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ جمع آوری گردید و در $20^{\circ}C$ نگهداری شد (۷ و ۱۱).

ارزیابی پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی:

عیار آنتی‌بادی اختصاصی ضد بروسلای آبورتوس S99 با ELISA

امروزه کنترل بیماری بروسلوز به سه اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است. واکسیناسیون دام‌ها بر پایه ی تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده بروسلای آبورتوس (S19، ۴۵/۲۰) و بروسلای ملی‌تنسیس (Rev1) است (۲۱). استفاده از این واکسن‌ها در دام با محدودیت‌هایی همراه است؛ تحریک تولید آنتی‌بادی در دام‌های واکسینه شده که مانع از تفکیک آنها از دام‌های مبتلا می‌گردد، همچنین بروز سقط جنین و ابتلاء به بروسلوز در این حیوانات، باعث شده تا تلقیح این واکسن‌ها در دام‌ها با احتیاط انجام گیرد. همچنین واکسن‌های بروسلوز انسانی بر پایه‌ی پیکره‌ی کامل باکتری غیر فعال شده و یا سویه‌های زنده تخفیف حدت یافته با دو مشکل اساسی مواجه هستند: نخست آنکه گاهی ایجاد بیماری می‌نمایند، دوم آنکه با واکنش‌های ازدیاد حساسیت ناخواسته همراه می‌باشند. برای غلبه بر این مشکل، شاخص‌های آنتی ژنیک دیواره سلولی بروسلای مثل لیپوپلی ساکارید (LPS) و پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) به عنوان داوطلبین مناسب برای توسعه واکسن‌های زیر واحد مورد توجه قرار گرفته‌اند. OMPs جزء ترکیبات ساختاری سلول هستند و به عنوان فاکتورهای بیماری زا عمل می‌کنند، این پروتئین‌ها نقش مهمی در القای پاسخ‌های ایمنی دارند (۴-۱).

مطالعه حاضر بر روی مجموعه پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلای آبورتوس S99 به عنوان آنتی‌ژن حفاظتی به شکل منوالان و همچنین همراه با LPS و نیز ادجوانت کامل فروند (CFA)، در القای آنتی‌بادی اختصاصی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها:

سویه بروسلای آبورتوس S99 از کلکسیون باکتریایی بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتویاستور ایران تهیه گردید (۴).

استخراج OMPs بروسلای آبورتوس S99:

استخراج OMPs بروسلای آبورتوس S99 مطابق روش بهینه شده توسط کرمی و همکاران (۲۰۰۹) صورت پذیرفت (۵). به طور خلاصه توده‌ی سلولی در بافر تریس هیدروکلراید معلق و سپس RNase و DNase به مقدار مورد نظر اضافه شد. نمونه‌ها با دستگاه سونیکاتور (Bronson) در سیکل پیوسته تیمار شدند. در ادامه مایع روئی در 43500 rpm اولتراسانتریفوژ شد. رسوب حاصل که حاوی غشاء‌های خام می‌باشد در بافر تریس

anti IgG خردگوشی کونژوگه با HRP (Horseradish Peroxidase) به میزان $100 \mu\text{l}$ به هر چاهک اضافه شد، برای ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و سپس شستشو شد. برای نمایان شدن واکنش آنتی ژن - آنتی بادی، محلول سوبسترا (کروموژن) به هر چاهک اضافه شد. در پایان دانسیته نوری (OD) نمونه‌ها، به وسیله دستگاه ELISA - reader (مدل Sunrise مارک TECAN) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد (۹-۱۴ و ۱۲).

ارزیابی شد. میکروپلیت‌ها با آنتی ژن بروسلا آبورتوس S99 ($100 \mu\text{l}$ در هر چاهک) پوشیده شد و برای ۱ ساعت در 37°C انکوبه شدند.

پلیت‌ها در بافر بلوکه کننده (PBS - Casein) برای ۱ ساعت در 37°C اشباع شدند. آنتی سرم در رقت‌های $1/1000$ ، $1/10000$ و $1/100000$ و به مقدار $100 \mu\text{l}$ به هر چاهک اضافه گردید و به مدت یک ساعت انکوبه شد. شستشو سه بار با فسفات بافر سالین - آزاید (PBS - azide) انجام گردید.

جدول ۱: عیار IgG اختصاصی بر علیه بروسلا آبورتوس S99، پس از زمان‌های متناوب ایمونیزاسیون با ترکیبات متعدد

عیار IgG اختصاصی علیه بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از سومین تزریق	عیار IgG اختصاصی علیه بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از دومین تزریق	عیار IgG اختصاصی علیه بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از اولین تزریق	ترکیبات تزریق شده
2660 ± 124270	923 ± 76326	606 ± 68242	پورین بروسلا آبورتوس S99
1300 ± 136706	1693 ± 132896	3026 ± 122681	پورین بروسلا آبورتوس S99 + ادجوانت کامل فروند
2220 ± 155847	2980 ± 134726	2026 ± 123989	پورین بروسلا آبورتوس S99 + LPS بروسلا آبورتوس S99
۳ <	۳ <	۳ <	کنترل منفی

یافته‌ها:

سلولی تعلیق غلیظی از جسم سلولی بروسلا آبورتوس S99 در معرض امواج اولتراسونیک قرار داده شد. سپس برای جداسازی غشاء سلولی از سلول‌های شکسته نشده و مواد سیتوپلاسمی به

مراحل استخراج و تخلیص OMPs بروسلا آبورتوس S99 به نحوی انتخاب گردید تا در مرحله نهایی مجموعه پروتئین‌های عمده غشاء خارجی بروسلا بدست آیند. جهت جداسازی پوسته

آمیخته‌ای از روش‌های ورس‌تیت و همکاران (۱۹۸۱) و نیز روش کونولی و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد (۷-۵) و مقدار زیادی پروتئین تخلیص گردید. الگوی پروتئینی به دست آمده در نتیجه SDS - PAGE از OMPs تخلیص شده با روش‌های دیگر (روش دوبری و بیزارد) متفاوت است. این مشاهده ثابت می‌کند که تفاوت در روش استخراج باعث تفاوت در پروفایل پروتئینی SDS - PAGE خواهد شد (۷). طبق روش بکار رفته باند پروتئینی نمایان شده به دسته دوم از پروتئین‌ها، یعنی پورین‌ها، تعلق دارد. این گروه از پروتئین‌ها در بروسلا آبورتوس نسبت به بروسلا ملی‌تنسیس بیشتر هستند و نسبت به پروتئین‌های دیگر غشاء خارجی توانایی بیشتری در تحریک سیستم ایمنی دارند. پورین‌ها در جنس بروسلا توسط دو ژن OMP2a و OMP2b رمزدهی می‌شوند که بیش از ۸۵ درصد تشابه DNA دارند و با پروتئین RopA در ریزوبیوم لگومینوزاروم (۳۰-۴۰ درصد) و پروتئین OMP43 در بارتونلا هنسله (۳۸ درصد) از نظر توالی آمینواسیدی مشابه هستند (۱۵ و ۱۶).

به نظر می‌رسد که دلیل تفاوت در الگوی به دست آمده این است که در ضمن استخراج OMPs بروسلا از دیواره سلولی هضم شده با لیزوزیم، احتمالاً مقداری LPS و بخش‌هایی از مورین همراه پروتئین‌ها وجود دارد که می‌تواند سبب تفاوت پروفایل پروتئینی در روی ژل SDS - PAGE گردد (۱۷). در تجزیه و تحلیل ELISA روی سرم خرگوش ایمنی‌زایی شده، ترکیب پورین‌ها به همراه لیپوبلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس S99 بیشترین پاسخ همورال را در یک هفته بعد از سومین تزریق القاء نموده است. به علاوه، در گروه خرگوش‌های ایمنی‌زایی شده با ترکیب LPS به همراه پورین و CFA به همراه پورین، عیار آنتی‌بادی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه تزریق شده با پورین‌ها است. لذا، این دو ترکیب به عنوان ایمونوژن‌ترین ترکیبات معرفی می‌شوند. گرچه تفاوت بین عیارهای IgG در دو گروه LPS به همراه پورین و CFA به همراه پورین معنی‌دار نیست ($P > 0.05$)، اما هر دو گروه، در مقایسه با حیوانات ایمنی‌زایی شده با پورین‌های بدون LPS و CFA، به طور معنی‌دار عیار بیشتری نشان دادند ($P < 0.05$). سطوح بالای عیار IgG بر علیه بروسلا آبورتوس S99 در مقایسه با گروه کنترل، ایمونوژنیسیته پورین‌های بروسلا آبورتوس و صحت روش تخلیص پورین‌ها را نشان می‌دهد. به طوری‌که مراحل متعدد روش تخلیص با ساختارهای ایمونوژنیک و طبیعی پورین‌ها تداخل نمی‌کند. چون LPS به همراه Porin و Porin با CFA عیارهای بالای IgG را القاء می‌نماید، LPS بروسلا آبورتوس

ترتیب از سانتریفوژ با دور پایین و اولتراسانتریفوژ استفاده گردید. با توجه به ویژگی‌ها و اختلاف غشاء سیتوپلاسمی و غشاء خارجی، برای جداسازی این دو غشاء از یک دترژنت به نام N- لوریل سارکوزینات استفاده شد. پروتئین‌های غشاء خارجی به این دترژنت مقاوم هستند در حالیکه پروتئین‌های دیگر از بین می‌روند. این گروه از پروتئین‌ها در بروسلا برخلاف بسیاری از باکتری‌های گرم منفی دارای اتصال کووالانسی محکمی با لایه پتیدوگلیکان می‌باشند. به همین دلیل از استحکام بیشتری در برابر حرارت و عوامل دیگر برخوردار هستند. این برهم کنش بین غشاء خارجی و پتیدوگلیکان از طریق یک سری از OMPs که معمولاً لپوپروتئین هستند، صورت می‌گیرد. از آنجا که هیدرولیز آنزیماتیک پتیدوگلیکان به منوهای تشکیل دهنده خود، سبب آزاد شدن بیشتر پروتئین‌های غشاء خارجی می‌شود و با توجه به اینکه لیزوزیم روی پتیدوگلیکان اثر می‌گذارد و باعث شکستن آن به قطعات منومر تشکیل دهنده خود می‌شود، در این مطالعه برای جدا کردن پتیدوگلیکان از این آنزیم استفاده شد.

غلظت پروتئین با اسپکتروفوتومتر ۱۰۰۰ - ND، ۶/۲۷ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. آنالیز SDS - PAGE، یک باند پروتئینی در رنج ۳۶-۳۸ کیلو دالتون را نشان داد که در گروه ۲ پروتئین‌های بروسلا تقسیم بندی می‌شود. همانطور که قبلاً مشخص شد روش استخراج OMPs به کار رفته در این مطالعه منجر به تخلیص گروه ۲ پروتئین‌های بروسلا آبورتوس S99 می‌گردد و به عنوان یک روش اختصاصی برای استخراج و جداسازی این گروه از پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردد. بنابراین روش استخراج رضایت بخش بوده است، چون غلظت بالای گروه ۲ پروتئین‌ها قابل ملاحظه است.

پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی به OMPs بروسلا آبورتوس S99 به روش ELISA ارزیابی شد. عیار آنتی‌بادی IgG در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از اولین تزریق تعیین گردید و به صورت دانسیته نوری و انحراف معیار ($OD \text{ unit} \pm SD$) بیان شد. از سرم خرگوش‌های غیر ایمنی‌زایی شده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. داده‌های به دست آمده با دستگاه ELISA - reader از نظر آماری تجزیه و تحلیل شدند (جدول ۱). عیار سرم حیوانات ایمنی‌زایی شده به طور معنی‌دار بیشتر از کنترل منفی بود ($P < 0.05$).

بحث:

در این مطالعه به منظور تخلیص OMPs بروسلا آبورتوس S99

موثری هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال را القا می‌کند (۲۱-۱۹). پیروژنیسته پایین LPS به همراه توانایی بالا برای تحریک آنتی بادی‌های اختصاصی علیه بروسلا و امکان کاربرد آن به عنوان یک ادجوانت برای پورین‌های بروسلا، همگی خصوصیات هستند که کاربرد مجموعه LPS و پورین بروسلا را برای تحریک ایمنی حفاظتی و طولانی مدت بر علیه عفونت بروسلا پیشنهاد می‌کنند (۱۹ و ۲۰ و ۲۲). این دو دلیل، انتخاب OMPs به عنوان داوطلبین واکسن زیر واحدی را مطرح می‌نماید.

نتیجه‌گیری:

برای تحریک سیستم ایمنی؛ پروتئین‌ها به عنوان آنتی‌ژن‌های قوی محسوب می‌شوند، باعث ایجاد سلول‌های خاطره می‌گردند، ایمنی طولانی مدت ایجاد می‌کنند، هیچ گونه سمیتی برای افراد ندارند و سرانجام کاملاً ایمن هستند. زمانیکه پروتئین‌ها همراه LPS (جهت تحریک بیشتر سیستم ایمنی) استفاده شوند بسیار موثرتر خواهند بود. لذا، به عنوان داوطلب مناسبی برای طراحی و توسعه واکسن زیر واحد جهت پیشگیری از بروسلاز انسانی مورد توجه هستند.

S99 برای پورین‌های همین باکتری به عنوان یک ادجوانت قوی (با اثر مشابه CFA) با منشاء میکروبی محسوب می‌گردد. به نظر می‌رسد که با توجه به سمیت پایین LPS بروسلا آبورتوس نسبت به CFA (ده هزار برابر پیروژنیسته کمتر از LPS انتروباکتریاسه) و نیز عدم ایجاد ازدیاد حساسیت تاخیری، ادجوانت مناسب‌تری در مقایسه با ادجوانت‌های رایج باشد (۲۰-۱۸). ترکیب LPS و Porin به عنوان بهترین داوطلب واکسن زیر واحد ترکیبی در بین ترکیبات بیان شده پیشنهاد می‌شود. گرچه اپی‌توپ‌های زنجیره پلی‌ساکارید O (OPS) در LPS به طور قوی‌تر نسبت به OMPs قدرت تحریک آنتی‌بادی را دارند اما در ترکیب پیشنهادی فوق، پورین‌ها، پاسخ‌های ایمنی وابسته به لئوسیت T را تحریک می‌نمایند، در حالیکه LPS که یک آنتی ژن غیروابسته به لئوسیت T است، نمی‌تواند خاطره ایمونولوژیک را ایجاد نماید (۱۹ و ۲۰). با توجه به اینکه پورین‌ها به دلیل حضور زنجیره‌های بلند OPS در گونه‌های صاف (بیشترین گونه‌های بروسلا‌ی نوع وحشی) کمتر در دسترس آنتی‌بادی‌ها هستند و LPS هم فاقد خصوصیات ایمونولوژیک آنتی‌ژن‌های وابسته به T می‌باشد، ترکیبی از این دو ساختار دیواره سلولی بروسلا آبورتوس S99 به طور

فهرست مراجع:

- Schuring GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Mic* 2002; **90**: 479-496.
- Ragan VE, The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet Mic* 2002; **90**: 11-18.
- Corbel, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect Dis* 1997; **3**: 213-221.
- Young EJ, An overview of human brucellosis. *Clin infect Dis* 1995; **21**: 283-289.
- Verstrete, D R, Creasy MT, Caveney N T, Baldwin CL, Blab M W, winter A. J. Outer membrane Proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *J Infect Immun* 1982; **35**: 979-989
- Connolly P, Comerci D, Timothy G A, walz A, Quan M, Ryan C, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *J Research* 2006; **8**: 3767-3780.
- Verstrete DR, Winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane protein of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 1984; **48**: 182-187.
- Karami S, Siadat SD, Tabaraie B, Norouzian D, Harzandi N, Aghasadeghi MR, et al. Extraction and Molecular Evaluation of *Brucella abortus* S99 Major Outer Membrane Proteins. *Fayz*, In Press.
- Sharifat Salmani A, Siadat SD, Ahmadi H, Nejati M, Norouzian D, Tabaraie B, et al. Optimization of *Brucella abortus* S99 Lipopolysaccharide extraction by phenol and Butanol methods. *Res J Bio sci* 2008; **3**(6): 578-580.
- Shapouri R, Mohabati Mobarez A, Ahmadi H, Tabaraie B, Hosseini Doust R, et al. Optimization of *Brucella abortus* fermenter culture conditions and LPS extraction method for antigen production. *Res J Microbial* 2008; **3**(1): 1-8.
- Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D. Outer Membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the

- lipopolysaccharide of *Brucella abortus* S99. *Annals Microbiol* 2009; **56**(1): 145-149.
12. Cloeckaert A, Kerkhofs P, Lime Nt. Antibody response to Brucella outer membrane proteins in bovine brucellosis : Immunoblot analysis and competitive enzyme- linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J clin Microbiol* 1992; **30**: 3168- 3174.
 13. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Benard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and Lipopolysaccharide epitopes in Brucella species studied by enzyme – Linked Immunosorbent assay and flow cytometry *Infect Immun* 1995; **63**: 3845- 3852.
 14. Cloeckaert A, verger JM, Grayos M, vizaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of Brucella. *FEMS Microbial Let* 1996; **145**:1- 8
 15. Cloeckaert A, Zygmunt MS, Wergifosse P, Dabray G, Limet JN. Demonstration of peptidoglycan associated Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* 1992;**138**: 1543 – 1550.
 16. Diaz R, Jones LM, leong D, Wilson JB. Surface antigens of smooth Brucellae. *J Bacteriol* 1968; **96**: 893-901.
 17. Meredith CA , Jaughlin Mc. Immune response to porin in cattle immunized with whole cell , outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramy dipeptide adjuvants. *Infect Immun* 1983; **42**: 1159- 1167.
 18. Dzata GK, Confer AW, wychoff JH. The effects of adjuvants on immune responses in cattle injected with a *Brucella abortus* soluble antigen. *Ve Microbiol* 1991; **29** : 27 – 48.
 19. Chewonogrodzky JW, Dubray GE, Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1981; **31**:362.
 20. Moreno, ELM, Jones , Berman DT. Immunochemical characterization of rough Brucella lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1984; **43**: 779- 782.
 21. Jacques IA, Cloeckaert J N, Dubray G. Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of Brucella. *J Med Microbiol* 1992; **37**: 100-103.
 22. Schurig GG, Jones LM, Speth SL ,Berman DT. Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in Brucella infection. *Infect Immun* 1978;**21**: 994-1002

ارزیابی اپیدمیولوژیک ژن‌های ویروالانس *pap*, *sfa*, *cnf-1*, *hly* در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری

شهره فرشاد^{۱*}، فاطمه امام قریشی^۲، مانلی امین شهیدی^۱

(۱) مرکز تحقیقات میکروبی شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

(۲) بخش اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم

نویسنده رابط: شهره فرشاد، مرکز تحقیقات میکروبی شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۴۳۰۴ فاکس: ۰۷۱۱-۶۴۷۴۳۰۳ s-farshad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۳

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشریشیا کلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در کودکان است. چهار ژن ویروالانس *hly*, *cnf-1*, *pap*, و *sfa* در این ارگانیزم عامل مهمی در پاتوژنیسیته و به‌ویژه اتصال به سلول‌های اپی تلیال هستند. این مطالعه برای ارزیابی چهار ژن ویروالانس در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های ادراری کودکان مبتلا به عفونت ادراری و همچنین در راستای برقراری ارتباط آنها با شواهد بالینی انجام گرفت.

روش بررسی: سویه‌های اشریشیا کلی از نمونه‌های ادراری کودکان مبتلا به عفونت‌های ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان مطهری جهرم (مرداد ۱۳۸۴ الی مرداد ۱۳۸۵) جدا شد، و با تست‌های افتراقی شناسائی گردید. سویه‌ها از نظر وجود ژن‌های *hly*, *cnf-1*, *pap* و *sfa* با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، ارزیابی شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۹۶ سویه اشریشیا کلی از نمونه‌های ادراری ۱۰۱ کودک ۱ ماهه تا ۱۴ ساله، با میانگین سنی $26/9 \pm 21/8$ ماه، جدا شد. تشخیص افتراقی بیماری بالینی در ۴۶ مورد (۴۷/۹٪) سیستیت و در ۵۰ مورد (۵۲/۱٪) پیلونفریت بود. درصد شیوع ژن‌های *pap*, *sfa*, *hly* و *cnf-1* به ترتیب در میان سویه‌ها ۲۷/۱٪ (n=۲۶)، ۱۴/۶٪ (n=۱۴)، ۱۳/۵٪ (n=۱۳) و ۲۲/۹٪ (n=۲۲) بود. ۳۲ نمونه (۳۳/۳٪) برای حداقل یکی از ژن‌ها و ۶ نمونه (۶/۳٪) برای تمامی چهار ژن مثبت بودند. شایع‌ترین ژن‌ها در گروه سنی بالای ۳۶ ماه ژن‌های *pap* و *sfa* بودند اما در سنین زیر ۴۸ ماه *hly* شیوع بیشتری داشت ($P < 0/05$). ژن *cnf-1* به طور قابل ملاحظه‌ای در تعدادی از بیماران، که در سونوگرافی یافته‌های غیر طبیعی کلیوی داشتند، متداول تر بود ($P = 0/049$).

نتیجه‌گیری: شیوع ژن‌های ویروالانس *hly*, *cnf-1*, *pap* و *sfa* مشابه سایر بررسی‌ها است. به دلیل شیوع بیشتر موارد پیلونفریت در ارتباط با ارگانیزم‌های حامل این ژن‌ها، تشخیص سریع آنها در نمونه‌های ادراری ممکن است ما را در تشخیص زود هنگام پیلونفریت احتمالی و تسریع در مدیریت درمانی کمک نماید.

کلید واژه‌ها: اشریشیا کلی، پیلونفریت، سیستیت، واکنش زنجیره ای پلیمرز، ژن‌های ویروالانس

مقدمه:

توسط کادر بیمارستان و بر پایه علائم بالینی و نتایج آزمایشگاهی تشخیص داده شد. پیلونفریت حاد به صورت بالینی در نوزادان همراه با تب (دمای بالاتر از 38.5°C)، درد، حساسیت ناحیه لومبار و سپسیس تعریف شد. سیستمیت زمانی مورد توجه قرار گرفت که بیمار دارای پیوری (pyuria) و سوزش ادرار (dysuria) بدون تب بود. اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه قبلی عفونت، آنتی بیوتیک‌هایی که بیمار اخیراً مصرف کرده بود و سابقه بستری شدن طی ۲۸ روز گذشته برای تمام بیمارانی که دارای UTI اکتسابی از جامعه بودند با پرسش نامه جمع آوری شدند. معیار حذف بیمار از مطالعه شامل موارد ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی بود. یعنی عفونت‌هایی که ۴۸ ساعت بعد از پذیرش و یا طی چهار هفته پس از ترخیص قبلی مشاهده شده بودند.

جدا سازی سویه‌ها: سویه‌های *اشریشیا کلی* از نمونه های ادراری جدا و با استفاده از روش‌های استاندارد متداول شناسائی شدند (۸). معیار آزمایشگاهی UTI حاد با *اشریشیا کلی* شامل یک کشت مثبت با تعداد کلنی حداقل 10^5 کلنی در هر میلی لیتر ادرار بود. سپس سویه‌های جدا شده برای آزمایش‌های بعدی تجدید کشت شدند (۱۰۹).

استخراج DNA: سویه‌های *اشریشیا کلی* به مدت یک شبانه روز در محیط *leuria Bartauni broth* در 37°C کشت داده شدند. سپس باکتری‌ها از محیط‌های مایع ته نشست و جدا گردیدند، در آب مقطر استریل مجدداً به صورت سوسپانسیون در آمد و به مدت ۱۰ دقیقه در 95°C جوشانده شد. پس از سانتیفریژ، مایع روئی به عنوان الگوی DNA تا انجام آزمون PCR در 20°C نگهداری شد.

آزمون PCR: تشخیص ژن‌های *hly*, *pap*, *sfa*, *cnf-1* با استفاده از پرایمرهایی انجام شد که قبلاً گزارش شده بودند (۱۱) و از *TIB MOLBIOL syntheselabor GmbH* (Berlin, Germany) تهیه گردیدند. توالی این پرایمرها همراه با توضیحات مربوطه در جدول ۱ آمده است. دیگر آنزیم‌ها و مواد شیمیائی از کمپانی *Cinnagen chemical* تهران تهیه شدند. تکثیر در دستگاه *Thermal cycler* (اپندرف آلمان) براساس روش ارائه شده توسط *Yamamoto* و همکارانش انجام شد (۱۲). متناسب با اندازه قطعه مورد تکثیر، الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد و در کنار یک مارکر *100 bp DNA ladder* (MBI, fermentas, Lithuria) انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات با نرم افزار *windows spss* (version 11.5) پردازش شدند. برای متغیرهای پارامتریک و غیر پارامتریک از آمار توصیفی و برای ارزیابی ارتباط متغیرها از

عفونت مجاری ادراری (Urinary tract infection: UTI) یکی از متداول‌ترین عفونت‌ها است و *اشریشیا کلی* شایع‌ترین عامل آن شناخته شده است (۱). این ارگانیسم همچنین عامل ۹۰٪ تمامی عفونت‌های ادراری شناخته شده در بیماران سرپائی است (۲). شدت عفونت بستگی به هر دو عامل حساسیت میزبان و ویروانس باکتری‌های عفونت‌زا دارد. بیمارانی که مشکلات پزشکی زمینه‌ای دارند، یا به واسطه‌ی برخی اختلالات آناتومیک در مجاری ادراری مبتلا به اشکال در جریان ادرار هستند، و یا درگیر مداخلات تشخیصی درمانی می‌باشند، مستعد کلونیزاسیون مجاری ادراری با *اشریشیا کلی* هستند (۳). به نظر می‌رسد سویه‌های *اشریشیا کلی* که دارای قابلیت عفونت زائی ادراری هستند ویژگی‌های ویروانس مختلفی از خود نشان می‌دهند که در کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان و مهار دفاع میزبانی نقش دارند. بدین ترتیب می‌توانند به باکتری اجازه تهاجم به مجاری ادراری را بدهند که در حالت طبیعی استریل هستند (۴). ژن‌های مختلفی فاکتورهای ویروانس ادراری را کد می‌کنند که از آن جمله می‌توان به ژن‌های ذیل اشاره کرد:

همولیزین (*hly*)، فاکتور نکروز کننده سیتو توکسیک (*cnf-1*)، *p-pili* F13 (*pap*)، آدهزین‌های خانواده *S (sfa)*، آئروباکتین (*aer*)، پرسیپین باکتین (*fyu*) و تعدادی از فاکتورهای کپسولی (K5) و توکسین خود منتقل شونده (*sat-1*) که در کروموزوم و یا دسته‌های تشکیل دهنده پلاسمیدها واقع شده اند که تحت عنوان جزایر پاتوژنیستی (PAIs) خوانده می‌شوند. برخی از ژن‌ها همچون *hly*, *cnf-1*, *pap*; (PAI-I) *hly*, *pap*; (PAI-II); *sfa* (PAI-III); و *fhy* (PAI-IV) به‌عنوان مارکرهای PAI بکار برده می‌شوند (۵) که با از پای انداختن مکانیسم‌های دفاعی میزبان نقش مهمی را در پاتوژن سویه‌های *اشریشیا کلی* و ایجاد بیماری به عهده دارند. یکی از آنها مثل *pilus (pap or p fimbriae)* با پیلونفریت در ارتباط است (۶،۷). مع‌هذا اغلب بررسی‌ها نشان می‌دهند که در بزرگسالان، دفاع میزبان می‌تواند مانع اتصال شاخص‌های ویروانس شود. در این بررسی اپیدمیولوژی ژن‌های ویروانس *pap*, *sfa*, *cnf-1* و *hly* ارزیابی شد و ارتباط آنها با شواهد بالینی در کودکان مبتلا به UTI تعیین گردید.

مواد و روش‌ها:

بیماران: کودکان مبتلا به UTI مراجعه کننده به بیمارستان مطهری چهارم در فاصله ماه‌های مرداد ۸۵-۱۳۸۴ بررسی شدند. UTI

آزمون های t student و chi square و logic regression استفاده شد.

جدول ۱: ترادف پرایمرهای بکار رفته برای تکثیر ترادف های ژنی در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری

اندازه محصول	($5'-3'$) ترادف پرایمر	پرایمر	ژن و ناحیه مورد نظر
PCR (bp)			
۱۱۷۷	AACAAGGATAAG CAC TGT TCT GGC T	F	<i>hly</i>
	ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	R	
۴۹۸	AAG ATG GAG TTT CCT ATG CAG GAG	F	<i>cnf-1</i>
	CAT TCA GAG TCC TGC CCT CAT TAT T	R	
۳۲۸	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G	F	<i>pap</i>
	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	R	
۴۱۹	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	F	<i>sfa</i>
	CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	R	

یافته ها:

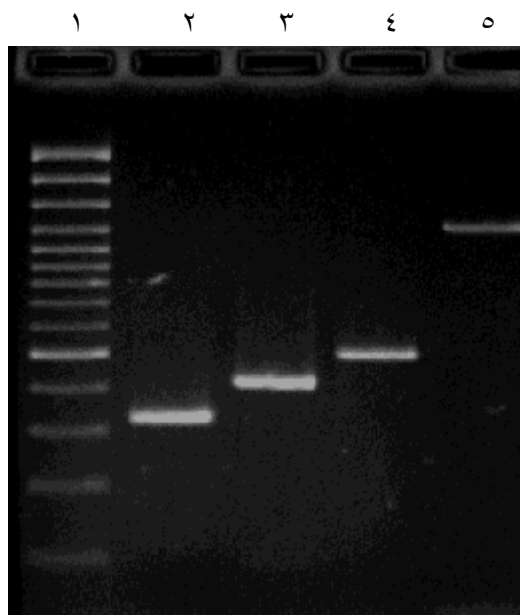
بیماران و سویه های اشریشیاکلی: از ۱۰۱ کودک مبتلا به UTI که ۶۵ نفر (۶۲/۵٪) دختر و ۳۶ نفر (۳۷/۵٪) پسر بودند ۹۶ سویه اشریشیاکلی جدا شد. دامنه سنی بیماران از ۱ ماه تا ۱۴ سال (میانگین $21/8 \pm 26/9$ ماه) بود. در بیماران مبتلا به *E. coli*، در ۴۶ نفر (۴۷/۹٪) سیستیت و در ۵۰ نفر (۵۲/۱٪) پیلونفریت حاد تشخیص داده شد. شیوع پیلونفریت در دختران در مقایسه با پسران بیشتر بود: $63/2\%$ در مقایسه با $36/4\%$ ($P=0.04$). از میان این بیماران فقط ۳۷ نفر سونوگرافی شده بودند که ۱۴ نفر (۳۷/۸٪) دارای یافته های غیر طبیعی همچون بازگشت ادرار، استنوزیس UPJ (Ureteropelvic junction stenosis)، کلیه چند کیستی و یا کلیه منفرد بودند (جدول ۲).

شیوع ژن های ویروالانس: در تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره ای پلیمرز (شکل ۱) طیف شیوع ژن های ویروالانس از ۱۳/۵٪ برای *hly* تا ۲۷/۱٪ برای *pap* متغیر بود. از دو ژن کد کننده ادهزین مورد مطالعه، *pap* در مقایسه با *sfa* در تعداد بیشتری از سویه ها شناسایی شد (۲۷/۱٪، $n=26$ ، در مقایسه با ۱۴/۶٪، $n=14$). اما از دو ژن تحت بررسی کد کننده توکسین، *cnf-1* با شیوع ۲۲/۹٪ ($n=22$) نسبت به *hly* با شیوع ۱۳/۵٪ ($n=13$) فراوان تر بود. $33/3\%$ ($n=32$) از ایزوله ها برای حداقل یک ژن و $6/3\%$ ($n=6$) برای هر چهار ژن مثبت بودند. نتایج ارتباط معنی داری بین سن

بیمار و حضور ژن ها را نشان دادند. در بیمارانی که سن آنها بالاتر از ۳۶ ماه بود فراوانی ژن های *pap*، *sfa* بیشتر بود در صورتی که در گروه سنی پائین تر از ۴۸ ماه ژن *hly* متداول تر بود (۶۶/۷٪ در مقایسه با ۳۳/۳٪؛ $P<0.05$) (جدول ۲). در بیماران مبتلا به سویه های *pap*، *sfa*، *cnf-1* و *hly*، شیوع پیلونفریت بیشتر از سیستیت بود. به طوری که در $85/7\%$ ، $63/3\%$ ، $62/5\%$ و $66/7\%$ مواردی که به ترتیب برای ژن های *hly*، *cnf-1*، *sfa*، *pap* مثبت بودند، موارد ابتلا به پیلونفریت تشخیص داده شد. همچنین ارتباط معنی داری بین وجود ژن *cnf-1* و یافته های غیر عادی در سونوگرافی بیماران وجود داشت. به نحوی که در $83/3\%$ از ایزوله های بیمارانی که ژن *cnf-1* تشخیص داده شد یافته های غیر عادی در سونوگرافی گزارش گردید ($P=0.019$).

جدول ۲: شیوع ژن های ویروالانس در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از گروه های مختلف کودکان مبتلا به عفونت های ادراری

فاکتور ویروالانس	یافته کلینیکی		سونوگرافی		جنس		سن بر حسب ماه			
	پیلونفریت	سیستیت	نرمال	غیر نرمال	مذکر	مونث	<۳۶	>۳۶	<۴۸	>۴۸
<i>pap</i> + (%)	۶۶/۷	۳۳/۳	۶۲/۵	۳۷/۵	۴۱/۷	۵۸/۳	۷۵	۲۵	---	---
<i>pap</i> - (%)	۴۶/۵	۵۳/۵	۵۴/۵	۴۵/۵	۳۳/۳	۶۶/۷	۸۷/۵	۱۲/۵	---	---
<i>sfa</i> + (%)	۶۲/۵	۳۷/۵	۳۳/۳	۶۶/۷	۳۳/۳	۶۶/۷	۶۴/۳	۳۵/۷	---	---
<i>sfa</i> - (%)	۵۰	۵۰	۵۹/۳	۴۰/۷	۳۵/۹	۶۴/۱	۸۷/۸	۱۲/۲	---	---
<i>cnf-1</i> + (%)	۶۳/۶	۳۶/۴	۱۶/۷	۸۳/۳	۳۵	۶۵	۶۶/۷	۳۳/۳	---	---
<i>cnf-1</i> - (%)	۴۸/۷	۵۱/۳	۷۲/۴	۲۷/۶	۳۵/۷	۶۴/۳	۸۹/۶	۱۰/۴	---	---
<i>hly</i> + (%)	۸۵/۷	۱۴/۳	۱۰۰	۰	۵۰	۵۰	---	---	۶۶/۷	۳۳/۳
<i>hly</i> - (%)	۴۷/۱	۵۲/۹	۶۱/۸	۳۸/۲	۳۳/۳	۶۶/۷	---	---	۸۹/۵	۱۰/۵



شکل ۱: نتایج PCR برای تشخیص ژن های ویروالانس در ۴ سویه اشریشیاکلی جدا شده از نمونه ادرار کودکان مبتلا به عفونت ادراری

ردیف ۱: مارکر وزن مولکولی (100-bp plus ladder)، ردیف ۲: *pap* (۳۲۸-bp)، ردیف ۳: *sfa* (۴۱۹-bp)

ردیف ۴: *cnf-1* (۴۹۸-bp)، ردیف ۵: *hly* (۱۱۷۷-bp)

بحث :

درصد و ۲۱/۹ درصد بودند (۲۲). Chatal و همکاران نشان دادند که اپرون های *pap* در ۷۹/۴٪ از سویه های جدا شده از پیلونفریت یافت شدند، که یا به تنهایی (در ۵۱/۵ درصد نمونه ها) و یا همراه با اپرون *afa* و یا اپرون *sfa/foc* بودند (در ۲۷/۹ درصد از نمونه ها). مشاهدات، فراوانی بالای اپرون های *pap* را در میان سویه های /شیرشیا کلی مرتبط با بروز پیلونفریت تأیید کرد. همچنین نشان دادند که اپرون های *afa* و *sfa/foc* از شاخص های *uropathogenic* هستند (۲۳). نشان داده شده است که توانایی اتصال به سطوح اپی تلیال نقش پیش شرط و لازم را در کلونیزاسیون مجاری ادراری دارد، که می تواند در غیاب ناهنجاری های اورولوژیک منجر به UTI شود. بررسی بیماران مبتلا به پیلونفریت حاد نشان داد که ناهنجاری های مجاری ادراری و یا مداخلات دارویی درمانی ممکن است که به ارگانیزم های غیر پاتوژن اجازه ورود و دسترسی به کلیه ها را بدهد (۲۴). بر همین اساس برخی از محققین فرض می کنند که نبود ویژگی های چسبندگی در سویه های /شیرشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به پیلونفریت می تواند به عنوان یک شاخص وجود ناهنجاری های آناتومیک زمینه ای یا بیماری های بالینی، مورد استفاده قرار گیرد. لذا، چنین وضعیتی می تواند ما را به سمت بررسی های بیشتر و تکمیلی هدایت کند (۲۴).

در بررسی حاضر فراوانی *sfa* و *pap* در بیمارانی که درسونوگرافی کلیه آنها شواهد غیر طبیعی مشاهده می شد، کمتر بود اما فراوانی *cnf-1* در این بیماران به صورت چشمگیر بیشتر بود ($P=0.019$).

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر گزارشی از ژن های ویروانس، *sfa*، *hly*، *pap* (*cnf-1*) در سویه های /شیرشیا کلی بیمارانی از جنوب ایران است که با دستاوردهای بسیاری از کشورهای دیگر مطابقت دارد. به دلیل شیوع بیشتر پیلونفریت در حضور این ژن ها، تشخیص سریع آنها در نمونه های ادراری می تواند به قطعیت بیشتر و مدیریت سریع تر پیلونفریت کمک کند. مع هذا، فقدان ویژگی های اتصال در سویه /شیرشیا کلی که از یک بیمار مبتلا به پیلونفریت جدا شده است بررسی و مطالعه بیشتر آن بیمار را توجیه می سازد.

درباره شیوع ژن های ویروانس /شیرشیا کلی که از بیماران مبتلا به UTI جدا شده اند، تحقیقات مختلفی صورت گرفته است. در یک بررسی در اسپانیا نشان داده شد که ۷۰ درصد سویه های جدا شده حامل حداقل یکی از ژن های ویروانس مورد نظر هستند (۱۳).

Silveria و همکارانش شیوع فنوتیپ های ($afa^+ - sfa^+ - pap^+$)، sfa^+ و $pap^+ - sfa^+$ را در سویه های ادراری /شیرشیا کلی به ترتیب شیوع ۳۸/۴۶ درصد، ۱۵/۳۸ درصد و ۷/۶۹ درصد گزارش کردند. در حالی که برای ژن *cnf-1* تنها دو مورد مثبت گزارش گردید (۱۴). Arrisoy با بررسی ۱۶۱ سویه /شیرشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری نشان داد ۵۸/۳۸ درصد سویه ها برای حداقل یکی از ژن های ویروانس مثبت بودند. فراوانی ژن های *pap*، *cnf-1*، *sfa*، *hly* در کل ایزوله ها به ترتیب ۲۲/۹۸، ۹/۹۴، ۶/۲۱ و ۱/۲۴ درصد بود (۱۱). ما نیز در مطالعه حاضر ژن های *pap*، *cnf-1*، *sfa* و *hly* را به ترتیب در ۲۷/۱ درصد، ۲۲ درصد، ۱۴/۶ درصد و ۱۳/۵ درصد از سویه های /شیرشیا کلی یافتیم. آنچه که در بررسی ها مهم و بارز به نظر می رسد وجود شاخص تر ژن *pap* در مقایسه با سایر فاکتورها است. این یافته شاید دلالت بر نقش کلیدی این فاکتور ویروانس در UTI ناشی از سویه های /شیرشیا کلی داشته باشد. در سویه های /شیرشیا کلی عامل عفونت ادراری به وضوح وجود پیلی P به عنوان فاکتور ترغیب کننده کلونیزاسیون و تهاجم شناخته شده است. اتصال باکتری به مخاط مثانه مرحله حیاتی و اصلی برای ایجاد عفونت ناشی از /شیرشیا کلی است (۱۵ و ۱۶). در واقع نقش ژن های کلاس دو *pap* در ظهور باکتریوری /شیرشیا کلی در بیماران مبتلا به UTI نسبت به بیماران مبتلا به کلانژیت حاد چشمگیرتر است (۱۷).

اهمیت نقش آدهزین های *pap* در پاتوفیزیولوژی پیلونفریت ناشی از /شیرشیا کلی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۲۱-۱۸). در مطالعه حاضر نیز ابتلاء به پیلونفریت در ارتباط با ایزوله های /شیرشیا کلی که دارای ژن های ویروانس بودند از فراوانی بیشتری برخوردار بود. ۶۶/۶ درصد، ۶۲/۵ درصد، ۶۳/۳ درصد و ۸۵/۷ درصد از بیمارانی که به ترتیب از لحاظ ژن های *pap*، *sfa*، *cnf-1*، *hly* مثبت بودند به پیلونفریت مبتلا بودند. دریک بررسی ۲۵ مورد از ۴۲ مورد پیلونفریت از لحاظ ژن *pap* مثبت بودند، اما تنها ۶ سویه از ۵۸ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به سیستمیت برای این ژن مثبت بودند. در این بررسی میزان فراوانی *hly* و *cnf-1* در بیماران مبتلا به پیلونفریت به ترتیب ۳۴

فهرست مراجع:

1. Gruneberg RN. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-82. *J. Antimicrob Chemother* 1984; **14**(1): 17-23.
2. Kunin CM. *Urinary tract infections: detection, prevention, and management*. 5th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1997; PP: 241-242.
3. Le Bouguenec, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(5): 1189-93.
4. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; **4**(1): 80-128.
5. Soto M, Jimenez de Anta MT, and Vila J. Quinolones Induce Partial or Total Loss of Pathogenicity Islands in Uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-Dependent or -Independent Pathways, Respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(2): 649-53.
6. Donnenberg MS, Welch RA. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: Mobley HLT, Warren JW, eds. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. Washington; American Society for Microbiology. 1996; PP: 135-174.
7. Orskov I, Orskov F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg* 1978; **95**(2): 551-75.
8. Farmer JJ. Enterobacteriaceae: introduction and identification. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington; ASM Press, 1999; PP: 442-58.
9. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Muñoa F, et al. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Res Microbiol* 1977; **148**(9): 745-55.
10. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J clin Microbiol* 1992; **30**(5): 1189-93.
11. Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Özel D, Köse SK, Özsoy ED, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. *Int J Clin Pract* 2006; **60**(2):170-3.
12. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; **12**(2): 85-90.
13. National Institute of Research and Development for Microbiology and Immunology. Comparison of genomic profiles of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2003; **62**(3-4):137-54.
14. Silveira WD, Benetti F, Lancelotti M, Ferreira A, Solferini VN, Brocchi M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev Inst Med trop* 2001; **43**(6): 345-50.
15. Wullt B. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **21**(6):605-21.
16. Wullt B, Bergsten G, Connell H, Röllano P, Gebratsedik N, Hang L, et al. P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Cell Microbiol* 2001; **3**(4):255-64.
17. Wang MC, Tseng CC, Chen CY, Wu JJ, Huang JJ. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 2002; **35**(10): 1161-6.
18. Gander RM, Thomas VL, Forland M. Mannose-resistant hemagglutination and P receptor recognition of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from adult patients. *J Infect Dis* 1985; **151**(3):508-13.
19. Norgren M, Båga M, Tennent JM, Normark S. Nucleotide sequence, regulation and functional analysis of the *papC* gene required for cell surface localization of *Pap* pili of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1987; **1**(2):169-78.
20. O'Hanley P, Low D, Romero I, Lark D, Vosti K, Falkow S, et al. Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1985; **313**(7): 414-20.
21. Westerlund B, Kuusela P, Risteli J, Risteli L, Vartio T, Rauvala H, et al. The O75X adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol Microbiol* 1989; **3**(3): 329-37.
22. Vila J, Simon K, Ruiz J. Are Quinolone-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Less Virulent? *J Infect Dis* 2002; **186**(7):1039-42.
23. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic

- Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(5): 1189–93.
24. Lomberg H, Hellstrom M, Jodal U, Leffler H, Lincoln K, Svanborg-Eden C. Virulence-associated traits in *Escherichia coli* causing first and recurrent episodes of urinary tract infection in children with or without vesicoureteral reflux. *J Infect Dis.* 1984; **150**(4): 561-69.

ارزیابی آزمون حساسیت به نالیدیکسیک اسید جهت غربالگری سویه‌های بالینی سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین

نگین ایرانشاهی^۱، رضارنجبر^۲، سید داور سیادت^۳، مهدی نجاتی^۴، ناصر هرزندی^۱، داریوش نوروزیان^۲، علی ناغونی^۱، سعید مروتی^۲، زهرا سفیری^۲، سهیلا یوسفی^۲، بهمن تبرائی^{۳*}

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۳) مجتمع تولیدی و تحقیقاتی، بخش واکسن های باکتریایی، انستیتوپاستور ایران

نویسنده رابط: بهمن تبرائی، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی، بخش واکسن های باکتریایی، انستیتوپاستور ایران

همراه: ۰۹۱۲۳۶۱۸۱۶۰ tabaraie@kfg.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۱

چکیده:

زمینه و اهداف: فلئوروکینولون ها به ویژه سیپروفلوکساسین به عنوان آنتی بیوتیک های انتخابی عفونت های سالمونلایی مطرح شده اند. اما موارد متعددی از شکست درمان با سویه های کاهش حساسیت یافته به سیپروفلوکساسین گزارش شده، که رو به افزایش است. این سویه ها براساس استاندارد (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute در محدوده حساس افزایش (MIC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) قرار دارند که در نتیجه شناسایی آن ها با چالش جدی مواجه است. اکنون به توصیه CLSI در بسیاری از کشورها از نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار، جهت شناسایی این سویه ها استفاده می شود. هدف این مطالعه تعیین کارایی نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار در غربالگری سویه های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین و اندازه گیری MIC سیپروفلوکساسین برای تایید کارایی این روش بود.

روش بررسی: سویه های سالمونلا طی سال های ۸۶-۸۷ از مناطق مختلف کشور جداسازی و با روش های بیوشیمیایی و سرولوژیک شناسایی شدند. حساسیت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین توسط روش دیسک دیفیوژن آگار انجام شد و MIC سیپروفلوکساسین با روش E.test اندازه گیری گردید.

یافته ها: از ۵۳ سویه، ۲۸ سویه (۵۲/۸٪) به روش دیسک دیفیوژن آگار، مقاوم به نالیدیکسیک اسید بودند. در این روش تمام سویه ها نسبت به سیپروفلوکساسین حساسیت نشان دادند اما در اندازه گیری MIC، ۸ سویه (۱۵٪) حساسیت کاهش یافته داشتند. سویه های اخیر در روش دیسک دیفیوژن آگار مقاوم به نالیدیکسیک اسید بودند که شناسایی آن ها با روش سیپروفلوکساسین دیسک دیفیوژن آگار مقدور نبود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تست حساسیت به نالیدیکسیک اسید می تواند به عنوان یک شاخص استاندارد برای غربالگری سویه های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: سالمونلا، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، تست حساسیت آنتی بیوتیکی

مقدمه:

دهنده وضعیت واقعی مقاومت کینولونی در گونه‌های سالمونلا نبوده است (۱۴)، و سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به فلئوروکینولون‌ها، تنها می‌توانند بر اساس مقاومت به نالیدیسیک اسید تشخیص داده شوند. به همین منظور، در حال حاضر به توصیه CLSI در بسیاری از کشورها از نالیدیسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار برای تشخیص سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به فلئوروکینولون‌ها، در بیماران مبتلا به عفونت‌های سالمونلائی خارج روده‌ای، استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۶).

این مطالعه نیز به منظور تعیین کارایی روش نالیدیسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار جهت غربالگری سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین و همچنین اندازه گیری MIC سیپروفلوکساسین جهت تایید کارایی این روش در سویه‌های سالمونلا، جدا شده از نمونه‌های بالینی کشور، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی ایزوله‌های سالمونلا از استان‌های مختلف کشور در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ جمع آوری شدند. ایزوله‌های سالمونلا با استفاده از محیط‌های غنی کننده مثل سلتیت F و محیط‌های کشت اختصاصی و افتراقی مانند Mac Conky agar (Salmonella and Shigella agar) SS agar، (Xylose lysine, deoxycholate agar) XLD agar، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد نظیر انتقال بر روی محیط TSI، سیترات، لیزین آیرون آگار، اوره و MRVP شناسایی شدند. پس از آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت تایید سالمونلا، از آزمون سروتایپینگ با آنتی سرم‌های ویژه گروه (ساخت شرکت‌های کوشا فراورگیتی و بهارافشان) استفاده شد (۲).

تست حساسیت به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و نالیدیسیک اسید توسط روش دیسک دیفیوژن آگار و با استفاده از دیسک‌های نالیدیسیک اسید (۳۰ µg) و سیپروفلوکساسین (۵ µg) (ساخت شرکت پادتن طب) و بر اساس استاندارد های CLSI انجام شد. برای تعیین MIC، طبق دستورالعمل شرکت سازنده نوارهای E.test (AB Biodisk, Solna, Sweden)، باکتری در سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون در آمد، کدورت آن با استاندارد نیم مک‌فارلند تنظیم شد، و در سطح محیط مولر هیتون آگار با سواب پنبه‌ای گسترش داده شد. سپس با پنس استریل، نوار E.test

عفونت‌های ناشی از سالمونلا که از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است (۱) از زمان قدیم به عنوان یکی از شایع ترین بیماری‌های روده‌ای قابل انتقال از طریق غذا در کانون توجه بوده است (۲). امروزه به دلیل افزایش روزافزون مقاومت سالمونلا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و شکست‌های درمانی متعددی که از همه جای دنیا گزارش می‌شود، اتخاذ تدابیر درمانی به‌ویژه انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت کاهش مرگ و میر عفونت‌های سالمونلا امری حیاتی می‌باشد (۳). طیف وسیع فعالیت بالینی، قابلیت نفوذ مناسب به بافت، روش تجویز آسان (خوراکی) (۴)، متوسط زمان تب‌زدایی کوتاه و همچنین درصد شکست‌های درمانی کمتر فلئوروکینولون‌ها در مقایسه با تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (کو‌تریموکسازول) و کلرامفنیکل (۵) باعث شده‌اند تا از آن‌ها به میزان قابل توجهی در درمان عفونت‌های سالمونلا استفاده شود. درحالی‌که سفالوسپورین‌های نسل سوم به دلیل گران‌تر بودن، تزریق داخل وریدی و طولانی بودن زمان تب‌زدایی در مقایسه با فلئوروکینولون‌ها در درجه دوم اهمیت قرار دارند (۶).

در مقایسه با دیگر اعضا انتروباکتریاسه، تاکنون در سالمونلا مقاومت بسیار بالا نسبت به فلئوروکینولون‌ها به ندرت گزارش شده است. این مسئله می‌تواند به دلیل وجود مکانیسم‌های متفاوت مقاومت فلئوروکینولونی در این باکتری باشد، که بروز سویه‌های مقاوم را محدود می‌نماید (۷ و ۸). با این حال، طی سال‌های اخیر موارد متعددی از شکست درمان با فلئوروکینولون‌ها در بیماران مبتلا به سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین گزارش شده است، که متأسفانه روز به روز بر تعداد آنها افزوده می‌شود (۹-۱۱). تقریباً تمامی این سویه‌ها نسبت به نالیدیسیک اسید مقاوم بوده و MIC سیپروفلوکساسین برای آنها در محدوده حساس (0.125-1 µg/ml) قرار دارد (۱۲). طبق استانداردهای اخیر Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) برای انتروباکتریاسه، سویه‌های حساس به سیپروفلوکساسین دارای MIC ≤ 1 µg/ml و سویه‌های مقاوم دارای MIC ≥ 4 µg/ml هستند. بنابراین، شناسایی سویه‌هایی که حساسیت آنها به سیپروفلوکساسین کاهش یافته با چالشی جدی مواجه شده است (۱۲ و ۱۳). زیرا، چنین سویه‌هایی در صورت درمان با فلئوروکینولون‌ها به‌ویژه سیپروفلوکساسین می‌توانند مقاوم شده و سبب شکست درمان شوند (۱۰). گزارشاتی از این دست نشان می‌دهد که استاندارد CLSI برای انتروباکتریاسه به درستی انعکاس

روی محیط کشت قرار گرفت و پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون، نتیجه با توجه به اندازه قطر هاله عدم رشد قرائت گردید. از اشریشیاکلی ATCC=25922 به عنوان ارگانیزم شاهد استفاده شد (۱۵).

یافته ها:

از ۵۳ بیمار مورد بررسی ۲۹ نفر (۵۴/۷٪) زن و ۲۴ نفر (۴۵/۳٪) مرد بودند. سن بیماران در محدوده ۱ تا ۶۵ سال قرار داشت. به ترتیب ۴۸ (۹۰٪) سویه از نمونه مدفوع، ۳ (۶٪) سویه از خون و ۲ (۴٪) سویه از مغز استخوان جداسازی شدند. فراوانی سروگروه های جداسازی شده شامل ۲۳ سویه (۴۳٪) گروه D، ۱۶ سویه (۳۰٪) گروه C، ۸ سویه (۱۵٪) گروه B، ۱ سویه (۱/۸٪) گروه A و ۵ سویه (۱/۱۰٪) مربوط به سایر سالمونلا ها بودند.

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد ۲۸ سویه (۵۲/۸٪) شامل ۱۲ سویه (۲۲/۵٪) متعلق به گروه D و ۱۳ سویه (۲۴/۴٪) متعلق به گروه C، به نالیدیکسیک اسید مقاوم و ۲۵ سویه (۴۷/۲٪) به آن حساس بودند. با روش دیسک دیفیوژن آگار هیچ سویه ای مقاوم و یا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین مشاهده نشد (جدول ۱). در روش E.test، ۴۵ سویه (۸۵٪) حساس به سیپروفلوکساسین بودند و ۸ سویه (۱۵٪) الگوی مقاومت جدیدی را نشان دادند که تشخیص آنها توسط روش دیسک دیفیوژن آگار مقدور نبود (جدول ۲). این ۸ سویه نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده، و در مقایسه با سویه های حساس، MIC بالاتری داشتند که به عنوان سویه های حد واسطه یا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین گزارش شدند (MIC=0.125 µg/ml). ارتباط بین مقاومت به نالیدیکسیک اسید و افزایش MIC سیپروفلوکساسین در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۱: نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار برای آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین

سیپروفلوکساسین (%)		نالیدیکسیک اسید (%)		سروگروه سالمونلا
S*	R	S	R	
۱/۸	۰	۱/۸	۰	A
۱۵	۰	۱۵	۰	B
۲۹/۹	۰	۵/۵	۲۴/۴	C
۴۳/۱	۰	۲۰/۶	۲۲/۵	D

*S: Susceptible, R: Resistant.

جدول ۲: نتایج MIC سیپروفلوکساسین به روش E.test

حداقل غلظت مهارکنندگی سیپروفلوکساسین (%)		نوع
S*	I	
۱/۸	۰	سالمونلا سرو گروه A
۱۵	۰	سالمونلا سرو گروه B
۲۰/۶	۹/۳	سالمونلا سرو گروه C
۴۱/۳	۱/۸	سالمونلا سرو گروه D

*S: Susceptible, I: Intermediate.

جدول ۳: ارتباط بین مقاومت نالیدیکسیک اسید و افزایش MIC سیپروفلوکساسین در سویه‌های سالمونلا

نوع سویه جداسازی شده	در صد ایزوله‌ها	محدوده MIC سیپروفلوکساسین (µg/ml)
سویه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید	۵۲/۸	(۰/۰۳۲-۰/۱۲۵)
سویه‌های حساس به نالیدیکسیک اسید	۴۷/۲	(۰/۰۰۲-۰/۰۰۸)

بحث :

سویه‌های سروگروه C در این مطالعه حائز اهمیت می‌باشد. همچنین افزایش تعداد سویه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید (۵۲/۸ درصد) در خور توجه است که می‌تواند به منزله هشدار در جهت افزایش سویه‌ها با حساسیت کاهش یافته فلئوروکینولونی باشد. از طرفی عدم تشخیص ۱۵ درصد سویه‌ها با حساسیت کاهش یافته سالمونلا در پرونده بیماران مربوطه، نشان می‌دهد که احتمالاً از روش نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کشور استفاده نمی‌شود. در حالیکه شناسایی این سویه‌ها با سطح مقاومت پایین به سیپروفلوکساسین برای اتخاذ تصمیم‌گیری‌های درست پزشکی در جهت درمان بهینه بیماران، کاهش شکست‌های درمانی و نیز بررسی‌های اپیدمیولوژیک، امری حیاتی می‌باشد.

در این مطالعه ارتباط بین مقاومت به نالیدیکسیک اسید و کاهش حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین و افزایش MIC سویه‌های سالمونلا مشهود بود. به طوری که برای سویه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید، MIC سیپروفلوکساسین (0.032-0.125 µg/ml)، در مقایسه با سویه‌های حساس به نالیدیکسیک اسید (0.002-0.008 µg/ml)، در محدوده بالاتری قرار داشت. نتایج بدست آمده کارایی روش نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار را در غربالگری سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین تایید می‌نماید. همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیشتر سویه‌های متعلق به سروگروه C، مقاوم به نالیدیکسیک اسید هستند. از این گذشته حدود نیمی از سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به سیپروفلوکساسین به سروگروه C تعلق دارند. حضور غالب

سویه های غیر تیفوئیدی سالمونلا مشاهده شد. ۰/۶ درصد از ۲۶۲۷ سویه سالمونلا غیر تیفوئیدی بررسی شده در این گزارش مقاوم به نالیدیکسیک اسید بودند. تا سال ۲۰۰۰ تعداد این سویه ها به ۲/۵ درصد افزایش یافت (۲۲).

در ایران بر اساس مطالعات حمیدیان و همکاران در سال ۱۳۸۷، از ۱۴۹ سویه سالمونلا جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال از سه بیمارستان در تهران، ۴۶/۳ درصد مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۳/۴ درصد مقاومت حد واسط داشتند (۲۳). این یافته ها با نتایج بررسی حاضر مطابقت داشته و می تواند به منزله هشدار در جهت افزایش مقاومت سالمونلا نسبت به نالیدیکسیک اسید در ایران باشد. در مطالعه آهنگر زاده رضایی و همکاران در سال ۱۳۸۷ که بر روی کودکان بستری شده در بیمارستان تبریز صورت گرفت، ۹ درصد از سویه های سالمونلا مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۲۴).

در حال حاضر علی رغم افزایش جهانی مقاومت به نالیدیکسیک اسید در سالمونلا، هنوز هم از فلئوروکینولون ها به میزان قابل توجهی در درمان عفونت های سالمونلایی استفاده می شود (۱۰ و ۹). البته افزایش اخیر سویه های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به فلئوروکینولون ها و مقاوم نسبت به نالیدیکسیک اسید و شکست های درمانی متعدد، تا حدودی کارایی این گروه از آنتی بیوتیک ها را تحت الشعاع قرار داده است. به نظر می رسد در حال حاضر بهترین راه منطقی جهت کاهش خطر شکست های درمانی مذکور؛ محدود نمودن استفاده از این گروه از آنتی بیوتیک ها در غذای حیوانات به ویژه در کشورهای توسعه یافته، انجام تست حساسیت به نالیدیکسیک اسید، و سپس اندازه گیری MIC سیپروفلوکساسین در سویه های مقاوم نسبت به نالیدیکسیک اسید باشد (۲۵). برخی معتقد هستند که از MIC 0.125 µg/ml سیپروفلوکساسین می توان به عنوان یک شاخص استاندارد با ارزش در شناسایی سویه هایی استفاده نمود که حساسیت آنها به فلئوروکینولون کاهش یافته است (۱۵).

متاسفانه آخرین گزارشات در آسیا حاکی از روند صعودی کاهش حساسیت به فلئوروکینولون ها در سالمونلا تیفی طی دهه های گذشته است (۲۶). به ویژه در جنوب آسیا الگوی مقاومت کینولونی جدیدی در سالمونلا / تریکا مشاهده شده است (۲۷). همه این سویه های گزارش شده، حساس به نالیدیکسیک اسید بودند و حساسیت آنها به سیپروفلوکساسین کاهش یافته بود. افزایش این دسته از سویه ها می تواند اعتبار نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار را در غربالگری سویه های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته

در سال های اخیر در اکثر کشورها موارد متعددی از افزایش جداسازی سویه های سالمونلای مقاوم به نالیدیکسیک اسید و کاهش حساسیت یافته به سیپروفلوکساسین گزارش شده است. بررسی های موجود نشان می دهد که سویه های کاهش حساسیت یافته، به درمان با داروهای فلئوروکینولونی به طور رضایت بخش پاسخ نمی دهند. علی رغم اینکه براساس استانداردهای CLSI، MIC فلئوروکینولون ها برای این سویه ها در محدوده حساس قرار دارد (۹-۱۱).

اولین گزارش شکست درمانی سالمونلا تیفی مقاوم به نالیدیکسیک اسید و حساسیت کاهش یافته به فلئوروکینولون ها با MIC=0.125 µg/ml در سال ۱۹۹۰ در بیماری که از هند به انگلستان باز گشته بود، مشاهده گردید (۱۶). سپس در سال ۱۹۹۷، اولین مورد از تب تیفوئید ناشی از سویه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید و کاهش حساسیت یافته به سیپروفلوکساسین با MIC= 0.125-1 µg/ml در ویتنام گزارش شد (۱۷). بعد از آن موارد متعددی از شکست های درمانی ناشی از سویه های سالمونلا تیفی با مقاومت چندگانه (MDR) و مقاوم به فلئوروکینولون ها در کشورهای در حال توسعه متعدد همچون هند، تایلند، تاجیکستان و کشورهای توسعه یافته مانند آمریکا و انگلستان گزارش گردید (۱۸). اولین مورد شکست درمانی ناشی از سویه های غیر تیفوئیدی مقاوم به نالیدیکسیک اسید که دارای MIC فلئوروکینولونی در محدوده حساس بودند، در سال ۱۹۹۰ گزارش گردید (۱۹).

مهم ترین همه گیری سالمونلای غیر تیفوئیدی در دانمارک در سال ۱۹۹۸ با سالمونلا تیفی موریوم MDR DT104 جدا شده از گوشت خوک به وقوع پیوست. همه سویه های دخیل در این همه گیری، مقاوم به نالیدیکسیک اسید و دارای MIC فلئوروکینولونی در محدوده حساس بودند (۱۹). در آمریکا در سال ۱۹۹۷ از ۲۹۳ سویه سالمونلا تیفی جدا شده، ۶/۸ درصد مقاوم به نالیدیکسیک اسید بوده و تا سال ۲۰۰۰ تعداد این سویه ها به ۲۳/۲ درصد افزایش یافت (۲۰). حدود ۸۰ درصد از عفونت های سالمونلا تیفی گزارش شده در آمریکا از خارج از آمریکا اکتساب شده بود. بنابراین، این گزارش در حقیقت انعکاس دهنده افزایش جهانی مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید در میان سویه های سالمونلا تیفی بود. از طرفی با توجه به اینکه انسان تنها مخزن سالمونلا تیفی است و همین طور انتقال مقاومت نالیدیکسیک اسید در باکتری متداول نمی باشد، لذا پیدایش سویه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید تا حد زیادی می تواند در نتیجه درمان بیماران مبتلا به تیفوئید با این داروها باشد (۲۱). در همان سال مقاومت مشابهی به نالیدیکسیک اسید در میان

طبی به عنوان یک روش ساده، سریع، ارزان و موثر جهت غربالگری سویه‌های سالمونلا با حساسیت کاهش یافته به فلوروکینولون، ارزشمند است و به‌عنوان یک ضرورت انجام آن توصیه می‌گردد. همچنین پیشنهاد می‌شود در سویه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید و قبل از اتخاذ تصمیم به درمان با آنتی بیوتیک، MIC سیپروفلوکساسین، بررسی شود.

زیر سؤال برد. با توجه به گزارشات موجود نیاز به بازنگری استاندارد CLSI نسبت به $MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$ و کاهش آن به $0.125 \mu\text{g/ml}$ برای آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی در خانواده انتروباکتریاسه بیش از پیش احساس می‌شود (۲۸).

نتیجه گیری:

نتایج بررسی‌ها حکایت از ارتباط بین مقاومت نالیدیکسیک اسید و افزایش میزان MIC سیپروفلوکساسین در سویه‌های سالمونلا دارد. لذا، نظر به نتایج بررسی حاضر و سایر مطالعات، انجام آزمون نالیدیکسیک اسید دیسک دیفیوژن آگار در آزمایشگاه‌های تشخیص

فهرست مراجع:

1. مهرور ن، اخوان سپهی ع، مهرور ع، عظیمی راد م، عدالت ر، جعفری ف و همکاران. بررسی قدرت تمایز سروتیپ های سالمونلا با تکنیک PCR-Ribotyping در سویه های جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال زیر ۱۵ سال، مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران پاییز ۱۳۸۶، دوره چهاردهم، شماره ۵۶، صص ۱۸۱ تا ۱۸۷.
2. رنجبر ر، ناغونی ع، تبرائی ب. ناهمگونی الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های بالینی سالمونلا در تهران، مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران تابستان ۱۳۸۷، سال ۲، شماره ۲، صص ۲۷ تا ۳۳.
3. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*, *Immunol Med Microbiol* 2005; **43**: 1-11.
4. Leibovitz E. The use of fluoroquinolone in children. *Curr Opin Pediatr* 2006; **18** (1): 64-70.
5. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid Fever. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1770-1782.
6. Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, Crook DW, Islam MN, Islam MH, et al. Molecular basis of resistance displayed by highly ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2006; **44** ; 3811-3813.
7. Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolone *Salmonella*; emerging mechanism and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 2006; **8**: 1937-1944.
8. Izumiya H, Mori K, Kurazono M, Yamaguchi M, Higashide M, Konishi N, et al. Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium displaying high level fluoroquinolone resistance in japan. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5074-5079.
9. Hakanen AJ, Kotilainen P, Pitcanen S, Huikko S, Siitonen A, Huovinen P. Reduction in fluoroquinolone susceptibility among non-typhoidal strains of *Salmonella* isolated from Finnish patients. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 569-572.
10. Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Angolo FJ. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in United States from 1996-2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 195-197.
11. Kay RS, Vandeveld AG, Fiorella PD, Crouse R, Blackmore C, Sanderson R, et al. Outbreak of health care-associated infection and colonization with multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Senftenberg in florida. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 805-811.
12. Aznar E, Alarcon, Buendia B, Garcia Penuela M, Lopez Brea. Detection of decreased susceptibility to fluoroquinolone s in *Salmonella* spp. By five different methods including real-time polymerase chain reaction (PCR). *International J Antimicro Agents* 2007; **30**: 67-71.

13. Arestrup FM, Wiuff C, Molbac K, Threlfall EJ. Is it time to change Fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 827-829.
14. Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ. Reevaluating fluoroquinolone for breakpoints for *Salmonella enterica* serotype typhi and for non-typhi salmonellae. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 75-81.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
16. Launay O, Nguyen VJ, Acar JF. Typhoid fever due to *Salmonella typhi* strain of reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect* 1997; **3**.
17. Wain J, Hoa NT, Chinh NT, VH, Everett MJ, Diep TS, Day PJ, et al. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Vietnam: Basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin infect* 1997; **25**: 1404-1410.
18. Rupali P, Abraham OC, Jesudason MV, John TJ, Zachariah A, Sivaram S, et al. Treatment failure in typhoid fever with ciprofloxacin susceptible *Salmonella enterica* serotype typhi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **49**: 1-3.
19. Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N Engl J Med* 1999; **34**: 1420-1425.
20. Ackers ML, Puhf ND, Tauxe RV, Mintz ED. Laboratory based surveillance of *Salmonella* serotype typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. *JAMA* 2000; **283**: 2668-2673.
21. Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, Fracaro ML, Threlfall EJ, Angulo FJ. Emerging quinolone resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis* 1997; **3**: 371-372.
22. Rossiter S, McClellan J, Barrett T, Joyce K, Anderson AD. Emerging fluoroquinolone resistance among non-typhoidal *Salmonella* in the United States: NARMS International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta: American Society for Microbiology Press, 2002: 171-172.
23. Hamidian M, Tajbakhsh M, Rezadehbashi M, Shokrzadeh L, Dabiri H, Zali MR. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp to Nalidixic acid isolated from patients with acute diarrhea in Tehran. *The Second Iranian Congress of Clinical Microbiology* 7-9 October, 2008 Shiraz.
24. Ahangarzadeh Rezaee M, Abri M, Asghari R, Abdoli Oskoui SH, Hassani A. Occurrence and susceptibility to antibiotics of *Salmonella* and *Shigella* species isolated from hospitalized children in Tabriz pediatric hospital. *The Second Iranian Congress of Clinical Microbiology* 7-9 October, 2008 Shiraz.
25. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist* 2000; **6**: 77-83.
26. Kwang SL, Ha Yeon L, Eun JJ, Jin W, Chung. A Case of Typhoid Fever to Failed Ciprofloxacin, Infected in Korea. *Infect Chemother* 2008; **40**(3): 175-178.
27. Antti J, Hakanen, Marianne L, Pentti H, Jari J, Anja S, et al. New Quinolone Resistance Phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic Acid-Susceptible Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(11): 5775-5778.
28. Dilruba Ahmed, Liton T, D'Costa, Khorshed Alam, G Balakrish Nair, M Anowar Hossain. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar typhi Isolates with High-Level Resistance to Ciprofloxacin in Dhaka, Bangladesh *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(10): 3516-3517.

بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در گونه‌های انتروکوک جدا شده از افراد سالم در شهر تهران ۸۷-۱۳۸۶

نسرین نوحی^{۱*}، ملیحه طالبی^۲، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، محمدرضا پورشفیعی^۲

۱) گروه میکرب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی
۲) بخش میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: نسرین نوحی، گروه میکرب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی
همراه: ۰۹۱۴۴۲۶۳۷۸۴ nasrinnoohi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۴

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک فلور طبیعی روده انسان و حیوانات است که طی سال‌های اخیر به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است. مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در انتروکوک اثر سینرژیستی بین این آنتی بیوتیک و آنتی بیوتیک‌های مؤثر روی دیواره باکتری را از بین می‌برد. ژن اصلی ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین در انتروکوک *Ia-aph(2'')-Ie(6')* است. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در گونه‌های انتروکوک جدا شده از افراد سالم در شهر تهران بود.

روش بررسی: نمونه مدفوع داوطلبین سالم غیر بستری در شهر تهران، پس از غنی سازی در محیط Brain hearth infusion broth حاوی جنتامایسین، بر روی محیط m-انتروکوکوس کشت داده شد. بعد از شناسایی گونه‌ها، MIC سویه‌ها به جنتامایسین تعیین شد و حساسیت سویه‌های مقاوم در مقابل ۸ آنتی بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفوزیون آگار بررسی گردید. برای بررسی مولکولی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در سویه‌های مقاوم، PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۵۰۰ نمونه مدفوع در ۷۶ (۱۵/۲٪) نمونه انتروکوک مقاوم به سطح بالای جنتامایسین ($MIC \geq 500 \mu g/ml$) جداسازی شد. گونه‌های جداسازی شده عبارت بودند از: ۴۵ (۵۹/۲٪) سویه انتروکوکوس فکالیس، ۲۹ (۳۸/۱٪) سویه انتروکوکوس فسیوم و ۲ (۲/۷٪) سویه انتروکوکوس گالیناروم بودند. ۱۱ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد. تمام سویه‌ها دارای ژن مقاومت *Ia-aph(2'')-Ie(6')* بودند.

نتیجه گیری: شیوع انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در افراد سالم مورد مطالعه در مقایسه با مطالعات سایر نقاط دنیا، بالا ارزیابی می‌شود. همانند سایر مطالعات، ژن اصلی و شاخص ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین، *Ia-aph(2'')-Ie(6')* شناخته شد.

کلید واژه‌ها: انتروکوک، جنتامایسین، مقاومت سطح بالا، افراد سالم

مقدمه:

انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در افراد سالم غیر بیمارستانی، شناسایی ژن‌های مقاومت و بررسی حساسیت ضد میکروبی آنها بود.

مواد و روش‌ها:

نمونه برداری: نمونه مدفوع ۵۰۰ داوطلب غیر بیمارستانی (شامل کسانی که بنا به دلایلی از جمله ازدواج، درخواست کار، بررسی عمومی سالیانه "چکاپ"، تعیین گروه خونی و غیره به آزمایشگاهها مراجعه کرده بودند و نیز داوطلبان متفرقه و سالم) شهر تهران از ماه‌های مهر ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷ بررسی شد. در این مطالعه، از هر داوطلب فقط یک نمونه گرفته شد و از هر نمونه فقط یک سویه مقاوم مورد بررسی قرار گرفت. افراد مورد مطالعه در این بررسی طی ۶ ماه قبل از نمونه برداری سابقه بستری در بیمارستان را نداشتند و در دوره ۲ ماه قبل از نمونه برداری تحت درمان آنتی بیوتیکی قرار نگرفته بودند.

جداسازی و شناسایی انتروکوک: ابتدا نمونه‌ها در محیط BHI مایع حاوی ۳۲ µg/ml جنتامایسین به مدت یک شبانه روز و در دمای ۴۵°C غنی سازی شدند و سپس سوسپانسیون حاصل بر روی محیط m-انتروکوکوس آگار (Becton Dickinson and co., Sparks, MD, USA) ۳۲µg/ml جنتامایسین کشت داده شدند (۴۸ h / ۳۷°C). کلونی‌های تپیک انتروکوک بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. سپس آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی جنس و گونه بر روی سویه های جدا شده انجام گرفت. این آزمایش‌ها شامل رنگ آمیزی گرم، رشد در محیط بایل اسکولین آگار، رشد روی محیط ۶/۵٪ نمک، تحمل ۰/۰۴٪ تلوریت، تست کاتالاز، تست PYR، آرژنین دهیدرولاز، حرکت، تولید پیگمان، هیدرولیز کربوهیدرات‌ها (آرابینوز، گلیسرول، لاکتوز، مانیتول، ملیبیوز، رافینوز، ریبوز، سوربوز، سوربیتول، ساکارز و تری هالوز) بود (۹).

آزمایش حساسیت ضد میکروبی: حساسیت ضد میکروبی سویه‌ها به روش انتشار از دیسک در مورد آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین (۳۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، آمپی سیلین (۱۰ µg)، سپیروفلوکسازین (۵ µg)، لینزولید (۳۰ µg)، سینرسید (۱۵ µg) و تایکوپلانین (۳۰ µg) از BioRad, Hercules, CA, USA یا BBL, Sensi Disc, USA) روی محیط مولر هینتون آگار (Difco, USA) سنجیده شد.

انتروکوک فلور طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات است (۱). این میکرواورگانیزم دومین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری در بیمارستان‌ها و سومین عامل رایج ایجاد باکتری می بیمارستانی است. از بین ۲۰ گونه مختلف جنس انتروکوکوس (Enterococcus)، به طور معمول گونه‌های انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) و انتروکوکوس فسیوم (*E. faecium*) در بدن انسان کلونیزه شده و عامل اصلی عفونت در انسان می‌باشند. به طوری که ۸۰ تا ۹۰ درصد عفونت‌های ناشی از انتروکوک در انسان توسط گونه *E. faecalis* و ۱۰ تا ۱۵ درصد از آنها توسط *E. faecium* ایجاد می‌شود (۱ و ۲). یکی از دلایل اصلی که انتروکوک‌ها در بیمارستان‌ها زنده می‌مانند، مقاومت ذاتی آنها به چندین آنتی بیوتیک مورد استفاده معمول در بیمارستان‌ها است. شاید عامل مهم‌تر توانایی آنها در کسب مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج موجود از طریق موتاسیون و یا کسب ماده ژنتیکی حامل ژن مقاومت از طریق کونژوگاسیون یا روش‌های دیگر می‌باشد (۳). انتروکوک‌های مقاوم در مدفوع حیوانات، غذاهای تولید شده با منشاء حیوانی، آب‌های سطحی و فاضلاب‌های بیمارستانی در سطح وسیع یافت می‌شوند که قادر هستند به افراد سالم جامعه انتقال یافته و در جامعه غیر بیمارستانی منتشر شوند. وجود این باکتری‌های مقاوم در فلور نرمال، ذخیره مناسبی برای ژن‌های مقاومت جهت انتقال به باکتری‌های پاتوژن به شمار می‌آید (۱، ۴ و ۵).

مقاومت به سطح بالای جنتامایسین (high level gentamicin resistance: HLGR) در انتروکوک‌ها سینتریزم بین جنتامایسین و آنتی‌بیوتیک‌های موثر روی دیواره باکتری‌ها مثل ونکومایسین، آمپی سیلین و پنی سیلین را از بین می‌برد (۲ و ۶). از این رو، کسب این مقاومت توسط انتروکوک‌ها بسیار حائز اهمیت است. مقاومت سطح بالا به جنتامایسین ($MIC \geq 500 \mu g/ml$) در انتروکوک اغلب به واسطه ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ایجاد می‌شود که آنزیم غیر فعال کننده آمینوگلیکوزید AAC(69)-APH(20) را کد می‌کند (۷). این آنزیم با ایجاد تغییر در ساختار آمینوگلیکوزیدها باعث غیر فعال شدن آنها می‌شود (۶).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که برای کنترل انتشار مقاومت باکتریایی در یک منطقه جغرافیایی، کسب اطلاعات راجع به طرح‌های حساسیت باکتری‌ها در آن منطقه ضروری می‌باشد (۸). از این رو هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع

فراوانی و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها عبارت بود از: اریترومايسين ۷۱ سويه (۹۳/۴٪)، سيپروفلوکسازين ۲۶ سويه (۳۴/۲٪)، تتراسيکلين ۷۱ سويه (۹۳/۴٪)، کلرامفنیکل ۱۴ سويه (۱۸/۴۲٪)، آمپی سیلین ۱۹ سويه (۲۵٪)، تايکوپلانتين ۴ سويه (۵/۲۶٪) و سينرسيد ۴۵ سويه (۵۹/۲٪). تمام سويه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک لينزوليد حساس بودند. همانطور که در جدول ۱ مشخص است، مقاومت به سينرسيد در گونه *E. faecium* و همين‌طور مقاومت به آمپی‌سيلين در گونه *E. faecalis* مشاهده نشد. تمام سويه‌های *E. faecalis* به سينرسيد مقاوم (ذاتی) بودند و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تايکوپلانتين و آمپی‌سيلين، فقط در گونه *E. faecium* مشاهده شد. ۶۵/۵٪ از سويه‌های *E. faecium* مقاوم به آمپی‌سيلين بودند. بالاترين ميزان مقاومت به کلرامفنیکل در سويه‌های *E. faecalis* دیده شد. مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۴۲ (۵۶٪) سويه دارای مقاومت چند گانه بودند. يعني علاوه بر جنتاميسين به سه آنتی‌بیوتیک ديگرنيز مقاومت نشان دادند.

نتايج حاصل از PCR نشان داد که تمام سويه‌های مورد مطالعه دارای ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* بودند (شکل ۱).

جدول ۱: تعداد و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

برحسب گونه در سويه‌های مقاوم

آنتی‌بیوتیک	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
سيپروفلوکسازين	۱۶(۵۵/۱)	۱۰(۲۲/۲)
اريترومايسين	۲۶(۸۹/۶)	۴۳(۹۵/۵)
کلرامفنیکول	۱(۳/۱)	۱۳(۲۸/۹)
آمپی‌سيلين	۱۹(۶۵/۵)	-
تتراسيکلين	۲۷(۹۳/۱)	۴۲(۹۳/۳)
تايکوپلانتين	۴(۱۳/۸)	-
لينزوليد	-	-
سينرسيد	-	۴۵(۱۰۰)

MIC سويه‌های جدا شده نسبت به جنتاميسين (Sigma) به روش microbroth dilution تعيين شد (۱۰). رقت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی ۱۶-۲۰۴۸ µg/ml بود.

استخراج DNA: استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام گرفت. 6ml از سوسپانسيون باکتری کشت شده در محيط BHI مایع، به مدت 18 دقيقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقيقه سانتریفوژ شد. روی رسوب حاصله ۳۰۰µl از بافر ليز(حاوی EDTA 0.5M, Tris-HCL 1M, sucrose 50% و ليزوزيم) اضافه شد و به مدت 1 ساعت در بن ماری 37°C قرار داده شد.

سپس به محلول حاصله ۲۵ µl از ۱۰٪ SDS اضافه شد و بعد از قرار دادن روی یخ به مدت ۱۰ دقيقه، به مدت ۱۶ دقيقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقيقه سانتریفوژ شد. سوسپانسيون رویی ابتدا دو مرتبه با فنل و کلروفرم-ایزوپروپانول و سپس با کلروفرم شستشو داده شد. در هر مرحله مایع رویی برداشته شد. در نهایت رسوب DNA حاصل از اضافه شدن اتانول ۱۰۰ بر روی مایع رویی، در بافر TE حاوی RNase حل شد(۱۱).

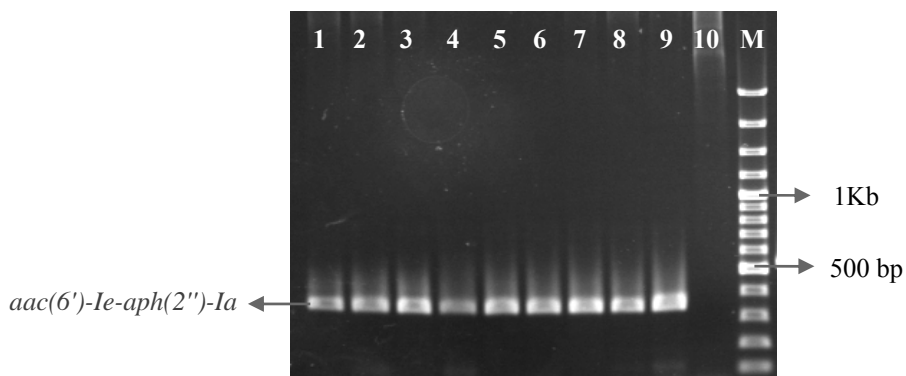
PCR: با استفاده از PCR و پرایمر اختصاصی 5'CAG AGC و CTT GGG AAG ATG AAG3'

5'CCT CGT GTA ATT CAT GTT CTG GC3' حضور ژن مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aac(69)-Ie-*

aph(20)-Iaa در سويه‌های مقاوم بررسی شد. در این مطالعه از زوج پرایمرهای پیشنهاد شده Chow و همکارانش استفاده شد (۶). سيكل حرارتي برای انجام آزمایش PCR شامل یک مرحله lysing اولیه ۳ دقيقه در ۹۴°C، ۳۵ سيكل از ۴۰ ثانيه در ۹۴°C (denaturation)، ۴۰ ثانيه در ۵۵°C جهت اتصال پرایمر (annealing)، ۴۰ ثانيه در ۷۲°C برای تکثیر قطعه هدف (extension) و در نهایت یک مرحله extension نهایی ۲ دقيقه در ۷۲°C بود. در نهایت الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در هر PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ انجام شد و پس از رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها:

از ۵۰۰ نمونه مدفوعی، ۷۶ نمونه (۱۵/۲٪) حاوی سويه مقاوم به سطح بالای جنتاميسين بودند. انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی سويه‌های جدا شده نشان داد که ۴۵ (۵۹/۲٪) سويه *E. faecalis*، ۲۹ (۳۸/۱٪) سويه *E. faecium* و ۲ (۲/۶۳٪) سويه *E. gallinarum* بودند. نتايج MIC نشان داد که تمام سويه‌های مقاوم به جنتاميسين دارای MIC ≥ 500 µg/m بودند.



شکل ۱: PCR جهت تکثیر ژن مقاومت به جنتامایسین، مارکر ۱۰۰ bp (M)، نمونه‌های مثبت برای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (شماره های ۱-۹) و کنترل منفی (شماره ۱۰)

بحث:

بالای جنتامایسین در بین افراد سالم جامعه متفاوت است. طی مطالعه‌ای در آمریکا در سال ۲۰۰۰ شیوع انتروکوک‌های HLGR در بین افراد سالم به عنوان فلور طبیعی روده ۱ درصد گزارش شد. در مطالعه انجام شده در هنگ کنگ (۲۰۰۴) و همین طور در پرتغال (۲۰۰۶) بر روی افراد سالم جامعه، شیوع HLGRE به ترتیب ۲۷/۸ درصد و ۱۱ درصد گزارش شده است (۱۸ و ۱۹). در مطالعه حاضر شیوع انتروکوک‌های HLGR در جامعه سالم ۱۵/۲ درصد به دست آمد که با توجه به سایر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا رقم بالایی است. طی سه دهه اخیر آمینوگلیکوزیدها از جمله جنتامایسین در سطح وسیع جهت درمان عفونت‌های مختلف در بیماران بیمارستانی و غیر بیمارستانی در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. این امر می‌تواند مهم‌ترین عامل شیوع بالای مقاومت در جامعه باشد.

در اکثر مطالعات انجام شده در خصوص شیوع انتروکوک‌های مقاوم به جنتامایسین، دو گونه غالب جداسازی شده *E. faecium* و *E. faecalis* بودند. درصد بالای انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین جداسازی شده در این مطالعه *E. faecium* و *E. faecalis* بودند که ۵۹/۲ درصد آنها متعلق به گونه *E. faecalis* بود. در مطالعه سیفی و همکاران بر روی انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین، ۶۴ درصد از ایزوله‌های *E. faecium* جداسازی شده از فاضلاب و ۲۹ درصد از ایزوله‌های *E. faecalis* به سطح بالای جنتامایسین مقاوم بودند (۲۰). مشابه با مطالعه ما، در مطالعه‌ای در آمریکا روی افراد سالم و غیر بیمارستانی، گونه غالب انتروکوک‌های مقاوم به جنتامایسین، *E. faecalis* گزارش شده است (۲۱).

نتایج نشان داد میزان HLGR بالا است و همه سویه‌های جدا شده دارای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* هستند.

فلور روده افراد سالم در جامعه، محل ذخیره مناسبی برای باکتری‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت به شمار می‌آید. این مسئله شیوع مقاومت در سطح جامعه را بالا برده و درمان عفونت‌های انتروکوک‌های مقاوم را با مشکل رو به رو می‌کند. از این رو، بررسی شیوع انتروکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جامعه سالم انسانی از نظر اپیدمیولوژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی شیوع مقاومت به جنتامایسین در آمریکا، کانادا، آمریکای لاتین، اروپا و آسیا حاکی از مقاومت ۱۴ تا ۴۰ درصد انتروکوک‌ها به جنتامایسین می‌باشد (۱۲). در مورد شیوع HLGR در انتروکوک‌های جدا شده از نمونه‌های غیر بیمارستانی، طی مطالعه‌ای در تایلند در سال ۲۰۰۶، شیوع انتروکوک‌های مقاوم به جنتامایسین در مواد غذایی منجمد شده و آب‌های سطحی این کشور به ترتیب ۰/۹ درصد و ۱/۶ درصد گزارش شده است (۱۳). همین طور در مطالعه‌ای در مالزی شیوع انتروکوک‌های مقاوم به جنتامایسین در ماکیان، ۱۹/۵ درصد گزارش شد (۱۴).

بررسی شیوع HLGR در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در ایران نشان دهنده افزایش رو به رشد مقاومت در سطح بیمارستان‌های کشور است (۱۷-۱۵). در مطالعه سیفی و همکاران روی انتروکوک‌های جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری میزان HLGR در ایزوله‌های *E. faecium* و *E. faecalis* به ترتیب ۹۲ درصد و ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۷). گزارشات به دست آمده از سایر نقاط دنیا در مورد شیوع انتروکوک‌های مقاوم به سطح

مقاومت به تائیکوپلانتین و لینزولید پایین بود. در مطالعات مختلف انجام شده در ایران مشابه با این مطالعه، مقاومتی به آنتی بیوتیک لینزولید مشاهده نشده است (۱۷). در این مطالعه، مقاومتی به سینرسید در *E. faecium* مشاهده نشد. *E. faecalis* دارای مقاومت ذاتی به سینرسید است ولی *E. faecium* مقاوم به چندین آنتی بیوتیک مختلف به طور همزمان معمولاً به این آنتی بیوتیک حساس می باشد. در سایر مطالعات انجام شده در ایران نیز میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک پایین گزارش شده است (۱۷). تمام سویه‌های مقاوم به آمپی سیلین جداسازی شده در این مطالعه متعلق به گونه *E. faecium* بود. در بین سویه‌های *E. faecalis* مقاومتی به این آنتی بیوتیک مشاهده نشد. در کل در بین انتروکوک‌های مقاوم، ۱۱ طرح مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد. قابل ذکر است که بیش از نیمی از سویه‌های HLGR جداسازی شده، به ۳ آنتی بیوتیک دیگر به جز جنتامایسین مقاوم بودند.

نتیجه گیری:

این مطالعه حاکی از شیوع بالای مقاومت به جنتامایسین در فلور روده افراد سالم و غیر بیمارستانی در شهر تهران می باشد. از طرف دیگر یک منبع بزرگ ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در بین انتروکوک‌های جداسازی شده در این مطالعه شناسایی شد. این مقاومت قابل انتقال به سایر باکتری‌های فلور نرمال می باشد که نتیجه آن افزایش سطح مقاومت در جامعه سالم انسانی و به تبع آن در بیمارستان‌ها است. این امر درمان عفونت‌های ناشی از این میکرواورگانسیم‌های مقاوم را بیش از پیش با مشکل رو به رو می کند.

در مورد ژن‌های مختلف ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین، مطالعات متفاوت در آمریکا، کانادا، آمریکای لاتین، اروپا و آسیا نشان داده که ۷۹ درصد مقاومت‌های سطح بالا به جنتامایسین توسط ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* حاصل شده و همین طور ۵ درصد آنها دارای *aph(2'')-Ib* ۱۶ درصد دارای *aph(2'')-Ic* و ۱۴ درصد دارای *aph(2'')-Id* می باشند (۱۲). طبق مطالعات انجام شده در ایران بر روی انتروکوک‌های HLGR جدا شده از بیمارستان‌های مختلف با $MIC \geq 500 \mu g/ml$ برای جنتامایسین، حضور ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* در سطح بالا گزارش شده است. به طوری که تمامی انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین دارای این ژن مقاومت بودند (۱۵، ۱۶ و ۲۰). در مطالعه حاضر مطابق با سایر مطالعات در نقاط مختلف دنیا، *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ژن غالب ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین است. این ژن روی ترانسپوزون یا پلاسمید قرار دارد که به راحتی قادر به انتقال به سایر باکتری‌ها از جمله استافیلوکوک می باشد و عامل ایجاد مقاومت در مقابل اکثر آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی است. در این مطالعه ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* در تمام انتروکوک‌های HLGR جدا شده از افراد سالم جامعه شناسایی شد. نتایج حاکی از اهمیت ویژه این ژن در ایجاد و انتقال مقاومت به جنتامایسین در بین انتروکوک‌ها در تهران است. این سطح بالای مقاومت در جامعه سالم انسانی، به عنوان یک محل ذخیره مناسب برای این ژن مقاومت می باشد که به سرعت مقاومت را در جامعه سالم گسترش می دهد.

نتایج آزمایش‌های ضد میکروبی حاکی از مقاومت چند گانه در بین انتروکوک‌ها بود. بالاترین میزان مقاومت (بیش از ۹۰ درصد) در مقابل اریترومایسین و تراسیکلین مشاهده شد. از طرف دیگر میزان

فهرست مراجع:

- Huycke M M, Sahm D F, Gilmore M S. Multiple drug resistant enterococci: The nature of problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(2): 239-249.
- Marothi Y A, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance. *Indian J Med Microbiol*. 2005; 23(4):214-219.
- Cleaveland DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9:90-102.
- Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Mollby R, Pourshafie M R. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Curr Microbiol*. 2007; 56:468-473.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(4):686-707.
- Vakulenko S B, Donabedian S M, Vaskresenskiy A M, Zerros M J, Lerner S A, Chow J W. Multiplex PCR for detection of

- aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**(4):1423-1426.
7. Kao S J, You I L, Clewell D B, Donabedian S M, Zerros M J, Petrin J, Shaw K.J. Detection of high-level aminoglycoside resistance gene *aph*(2) –Ib in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**(10):2876-2879.
 8. Talebi M, Eshraghi S S, Pourshafie M R, Pourmand M R, Eshraghian M R. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Iranian J Publ Health.* 2007; **36**(4):20-25.
 9. Manero A, Blanch A R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; **65**: 4425–4430.
 10. National Committee for Clinical laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement. 2001, vol21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 11. The *Enterococcus* research site. Total DNA purification from *Enterococcus*. [http://W3.ouhsc.edu/Enterococcus/DNA Purification from Enterococcus](http://W3.ouhsc.edu/Enterococcus/DNA_Purification_from_Enterococcus).
 12. Vakulenko S B, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; **16**: 430-450.
 13. Tansuphasiri U, Khaminthakul D, Pandii W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; **37**: 162-70.
 14. Chan Y Y, Abd Nasir M H, Yahaya M A, Salleh N M, Md Dan A D, Musa A M, Ravichandran M. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. *Int J Food Microbiol.* 2008; **122**: 221-6.
 15. Feizabadi M M, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microb Drug Resist.* 2006; **12**: 265-268.
 16. Feizabadi M M, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzade A, Asadi S, Etemad G. Phenotypical characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003; **49**: 645-649.
 17. Saifi M, Pourshafie M R, Eshraghian M R, Soltan Dallal M M. Anti-microbial resistance of enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. *Iran Biomed J.* 2008; **12**: 185-90.
 18. Boost M, Lai L, Donoghue M. Drug resistance in fecal enterococci in Hong Kong. *J Infect Chemother.* 2004; **10**: 326-330.
 19. Novais C, Coque T M, Sousa J C, Peixel V. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 2006; **12**: 1131-1134.
 20. Saifi M, Soltan Dallal M M, Pourshafei M R, Eshraghian M R, Pourmand M R, Salari M H, Skirazi M H. High level resistance of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from municipal sewage treatment plants to gentamicin. *Iranian J Publ Health.* 2008; **37**: 103-107.
 21. Clark N C, Cooksey R C, Hill B C, Swenson J M, Ternover F C. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**:2311–2317.

بررسی فاکتورهای ویروالانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه های ادرار

احمد قاسمی^۱، رضوان منیری^{۱*}، احمد خورشیدی^۱، سید غلامعباس موسوی^۲

۱) گروه میکروبی شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲) دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

نویسنده رابط: رضوان منیری، گروه میکروبی شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

تلفن: ۰۳۶۱-۵۵۵۰۰۲۱ moniri@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۱۸

چکیده:

زمینه و اهداف: *انتروکوکوس فکالیس*، کومنسال و فلورنرمال روده انسان بوده ولی قادر است عفونت های بیمارستانی ایجاد کند. در این باکتری چندین فاکتور ویروالانس شناسایی شده که شامل توده تجمعی (Agg)، پروتئین سطحی *انتروکوک* (Esp)، سیتولیزین (Cyl) و آنزیم ژلاتیناز می باشد. این فاکتورها به طور همگرا عمل می کنند که منجر به افزایش ویروالانس می شود و سبب تخریب و تهاجم بافتی می گردد. هدف از این مطالعه تعیین شاخص های فنوتیپی فاکتورهای ویروالانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه های ادرار بود.

روش بررسی: در این مطالعه تولید بیوفیلم، همولیزین و ژلاتیناز در ۹۵ ایزوله بالینی *انتروکوکوس فکالیس*، جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری، بررسی شدند. اطلاعات جمع آوری شده با آزمون های دقیق فیشر و مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: از ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۹ سویه (۲۰٪) آنزیم ژلاتیناز تولید نمودند. ۴۲ سویه (۴۴٪) دارای همولیز بودند که ۳۵ سویه (۳۵/۸٪) همولیز بتا، ۷ سویه (۷/۴٪) همولیز آلفا و ۵۳ سویه (۵۶/۸٪) فاقد همولیز بودند. ۱۰ سویه (۱۰/۵٪) تولید بیوفیلم قوی (بیشتر از ۰/۲)، ۶ سویه (۶/۳٪) تولید بیوفیلم متوسط (کمتر از ۰/۲ و بیشتر از ۰/۱) و ۷۹ سویه (۸۳/۲٪) تولید بیوفیلم ضعیف (کمتر از ۰/۱) نمودند. بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط با فاکتورهای سن، جنس، مصرف قبلی آنتی بیوتیک، استفاده از کاتتر، و تولید همولیزین و فعالیت ژلاتیناز اختلاف معنی داری یافت نشد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم ویروالانس معرفی نشد. به نظر می رسد اثرات آنها تجمعی باشد.

کلید واژه ها: *انتروکوکوس فکالیس*، فاکتورهای ویروالانس، ژلاتیناز، بیوفیلم، عفونت مجاری ادراری

مقدمه:

ویروالانس مهم، کم در نظر گرفته شد (۲۴). هر چند نتایج مطالعات اخیر پیشنهاد نموده که ژن‌های سیتولیزین خاموش از ایزوله‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* ممکن است یک پروفیل منفی فنوتیپی را نشان دهد، یعنی فاقد فعالیت همولیتیک بر روی محیط آگار خوندار باشد، ولی فاکتورهای محیطی نظیر آن چه که در محل عفونت رخ می‌دهد ممکن است باعث فعالیت ژن‌ها گردد (۲۵). هدف از این مطالعه تعیین فاکتورهای ویروالانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری بود. در این مطالعه رابطه بالقوه بین تشکیل بیوفیلم و نقش بالینی *انتروکوکوس فکالیس* در مجاری ادراری و نیز تولید بیوفیلم و آنزیم های خارج سلولی، همولیزین و ژلاتیناز تعیین گردید.

مواد و روش ها:

این مطالعه توصیفی بر روی ۶۰۰ نمونه ادرار از بیماران بستری در بیمارستان شهید بهشتی کاشان، که میزان گلبول‌های سفید در آزمایش ادرار مساوی یا بیشتر از ۵ در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی زیاد ($WBC \geq 5/hpf$) بود، انجام پذیرفت. نمونه‌های ادرار بر روی محیط های آگار خون دار و آگار اتوزین متیلن بلو کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌های با رشد بیش از ۱۰۰۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر ادرار، با رنگ آمیزی گرم، تست حساسیت به باسیتراسین، حساسیت به تری متوپریم-سولفامتاکسازول (SXT)، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵ درصد، تست هیدرولیز ال-پیرولیدونیل-بتا-نفتیل آمید (PYR)، رشد در دمای ۴°C، رشد بر روی محیط بایل اسکولین، تعیین هویت شدند. ۹۵ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* انتخاب و برای فاکتورهای ویروالانس تولید بیوفیلم، تولید همولیزین و تولید آنزیم ژلاتیناز بررسی شدند. فعالیت ژلاتیناز با رشد باکتری بر روی محیط حاوی ۳ درصد ژلاتین مشخص گردید چند کلنی خالص بر روی محیط حاوی ژلاتین به صورت زیگزاگ کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. بعد از این مدت با اضافه کردن یک میلی لیتر از محلول اسید هیدروکلریک در صورت مشاهده هاله شفاف اطراف خط کشت نتیجه مثبت تلقی گردید. به منظور سنجش بیوفیلم *انتروکوکوس فکالیس* رشد یافته در محیط Trypticase soy broth (TSB) حاوی ۰/۵ درصد گلوکز به نسبت ۱/۴۰ با محیط TSB حاوی ۰/۵ درصد گلوکز رقیق گردید. سپس ۲۰۰ μl از سوسپانسیون حاصل به گوده های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و

انتروکوکوس فکالیس از اعضاء فلور نرمال روده انسان بوده و قادر است عفونت‌های بیمارستانی ایجاد کند (۵-۱). اگرچه پاتوژنیسته *انتروکوکوس فکالیس* در عفونت‌های ادراری خیلی مورد توجه نمی‌باشد ولی فراوانی آن در بسیاری از گزارشات بیش از ۲۰ درصد ایزوله‌های ادراری را تشکیل می‌دهد (۸-۶). چندین فاکتور ویروالانس در *انتروکوکوس فکالیس* توصیف شده که شامل ترکیبات (Esp)، پروتئین سطحی *انتروکوک* (Agg aggregation)، سیتولیزین (Cyl) که دارای فعالیت باکتریسیدال، همولیتیک بوده و آنزیم ژلاتیناز است (۳ و ۴). حدس زده می‌شود که این فاکتورها به طور همگرایی به واسطه تسهیل دسترسی به *quorum* و فعال نمودن تنظیم *quorum-sensing*، ویروالانس باکتری را افزایش دهند. این امر منجر به صدمات بافتی و تهاجم عمقی تر باکتری می‌گردد (۹-۱۲). مطالعات اخیر نشان داده که *انتروکوکوس فکالیس* بیوفیلم تشکیل می‌دهد و سیستم *quorum-sensing* کنترل کننده توسعه بیوفیلم، در *انتروکوکوس فکالیس* می باشد (۱۷-۱۳). پروتئین سطحی *انتروکوک* که توسط ژن *esp* کروموزومی رمزدهی می‌شود با افزایش بیماریزایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است (۱۳ و ۱۹-۱۷). تولید سیتولیزین به طور قابل توجهی شدت اندوکاردیت و اندوفالمت را در مدل حیوانی تشدید نموده و باعث شدت بیماری *انتروکوک* در انسان می‌گردد (۱ و ۲۰ و ۲۱). پروتئین سطحی *انتروکوک* در اتصال اولیه و تشکیل بیوفیلم *انتروکوکوس فکالیس* دخالت دارد (۱۳). نقش پروتئین سطحی در کلونیزه شدن و بقای *انتروکوکوس فکالیس* در عفونت های مجاری ادراری در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است (۱۹). پروتئین سطحی، در مقادیر بالا در ایزوله‌های مولد اندوکاردیت و باکتری می مشاهده شده ولی به ندرت در ایزوله‌های مدفوعی افراد سالم مشاهده می‌گردد (۲۲). آنزیم ژلاتیناز، توسط ژن *gelE* کروموزومی رمزدهی می‌شود. این آنزیم یک متالوپروتئاز روی خارج سلولی است که کلاژن، ژلاتین و پپتیدهای کوچک را هیدرولیز می‌کند (۱) و در تشکیل اندوکاردیت در مدل‌های حیوانی نقش دارد (۱ و ۲۳ و ۲۴). تشکیل بیوفیلم به سلول‌ها اجازه می‌دهد در شرایط نامساعد زنده بمانند (۲۵). تحقیقات اپیدمیولوژی نقش سیتولیزین را در وقوع بیماری تایید می‌کند. در مطالعه‌ای سیتولیزین در مقایسه با ایزوله‌های اندوکاردیت و نمونه مدفوع افراد سالم، بیشتر در ایزوله‌های باکتری می دیده شده است (۲۲). Coque و همکاران هیچ اختلافی را در بروز سیتولیزین در بین ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* از اندوکاردیت، باکتری می و یا نمونه مدفوع افراد سالم مشاهده نکردند (۲۶). در مطالعه دیگری فقط ۱۶ درصد از ایزوله‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* سیتولیزین تولید کرده و نقش این پروتئین به عنوان فاکتور

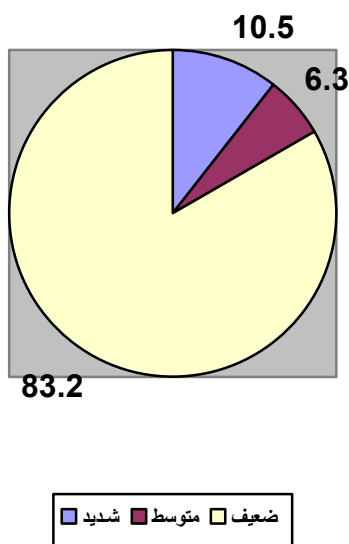
شد که ۹۵ سویه (۸۳/۳٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۹ سویه (۱۶/۷٪) *انتروکوکوس فسیوم* بود. سن بیماران مورد مطالعه ۲۸/۰۶±۳۹/۲۰ سال و از حداقل ۱ ماه تا حداکثر ۹۱ سال متغیر بود. ۴۸ نفر از بیماران مرد (۵۰/۵٪) و ۴۷ نفر زن (۴۹/۵٪) بودند. ۵ نفر (۵/۳٪) دارای سوند ادراری بودند. ۱۶ نفر (۱۶/۸٪) سابقه مصرف آنتی بیوتیک داشتند.

۴۲ سویه (۴۴/۲٪) دارای همولیز بودند: ۳۵ سویه (۳۵/۸٪) همولیز بتا، ۷ سویه (۷/۴٪) همولیز آلفا. ۵۳ سویه (۵۶/۸٪) فاقد همولیز بودند. میانگین و انحراف معیار تشکیل بیوفیلم در دانسیته اپتیک ۴۹۰، ۰/۱۱±۰/۰۷ و از حداقل ۰/۰۰۲ تا حداکثر ۰/۹۹۴ متغیر بود. از ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس* ۱۰ سویه (۱۰/۵٪) بیوفیلم قوی (بیشتر از ۰/۲)، ۶ سویه (۶/۳٪) بیوفیلم متوسط (کمتر از ۰/۲ و بیشتر از ۰/۱) و ۷۹ سویه (۸۳/۲٪) بیوفیلم ضعیف (کمتر از ۰/۱) تولید نمودند (نمودار ۱). ۱۹ سویه (۲۰٪) آنزیم زلاتیناز تولید کردند. رابطه بین ظرفیت تولید بیوفیلم در ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های ادرار و فاکتورهای ویروالانس و خصوصیات دموگرافیک بیماران در جدول ۱ ارائه شده است.

در دمای °C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. میکروپلیت سه مرحله توسط آب مقطر استریل شسته و بعد به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود. بیوفیلم اتصال یافته با افزودن ساfranین ۰/۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه رنگ آمیزی شد. سپس سه مرحله با آب مقطر استریل شسته شد تا رنگ اضافی حذف و بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، جذب نوری بیوفیلم بر روی سطح ته گوده پلیت خشک شده در ۹۰ OD با ELISA Reader قرائت گردید. محیط کشت TSB بدون باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. هر آزمایش در سه مرحله در سه روز متفاوت تکرار گردید. سپس میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. از *Entrococcus faecalis* ATCC ۲۹۲۱۲ به عنوان شاهد استفاده گردید (۲۷ و ۲۸). اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی و با آزمون آماری مجذور کای و آزمون دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها:

از ۶۰۰ نمونه ادرار کشت شده، ۱۱۴ سویه *انتروکوک* (۱۹٪) جدا



نمودار ۱: درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه های ادرار

جدول ۱: رابطه بین ظرفیت تولید بیوفیلم در سویه های ایتروکوکوس فکالیسی جدا شده از نمونه های ادرار، فاکتورهای ویرولانسی و خصوصیات دموگرافیک بیماران

P value	جمع تعداد (%)	بیوفیلم ضعیف تعداد (%)	بیوفیلم شدید و متوسط تعداد (%)	تشکیل بیوفیلم در OD 490 خصوصیات دموگرافیک
۰/۶۱۶	۴۷ (۱۰۰)	۴۰ (۸۵/۱)	۷ (۱۴/۹)	جنس زن
	۴۸ (۱۰۰)	۳۹ (۸۱/۲)	۹ (۱۸/۸)	مرد
۰/۶۷۶	۵۲ (۱۰۰)	۴۴ (۸۴/۶)	۸ (۱۵/۴)	سن (سال) ۸-۴۰
	۴۳ (۱۰۰)	۳۵ (۸۱/۴)	۸ (۱۸/۶)	۴۱-۹۱
۰/۷۲۹	۱۶ (۱۰۰)	۱۳ (۸۱/۲)	۳ (۱۸/۸)	مصرف آنتی بیوتیک دارد
	۷۹ (۱۰۰)	۶۶ (۸۳/۵)	۱۳ (۱۶/۵)	ندارد
≧۱	۵ (۱۰۰)	۴ (۸۰)	۱ (۲۰)	استفاده از کاتتر ادراری دارد
	۹۰ (۱۰۰)	۷۵ (۸۳/۳)	۱۵ (۱۶/۷)	ندارد
۰/۱۰۵	۴۲ (۱۰۰)	۳۸ (۹۰/۵)	۴ (۹/۵)	تولید همولیزین دارد
	۵۳ (۱۰۰)	۴۱ (۷۷/۴)	۱۲ (۲۲/۶)	ندارد
≧۱	۱۹ (۱۰۰)	۱۶ (۸۴/۲)	۳ (۱۵/۸)	تولید آنزیم ژلاتیناز دارد
	۷۶ (۱۰۰)	۶۳ (۸۲/۹)	۱۳ (۱۷/۱)	ندارد
	۹۵ (۱۰۰)	۷۹ (۸۳/۲)	۱۶ (۱۶/۸)	جمع

بحث:

نگردید. *Coque* و همکاران گزارش نمودند که همولیزین در ۱۳ درصد و ژلاتیناز در ۵۳ درصد ایزوله های ایتروکوکوس فکالیسی جدا شده از نمونه های ادرار مشاهده شده است (۲۶). *Vergis* و همکاران گزارش نمودند که در سویه های ایتروکوکوس فکالیسی، فراوانی همولیزین ۱۷/۹ درصد (۶۳ سویه از ۳۵۲ سویه)، و ژلاتیناز ۴۷/۴ درصد (۱۶۷ سویه از ۳۵۲ سویه) بوده است (۲۷). *Seno* و همکاران نشان داد که بین وجود پروتئین سطحی ایتروکوک و ژلاتیناز و توانایی سویه ها در تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط قوی وجود دارد (۲۸). در مطالعه *Kristich* و همکاران نشان داده شده است که سویه ی فاقد پروتئین سطحی قادر است در سطوح بی جان مستقل از پروتئین سطحی ایتروکوک تشکیل بیوفیلم دهد و ژلاتیناز باعث افزایش تشکیل بیوفیلم در ایتروکوکوس فکالیسی می گردد (۱۴). همچنین مشخص شده که پروتئین سطحی ایتروکوک برای تشکیل بیوفیلم ضروری نبوده ولی وجود آن با

ایتروکوک مهم ترین عامل عفونت های بیمارستانی است. اگرچه ایتروکوکوس فکالیسی به ندرت عفونت های ادراری جدی ایجاد می کند ولی، جدا سازی آن از عفونت های ادراری بیماران بستری رو به افزایش است (۸-۶). استفاده از سوندهای ادراری در بیماران بستری، باعث افزایش عفونت های ادراری در بیمارستان گردیده و اهمیت تشکیل بیوفیلم و ارتباط آن با پاتوژنیسیته ایتروکوکوس فکالیسی را در عفونت ادراری مشخص می کند. بیوفیلم زمانی به وجود می آید که سلول ها در سطح کلونیزه شده تجمع یافته و یا به صورت چند سلولی رشد نمایند و خود را در یک ماتریکس پلی ساکارییدی خارجی جای دهند (۲۶). در مطالعه ما بیوفیلم شدید و متوسط در ۱۶/۸ درصد، ژلاتیناز در ۲۰ درصد و همولیزین در ۴۴/۲ درصد از سویه ها مشاهده شد. بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط و فاکتورهای سن، جنس، مصرف قبلی آنتی بیوتیک، استفاده از کاتتر و تولید همولیزین و آنزیم ژلاتیناز ارتباط معنی داری مشاهده

پاسخ به هر فاکتور باکتریایی مداخله‌گر در چسبندگی اجزای ماتریکس خارج سلولی به میزبان، دخالت دارد (۲۹).

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط و فاکتورهای سن، جنس، مصرف قلی آنتی بیوتیک، استفاده از کاتتر، تولید همولیزین و آنزیم ژلاتیناز همگرایی وجود ندارد. هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم ویرولانسی، معرفی نشد. لذا، به نظر می رسد اثرات آنها تجمعی می باشد.

تشکیل مقادیر بالایی از بیوفیلم همراه بوده است (۱۵). Trendolkar و همکاران بیان نمودند که پروتئین سطحی انتروکوک، به عنوان یک فاکتور کلیدی برای توانایی انتروکوکوس فکالیس در تشکیل بیوفیلم، در یک وضعیت وابسته به گلوکز می باشد (۱۷). در مطالعه Seno و همکاران ظرفیت تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های دارای پروتئین سطحی به طور قابل توجهی بیشتر از ایزوله‌های فاقد پروتئین سطحی بود (۲۹). در صورتی که Trendolkar و همکاران چنین اثر همگرایی را بین ژلاتیناز و پروتئین سطحی انتروکوک بر روی تشکیل بیوفیلم نشان ندادند (۱۷). تشکیل بیوفیلم به وسیله انتروکوک نه تنها در وسایل پزشکی بلکه در

فهرست مراجع:

- Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE. Enterococcal virulence. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE and Rice LB eds. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington DC; ASM.2002; PP: 301-354.
- Hancock LE and Gilmore MS: Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI eds. *Gram positive pathogens*. Washington DC; ASM.2000; PP: 251-258.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence, antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 513-522.
- Huycke MM, Sahm DF and Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem, agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 239-249.
- Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 37-47.
- Ronald A: The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; **113**: 14S-19S.
- National Nosocomial Infections Surveillance System: National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999; **27**: 520-532.
- Gatermann SG. Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci in urinary tract infections. In: Mobley HLT, Warren JW, eds. *Molecular pathogenesis and clinical management*. Washington DC; ASM.1996; pp: 313-340.
- Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; **415**: 84-87.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000; **68**: 2579-2586.
- Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2001; **41**: 145-154.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* 2001; **183**: 3372-3382.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 4538-4545.
- Kristich CJ, Li Y-H, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 154-163.
- Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and

- various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 3658-3663.
16. Hancock LE , Perego M. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5629-5639.
 17. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS , Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 6032-6039.
 18. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G , Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; **67**: 193-200.
 19. Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS , Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001; **69**: 4366-4372.
 20. Coburn PS , Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 2003; **5**:661-669.
 21. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonne F, *et al.* In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* 2002; **153**:75-80.
 22. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995; **34**:152-156.
 23. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**:39-42.
 24. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001; **67**(4):1628-35.
 25. Hall-Stoodley L, Costerton JW , Stoodley P. Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**:95-108
 26. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM , Murray BE. incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococcus isolated from patients with endocarditis and other infection and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 1995; **171**:1223-1229
 27. Vergis EN, Shanker N, Chow JW, Hayden MK, Sndman DR, Zervos MJ *et al* . Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis*. 2002; **35**: 570-575
 28. Seno y, Kariyama R , Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H . Clinical Implications of Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis* in the Urinary Tract *Acta Med* . Okayama 2005; **59** (No) 3: 79 - 87.
 29. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R , Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence to *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 2004; **72**:5877-5885

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سروگروه های *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن، جدا شده از مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال در تهران ۸۷-۱۳۸۶

محمد حسن شیرازی^۱، ابوالفضل اکبری^۱، محمد کاظم شریفی یزدی^۲، مصطفی حسینی^۳، فاطمه فرد صانعی^۱، روناک بختیاری^۱، محمد مهدی سلطان دلال^{۱*}

۱) بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳) گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده رابط: محمد مهدی سلطان دلال، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه

علوم پزشکی تهران

تلفن: ۶۶۴۶۲۲۶۸ soltanirad34@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۰

چکیده:

زمینه و اهداف: *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن (*Enteropathogenic E.coli: EPEC*) یکی از عوامل عمده اسهال کودکان در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه می باشد که گاهی موجب بیماری شدید و یا حتی مرگ می شود. سروگروه ها و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری ها در نواحی جغرافیایی مختلف، متفاوت می باشد. آگاهی از الگوی توزیع این سویه ها و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها جهت به کارگیری مناسب آنتی بیوتیک ها ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین سروگروه های غالب EPEC جدا شده از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال در تهران و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها انجام گرفت. **روش بررسی:** ۲۷۸ نمونه اسهال کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان علی اصغر (ع) تهران جمع آوری و از لحاظ وجود سروگروه های EPEC با آزمون های باکتری شناسی و سرولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون آنتی بیوگرام این سویه ها با استفاده از ۱۶ آنتی بیوتیک با روش انتشار دیسک صورت گرفت.

یافته ها: از ۲۷۸ نمونه مدفوع در ۱۹ نمونه (۶/۸٪) EPEC جدا شد که بیشترین فراوانی آن مربوط به کودکان زیر ۱ سال و بیشترین سروگروه آن سروگروه IV بود. بیشترین میزان حساسیت سویه ها (۱۰۰٪) نسبت به ایمی پنم و مروپنم و بیشترین میزان مقاومت (۶۳/۲٪) نسبت به نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آموکسی سیلین مشاهده شد. همچنین ۱۷ سویه (۸۹/۵٪) به سفنازیدیم و جنتامایسین حساس بودند.

نتیجه گیری: اکثر سویه ها مقاومت کامل و یا متوسط به نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آموکسی سیلین دارند. این مقاومت در حال افزایش است. جهت درمان قطعی و عدم بروز مقاومت روزافزون سویه های پاتوژن، تعیین الگوی آنتی بیوتیکی این سویه ها ضروری است.

کلید واژه ها: *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن، مقاومت آنتی بیوتیکی، اسهال، کودکان

مقدمه:

و از لحاظ وجود /شریشیاکلی مورد آزمایش قرار گرفت. پس از اخذ نمونه‌ها، مشخصات مربوط به هر یک (شامل تاریخ مراجعه، نوع اسهال، سن، جنس، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و مدت زمان بستری) ثبت گردید. نمونه‌ها بر روی محیط‌های انتخابی انتروباکتریاسه نظیر هکتون انتریک آگار (شرکت MERCK) کشت داده شد و با کمک محیط‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، MR/VP، SIM، اوره، سیمون سیترات و لیزین به عنوان /شریشیاکلی مورد تایید واقع شدند.

سروتایپینگ سویه‌های جدا شده با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی و چند دودمانی (شرکت تولیدی و پژوهشی بهار افشان تهران) با روش آگلوتیناسیون بر روی لام انجام شد. برای انجام تست سرولوژی ابتدا یک قطره از آنتی‌سرم بر روی لام گذاشته شد، چند کلونی خالص شده از کشت ۱۸ ساعته باکتری از محیط کشت TSI برداشته و کاملاً با آنتی‌سرم مخلوط شد. در صورت آگلوتینه شدن قطره آنتی‌سرم پس از ۴۰ ثانیه، سروگروه باکتری شناسایی شد. سپس تست آنتی بیوگرام، با استفاده از روش انتشار در دیسک (به روش کربی-بایر) و براساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (Clinical and laboratory standards institute- CLSI) (۱۱)، در برابر ۱۶ دیسک آنتی بیوتیکی (شرکت MAST) صورت گرفت.

فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سروگروه‌های /شریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (NAL)، تری متوپریم - سولفامتوکسازول (SxT)، سیپروفلوکساسین (CIPR)، استرپتومایسین (S)، کلیستین سولفات (C)، سفوناکسیم (CTX)، تتراسایکلین (TET)، ایمی پنم (IMI)، مروپنم (MRP)، سفالکسین (CFX)، آموکسی‌سیلین (A)، سفنازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CTR)، کلرامفنیکل (CO)، نیتروفورانتوئین (NI) و جنتامایسین (GEN) بررسی شد.

یافته‌ها:

از بین ۲۷۸ نمونه اسهال، ۱۹ سویه (۶/۸٪) /شریشیاکلی جدا شد، که با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی به عنوان سویه‌های انتروپاتوژنیک (EPEC) شناسایی گردید.

از مجموع سویه‌های EPEC به ترتیب ۱۲ سویه (۶۳/۲٪) متعلق به سروگروه پلی IV (O20, O114)، ۴ سویه (۲/۲۱٪) متعلق به

اسهال هنوز هم به عنوان یکی از رایج‌ترین (۱۵ تا ۲۰٪) عوامل مرگ و میر در بین کودکان زیر ۵ سال است که عامل ۵ تا ۱۰ میلیون مرگ و میر در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین می‌باشد (۱). عوامل اتیولوژیک اسهال شامل طیف وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها است. از بین عوامل بیماری‌زای باکتریایی، /شریشیاکلی مولد اسهال (Diahreagenic Escherichia coli : DEC) در این دسته بندی جایگاه ویژه‌ای دارد و یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان است. سویه‌های DEC را می‌توان براساس خصوصیات ویرولا‌نس، وابستگی سروتیپی، ویژگی‌های بالینی و اپیدمیولوژیک به شش پاتوتایپ عمده دسته بندی کرد (۲) پاتوتایپ /شریشیاکلی انتروپاتوژن (enteropathogenic Escherichia coli :EPEC) عامل عمده اسهال کودکان در کشورهای توسعه نیافته است، اما به طور روزافزون در کشورهای توسعه یافته نیز شناسایی می‌شود (۳، ۴ و ۵). از شناسایی سروتیپ‌های EPEC به کمک آنتی‌سرم‌های اختصاصی آنتی ژن O به عنوان ابزار مفیدی در مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود. تاکنون حدود ۱۶۰ سروتیپ /شریشیاکلی شناخته شده است (۵). در مطالعات متعدد گزارش شده است که EPEC در کودکان زیر ۵ سال (به ویژه زیر یک سال) عامل عمده ایجاد اسهال پایدار و مزمن می‌باشد (۹ و ۶-۹).

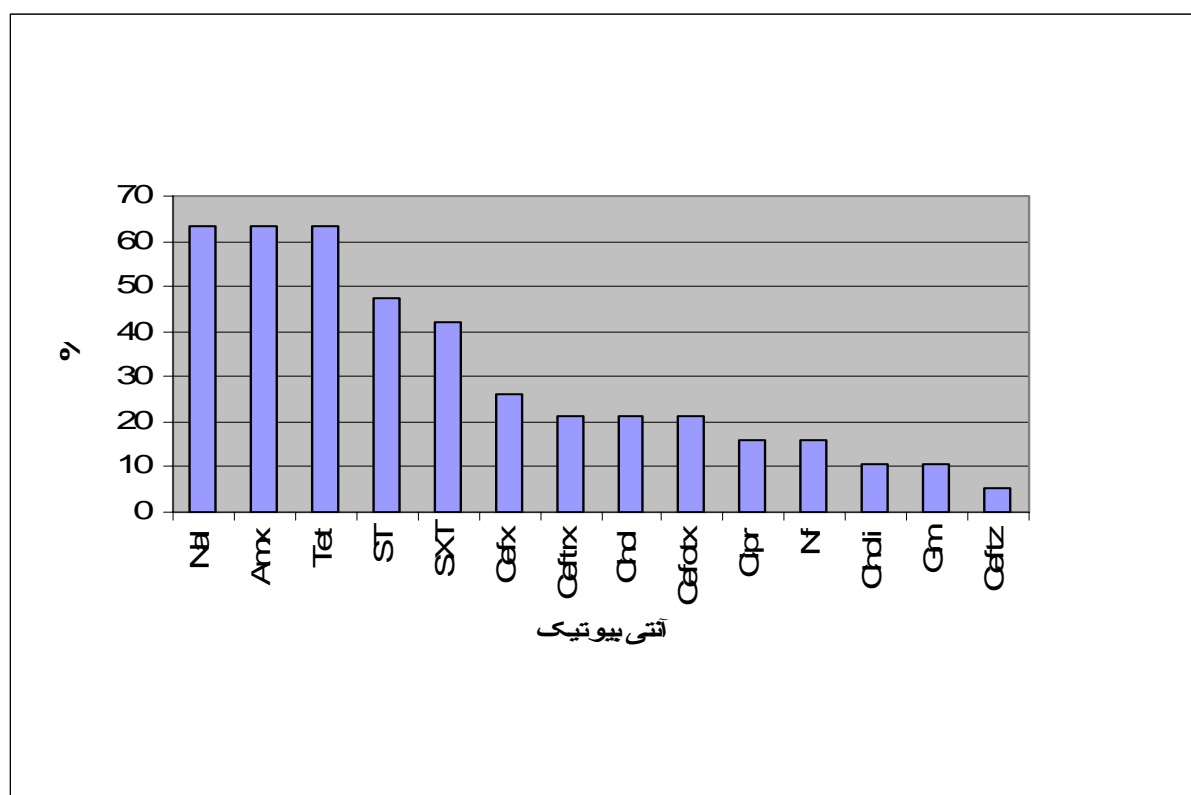
افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های پاتوژن به ویژه در کودکان به عنوان یکی از مشکلات بهداشت جهانی محسوب می‌شود. مقاومت آنتی بیوتیکی EPEC، به علت شیوع زیادی که در کودکان زیر ۵ سال دارد، حائز اهمیت است (۱۰). با توجه به مطالعات متعدد جهانی، از جمله در کشور ما، شیوع EPEC در اسهال کودکان زیر پنج سال قابل توجه می‌باشد (۳-۱۰ و ۱۱). شناسایی عوامل باکتریایی مولد اسهال و انجام آزمون تعیین حساسیت آنتی‌میکروبی آنها می‌تواند به درمان بموقع و مناسب بیماری و به‌کارگیری تدابیر بهداشتی، به منظور پیشگیری و کنترل آنها، منجر شود. از این رو هدف از این مطالعه تعیین سروگروه‌های غالب EPEC جدا شده از کودکان زیر ۵ سال شهر تهران و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها بود.

مواد و روش‌ها:

۲۷۸ نمونه اسهال کودکان زیر ۵ سال به مدت ۴ ماه (از فروردین تا تیر ماه ۱۳۸۷) از بیمارستان علی اصغر (ع) تهران جمع‌آوری شد

کلرامفنیکل: ۲۱/۱٪، سفوتاکسیم: ۲۱/۱٪، سیپروفلوکساسین: ۱۵/۸٪، نیتروفورانتوئین: ۱۵/۸٪، کلیستین سولفات: ۱۰/۵٪، جنتامایسین: ۱۰/۵٪، سفنازیدیم: ۵/۳٪ (نمودار ۱). تمامی سرگروه‌ها به طور کامل به ایمی پنم و مروپنم حساس بودند. همچنین ۸۹/۵٪ سویه‌ها (۱۷ سویه) کاملاً به سفنازیدیم و جنتامایسین حساس بودند.

سرگروه پلی III (O44, O125, O126, O128)، ۲ سویه (۱۰/۵٪) متعلق به سرگروه پلی I (O26, O55, O111) و ۱ سویه (۵/۳٪) متعلق به سرگروه پلی II (O86, O127) بودند. بیشترین فراوانی EPEC مربوط به کودکان زیر ۱ سال و بیشترین سرگروه مربوط به سرگروه IV بود. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سرگروه‌های EPEC جدا شده به شرح ذیل بود: نالیدیکسیک اسید: ۶۳/۲٪، آموکسی سیلین: ۶۳/۲٪، تتراسایکلین: ۶۳/۲٪، استرپتومایسین: ۴۷/۴٪، تری متوپریم - سولفامتوکسازول: ۴۲/۱٪، سفالکسین: ۲۶/۳٪، سفتریاکسون: ۲۱/۱٪.



نمودار ۱: درصد مقاومت سویه‌های اشریشیاکلی انتروپاتوزن نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

، تری متوپریم_سولفامتوکسازول: SXT ، استرپتومایسین: ST ، تتراسایکلین: Tet ، آموکسی سیلین: Amx ، نالیدیکسیک اسید: Nal ، نیتروفورانتوئین: Nf ، سیپروفلوکساسین: Cipro ، سفوتاکسیم: Cefotx ، کلرامفنیکل: Chol ، سفتریاکسون: Cftz ، سفالکسین: Cefx ، سفنازیدیم: Cftz ، جنتامایسین: Gm ، کلیستین: Choli

بحث:

آگاهی پزشکان در هر کشور و یا منطقه خاص از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا در اتخاذ راهکارهای مناسب درمانی اهمیت بسزایی دارد. سرگروه‌های مختلف EPEC عامل عمده اسهال نوزاد انسان در کشورهای توسعه نیافته می‌باشند، اما به طور روزافزون در کشورهای توسعه یافته نیز شناسایی

بیشترین سویه‌های مورد مطالعه به سرگروه IV تعلق دارند. تمام سرگروه‌ها به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم حساس بودند. بیشترین میزان مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آموکسی سیلین مشاهده شد. چند سویه مقاوم به سفنازیدیم هم یافت شد.

می‌شوند (۳). عفونت ناشی از EPEC معمولا در ارتباط با اسهال پایدار و مزمن در کودکان، به‌ویژه دامنه سنی زیر یک سال است (۵). معمولا الگوی توزیع جغرافیایی سروتیپ‌های EPEC ایجادکننده اسهال در سراسر دنیا متفاوت می‌باشد. از این رو بایستی به منظور کنترل دقیق بیماری ناشی از این سویه‌ها، سروتیپ‌های شایع در هر منطقه شناسایی شود. از شناسایی سروتیپ‌های EPEC به کمک آنتی سرم‌های اختصاصی آنتی ژن O، به‌عنوان ابزار مفیدی در مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود (۵). شایع‌ترین سروتیپ‌های EPEC ایجادکننده اسهال در نوزادان شامل O126, O127, O114, O111, O56, O86, O26 و... می‌باشند (۱۲).

در این مطالعه ۱۹ سویه (۶/۸ درصد) متعلق به سروگروه‌های EPEC جدا شد که بیشترین فراوانی آنها مربوط به کودکان زیر ۱ سال بود. در مطالعه قبلی ما (۹۹-۱۹۹۸)، EPEC در اسهال کودکان زیر پنج سال به‌عنوان شایع‌ترین پاتوژن باکتریایی و به میزان ۶/۸ درصد در کل موارد اسهال کودکان شهرستان اسلام شهر در جنوب تهران گزارش شد (۱) که با نتایج این مطالعه که در منطقه دیگری از شهر تهران انجام گرفت، کاملا همخوانی دارد. نصرالهی و شریف در ساری (۱۳۷۷)، شیوع سروگروه‌های EPEC در کودکان زیر یک سال را ۱۲ درصد (از کل عوامل ایجاد کننده اسهال) گزارش نمودند (۱۳). در مطالعه برجیان در بروجن (۱۳۷۷) میزان شیوع EPEC در کودکان زیر ۲ سال ۳۰/۴۳ درصد گزارش شد (۱۴). منصور (۱۳۷۲) در مطالعه خود EPEC را به‌عنوان شایع‌ترین (۴۹ درصد) عامل اسهال باکتریایی در کودکان زیر ۵ سال شهر کرمان گزارش نمود (۱۵). فاگونز و همکاران (۱۹۹۵) فراوانی پاتوتایپ EPEC را در کودکان زیر یک سال برزیل ۴۲ درصد گزارش نمودند (۱۶). در مطالعه یوسفی مشعوف و مشتاقی (۸۴-۱۳۸۲، همدان) EPEC به‌عنوان شایع‌ترین عامل باکتریایی (۶۷/۸ درصد) اسهال گزارش شد (۱۷). در سال ۱۹۹۶ کراویوتو و همکاران میزان اسهال ناشی از EPEC را در کودکان زیر یک سال ۵۱/۳ درصد گزارش نمودند (۱۸).

در مطالعه حاضر بیشترین سروگروه EPEC جدا شده مربوط به سروگروه O20, O114) IV بود. با توجه به مطالعات متعددی که قبلا صورت گرفته است، در شیوع سروگروه‌ها و سروتیپ‌های EPEC در مناطق جغرافیایی مختلف، تنوع وجود دارد. در مطالعه نصرالهی و شریف، ۵۰ درصد سویه‌ها متعلق به سروگروه پلی I (O26, O55, O111) بودند (۱۳). ما در مطالعه قبلی خود (۹۹-۱۹۹۸) سروتیپ‌های O26, O55, O119, O127, O111 را به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ‌های EPEC در اسهال کودکان زیر ۲ سال جنوب شهر تهران گزارش نمودیم (۱۹). در مطالعه فاگونز، بیشترین (حدود ۵۰ درصد) سویه‌های جدا شده به سروگروه O128, O111, O119, O25, O111 تعلق داشتند (۱۶). یوسفی مشعوف سروتیپ O128 را به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ EPEC در اسهال کودکان گزارش می‌کند (۱۷).

در مطالعه حاضر بیشترین میزان حساسیت سروگروه‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمپنم و مروپنم و بیشترین میزان مقاومت آنها (۶۳/۲ درصد) نسبت به نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین مشاهده شد. همچنین ۸۹/۵ درصد سروگروه‌ها (۱۷ مورد) به سفنازیدیم و جنتامایسین حساس بودند. در مطالعه یوسفی مشعوف، موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها ایمپنم، جنتامایسین، نیتروفوران‌توئین و سفتریاکسون بودند و بیشترین مقاومت نسبت به تری متوپریم - سولفامتوکسازول، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل بود (۱۷). در مطالعه مویندین مقاومت به استرپتومایسین (۶۴/۳ درصد) و تتراسایکلین (۵۳/۶ درصد) بیشتر بود و هیچ یک از سویه‌ها به نالیدیکسیک اسید و سولفامتوکسازول مقاوم نبودند. مقاومت به آموکسی‌سیلین ۳۹/۳ درصد و به کلرامفنیکل ۱۰/۷ درصد بود (۲۰). در مطالعه جعفری و همکاران (۱۹۹۲ در انستیتو پاستور ایران) مقاومت سروتیپ‌های EPEC به آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌قرار زیر گزارش شد: ۱/۶ درصد به جنتامایسین، ۷۹/۶ درصد به استرپتومایسین، ۸۸/۱ درصد به تری متوپریم - سولفامتوکسازول، ۶۹/۵ درصد به تتراسایکلین، ۵۲/۵ درصد به کلرامفنیکل و ۹۱ درصد به آمپی‌سیلین. در این مطالعه هیچ سروتیپ مقاوم به نالیدیکسیک اسید مشاهده نشد (۲۱). در مقابل در مطالعه ما ۶۳/۲ درصد سروگروه‌ها به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که این حاکی از افزایش روز افزون مقاومت به این آنتی بیوتیک و احتمالا تنوع الگوی توزیع سویه‌های مختلف در زمان‌ها و مکان‌های مختلف است. در مطالعه جلالی در تبریز روند افزایش مقاومت سروتیپ‌های EPEC به تری متوپریم - سولفامتوکسازول و کاهش مقاومت به تتراسایکلین و کانامایسین مشاهده شد. که این ممکن است در نتیجه تنوع ناحیه‌ای در انتخاب درمان آنتی بیوتیکی باشد (۲۲). حدود ۷۵ درصد سروتیپ‌های EPEC در آمریکا به حداقل یک دارو و ۶۴ درصد به چند دارو مقاوم اند. ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو به ۲ دلیل زیر می‌تواند موجب نگرانی سازمان بهداشت جهانی باشد: محدودیت در انتخاب درمان در بیماری شدید و ظهور روز افزون سویه‌های مقاوم به چند دارو که حاکی از توانایی پاتوژن‌ها در انتقال عناصر مقاومت بین این سویه‌ها می‌باشد (۲۰).

در این مطالعه ۱۹ سویه (۶/۸ درصد) متعلق به سروگروه‌های EPEC جدا شد که بیشترین فراوانی آنها مربوط به کودکان زیر ۱ سال بود. در مطالعه قبلی ما (۹۹-۱۹۹۸)، EPEC در اسهال کودکان زیر پنج سال به‌عنوان شایع‌ترین پاتوژن باکتریایی و به میزان ۶/۸ درصد در کل موارد اسهال کودکان شهرستان اسلام شهر در جنوب تهران گزارش شد (۱) که با نتایج این مطالعه که در منطقه دیگری از شهر تهران انجام گرفت، کاملا همخوانی دارد. نصرالهی و شریف در ساری (۱۳۷۷)، شیوع سروگروه‌های EPEC در کودکان زیر یک سال را ۱۲ درصد (از کل عوامل ایجاد کننده اسهال) گزارش نمودند (۱۳). در مطالعه برجیان در بروجن (۱۳۷۷) میزان شیوع EPEC در کودکان زیر ۲ سال ۳۰/۴۳ درصد گزارش شد (۱۴). منصور (۱۳۷۲) در مطالعه خود EPEC را به‌عنوان شایع‌ترین (۴۹ درصد) عامل اسهال باکتریایی در کودکان زیر ۵ سال شهر کرمان گزارش نمود (۱۵). فاگونز و همکاران (۱۹۹۵) فراوانی پاتوتایپ EPEC را در کودکان زیر یک سال برزیل ۴۲ درصد گزارش نمودند (۱۶). در مطالعه یوسفی مشعوف و مشتاقی (۸۴-۱۳۸۲، همدان) EPEC به‌عنوان شایع‌ترین عامل باکتریایی (۶۷/۸ درصد) اسهال گزارش شد (۱۷). در سال ۱۹۹۶ کراویوتو و همکاران میزان اسهال ناشی از EPEC را در کودکان زیر یک سال ۵۱/۳ درصد گزارش نمودند (۱۸).

در مطالعه حاضر بیشترین سروگروه EPEC جدا شده مربوط به سروگروه O20, O114) IV بود. با توجه به مطالعات متعددی که قبلا صورت گرفته است، در شیوع سروگروه‌ها و سروتیپ‌های EPEC در مناطق جغرافیایی مختلف، تنوع وجود دارد. در مطالعه نصرالهی و شریف، ۵۰ درصد سویه‌ها متعلق به سروگروه پلی I (O26, O55, O111) بودند (۱۳). ما در مطالعه قبلی خود (۹۹-۱۹۹۸) سروتیپ‌های O26, O55, O119, O127, O111 را به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ‌های EPEC در اسهال کودکان زیر ۲ سال جنوب شهر تهران گزارش نمودیم (۱۹). در مطالعه فاگونز، بیشترین (حدود ۵۰ درصد) سویه‌های جدا شده به سروگروه O128, O111, O119, O25, O111 تعلق داشتند (۱۶). یوسفی مشعوف سروتیپ O128 را به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ EPEC در اسهال کودکان گزارش می‌کند (۱۷).

در مطالعه حاضر بیشترین میزان حساسیت سروگروه‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمپنم و مروپنم و بیشترین میزان مقاومت آنها (۶۳/۲ درصد) نسبت به نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین مشاهده شد. همچنین ۸۹/۵ درصد سروگروه‌ها (۱۷ مورد) به سفنازیدیم و جنتامایسین حساس بودند. در مطالعه یوسفی مشعوف، موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها ایمپنم، جنتامایسین، نیتروفوران‌توئین و سفتریاکسون بودند و بیشترین مقاومت نسبت به تری متوپریم - سولفامتوکسازول، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل بود (۱۷). در مطالعه مویندین مقاومت به استرپتومایسین (۶۴/۳ درصد) و تتراسایکلین (۵۳/۶ درصد) بیشتر بود و هیچ یک از سویه‌ها به نالیدیکسیک اسید و سولفامتوکسازول مقاوم نبودند. مقاومت به آموکسی‌سیلین ۳۹/۳ درصد و به کلرامفنیکل ۱۰/۷ درصد بود (۲۰). در مطالعه جعفری و همکاران (۱۹۹۲ در انستیتو پاستور ایران) مقاومت سروتیپ‌های EPEC به آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌قرار زیر گزارش شد: ۱/۶ درصد به جنتامایسین، ۷۹/۶ درصد به استرپتومایسین، ۸۸/۱ درصد به تری متوپریم - سولفامتوکسازول، ۶۹/۵ درصد به تتراسایکلین، ۵۲/۵ درصد به کلرامفنیکل و ۹۱ درصد به آمپی‌سیلین. در این مطالعه هیچ سروتیپ مقاوم به نالیدیکسیک اسید مشاهده نشد (۲۱). در مقابل در مطالعه ما ۶۳/۲ درصد سروگروه‌ها به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند که این حاکی از افزایش روز افزون مقاومت به این آنتی بیوتیک و احتمالا تنوع الگوی توزیع سویه‌های مختلف در زمان‌ها و مکان‌های مختلف است. در مطالعه جلالی در تبریز روند افزایش مقاومت سروتیپ‌های EPEC به تری متوپریم - سولفامتوکسازول و کاهش مقاومت به تتراسایکلین و کانامایسین مشاهده شد. که این ممکن است در نتیجه تنوع ناحیه‌ای در انتخاب درمان آنتی بیوتیکی باشد (۲۲). حدود ۷۵ درصد سروتیپ‌های EPEC در آمریکا به حداقل یک دارو و ۶۴ درصد به چند دارو مقاوم اند. ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو به ۲ دلیل زیر می‌تواند موجب نگرانی سازمان بهداشت جهانی باشد: محدودیت در انتخاب درمان در بیماری شدید و ظهور روز افزون سویه‌های مقاوم به چند دارو که حاکی از توانایی پاتوژن‌ها در انتقال عناصر مقاومت بین این سویه‌ها می‌باشد (۲۰).

ملی و جهانی جهت به کارگیری راهکارهای درمانی منطبق بر حساسیت این باکتری‌ها مفید می‌باشد.

نتیجه گیری:

شیوع بالای سروگروه‌های EPEC در اسهال کودکان زیر ۵ سال حاکی از نقش بااهمیت آنها در ایجاد بیماری است. لازم است در آزمون‌های روتین آزمایشگاهی و در کنار مطالعات اپیدمیولوژیک، تست‌های سرولوژی سویه‌های EPEC بیشتر مورد استفاده قرار گیرند. از طرفی با توجه به تنوع در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تنوع در الگوی توزیع و انتشار سروتیپ‌های مختلف EPEC در نواحی جغرافیایی، و روند افزایش روز افزون مقاومت این سویه‌ها به تری متوپریم - سولفامتوکسازول، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید و تتراسایکلین بایستی در مصرف این آنتی‌بیوتیک‌ها دقت نمود. به منظور درمان کامل و جلوگیری از گسترش اسهال ناشی از این سویه‌های مقاوم در کودکان، انجام دقیق تست‌های آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک و پرهیز از مصرف بی رویه و خودسرانه این آنتی بیوتیک‌ها ضروری است.

تقدیر و تشکر:

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

در مطالعه ماندوماندو (بارسلونای اسپانیا ۲۰۰۶) مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های EPEC جدا شده از کودکان زیر ۵ سال به شرح زیر بود: آمپی سیلین ۷۱ درصد، کلرامفنیکل ۳۶ درصد، سولفامتوکسازول ۵۷ درصد و تتراسایکلین ۵۷ درصد (۲۳). در مطالعه جوردی ویلا (تانزایا ۱۹۹۹) بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی DEC در کودکان زیر ۵ سال، تمامی سویه‌های اشیریشیاکلی به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین حساس بودند اما مقاومت به آمپی سیلین و تری متوپریم - سولفامتوکسازول بسیار بالا (۹۰/۴ درصد) بود (۲۴). در مقابل، در مطالعه حاضر ۱۵/۸ درصد سویه‌ها به طور کامل به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. از آنجایی که در این مطالعه چند سویه مقاوم به نالیدیکسیک مشاهده شد انتظار می‌رود تا در آینده‌ای نه چندان دور سویه‌های مقاوم به سرعت ظهور یابند. تنوع در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است ناشی از تنوع در سروتیپ‌های غالب مسؤل اسهال کودکان و مدیریت متفاوت موارد اسهال در نواحی خاص و گاهی درمان بدون آنتی‌بیوتیک بیماری باشد.

در مطالعه ما چند سویه (۵/۳ درصد) مقاوم به سفنازیدیم مشاهده شد که این مسئله می‌تواند در صورت عدم توجه به مصرف بموقع و مناسب این آنتی‌بیوتیک در آینده‌ای نزدیک منجر به ظهور روزافزون سویه‌های مقاوم شود. در اکثر مطالعات، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک نظیر تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید، آمپی سیلین، تری متوپریم - سولفامتوکسازول و آموکسی سیلین بالا است. یکی از مشکلات مربوط به این سویه‌ها در آینده می‌تواند مقاومت به چند دارو باشد. لذا، چنین مطالعاتی نه تنها در تحقیقات اپیدمیولوژی و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف در نواحی جغرافیایی مختلف، بلکه در طراحی سیاست‌های سلامت

فهرست مراجع:

1. Soltan-Dallal MM. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. *Arch Irrn Med.* 2001;**4**(4). 201-203.
2. Bueris V, Palma Sircili M, Taddei C.R, Fernandes M, Franzolin M.R, Mrtinez M, Ramos S, Rachid Trabulsi L. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;**102**(7):839-844.
3. Prère MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O. Bacterial etiology of diarrhea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. *Pathol Biol (Paris).* 2006;**54**(10):600-602.
4. Unsworth KE, Mazurkiewicz P, Senf F, Zettl M, McNiven M, Way M, Holden DW. Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Microbiol.* 2007;**9**(2):438-439.

5. Hoque SS, Faruque AS, Mahalanabis D, Hasnat A. Infectious agents causing acute watery diarrhea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. *J Trop Pediatr*. 1994;**40**(6):351-354.
6. Ruchaud-Sparagano MH, Maresca M, Kenny B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell Microbiol*. 2007;**9**(8):1909-1921.
7. Guth BE, Giraldi R, Gomes TA, Marques LR. Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC. *Can J Microbiol*.;**40**(5):341-344.
8. Dow MA, Toth I, Malik A., Herpay M, No grady N, Ghenghesh K.S, Nagy B. Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Libya a Comparative Immunology, *Microbio Infect Dis*.2006 , **29** :100-113.
9. Tawfeek HI, Najim NH, Al-Mashikhi S. Studies on diarrhoeal illness among hospitalized children under 5 years of age in Baghdad during 1990-97. *East Mediterr Health J*. 2002;**8**(1):181-188.
10. Kumarasinghe G, Lim YS, Chow C, Bassett DC. Prevalence of bacterial agents of diarrhoeal disease at the National University Hospital, Singapore and their resistance to antimicrobial agents. *Trop Geogr Med* 1992;**44**(3):229-232.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS documents M 100 – SIS, 940 West Valley Road. Wayne, PA, 19087 USA. 2005.
12. Gonzalez R, Diaz C, Marino M, Cloralt R, Pequenezze M, Perezschael I. Age-Specific Prevalence of *Escherichia coli* with Localized and Aggregative Adherence in Venezuelan Infants with Acute Diarrhea. *J Clini Microbiol* 1997; **35**(5): 1103–1107.
۱۳. نصرالهی م. و شریف م. شیوع اسهال ناشی از اشریشیاکلی انتروپاتوژن در کودکان زیر یک سال مراجعه کننده به مراجع درمانی ساری (۷۷-۱۳۷۶). مجله دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی- درمانی قزوین. ۱۳۷۹، شماره ۱۳، صفحه ۶۸-۶۳.
۱۴. برجیان س. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های شیگلا و اشریشیاکلی انتروپاتوژن جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال
- مراجعه کننده به بیمارستان ولی عصر عج بروجن ۱۳۷۷. مجله دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی استان زنجان، ۱۳۷۸، شماره ۲۶ و ۲۷، صفحه ۴۸-۵۵.
۱۵. منصوری ش. بررسی باکتری های مولد اسهال در کودکان زیر پنج سال در شهر کرمان. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۳، شماره ۳، صفحه ۱۱۳-۱۰۸.
16. Fagundes Neto U, Schmitz LG, Scaletsky I. Clinical and epidemiological characteristics of acute diarrhea by classical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev Assoc Med Bras*. 1995; **41**(4):259-265.
۱۷. یوسفی مشعوف ر. و مشتاقی ع.الف. سروگروپینگ باکتری های پاتوژن روده ای عامل اسهال ایزوله شده از کودکان و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۸۶، شماره ۴، صفحه ۱۲-۷.
18. Cravioto A, León LA, Hernández JM, Eslava C. Gac Med Mex Infections caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Gac Med Mex*. 1996;**132**(6):611-615.
19. Soltan Dallal MM, Khorramizadeh MR, MoezArdalan K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran. *East Mediterr Health J*. 2006;**12**(6): 792-797.
20. Moyenuddin M, Wachsmuth K, Stevel L, Moseley Cheryl A, Paul A. Serotype, Antimicrobial Resistance, and Adherence Properties of *Escherichia coli* Strains Associated with Outbreaks of Diarrheal Illness in Children in the United States. *J Clin Microbiol* 1989; **27**(10):2234-2239.
21. Jafari A, Bouzari S, Farhodi-Moghaddam A.A. Drug resistance in diarrhogenic *Escherichia coli* (ETEC, EPEC). *Ira J Med Sci*. 1992. Vol.17, Nos **1,2**:84-87.
22. Jalali A, Nikvash S. Prevalence of drug resistance in Salmonella, Shigella and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients feces in the medical center for children (Tabriz, Iran). *Med J Tabriz University* 1998; **22**:118-122.
23. Mandomando M, Eusebio V, Joaquim R, Sergi S, Fatima A, Xaviera V, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(3): 522–527.
24. Jordi V, Martha V, Climent C, Honorato U,

Hassan M, David S, *et al.* Antimicrobial resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 Years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**(12):3022–3024.

سروتایپینگ سویه‌های *Streptococcus pneumoniae* جدا شده از عفونت‌های مختلف در تهران در سال ۱۳۸۷

علی مهربانی توانا^{۱*}، رمضانعلی عطائی^۲، اسمعیل حسین نجدگرامی^۲، محمد مهدی گویا^۳، محمد رهبر^۵

(۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)
(۲) مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)
(۳) گروه بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
(۴) مرکز مدیریت بیماری های واگیر، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
(۵) آزمایشگاه مرجع سلامت
نویسنده رابط: علی مهربانی توانا، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)
همراه: ۰۹۱۲۱۰۹۷۳۵۸ mehrrab@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: استرپتوکوکوس پنمونیه باکتری پاتوژنی است که به طور عمده سبب عفونت گوش میانی، پنمونی، و مننژیت می‌شود. همچنین این باکتری دومین عامل عمده مننژیت در کودکان زیر دو سال است. براساس تفاوت‌های آنتی‌ژنیک در پلی ساکراید های کپسولی این باکتری بیش از ۹۰ سروتیپ شناسایی شده است. انتشار سروتیپ ها براساس گروه‌های سنی، علائم بالینی و مناطق جغرافیایی متغیر است. هدف از این مطالعه تشخیص سروتیپ‌های غالب استرپتوکوکوس پنمونیه مسبب بیماری‌های مختلف در تهران در سال ۱۳۸۷ بود.

روش بررسی: در این تحقیق ۵۰ ایزوله استرپتوکوکوس پنمونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی استان تهران جمع آوری شد و مجدداً مورد تأیید قرار گرفت. سپس ایزوله‌ها به روش استاندارد تورم کپسول (کوالانگ) سروتایپینگ شدند (براساس دستورالعمل انستیتو سرم (SSI) دانمارک). اطلاعات حاصل تجزیه و تحلیل و نتیجه گیری شد.

یافته‌ها: از ۵۰ ایزوله استرپتوکوکوس پنمونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی استان تهران ۱۸ ایزوله (۳۶٪) از دستگاه تنفس، ۱۳ ایزوله (۲۶٪) از عفونت های خونی، ۱۰ ایزوله (۲۰٪) از عفونت چشم و ۷ ایزوله (۱۴٪) از سایر عفونت‌ها بودند. شایع ترین سروتیپ‌ها 6A و 6B بودند. سروتیپ غالب در بزرگسالان ۲ و در کودکان گروه ۱۹ (شامل 19B, 19A, 19F 19C) بود. سروتیپ‌های غالب برحسب نوع عفونت به ترتیب گروه های ۷، ۱۹ و سروتیپ ۴ در عفونت‌های دستگاه تنفس، چشم و خون بودند.

نتیجه گیری: سروتیپ غالب گروه ۶ است که بین کودکان و بزرگسالان مشترک می باشد.

کلید واژه ها: استرپتوکوکوس پنمونیه، تایپینگ، سروتیپ

مقدمه:

استرپتوکوکوس پنمونیه باکتری پاتوژنی است که به طور عمده باعث ایجاد عفونت گوش میانی و پنمونی می‌شود. این باکتری دومین عامل عمده مننژیت در کودکان زیر دو سال هم هست (۱ و ۲). شروع پنمونی پنموکوکمی معمولاً ناگهانی و همراه با تب و لرز، درد شدید در ناحیه سینه، خلط آجری رنگ و یا خونی مشابه ترشحات آئولولی است. در اوائیل بیماری که تب بالاست در حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد موارد، باکتری می‌هم مشاهده می‌شود. پس از به کار بردن آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه در مواردی که دارو سریع تجویز می‌شود، بیمار کاملاً بهبود می‌یابد و از پیشرفت ضایعه ریوی جلوگیری می‌شود (۳). در ایالات متحده آمریکا و اروپا ۲۵ الی ۴۰ درصد از مننژیت‌ها را پنموکوک ایجاد می‌کند. اخیراً بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنیک در پلی‌ساکاریدهای کپسولی پنموکوک بیش از ۹۰ سروتپ شناسایی شده است. انتشار سروتپ‌ها بر اساس گروه‌های سنی، علائم بالینی و مناطق جغرافیایی متغیر است. تفاوت‌های ناحیه‌ای در شیوع سروتپ‌های اختصاصی و فهم سروتپ‌های هر ناحیه جغرافیایی بسیار مهم است (۴). پنموکوک از طریق مجاری تنفسی می‌تواند به سایر نقاط بدن راه یابد. سینوس‌ها و گوش داخلی بیش از همه در معرض خطر هستند. این باکتری همچنین از طریق خون یا ماستوئید به مننژ رسیده و ایجاد مننژیت می‌کند. باکتری پنموکوک گاهی عوارض شدیدی مانند مننژیت، اندوکاردیت و آرتریت عفونی ایجاد می‌کند. امروزه اندوکاردیت حاد پنموکوکمی به علت استفاده بموقع آنتی‌بیوتیک‌ها به ندرت دیده می‌شود (۷-۵). استرپتوکوکوس پنمونیه دارای ۴۰ سروگروه و ۹۰ سروتپ است. لذا، در طراحی واکسن پلی‌والان موثر اطلاعات اپیدمیولوژیک، پتانسیل تغییرپذیری آنتی‌ژن‌های انحصاری، امکان تداخل آنتی‌ژنیک، و امکان پذیرش فناوری باید به دقت مد نظر قرار بگیرد (۹ و ۸). اساس طبقه‌بندی سروتپ‌های استرپتوکوکوس پنمونیه، ترکیبات شیمیایی آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی کپسول است (۱۰ و ۱۱). و با آنکه شیوع سروتپ‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی فرق می‌کند، اما عفونت‌های پنموکوکمی فقط توسط تعداد محدودی از سروتپ‌ها ایجاد می‌شود (۱۲-۱۴).

به مشکلات فنی نگهداری ارگانیزم و دسترسی به آنتی‌سرم‌های لازم جهت تایپینگ آن به عنوان مشکلاتی که در فرا روی این کار قرار دارند، می‌توان اشاره کرد. لذا، بررسی اولیه به صورت یک مطالعه پایلوت و با هدف تعیین سروتپ‌های غالب استرپتوکوکوس پنمونیه، در بیماری‌های مختلف نظیر اوتیت میانی، باکتری، عفونت چشم، سپتی‌سمی و غیره، انجام شد.

مواد و روش‌ها:

ضمن هماهنگی با آزمایشگاه‌های مراکز آموزشی درمانی مستقر در تهران طی ۱۸ ماه (از مهر ماه ۱۳۸۶ الی اسفند ماه ۱۳۸۷) تنها ۵۰ سویه استرپتوکوکوس پنمونیه از بیماران جداسازی شدند. پس از آزمایش‌های تشخیصی اولیه، سویه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) منتقل شدند. با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و دیسک‌های اپتوشین و باسیتراسین شناسایی دقیق صورت گرفت. با بررسی روش‌های مختلف سروتایپینگ (۱۷-۱۵)، از روش استاندارد کوآلنگ استفاده شد. آنتی‌سرم‌ها از انستیتو سرم دانمارک (Statens Serum Institut = SSI) خریداری شدند. اطلاعات حاصل برای تجزیه و تحلیل و نتیجه‌گیری به رایانه منتقل و تصویر روشنی از انتشار استرپتوکوکوس پنمونیه در مراکز درمانی آموزشی استان تهران حاصل شد. از سوی دیگر، برای داشتن بانکی از سویه‌های جمع‌آوری شده، که بتوان آنها را درازمدت و برای مصارف متعدد نگه‌داری کرد، سویه‌ها لیوفیلیزه شدند. با توجه به امکانات خوب و استاندارد سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران حدود ۱۱ ویال از هر نمونه و در حدود ۳۵ سویه لیوفیلیزه شدند.

یافته‌ها:

۱۸ سویه (۳۶٪) از دستگاه تنفس، ۱۳ سویه (۲۶٪) از عفونت‌های خون، ۱۰ سویه (۲۰٪) از عفونت چشم و ۹ سویه (۱۸٪) از سایر عفونت‌ها جدا شده بودند. فرآیند مورد استفاده برای سروتایپینگ سویه‌های استرپتوکوکوس پنمونیه سامانه شطرنجی استاندارد انستیتو SSI بود. (جدول ۱).

جدول ۲ فراوانی و نوع تیپ یا گروه را برای ۵۰ سویه نشان می‌دهد.

سویه شماره ۵۰ با هیچکدام از آنتی‌سرم‌ها واکنش نداد و به عنوان مجهول منظور شد. این سویه که سروتپ آن مجهول بود در جدول فوق لحاظ نشد.

توزیع فراوانی سروتپ‌ها به تفکیک اندام‌های مختلف در نمودار ۱ ارایه شده است.

سروتپ‌های جدا شده از گروه‌های اطفال و بزرگسالان در جدول

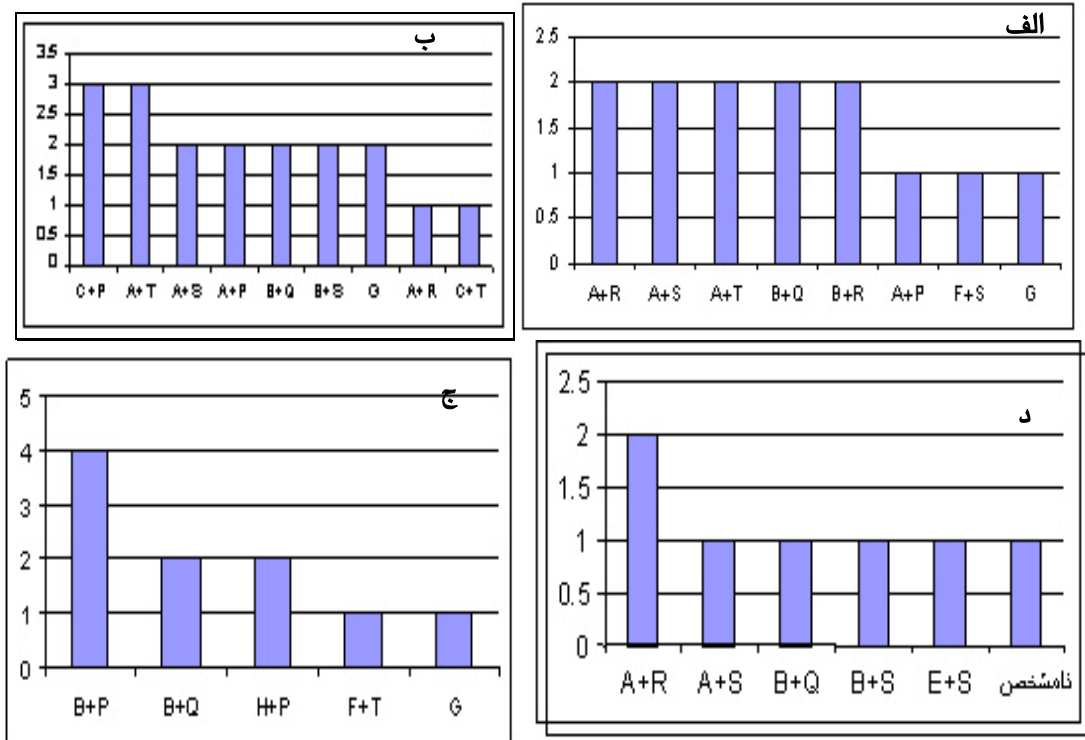
۳ نشان داده شده‌اند.

جدول ۱: سامانه شطرنجی برای تعیین تیپ یا گروه بندی پنموکوک

	P	Q	R	S	T	تیپ های غیر واکسنی
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24,* 31, 40
D			9*		11*	16,* 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32,* 41*
H	14	23*		15*		13, 28*
G						29,34,35,*42, 47*
I						25,38,43,44,45,46, 48

جدول ۲: فراوانی و نوع تیپ یا گروه سویه ها

	P	n	Q	n	R	n	S	N	T	n		
A	1	4	18*	1	4	4	5	5	2	5		
B	19*	4	6	6	3	3	8	3				
C	7*	3							20	2		
D					9*				11*			
E					12*		10*	1	33*			
F							17*	1	22*	1		
H	14	2	23*				15*					
G											29,34,35,*42,47*	4
I		13		7		7		10		8		49



نمودار ۱: توزیع فراوانی سروتیپ‌ها به تفکیک نوع عفونت.

(الف) دستگاه تنفس، (ب) دستگاه گردش خون، (ج) عفونت چشم، (د) سایر عفونت‌ها

جدول ۳: سروتیپ‌های جدا شده از اطفال و بزرگسالان

سروتیپ‌های جدا شده از اطفال	سروتیپ‌های جدا شده از بزرگسالان
۱	۱
۴	۴
۶A و ۶B	۶A و ۶B
۷F	۷F
۱۴	۱۴
۱۹F	۱۹F
۲۳F	۲۳F
۵	۳
۱۸C	۸
۱۹A	۹V

بحث :

بیشترین سویه‌ها از عفونت‌های تنفسی و خونی هستند و شایع‌ترین سروتیپ‌ها A ۶ و B ۶ هستند. سروتیپ غالب در بزرگسالان ۲ و در کودکان گروه ۱۹ (شامل ۱۹ C, ۱۹ F, ۱۹ A, ۱۹ B) است. نتایج موید عملکرد بهینه سروتایپینگ به روش شطرنجی است. زیرا ضمن صرفه جویی در مصرف آنتی‌سرم، سروتایپینگ و گروه‌تایپینگ بیش از ۹۵ درصد سویه‌ها موفقیت آمیز بوده است. نشان داد بیماری‌های شایع پنموکوکمی توسط تعداد قلیلی از سروتیپ‌های /ستریپتوکوکوس پنمونیه ایجاد می‌شود. این مطلب مورد تأیید محققین بین‌المللی نیز می‌باشد (۱۸ و ۱۹). سویه‌هایی که با آنتی‌سرم G واکنش داده‌اند جزو سویه‌های واکنسی ۲۳ والان یا ۷ والان کونزوگه محسوب نمی‌شوند. براساس یافته‌های مشابه، محققین ساخت واکنس به فکر طراحی و ساخت واکنس‌های پلی‌والان و کونزوگه برای این باکتری افتاده‌اند. زیرا بیش از ۹۰ درصد بیماری‌های پنموکوکمی توسط تعداد معدودی از آنها ایجاد می‌شود.

تایپینگ به روش سامانه شطرنجی به کارآیی بسیار بالای این روش در تعیین تیپ یا گروه تمام سویه‌های /ستریپتوکوکوس پنمونیه بر می‌گردد (۱۲، ۲۰ و ۲۱). در تحقیقی که سازمان بهداشت جهانی بر روی ۱۰۰۰۰ سویه جمع‌آوری شده انجام داده است، در سروتایپینگ، فقط حدود ۵ درصد از سویه‌ها با هیچکدام از آنتی‌سرم‌ها واکنش نداده‌اند (۲۱). این میزان در مطالعه حاضر ۲ درصد است، که احتمالاً این تفاوت ناشی از تعداد کم نمونه باشد. از وضعیت تیپ‌های /ستریپتوکوکوس پنمونیه در کشورهای درحال توسعه و به‌ویژه کشورهای آسیای میانه و خاورمیانه اطلاعی در دست نیست. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در جهان در جریان می‌باشد. مطالعه در نیپال تیپ‌های غالب را به ترتیب

۱۹ A و ۱۲ F و ۱۹ B گزارش می‌کند (۲۲). مطالعات مشابه در مکزیک (۲۳) گامبیا (۲۴) و کره شمالی (۲۵) به وجود سویه‌های غالب در کشورهای خود پرداخته‌اند که می‌توانستند با واکنسیناسیون پیشگیری کنند.

نتیجه‌گیری:

بیشترین سویه‌ها متعلق به تیپ‌های B+Q می‌باشد که موسوم به گروه ۶ است. این گروه دارای دو سروتیپ A ۶ و B ۶ می‌باشد که بین کودکان و بزرگسالان مشترک است. بیشترین سویه‌های دریافتی از بزرگسالان مربوط به دستگاه تنفس و عمدتاً به تیپ ۲، و بیشترین سویه‌های دریافتی از کودکان مربوط به عفونت‌های چشمی و از گروه ۱۹ با ۴ تیپ مختلف (شامل ۱۹ C, ۱۹ B, ۱۹ A, ۱۹ F) است.

از کاستی‌های این تحقیق می‌توان به بررسی تعداد اندکی از سویه‌های /ستریپتوکوکوس پنمونیه اشاره کرد. اما، با توجه به ادامه مطالعه امید است که این نقیصه در آینده رفع شود.

تقدیر و تشکر:

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی مرکز بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه و نیز مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر و وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی انجام شده است. لذا، محققین بر خود لازم می‌دانند که از حامیان و سایر همکاران از جمله اساتید محترم آقایان دکتر مصطفی قانع، دکتر علی کریمی و دکتر رضا رنجبر تشکر و سپاسگزاری نمایند.

فهرست مراجع:

1. Giorgi Rossi P, Mantovani J, Ferroni E, Forcina A, Stanghellini E, Curtale F, et al. Incidence of bacterial meningitis (2001–2005) in Lazio, Italy: the results of a integrated surveillance system. *BMC Infectious Diseases* 2009, **9**:13. is available in <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/13>
2. Klemets P, Lyytikäinen O, Ruutu P, Ollgren J, Nuorti P. Invasive pneumococcal infections among persons with and without underlying medical conditions: Implications for prevention strategies. *BMC Infectious Diseases* 2008, **8**:96. is available in <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>

3. Hger H L, Woolley T W, Berk S L. Review of recent pneumococcal infections with attention to vaccine and nonvaccine serotypes. *Rev Infect Dis* 1990; **12**: 267-272.
4. Nielsen S V, and Henrichsen J. Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. *Clin Infect Dis* 1992; **15**(5):794-798.
5. Black S B, Shinefield H R, Hansen J, Elvin L, Laufer D, Malinoski F. Post licensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *J Pediatr Infect Dis* 2001; **20**:1105-1107.
6. Robbins J. B, Austrian R, Lee C J, Rastogi S C, Schiffman G, Henrichsen J, *et al.* Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on cross-reactivity types within groups. *J Infect Dis* 1983; **148**:1136-1159.
7. Steinberg J J, Levine D S, Desiderio D, Hanna B A. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* recovered from a large urban hospital population: the Bellevue experience from 1973-1984. *Lab Med* 1988; **19**:741-743.
8. Nascimento-Carvalho CM, Freitas-Souza LS, Moreno-Carvalho OA, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG, *et al.* Cepas invasivas de pneumococo isoladas de crianças e adolescentes em Salvador. *J Pediatr (Rio J)* 2003; **79**:209-14.
9. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol* 1997; **35**:764-766.
10. Butler J C, Breiman R F, Campbell J F, Lipman H B, Broome C V, Facklam R R. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. *JAMA* 1993; **70**:1826-1831
11. Appelbaum P C. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992; **5**:77-83.
12. Bruyn G A W, Zegers B J M, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992; **14**:251-262.
13. Austrian R. The enduring *pneumococcus*: unfinished business and opportunities for the future. *Microb Drug Resist* 1997; **3**:111-115.
14. Black S B, Shinefield H R, Hansen J, Elvin L, Laufer D, Malinoski F. Post licensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *J Pediatr Infect Dis* 2001; **20**:1105-1107.
15. Coffey T J, Dowson C G, Daniels M, Zhou J, Martin C, Spratt B G, *et al.* Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991; **5**: 2255-2260.
16. Klein J O. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis* 1981; **3**: 246- 253
17. Sniadack D H, Schwartz B, Lipman H, Bogaerts J, Butler J C, Dagan R, *et al.* Potential intervention for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children implications for vaccine strategies. *J Pediatr Infect Dis* 1995; **14**: 503- 510.
18. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2759- 2762.
19. Bernard B, McEllistrem M C, Gertz E R, Wedel S, Boxrud J D, Gonzalez L A, *et al.* Pre- and Post vaccination Clonal Compositions of Invasive Pneumococcal Serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J Clin Microbiol* 2006; **44** (3): 999-1017 .
20. Arai S, Konda T, Wada A, Mastunga Y, Okabe N, Watanabe H, *et al.* Use of antiserum-coated latex particle for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Immunol* , 2001; **45**: 159- 162.
21. Garenne M, Ronsmans C, and Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat Q* 1992; **45**:180-191.
22. Shah AS, Knoll MD, Sharma PR, Moisi JC, Kulkarni P, Lalitha MK, *et al.* Invasive pneumococcal disease in Kanti Children's Hospital, Nepal, as observed by the South Asian Pneumococcal Alliance network. *Clin Infect Dis* 2009; **48**(Suppl 2):S123-S128.
23. Rodgers GL, Mercado G, Bierschwale H, Paradiso P. Comment on "Serotypes and susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Mexico". *Salud Publica Mex* 2009; **51**(1): 4.
24. Antonio M, Oluwalana C, Secka O, Corrah T, Howie S, Adegbola RA. Exogenous re-infection by a novel *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 as a cause of recurrent meningitis in a child from The Gambia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; **20**; 8:3. available in <http://www.annclinmicrob.com/content/8/1/3>
25. Song JH, Baek JY, Cheong HS, Chung DR, Peck KR, Ko KS. Changes of serotype and genotype in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a Korean hospital in 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **63**(3):271-278.

ارزیابی آلودگی بستنی سنتی به اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در شهرستان سمنان سال ۱۳۸۶-۷

وحیده افراز^۱، علی جزایری مقدس^{۲*}، غلامرضا ایراجیان^۳

۱) آزمایشگاه مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

۲) بخش میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

۳) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

نویسنده رابط: علی جزایری مقدس، بخش میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

همراه: ۰۹۱۲۴۳۸۸۱۸۸ sa_jazayery@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۸

چکیده:

زمینه و اهداف: بستنی محصولی لبنی و منجمد شده است که از ترکیب و فرآیند مناسب شیر، خامه، شکر و مواد طعم دهنده به دست می آید و می تواند حاوی پایدار کننده ها و رنگ نیز باشد. این فرآورده با توجه به مواد تشکیل دهنده و PH نزدیک به خنثی و نگهداری طولانی مدت، محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم ها محسوب می گردد. هدف از این مطالعه ارزیابی کیفیت بستنی سنتی (غیر پاستوریزه) عرضه شده در شهرستان سمنان از نظر آلودگی به اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بود.

روش بررسی: تعداد ۱۳۶ نمونه در طول دو سال (۸۷-۱۳۸۶) از سطح شهرستان سمنان نمونه برداری و در شرایط استریل به آزمایشگاه مواد خوراکی، آشامیدنی، آرایشی و بهداشتی منتقل شد. نمونه ها از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی طبق استاندارد های ملی ایران بررسی شدند.

یافته ها: از مجموع ۱۳۶ نمونه بستنی، ۹۶ نمونه (۷۰/۶ درصد) به اشیریشیاکلی، ۵۳ نمونه (۳۸/۹ درصد) به استافیلوکوکوس اورئوس و ۵۲ نمونه (۳۸/۲٪) نیز به هر دو باکتری آلوده بودند. ۳۹ نمونه (۲۸/۷٪) فاقد آلودگی بودند.

نتیجه گیری: میزان آلودگی بستنی های مورد بررسی به استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی زیاد و در اغلب موارد از بررسی های مشابه بیشتر است.

کلیدواژه ها: بستنی سنتی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیاکلی، آلودگی، مسمومیت غذایی

مقدمه:

E. coli یکی از شاخص‌هایی است که برای تعیین آلودگی میکروبی بستنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. *E. coli* شایع‌ترین باکتری فلور طبیعی می‌باشد که به عنوان عامل بیماری‌زای انسانی، از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری، زخم، پنمونی، مننژیت و سپتی‌سمی جدا شده و همچنین سویه‌های خاصی از آن باعث گاستروانتریت می‌گردد (۸).

هدف از این مطالعه ارزیابی کیفیت بستنی غیر پاستوریزه (سنتی) عرضه شده در شهرستان سمنان از نظر آلودگی به اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی مقطعی ۱۳۶ نمونه در طول دو سال (۱۳۸۶ و ۱۳۸۷) بررسی شدند. نمونه‌ها به طور مستمر از سطح شهرستان سمنان، توسط کارشناسان مرکز بهداشت شهرستان، و بر اساس رعایت اصول بهداشتی (تحت شرایط استریل، نگهداری نمونه‌ها در جعبه یخی پس از نمونه برداری تا رساندن آنها به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی استان، در زمان حداکثر ۵ ساعت) جمع‌آوری شدند. نمونه‌های ارسالی پس از توزین به میزان ۱۰ گرم در شیشه‌های استریل و رعایت شرایط آسپتیک با ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر مخلوط می‌گردید. این مخلوط پس از ده دقیقه جهت بررسی وجود استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی مورد آزمایش قرار می‌گرفت.

برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس از محیط‌های کشت کوکمیت و برد پارکر استفاده شد. در این روش یک میلی‌لیتر از رقت مورد نظر به لوله در پیچ دار حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محسوط کوکمیت اضافه می‌شد، و ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شد. پس از این مدت ۰/۵ میلی‌لیتر از آن در سطح محیط برد پارکر کشت داده می‌شد، و ۳۰ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردید. ایجاد پرگنه‌های سیاه براق با لبه نازک سفید و هاله شفاف در اطراف آن مشخصه استافیلوکوکوس می‌باشد. برای آزمون‌های تاییدی از تست کوآگولاز با پلاسماي خرگوش و تخمیر هوازی ویبی هوازی مانیتول در محیط Mannitol Salt Agar استفاده شد (۷).

برای بررسی وجود اشریشیاکلی از محیط‌های LST (Lauryl Sulfate Tryptose Broth) با غلظت دو برابر

شیر و فرآورده‌های آن یکی از گروه‌های غذایی اصلی برای تامین بسیاری از مواد مغذی ضروری مانند کلسیم و ویتامین B2 محسوب می‌شود. ارزش غذایی بستنی به اجزاء تشکیل دهنده آن و همچنین به ارزش مواد اولیه‌ای بستگی دارد که در ساخت بستنی مصرف می‌شود (۱). بستنی تقریباً حاوی ۱۲ درصد چربی، ۱۱ درصد شیر بدون چربی، ۱۵ درصد شکر و یا شیرین کننده‌های دیگر و ۳ درصد امولسیفایر و قوام دهنده می‌باشد، که به صورت سنتی و صنعتی تهیه می‌گردد (۲).

این فرآورده با توجه به مواد متشکله و PH نزدیک به خنثی و نگهداری طولانی مدت، محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها است. از طرفی نحوه تولید بستنی‌های سنتی با استفاده از شیر غیر پاستوریزه و آلودگی در حین تولید، این ماده غذایی را از جمله عوامل مهم بروز مسمومیت‌های غذایی قرار داده است (۳). آلودگی بستنی در مراحل مختلف تولید رخ می‌دهد. در تولید صنعتی، بستنی در مراحل پاستوریزاسیون، فریز کردن و سخت شدن (Hardening) به میکروارگانیسم‌ها آلوده می‌گردد. اما در تولید سنتی احتمال آلودگی بیشتر است (۴).

در ایران تولید بستنی‌های غیر پاستوریزه تحت عنوان بستنی سنتی که به روش دستی تهیه می‌شود بسیار رایج بوده و مصرف آن در ماه‌های گرم سال زیاد می‌شود. آلودگی این محصول به میکروارگانیسم‌های پاتوژن سبب مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی شده، سلامت افراد را به خطر انداخته، و موجب زیان‌های اقتصادی و اجتماعی قابل توجه می‌گردد (۵).

مسمومیت غذایی، بیماری حاد ناشی از عدم رعایت بهداشت مواد غذایی است که عوامل باکتریایی یکی از علل مهم به‌وجود آورنده آن می‌باشند (۶). استافیلوکوکوس اورئوس در آب، هوا، گرد و خاک، شیر و سایر مواد غذایی و فاضلاب یافت می‌شود. محل زندگی آن بیشتر در پوست، بینی و دستگاه تنفسی (قسمت فوقانی) انسان و حیوانات است. این باکتری بعد از اشریشیاکلی مهم‌ترین منشاء آلودگی غذاهای انسان می‌باشد (۴). بیشتر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در تراکم‌های نسبتاً بالا از کلرور سدیم (۷/۵٪ الی ۱۰٪) رشد کرده و قادر به تخمیر مانیتول هستند (مانیتول مثبت). این صفت در بازشناسی استافیلوکوکوس اورئوس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که مانیتول منفی است به کار می‌رود. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نظر شکل مانند استافیلوکوکوس اورئوس است ولی کوآگولاز منفی می‌باشد (۷).

تست‌ها شامل کشت در محیط افتراقی TSI، اندول، متیل رد، وی پی و سیمون سیترات (IMVIC) بود. نتایج برای اشریشیا کلی به صورت زیر است: TSI؛ اسید/اسید، H₂S منفی، گاز+. IMVIC: اندول و متیل رد مثبت، وی پی و سیترات منفی (۹).

یافته ها:

با توجه به آزمون‌های انجام شده از مجموع ۱۳۶ نمونه بستنی، ۹۶ نمونه (۷۰/۶ درصد) آلوده به اشریشیا کلی بودند. همچنین ۵۳ نمونه (۳۸/۹ درصد) از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند. ۵۲ نمونه (۳۸/۲ درصد) نیز به هر دو باکتری مورد بررسی آلوده بود و ۳۹ نمونه (۲۸/۷ درصد) فاقد آلودگی بودند. توزیع فراوانی نمونه‌های مورد آزمایش و موارد مثبت در فصول سال در جدول ۱ ارائه شده است.

(دوبل)، E.C براث و پپتون واتر استفاده شد. در ابتدا ۱۰ میلی لیتر از رقت تهیه شده به ۱۰ میلی لیتر LST دوبل حاوی لوله دور هام اضافه می‌شد، و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار می‌گرفت. در صورت ایجاد گاز یک تادو قطره از محلول فوق به ۱۰ میلی لیتر محیط E.C براث با غلظت معمولی و حاوی لوله دور هام افزوده می‌شد. این لوله آزمایش به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در بن ماری ۴۵-۴۴ °C قرار می‌گرفت. در صورت عدم تشکیل گاز، E.coli منفی گزارش می‌شد. در صورت تشکیل گاز یک تا دو قطره از آن به آب پیتونه بدون اندول افزوده می‌شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در بن ماری ۴۵-۴۴ °C انکوبه می‌گردید. سپس نیم میلی لیتر معرف کواکس به لوله افزوده می‌شد. پس از یک دقیقه ایجاد رنگ قرمز در سطح محیط کشت موید واکنش اندول مثبت بود. از محیط E.C broth بر روی محیط کشت Mac Conkey Agar کشت می‌شد تا کلنی‌های ارغوانی لاکتوز مثبت مشاهده شوند. سپس از کلنی‌های فوق بر روی نوترینت آگار کشت داده می‌شد تا از کلنی‌های ایزوله برای انجام تست‌های تاییدی استفاده شود. این

جدول ۱: توزیع فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی در نمونه های بستنی

تعداد نمونه (درصد)	آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس	آلوده به اشریشیا کلی	آلوده به هر دو باکتری	غیر آلوده	
۳۷ (۲۷/۲)	۸	۲۳	۷	۱۳	بهار
۹۰ (۶۶/۲)	۴۳	۶۸	۴۳	۲۲	تابستان
۵ (۳/۶)	۱	۳	۱	۲	پاییز
۴ (۳)	۱	۲	۱	۲	زمستان
۱۳۶ (۱۰۰)	۵۳ (۳۸/۹)	۹۶ (۷۰/۶)	۵۲ (۳۸/۲)	۳۹ (۲۸/۷)	جمع

بحث :

۳۸/۹ درصد نمونه‌ها آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس داشتند. این نتیجه با بررسی انجام شده در تهران (۴۳/۱ درصد) (۱۵) مطابقت داشته و از بررسی‌های انجام شده در یاسوج (۲۸/۶ درصد) (۱۴)، کامبوج (۱۲/۲ درصد) (۱۲)، پاکستان (۲۶ درصد) (۱۱)، کردستان (۱/۷ درصد) (۴) بیشتر و از بررسی انجام شده در قزوین (۶۲ درصد) (۱۰) کمتر است.

در دنیا همه ساله حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از مواد غذایی تولید شده به علت عدم استفاده از روش‌های مناسب تولید، نگهداری و عرضه دستخوش آلودگی و فساد می‌شود. از این طریق خسارات مالی، جانی و بهداشتی زیادی حاصل می‌گردد (۱۴). یکی از مهم‌ترین

میزان آلودگی نمونه‌های بستنی به اشریشیا کلی تقریباً دو برابر استافیلوکوکوس اورئوس است. این در حالی است که بیش از یک سوم نمونه‌ها به هر دو باکتری آلوده هستند و کمتر از یک سوم فاقد آلودگی می‌باشند.

در این بررسی ۷۰/۶ درصد نمونه‌ها آلوده به اشریشیا کلی بودند. این میزان در مقایسه با بررسی انجام شده توسط احمد آفاقی در قزوین (۶۰ درصد) (۱۰)، پاکستان (۴۶ درصد) (۱۱)، کامبوج (۳۰ درصد) (۱۲)، مطالعه نورامیر مظفری (۱۶/۵ درصد) (۱۳)، یاسوج (۱۷ درصد) (۱۴)، زاهدان (۳/۶۵ درصد) (۵) بیشتر است و به بررسی انجام شده در کردستان (۶۹/۹ درصد) (۴) نزدیک می‌باشد.

اشریشیاکلی در اغلب موارد از بررسی‌های مشابه بیشتر است. این آلودگی ممکن است ناشی از عدم پاستوریزاسیون شیر و مخلوط بستنی و همچنین ناشی از افرادی باشد که مستقیماً در تهیه آن نقش دارند. آلودگی اولیه ممکن است حین حمل و نقل و انبار نمودن هم پیش آمده باشد. مصرف بستنی در گروه‌های سنی مختلف به‌ویژه در کودکان بسیار رایج بوده و در ماه‌های گرم سال زیاد می‌شود. آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن سلامت افراد را به خطر می‌اندازد. لذا، پاستوریزاسیون شیر و مخلوط بستنی، رعایت بهداشت توسط افرادی که مستقیماً در تهیه آن سروکار دارند، همچنین نظارت بر فرآیند تولید و توزیع بستنی‌های سنتی، و سرانجام ایجاد زمینه مناسب برای تبدیل وضعیت تهیه و توزیع بستنی از سنتی به صنعتی الزامی است.

مسائل بهداشتی کشورهای در حال توسعه آلودگی مواد غذایی می‌باشد که منجر به بیماری‌های عفونی قابل انتقال از غذا می‌گردد. کنترل این بیماری تنها در پی شناخت و جدا سازی عوامل آلوده کننده و حذف روش‌هایی میسر می‌گردد که از آن طریق مواد غذایی آلوده می‌گردند (۱۳). انتقال پاتوژن‌ها از غذا و به‌خصوص فرآورده‌های شیر به انسان به گونه پاتوژن و عوامل محیطی بستگی دارد. بستنی یکی از مهم‌ترین عوامل بروز مسمومیت‌های غذایی به ویژه در کودکان است (۱۲) که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بهداشتی در آن آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی می‌باشد (۱۶).

نتیجه گیری:

آلودگی بستنی‌های مورد بررسی به استافیلوکوکوس اورئوس و

فهرست مراجع:

1. Anuranjini C, Geethu S, Dhanashree B. Bacteriological analysis of ice creams from Mangalore, south India. *Indian J Med Res* 2008; **127**(1):91-2.
2. Alvarez VB, Wolters CL, Vodovotz Y, Ji T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. *J Dairy Sci* 2005; **88**(3):862-71.
3. Maifreni M, Civilini M, Domenis C, Manzano M, Di Prima R, Comi G. Microbiological quality of artisanal ice cream. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1993; **194**(5-6):553-70.
4. Hazhir MS, Rashidi K, Senobar Tahaei SN, Reshad Manesh N, Mofareh N. Assessment of the types and rate of contamination in traditional ice-cream in Kurdistan province and its relationship to environmental and personal health care. *Scientific J Kurdistan University Med Sciences* 2005; **37**(10): 60-53.
5. Shadan MR, Khoushabi F, Safari F. The evaluation of physicochemical and microbial status of traditional ice creams in Zahedan. *TABIB-E-SHARGH* 2003; **4**(4):221-215.persian.
6. Salek Moghadam A, Forouhesh Tehrani H, Mozafari NA, Ansari H. Prevalence of virulence factors among E.coli isolated from food materials from Iran University of Medical Sciences' food microbial laboratory. *FEYZ* 2000; **15**(4): 40-32.persian.
7. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Protocol number 1194
8. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and practice of infectious disease*. 6th ed. Philadelphia; Elsevier. 2005.pp2567-86.
9. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Protocol number 2946.
10. Afaghi A. Bacteriological analysis of creamy foodstuffs. *Irn J Public Health* 1990; **4-1**(19): 19-15.persian.
11. Masud T. Microbiological quality and public health significance of ice-cream. *J Pak Med Assoc*. 1989 ; **39**(4):102-4.
12. Kruy SL, Soares JL, Ping S, Sainte-Marie FF. Microbiological quality of "ice, ice cream. Sorbet" sold on the streets of Phnom Penh; April 1996-April 1997. *Bull Soc Pathol Exot*. 2001; **94**(5):411-4. French.
13. Mozafari NA, Forohesh Tehrani H, Salek Moghadam AR, Ansari H, Mojtahedi A. A comprehensive survey of the Enterobacteriaceae strains isolated from contaminated food stuffs in the Iran University center for the control of food, cosmetic and hygienic products. *Scientific Med J Ahwaz University Med Sciences* 2002; **32**: 50-45.persian.
14. Pour Mahmoodi A, Mohammadi J, Mirzaei A, Momeni Nejad M, Afshar R. Epidemiological study of traditional ice cream in Yasuj. *ARMAGHANE-DANESH* 2003; **29**(8): 65-59. persian.
15. Soltandallal MM, Saberpoor F, Norozbabaee H, Fakharian F, Aghaamiri S, Fazelifard PS, et al. Determination of Coagulase positive

Staphylococcus in food products in Tehran. 9th Iranian Congress of Microbiology. Kerman, Iran, 2008.

16. Daniels NA, MacKinnon L, Rowe SM, Bean NH, Griffin PM, Mead PS. Foodborne disease outbreaks in United States schools. *J Pediatr Infect Dis* 2002; **21**(7):623-8.

شیوع کلینزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در بینی کودکان بستری و برخی عوامل خطر موثر بر آن

مسعود شریفی*، مهشید سررشته داری^۱، فرناز حسنی^۲، بهاره رئیسی^۳، محمود علیپور حیدری^۴

۱) گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۲) گروه بیماری‌های اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۳) پزشک عمومی

۴) گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

نویسنده رابط: مسعود شریفی، گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

همراه: ۰۹۱۲۳۸۱۹۰۵۴ dr_m_sharifi2002@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۲۰

چکیده:

زمینه و اهداف: توانائی سازش *استافیلوکوکوس اورئوس* با آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (*Methicilin resistant Staphylococcus aureus*: MRSA) در اوایل دهه ۱۹۶۰ شد. MRSA ابتدا در مراکز بیمارستانی (HA-MRSA: hospital-associated-MRSA) و از اواخر دهه ۱۹۹۰، در جامعه (CA-MRSA: community-associated MRSA) و در تمام دنیا ظهور کرد. مطالعه بیماران در بدو پذیرش و هنگام ترخیص از بیمارستان اطلاعات ذی‌قیمتی از نظر موقعیت سویه‌های CA-MRSA، میزان خطر کلینزاسیون با سویه‌های HA-MRSA و عوامل خطر کلینزاسیون را فراهم می‌کند تا بتوان به پیشگیری از انتقال ارگانیزم و کنترل محیط بیمارستانی فائق شد و از اشاعه سویه‌های بیمارستانی به داخل جامعه جلوگیری کرد. این مطالعه با هدف تعیین شیوع کلینزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در بینی کودکان بستری و برخی عوامل خطر موثر بر آن انجام شد.

روش بررسی: از ۲۰۰ کودک ۲ تا ۱۲ ساله به هنگام پذیرش و ترخیص در مرکز آموزشی درمانی کودکان قدس قزوین نمونه سواب بینی گرفته شد. نمونه‌ها در محیط‌های اختصاصی کشت و بعد از جداسازی و تعیین هویت سویه‌ها برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین از روش Oxacillin screening plates مطابق با دستورالعمل Clinical and laboratory standards institute (CLSI) استفاده شد. اطلاعات دموگرافیک و اختصاصی از طریق پرسش‌نامه جمع‌آوری و داده‌ها با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: به هنگام پذیرش تعداد حاملین سویه‌های *S. aureus* حساس به متی‌سیلین (*Methicilin sensitive Staphylococcus aureus*: MSSA) و MRSA به ترتیب ۶ (۳٪) و ۱ (۵٪) نفر بودند. از ۱۹۳ نفر باقیمانده به هنگام ترخیص به ترتیب ۱۴ نفر (۷/۲٪) و ۳ نفر (۱/۶٪) با سویه‌های مذکور کلنیزه شدند. برای تمام بیماران کلنیزه با MRSA سفتریاکسون مصرف شده بود. بین کلینزاسیون سویه MRSA و متغیرهای مورد بررسی ارتباط معنی‌دار یافت نشد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها مؤید حضور سویه MRSA در جمعیت کودکان شهر قزوین است. در پی بستری بروز کلینزاسیون با سویه‌های MSSA و MRSA در مقایسه با حالت حامل در بدو پذیرش با همین ارگانیزم‌ها به ترتیب ۲/۴ و ۳/۲ برابر است. این میزان برای MRSA افزون‌تر است که با مصرف سفتریاکسون همسو می‌باشد.

کلمات کلیدی: *S. aureus*, MRSA، کلینزاسیون، سفتریاکسون، کودکان

مقدمه:

کشور برابری می‌کند (۵). شیوع MRSA به مقدار زیادی در بین کشورهای مختلف، و حتی از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر در یک کشور فرق می‌کند (۴).

مطالعه بیماران در بدو پذیرش و هنگام ترخیص از بیمارستان اطلاعات ذی‌قیمتی از نظر موقعیت سویه‌های اکتسابی از جامعه و میزان خطر کلنیزاسیون با سویه‌های بیمارستانی را در اختیار ما قرار می‌دهد. از سوی دیگر عوامل خطر کلنیزاسیون را هم می‌توان شناسایی کرد تا از این راه هم به پیشگیری از انتقال ارگانسیم و کنترل محیط بیمارستانی فائق شویم و هم از اشاعه سویه‌های بیمارستانی به داخل جامعه جلوگیری کنیم. از آنجائی که تا کنون درباره این موضوع مطالعه‌ای صورت نگرفته است، بررسی حاضر با هدف تعیین شیوع کلنیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بینی کودکان بستری و برخی عوامل خطر موثر بر آن انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها:

این بررسی با حجم نمونه ۲۰۰ نفر در مرکز آموزشی درمانی کودکان قدس در قزوین انجام شد. نمونه‌گیری به روش سر شماری و محدود به گروه‌های سنی ۲ تا ۱۲ سال بود که در دو مرحله انجام پذیرفت. به هنگام پذیرش و ترخیص بیماران نمونه سواب بینی جمع‌آوری و بعد از تلقیح در محیط‌های آگار خوندار و مانیتول سالت آگار، ظروف پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از رنگ آمیزی گرم، آزمایش‌های کاتالاز، کوآگولاز روی لام، کوآگولاز لوله ای و DNase برای تعیین هویت سویه‌های جدا شده استفاده گردید (۶). برای تعیین مقاومت به متی سیلین از روش oxacillin screening plate، مطابق با دستورالعمل (Clinical and laboratory standards institute) استفاده شد (۷). در این روش به محیط Mueller - Hinton agar، ۴٪ NaCl و ۶ μg/ml آنتی بیوتیک oxacillin (محصول کارخانه سیگما، آلمان) اضافه شد. رشد استافیلوکوک بر روی این محیط بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مؤید وجود مقاومت به متی سیلین تلقی می‌شود. از سویه S.aureus ATCC 33591 به عنوان سویه مقاوم به متی سیلین واز سویه S.aureus ATCC 25923 به عنوان سویه حساس به متی سیلین استفاده شد. اطلاعات دموگرافیک (سن، جنس، محل سکونت و تحصیلات) و

توانائی سازش (*Staphylococcus aureus* (S. aureus) با آنتی بیوتیک‌ها، منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین (*methicilin resistant Staphylococcus aureus*: MRSA) شد. عامل مقاومت به متی سیلین و دیگر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، ژن mecA است. این ژن بر روی عامل ژنتیکی متحرکی موسوم به Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) قرار دارد. از SCCmec، هفت واریان اصلی موسوم به تیپ‌های I تا VII شناسائی شده است. برای مطالعه تحول کلون‌های MRSA که از اوایل دهه ۱۹۶۰ ظهور پیدا کردند، و نیز انتشار آنها در جهان از فناوری‌های مختلف مولکولی استفاده شده است. کلون‌های اولیه MRSA مرتبط با مراکز بیمارستانی بودند (hospital-associated-MRSA: HA-MRSA) که در دهه ۱۹۶۰ ظاهر شدند. اما، از اواخر دهه ۱۹۹۰، کلون‌های اکتسابی از جامعه (community-associated MRSA: CA-MRSA) هم در دنیا ظهور کردند. CA-MRSA دارای SCCmec تیپ IV, V یا VII هستند، که اکثریت آنها در مقایسه با HA-MRSA، به دیگر دودمان‌های *S. aureus* تعلق دارند. ضمن آنکه CA-MRSA اغلب، لکوسیدین پنتون والانتین (PVL) را با خود همراه دارد (۱). اپیدمیولوژی MRSA با ظهور سویه‌های اکتسابی از جامعه پیچیده‌تر شد. سویه‌های اخیر بین افراد سالم، که هیچ ارتباطی با سیستم بهداشتی و درمانی ندارند، روی می‌دهد (۲). سویه‌های CA-MRSA اغلب عامل عفونت‌های خفیف پوست و بافت نرم هستند. اما، موارد شدید و تهدید کننده حیات نظیر پنمونی نکروزان، فاسیت نکروزان، میونکروز و سپسیس هم در حال ظهور می‌باشند (۳). نظر براین است که در سال‌های اخیر تمایز بین HA-MRSA و CA-MRSA رنگ باخت و اکنون CA-MRSA در بسیاری از بیمارستان‌های امریکا اندمیک شده است. منشاء MRSA احتمالاً ناشی از انتقال SCCmec به تعداد محدودی از دودمان‌های حساس به متی سیلین *methicilin sensitive Staphylococcus aureus* (MSSA) است (۱).

شیوع MRSA عامل مهم ابتلاء (موربیدیتی)، افزایش هزینه درمان و مرگ (مورتالیتی) در بیمارستان‌ها است، که طی دهه اخیر افزایش یافته است (۴). اکنون عفونت‌های MRSA سالانه عامل مرگ قریب ۱۹۰۰۰ بیمار بستری در امریکا است. این میزان با تعداد مرگ ناشی از تمام موارد ایدز، سل و هپاتیت‌های ویروسی در این

نفر (۶۰٪) در منزل، و ۸۰ نفر (۴۰٪) در مقاطع پیش دبستانی تا پنجم دبستان تحصیل می‌کردند. طی ۲ هفته قبل از بستری ۸۱ نفر (۴۰/۵٪) سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند. متغیرهای مورد بررسی (سابقه ابتلاء به رینیت و سینوزیت، مصرف آنتی‌بیوتیک در دو هفته قبل از بستری، علت بستری و نیز مدت بستری) در جدول ۱ نشان داده شده است. ۱۳۸ نفر (۶۹٪) طی بستری جمعاً ۲۳۸ قلم آنتی‌بیوتیک متشکل از ۱۵ نوع مختلف دریافت کرده بودند. در این میان سه آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون (۲۴/۷٪) آمپی سیلین (۱۵/۵٪) و سفالوتین (۱۵/۵٪) در مجموع بیش از نیمی از اقلام آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده (۵۵/۷٪) را به خود اختصاص دادند.

اطلاعات اختصاصی (علت و مدت بستری، مصرف آنتی‌بیوتیک در دو هفته اخیر، آنتی‌بیوتیک مصرفی در طول بستری) از پرونده بیماران و از طریق پرسش نامه جمع‌آوری شدند. داده‌ها با نرم افزار SPSS پردازش و با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها:

دامنه سنی جمعیت مورد مطالعه ۲ تا ۱۲ سال با میانگین $5/92 \pm 2/83$ سال بود. ۱۲۰ نفر (۶۰٪) مذکر، ۸۰ نفر (۴۰٪) مؤنث، ۱۱۴ نفر (۵۷٪) ساکن شهر قزوین، ۴۶ نفر (۲۳٪) ساکن روستاهای اطراف و ۴۰ نفر (۲۰٪) ساکن سایر شهرستان‌های استان بودند. ۱۲۰

جدول ۱: فراوانی عوامل خطر مورد مطالعه در کلونیزاسیون کودکان با سویه MRSA

متغیر	تعداد (درصد)
دارد	۸ (۴)
سابقه ابتلاء به رینیت	ندارد
ندارد	۱۹۲ (۹۶)
دارد	۱۹ (۹/۵)
سابقه ابتلاء به سینوزیت	ندارد
ندارد	۱۸۱ (۹۰/۵)
دارد	۷۷ (۳۸)
سابقه بستری	ندارد
ندارد	۱۲۳ (۶۲)
کمتر از ۳ روز	۲۷ (۳۵/۱)
مدت بستری قبلی	۳۷ (۴۸)
۳-۷ روز	۱۳ (۱۶/۹)
۸ روز و بیشتر	۸۱ (۴۰/۵)
دارد	ندارد
مصرف آنتی‌بیوتیک در دو هفته اخیر	۱۱۹ (۵۹/۵)
تنفسی	۵۲ (۲۶)
سیستم عصبی مرکزی	۵۲ (۲۶)
علت بستری کنونی	۴۳ (۲۱/۵)
گوارشی	۲۳ (۱۱/۵)
مجاری ادراری	۳۰ (۱۵)
سایر	۲۱ (۱۰/۵)
کمتر از ۳ روز	۱۳۵ (۶۷/۵)
مدت بستری کنونی	۴۴ (۲۲)
۳-۷ روز	۱۳۸ (۶۹)
۸ روز و بیشتر	۶۲ (۳۱)
دارد	ندارد
مصرف آنتی‌بیوتیک در مدت بستری کنونی	ندارد

(۱/۶٪) با سویه MRSA (جدول ۲). بین متغیرهای مورد بررسی و کلونیزاسیون با سویه MRSA رابطه معنی دار یافت نشد ($P > 0.05$). برای تمام بیماران کلنیزه شده با MRSA سفتریاکسون مصرف شده بود.

به هنگام پذیرش ۷ نفر (۳/۵٪) حامل *S. aureus* بودند: ۶ نفر (۳٪) حامل MSSA و یک نفر (۰/۵٪) حامل MRSA بود. از ۱۹۳ نفر باقیمانده در زمان ترخیص ۱۷ نفر (۸/۸٪) با سویه های *S. aureus* کلنیزه شده بودند: ۱۴ نفر (۷/۲٪) با سویه MSSA و ۳ نفر

جدول ۲: توزیع فراوانی حاملین (بدو پذیرش) و افراد کلنیزه شده (هنگام ترخیص) با سویه های *S. aureus*

کلنیزاسیون	حاملین	سویه
۱۴ (۷/۲٪)	۶ (۳٪)	MSSA
۳ (۱/۶٪)	۱ (۰/۵٪)	MRSA
۱۷۶ (۹۱/۲٪)	۱۹۳ (۹۶/۵٪)	منفی
۱۹۳ (۱۰۰٪)	۲۰۰ (۱۰۰٪)	جمع

بحث :

کشور از افزایش معنی دار کلنیزاسیون MRSA در بینی ۵۰۰ کودک سالم از ۰/۸ درصد (۲۰۰۱) به ۹/۲ درصد (۲۰۰۴) حکایت می کند (۱۰). بررسی کلنیزاسیون کودکان ۵ تا ۷ ساله در ناحیه جنوب غربی آلمان نشان داد که در میان ۱۴۵۵ ایزوله *S. aureus*، سویه MRSA بسیار اندک بوده است (۰/۳ درصد). در حالیکه یک چهارم کودکان سن ورود به مدرسه با *S. aureus* کلنیزه هستند، اما شیوع MRSA در این ناحیه بسیار نادر است (۱۱).

در مطالعه ما به هنگام ترخیص ۷/۲ درصد با سویه MSSA و ۱/۶ درصد با سویه MRSA و در مجموع ۸/۸ درصد با *S. aureus* کلنیزه شده بودند. بررسی شیوع کلنیزاسیون با سویه MRSA در بیمارستان آموزشی در عربستان سعودی نشان داد که از ۶۹ بیمار بزرگسال و کودک بستری در بیمارستان ۱۴ درصد با MRSA کلنیزه شده اند (۱۲). در یک مرکز بیمارستانی در آمریکا از ۳۷۴ نفر غیرکلنیزه، ۶ نفر (۱/۷ درصد) سویه MRSA را طی بستری کسب کرده بودند (۱۳) که نزدیک به یافته ما (۱/۶ درصد) می باشد. بروز MRSA در بین عوامل عفونی جدا شده در بیمارستانها فوق العاده زیاد است (۵۰-۴۸ درصد) در حالیکه میزان حالت حامل با MRSA در جامعه پایین است (۱۴).

نتایج مطالعه درباره مدت کلنیزاسیون با سویه MRSA بعد از ترخیص از بیمارستان نشان می دهد که بعد از ترخیص، حالت حامل طولانی مدت است (۱۵) و بیمارانی که MRSA را در

نتایج نشان داد که میزان کلنیزاسیون با *S. aureus* ۲/۵ برابر حاملین این ارگانیزم در بدو پذیرش است. این میزان برای سویه MSSA به ۲/۴ و برای سویه MRSA به ۳/۲ برابر حاملین با همین سویه ها بالغ می گردد. کلنیزاسیون با MRSA از سومین روز بستری آغاز می شود، محدود به هفته اول بستری است و با مصرف سفتریاکسون در طول مدت بستری در بیمارستان همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر از جمعیت کودکان ۲ تا ۱۲ سال به هنگام پذیرش ۳ درصد حامل سویه MSSA و ۰/۵ درصد حامل سویه MRSA بودند. از نمونه سواب بینی ۵۰۰ کودک (کمتر از ۱۶ سال) مراجعه کننده به درمانگاه کودکان دانشگاه شیکاگو در ۲۴/۴ درصد سویه MSSA و در ۲/۵ درصد سویه MRSA جدا شد (۸). به هنگام پذیرش در بخش های کودکان بیمارستان Asohikawa Kosei ژاپن در فاصله سال های ۹۳-۱۹۹۲ و ۹۸-۱۹۹۷ از ۲۱۷۶ سواب بینی بیماران در فاصله سنی ۷ روز تا ۱۷ سال، ۵۰ سویه MRSA (۲/۳ درصد) جدا شده است (۹). میزان ایزولاسیون در مطالعات مذکور بیشتر از نتایج مطالعه حاضر است که یک دلیل آن می تواند بالا بودن دامنه سنی (به ترتیب ۱۶ و ۱۷ سال) باشد. اما، باید توجه داشت که افزایش اکتساب سویه های CA-MRSA در جوامع مختلف، متفاوت است. مطالعه در بیمارستان کودکان دانشگاه شیکاگو نشان داده است شیوع CA-MRSA در فاصله سال های ۱۹۹۰-۱۹۸۸ از ۱۰ نفر به ازاء هر صد هزار پذیرش به ۲۵۹ نفر در سال های ۹۵-۱۹۹۳ افزایش یافته است (۸). مطالعه دیگر در همین

بررسی ارتباط بین بروز کلونیزاسیون سویه MRSA و آنتی بیوتیک مصرفی طی مدت بستری نشان داد که در مجموع برای بیماران مورد مطالعه ۶۵ قلم آنتی بیوتیک تجویز شده است. سفتریاکسون، آمپی سیلین و سفالوتین بیش از نیمی از اقلام تجویز شده را به خود اختصاص دادند. به دلیل کم بودن تعداد کلونیزاسیون با MRSA ارتباط معنی دار یافت نشد. اما، تمام بیماران کلنیزه شده سفتریاکسون دریافت کرده‌اند. در یک گزارش تمام سویه‌های MRSA مقاوم به سفتریاکسون گزارش شده‌اند (۴)، که در این صورت یافته ما طبیعی جلوه می‌کند. اما، به طور کلی در این زمینه مطالعه مشابه یافت نشد. هر چند بررسی نشان داده است که در اکثر بیمارستان-هایی که طی یک دهه، برای پروفیلاکسی جراحی، از سفالوسپورین-های نسل اول استفاده شده است افزایش فراوانی سویه‌های MRSA را نیز به دنبال داشته است (۱۶).

MRSA با رعایت دقیق موازین کنترل عفونت به طور موثر کنترل شده است. یافته مذکور این اصل را که "انتقال عامل اصلی شیوع فراینده MRSA است"، تقویت می‌کند (۱۸). کنترل MRSA در کشورهایی با موفقیت بیشتر همراه بوده که به اصول کنترل انتقال (نظارت فعال بیماران کلنیزه از طریق کشت و کاربرد دقیق سدهای محافظتی برای بیماران کلنیزه شده یا عفونی با MRSA) توجه عملی داشته‌اند. بهداشت دست مهم‌ترین راه کنترل انتقال ارگانسیم‌های مقاوم به چندین دارو است. در مورد MRSA بر نظارت فعال جهت یافتن مخزن ارگانسیم از طریق کشت، رعایت بهداشت دست، استفاده بجا از سدهای محافظتی، رفع کلونیزاسیون بیماران و نظارت بر تجویز آنتی بیوتیک توصیه اکید می‌شود (۱۸ و ۱۹).

نتیجه گیری :

یافته‌های این مطالعه مؤید حضور سویه MRSA در جمعیت کودکان شهر قزوین است. بستری شدن در بیمارستان به کلونیزاسیون با سویه‌های MSSA و MRSA منجر می‌شود که نسبت به حاملین بدو پذیرش با همین سویه‌ها به ترتیب ۲/۴ و ۳/۲ برابر افزایش می‌یابد و در مجموع برای *S.aureus* به ۲/۵ برابر بالغ می‌گردد. اما، کلونیزاسیون برای سویه MRSA افزون‌تر است که البته نکته در خور تأملی است، و با مصرف سفتریاکسون مرتبط می‌باشد. مطالعات نشان داده که حداقل یک سوم تمام بیماران در مدت بستری یک دوره درمان آنتی بیوتیکی دریافت می‌کنند، که بخش اعظم آن یا ضروری نیست و یا تجویز آن نامناسب است

بیمارستان کسب نمودند بعد از ترخیص همان سویه را به ۱۴ درصد از افراد در تماس‌های خانوادگی انتقال داده‌اند (۱۶).

در بررسی حاضر کلونیزاسیون با سویه MRSA محدود به گروه‌های سنی ۲، ۶ و ۱۰ سال تمام بود. مطالعه جداسازی سویه‌های MRSA از بینی کودکان در بخش اطفال بیمارستان Ashikawo kosei ژاپن نشان داد از ۵۰ سویه MRSA جدا شده سن ۴۸ درصد از بیماران کلنیزه شده، کمتر از یکسال بوده است. مطالعه دیگری در فاصله سال‌های ۹۳-۱۹۹۲ در ژاپن نشان داد که از ۱۶۶۵ بیمار، سن ۲۸ نفر کلونیزه با سویه‌های MRSA از ۲ ماه تا ۹ سال بود و در ۱۴ نفر کمتر از یکسال بود (۹). در واقع کلونیزاسیون در مطالعات مذکور در کودکان کمتر از یکسال شایع بوده است، اما در مطالعه ما هر چند تعداد افراد کلونیزه شده اندک است و امکان استنتاج را درباره متغیر سن میسر نمی‌سازد، اما همان تعداد اندک هم در کودکان با سنین بالاتر بروز نموده است.

توزیع فراوانی نسبی کلونیزاسیون با سویه MRSA بر حسب جنس نشان می‌دهد که کلونیزاسیون در جنس مذکر نسبت به جنس مؤنث همانند نسبت ۲ به ۱ می‌باشد. در گزارشات موجود به متغیر جنس اشاره‌ای نشده است. فقط در مطالعه‌ای در یک بیمارستان آموزشی در عربستان سعودی درباره ۲۴۰ بیمار بزرگسال و کودک نشان داده شده که از ۶۹ بیمار کلونیزه شده با سویه MRSA متغیر جنس مذکر (P=۰/۰۴) از جمله متغیرهایی است که در پیش بینی کلونیزاسیون با MRSA دخیل می‌باشد (۱۲).

کلونیزاسیون با سویه‌های MRSA بر حسب زمان بستری به روزهای سوم تا هفتم بستری محدود بوده است. بررسی شیوع کلونیزاسیون در بیمارستان آموزشی در عربستان سعودی نشان داد که مدت اقامت در بیمارستان از جمله متغیرهایی است که برای پیش بینی کلونیزاسیون MRSA مطرح می‌باشد (P=۰/۰۰۴) (۱۲). مطالعه Fishbain در مرکز بیمارستانی در امریکا نشان داده متوسط مدت بستری بیمارانی که سویه MRSA را کسب نمودند ۱۷/۷ روز بوده است. این مدت برای گروه بیمارانی که کلونیزاسیون در آن‌ها اتفاق نیفتاده ۵/۳ روز بوده است (۱۳). بررسی در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) نشان داده مدت اقامت بیش از ۲ روز از عوامل معنی دار در اکتساب سویه‌های MRSA می‌باشد (۱۷). در واقع یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهند که کلیه موارد کلونیزاسیون در هفته اول اقامت در بیمارستان روی داده و شروع آن نیز از روز سوم بستری بوده است. این مدت در مقایسه با مطالعه Fishbain (۱۳) بسیار کوتاه‌تر است. می‌توان آن را به عدم توجه به زنجیره انتقال و در واقع اصول کنترل عفونت بیمارستانی نسبت داد، که در هر صورت هشدار دهنده است.

قزوین است. سویه MRSA شاهد، اهدائی آقای دکتر محمد رهبر از آزمایشگاه مرجع سلامت بود. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، از آقای دکتر محمد رهبر و از کلیه همکاران محترم مرکز آموزشی درمانی کودکان قدس قزوین که با همکاری بی‌شائبه امکان انجام مطالعه حاضر را میسر نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماید.

(۱۸). توجه عملی به موازین کنترل عفونت، نظارت بر تجویز منطقی آنتی‌بیوتیک و رعایت بهداشت دست در این باره ضروری است. بدیهی است آموزش بهداشت دست رکن اساسی موفقیت است (۲۰ و ۲۱).

تقدیر و تشکر:

این مقاله ماحصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی

فهرست مراجع:

- Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008;**8**:747-63.
- Mulqueen J, Cafferty F, Cormican M, Keane JD, Rossney A. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in GPs in the West of Ireland. *BJGP* 2007; **57**: 811-813.
- Yu-Tsung Lee, Jung-Chung Lin, Ning-Chi Wang, Ming-Yieh Peng, Feng-Yee Chang. Necrotizing fasciitis in a medical center in northern Taiwan: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *J Microbiol Immunol Infect* 2007;**40**:335-341.
- Akpaka PE, Kisson S, Swanston WH, Monteil M. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad & Tobago. *Ann Clin Microbiol Antimicrobio* 2006, **5**:16-22.
- Boucher HW, Ralph GC. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:S344-9.
- Sharifi M. *Application, Interpretation and principles of Biochemical Tests in Medical Microbiology*. Tabriz ;Ahrar Company. 2000; PP: 257-503.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial susceptibility testing Standards M2-A9 and M7-A7. 2006.
- Hussain FM, Boyle vovro S, Daum RS. Community acquired Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatric Infect Dis J* 2001; **20**: 763-7.
- Sakata H. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from nasopharyngeal swabs on admission to a ward for pediatric patients comparison between 1992-1993 and 1997-1998. *Kansenshogaku zosshi* 2001; **75**: 14-90.
- Creech CB 2nd, Kernodle DS, Alsentzer A, Wilson C, Edwards KM. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. : *Pediatr Infect Dis J* 2005 Jul;**24**(7):617-21
- Fluegge K, Adams B, Luetke Volksbeck U, Serr A, Henneke P, Berner R Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a southwestern region of Germany. *Eur J Pediatr* 2006;**165**:688-90.
- Austin TW, Austin MA, McAlear DE, Coleman BT, Osoba AO, Thagafi AO, et al. MRSA prevalence in a teaching hospital in western Saudi Arabi; *Saudi Med J* 2003; **24**: 1313-6.
- Fishbain JT, Lee JC, Nguyen HD, Mikita JA, Mikita CP, Uyehara CF, et al. Nosocomial transmission of Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*, A blinded study to establish base line acquisition rates. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003 ; **24** : 415 – 21.
- Hussain FM, Boyle- Vavra. Bethel CD, Daum RS. Current trends in community acaauired Methicillin resiatant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatric Inf Dis J* 2000; **19**: 1163-6.
- Scanvic A, Denic L, Gaillan S, Giry P, Andreumont A, Lucet JC. Duration of colonization by Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clin Infect Dis* 2001; **32** : 1393-8
- The problem pathogen partnership. university of Virginia Health sysyem. July 23, 2002 bmf @ virginia, edu
- Marshall C, Horrington G, Wolfe R, Fairley

- CK, Wesselingh S, Spelman D. Acquisition of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a large intensive care unit . *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;**24**: 372-6.
18. Carlene AM, Jernigan JA, Ostrowsky BE., Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, *et al.* SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and Enterococcus *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;**24**:362-386.
19. Maryland Department of Health and Mental Hygiene Epidemiology and Disease Control Program. Guideline for Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) In Long Term Care Facilities. July, 1989; Revision, May, 2000, January, 2001.
20. Sharifi M, Ghorbani A, Soltani Khaymehsary Z, Shafikhani M, Molapour A, Alipour Haydari M. Effectiveness of Hand hygiene education on the removal of hospital pathogenic organisms from the health care worker's hands. 17th Iranian congress on infectious disease and tropical medicine. 20-24 Dec. 2008; PP: 83.
21. Sharifi M, Ghorbani A, Soltani Khaymehsary Z, Shafikhani M, Molapour A, Alipour Haydari M, *et al.* Percentage change of hand's microbial contamination among health care worker's in Takestan hospital. 17th Iranian congress on infectious disease and tropical medicine. 20-24 Dec. 2008; PP: 157.

راهنمای اشتراک مجله

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

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

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

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

با پست سفارشی

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

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

را برای اشتراک رایگان به دفتر مجله ارائه نمایند.

فرم اشتراک

نام: نام خانوادگی: میزان تحصیلات:

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

آدرس کامل پستی:

کدپستی:

تلفن:

امضاء و تاریخ:

E-mail:

نوع اشتراک:

اشتراک سالیانه (۴ شماره) با احتساب هزینه پست:

اعضا انجمن میکروب شناسی ایران ۴۵۰۰۰ ریال

آزاد ۸۵۰۰۰ ریال

اشتراک تک شماره با احتساب هزینه پست:

اعضا انجمن میکروب شناسی ایران ۱۱۰۰۰ ریال

آزاد ۲۱۰۰۰ ریال

Prevalence of and some risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in hospitalized children

Sharifi M^{*1}, Sareshtedari M², Hassani F³, Reissi B³, AlipourHeidary M⁴

1) Department of Microbiology, School of Medicine, Qazvin university of Medical Sciences

2) Department of Pediatrics, School of Medicine, Qazvin university of Medical Sciences

3) General Physician

4) Department of Community Medicine, School of Medicine, Qazvin university of Medical Sciences

Corresponding author: Sharifi M. Department of Microbiology, School of Medicine, Qazvin university of Medical Sciences, Iran

Tel: +98(281)3336001-5 Mobile: 09123819054 E-Mail: dr_m_sharifi2002@yahoo.com

ABSTRACT

Background and objectives: The adaptive power of *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) to antibiotics led, in the early 1960s, to the emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The early MRSA clones were hospital-associated (HA-MRSA). However, from the late 1990s, community-associated MRSA (CA-MRSA) clones emerged worldwide. Patient's study on the admission and the discharge provides an important information about the position of CA-MRSA, the rate of HA-MRSA colonization, and risk factors for colonization. This information could be used for prevention of organism transmission, control of hospital environment, and prevention of hospital organisms spread into community. The aim of this study was to determine the prevalence of and some risk factors of methicillin-resistant *S.aureus* nasal colonization in hospitalized children.

Materials and Methods: Nasal swab specimens were collected on the admission and the discharge of patients admitted in the Qods educational and health pediatrics center of Qazvin. After isolation and identification the strains, the methicillin resistance was determined by *Clinical and laboratory standards institute* (CLSI) oxacillin screening plate method. Other information were collected by questionnaire. The data were analyzed by Chi-square test.

Results: A total number of 200 patients (2 to 12 years old) were studied. The carrier state of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), and MRSA strains were 6 (3%), and 1 (0.5%) respectively. From 193 remainder on discharging 14 (9%), and 3 (1.9%) patients were colonized with MSSA, and MRSA strains respectively. Ceftriaxone was administrated for all patients colonized with MRSA strains. There was no significant correlation between colonization with MRSA strains and studied variables.

Conclusion: Our findings confirm the presence of MRSA strain in children population in Qazvin city. The incidence of colonization with MSSA, and MRSA, in comparison of the carrier state with the same strains, were 2/4, and 3.2 times. This rate is higher in the case of MRSA, which is correlated with administration of Ceftriaxon.

Key words: *S.aureus*, MRSA, Colonization, Ceftriaxone, Children

Investigation of contamination of traditional non-pasteurized ice-creams with *E.coli* and *Staphylococcus aureus* in Semnan, Iran-year 2007-8

Afraz V¹, Jazayeri Moghadas A^{*2}, Irajian GR³

1) Food laboratory, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2) Department of Microbiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3) Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding author: Jazayeri Moghadas A, Department of Microbiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. Mobail: 09124388188 E. mail: sa_jazayeri@yahoo.com

ABSTRACT

Background and objectives: Ice cream is made from milk, cream, sugar, food additive and may contain preservatives and edible colors as well. This product provides good condition for bacterial growth.

This study was conducted to determine the frequency of *E.coli* and/or *Staphylococcus aureus* contaminated traditional non-pasteurized ice cream in Semnan.

Materials and Methods: In this descriptive cross sectional study, during two years, 136 samples of non-pasteurized ice creams were investigated in Semnan food and cosmetics laboratory. The samples were investigated for contamination with *E. coli* and *Staphylococcus aureus* according to Iranian standard guideline. The isolated bacteria were further identified by conventional bacteriologic tests.

Results Results: Of the 136 samples, 96 (70.6%) were contaminated with *E. coli*, 53 (38.9%) contaminated with *Staphylococcus aureus*, 52 (38.2%) contaminated with both bacteria and 39 (28.7%) were non contaminated.

Conclusion: Results of this study showed that frequency of traditional non-pasteurized ice creams which were contaminated with *E.coli* and *Staphylococcus aureus* was significantly higher than other surveys.

Key words: Ice cream, contamination, food poisoning, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*

Serotyping of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Tehran, Iran

Mehrabi Tavana A^{1*}, Ataee R², Najde Gerami E², Goya MM^{3,4}, Rahbar M⁵

- 1)Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2)Research center for Bacterial Toxins Application, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3) Infectious Diseases Ward, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4)Center for Communicable Diseases Management, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
- 5) Public Health Reference Laboratory, Tehran, Iran

Corresponding author: Mehrabi Tavana A, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Mobail: 09121097358 E. mail: mehrab@bmsu.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives: *Streptococcus pneumoniae* is a bacterial pathogen most commonly associated with acute otitis media and pneumonia and the second most important pathogen in cases of meningitis in children under 2 years old. Currently more than 90 pneumococcal serotypes have been identified based on their antigenic differences in the capsular polysaccharides, with distribution varying according to age group, clinical symptoms, and geographic area. The aim of this study was to determine the most prevalent serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with different infectious diseases in Tehran medical centers.

Materials and methods: In total 50 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* were collected from Tehran medical centers and re – identified using standard identification tests. Quelling test was used for serotyping of the isolates as per Statens Serum Institute (SSI) guideline. The data were analyzed using SSI guideline.

Results: In this study, the distribution of isolated *Streptococcus pneumoniae* in relation to site of infection were: respiratory tract, 18 isolates (36%); blood, 13 isolates (26%); eye, 10 isolates (20%) and other sites, 7 isolates (14%). The most common serotypes were 6A and 6B. The prevalent serotypes in adults and infants were serotype 2 and 19 (19A, 19B, 19C, 19F) respectively. The prevalent serotypes according to the site of infection were: respiratory tract, 7; blood, 4; and eye, 19.

Conclusion: The finding of this study showed that serotype 6 in common serotype in both adults and infants.

Key words: *Streptococcus pneumoniae* , serotyping , serotype

Antibiotic resistance patterns of enteropathogenic *E.coli* (EPEC) serogroups isolated from stool of under 5 years old children with diarrhea in Tehran:2007- 2008

Shirazi MH¹, Akbari A¹, Sharifi Yazdi MK², Hosseini M³, Fard Sanei F¹, Bakhtiari R¹, Soltan Dallal MM^{1*}

1) Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences (TUMS). Tehran, Iran

2) Department of Laboratory Medicine, Faculty Paramedical Sciences, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran

3) Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran

Corresponding author: Soltan Dallal MM, Division of Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Public Health & Institute Health Research, Medical Sciences University of Tehran, P.O.Box:14155-6446,Tehran, Iran.

Tel: + 98-21-66462268 Fax: + 98-21-66462267 E.mail address: soltanirad34@yahoo.com

ABSTRACT

Background and objectives: Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) strains have high prevalence in children and are of the most important diarrheagenic agents in developed and developing countries that may cause severe diarrhea even death. Prevalence and antibiotic resistance patterns differ in different geographic areas. Knowledge of the patterns is necessary for physicians in order to treatment of infections using appropriate antibiotics. This research aimed to detection of common EPEC serogroups in diarrheal under 5 year old children and study the patterns of antibiotic resistance of these strains.

Materials and Methods: 278 samples collected from children with diarrhea visited in Ali Asghar hospital, Tehran. Bacterial isolates confirmed as EPEC serogroups on the basis of standard biochemical and serological tests. Antibiotic susceptibility testing was performed using 16 different antibiotic discs by disc diffusion agar (Kirby-Bauer) method.

Results: In this study 19 strains (6.8%) of EPEC isolated that prevalence of EPEC strains particularly serogroup poly IV was more common in children under one year old. All strains were sensitive to meropenem and imipenem, 63.2 % were resistant to nalidixic acid, tetracycline and amoxicillin and 89.5 % of strains were sensitive to ceftazidime and gentamycin. Results indicated that most strains completely or intermediately were resistant to nalidixic acid, tetracycline and amoxicillin.

Conclusion: Antibiotic resistance of EPEC strains to nalidixic acid ,tetracyclin and amoxiciline is increasing. Due to increasing resistance towards antibiotics, we should use new and effective antibiotics according to antibiotic susceptibility testing for treatment of infections.

Keywords: enteropathogenic *Escherichia coli*, antibiotic resistance, diarrhea , children

The survey of virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolated from urine samples

Ahmad Ghasemi¹, Rezvan Moniri*¹, Ahmad Khorshidi¹, Gholam Abbas Musavi²

1)Department of Microbiology & Immunology, Kashan University of Medical Sciences

2)Department of Statistics, School of Health, , Kashan University of Medical Science

Corresponding author: Rezvan Moniri: Department of Microbiology & Immunology, Kashan University of Medical Sciences, kashan, Iran School of Health. Tel: +98 361 5550021 E. mail: moniri@kaums.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives: *Enterococcus faecalis* is a normal commensal in the human intestinal flora but can leads to nosocomial infections. Several virulence factors have been described in *E. faecalis*, including aggregation substance(Agg), enterococcal surface protein(Esp), cytolysin (Cyl) having both hemolytic and bactericidal activity, and gelatinase(Gel). These factors act synergistically to enhance virulence, resulting tissue damage and tissue invasion. The aims of this study was phenotypic determination of virulence factors of *E. faecalis* isolates recovered from patients with urinary tract infections.

Material and Methods: This descriptive study were carried out in 95 clinical *E. faecalis* isolates recovered from patients with urinary tract infections in Shahid Beheshti hospital in Kashan, Iran, between 2007 and 2008. The production of biofilm, hemolysin and gelatinase by these isolates was also examined and the associated medical records of patients were retrospectively reviewed. Data were analyzed using Chi Square and Exact Fischer tests.

Results: Gelatinase activity was detected in 19 of the 95 (20%) *E. faecalis* isolates, hemolysin was detected in 42 of 95 (44.2%) *E. faecalis* isolates as beta hemolysis 35.8% and alpha hemolysis 7.4%, and 79 out of 95(83.2%) isolates showed weak, 6 out of 95(6.3%) moderate and 10 out of 95 (10.5%) strong biofilm formation. There was no significant correlation between biofilm formation and age, sex, previous history of antibiotic therapy, catheterization, production of haemolysin and gelatinase activity.

Conclusions: No single factor was detected as virulence prediction. It seems that the factors act synergistically.

Key words: *E. faecalis*, virulence factors, gelatinase , biofilm , urinary tract infections

The study of high level gentamicin resistance in *Enterococcus* species isolated from healthy human in Tehran, 2007-8

Noohi N^{1*}, Talebi M², Ebrahimipour GH¹, Pourshafie MR²

1) Department of Microbiology, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2) Division of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran

Corresponding author: Noohi N, Department of Microbiology, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. Mobail: 0914 4263784 E. mail: nasrinnoohi@gmail.com

ABSTRACT

Background and Objective: Enterococci are natural inhabitants of the gastrointestinal tract of humans and animals. Over the past decade, enterococci have become one of the leading causes of nosocomial infections, because they have acquired resistance to many antimicrobial agents such as vancomycin and gentamicin. Development of high-level gentamicin resistance among enterococci represents a serious therapeutic problem as it precludes synergy between aminoglycosides and cell-wall active agents. High-level gentamicin resistance (MIC \geq 500 mg/ml) in enterococci is predominantly mediated by *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene. The aim of present study was determination of high level gentamicin resistance in *Enterococcus* species isolated from healthy human in Tehran.

Material and methods: After enrichment of the fecal samples collected from healthy volunteers in BHI broth containing gentamicin, the isolates were subcultured on m-Enterococcus agar containing gentamicin. The isolates were identified to the genus and species levels and MIC was determined. Antibiotic susceptibility of the isolates was tested by agar diffusion method for 8 various antibiotics. The *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene was identified by PCR technique.

Results: gentamicin resistant enterococci(GRE) were isolated from 76(15.2%) of 500 fecal samples. The isolated species were: *E. faecalis* 45(59.2%) ,*E. faecium* 29(38.1%) and *E. gallinarum* 2(2.63%). GRE isolates were highly resistant to gentamicin(MIC \geq 500 μ g/ml). Eleven different antimicrobial resistance patterns were observed in this study. All of isolates carried the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* resistance gene.

Conclusion: These results represent a rather high prevalence of gentamicin resistance enterococci as a normal flora in the community. The *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene was the most common gene among the gentamicin-resistant isolates evaluated in this stud.

Key words: Enterococcus, gentamicin, high-level resistance , healthy human.

Evaluation of nalidixic acid susceptibility testing for screening of clinical strains of *Salmonella* with decreased susceptibility to ciprofloxacin

Iranshahi N¹, Ranjbar R², Siadat SD³, Nejadi M³, Harzandi N¹, Norozian D³,
Naghoni A¹, Morovvati S², Safiri Z², Yousefi S², Tabaraie B^{3*}

1) Department of Microbiology, Islamic Azad University-Karaj Branch, Iran

2)) Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3) Bacterial vaccine and antigen preparation unit, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran

Corresponding author: Tabaraie B, Bacterial vaccine and antigen preparation unit, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Mobile: 09123618160

E. mail: tabaraie@kfg.ir

ABSTRACT

Background and objectives: Fluoroquinolones, in particular ciprofloxacin have recently become the drug of choice for antibiotic therapy of invasive *Salmonella* infections in many countries. However, several treatment failures due to *Salmonella* strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin have been reported. These isolates are still considered to be susceptible to ciprofloxacin according to CLSI interpretive criteria ($MIC \leq 1 \mu\text{g/ml}$) while they can not be detected by disk diffusion test. CLSI has recommended nalidixic acid disk diffusion as an indicator test for screening of *Salmonella* isolates with decreased susceptibility to ciprofloxacin. In this study the value of nalidixic acid susceptibility testing for screening of clinical strains of *Salmonella* with decreased susceptibility to ciprofloxacin was evaluated.

Material and methods: *Salmonella* spp. strains have been isolated from several provinces in Iran during 2007-2008. The strains were identified by standard biochemical tests and serology. The susceptibility of the isolates to nalidixic acid and ciprofloxacin was determined by disk diffusion method. MIC assay for ciprofloxacin was determined by E. test.

Results: 28 out of 53 *Salmonella* strains (52.8%) were resistant to nalidixic acid. Disk diffusion testing showed that all isolates were susceptible to ciprofloxacin however 8 (15%) resistant nalidixic acid isolates showed decreased susceptibility to ciprofloxacin ($MIC = 0.125 \mu\text{g/ml}$) when tested by E.test.

Conclusion: The results showed that nalidixic acid disk diffusion test can be considered as a reliable and cost-effective method for screening of *Salmonella* strains with low level resistance to ciprofloxacin.

Keywords: *Salmonella*, Ciprofloxacin, Nalidixic acid, Antibiotic susceptibility testing

Epidemiologic evaluation of virulence genes, *pap*, *sfa*, *cnf-1*, *hly* in *E. coli* strains isolated from children with urinary tract infection

Farshad S^{1*}, Emamghorashi F², Amin Shahidi M¹

1) Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

2) Pediatric Department, Jahrom University of Medical Sciences, Medical School, Jahrom, Iran

Corresponding Author: Farshad S, Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz, Iran.
Tel: +98 711 6474304 Fax: +98 711 6474303 E.mail: s_farshad@yahoo.com

ABSTRACT

Background and objectives: Urinary tract infection (UTI) caused by *E. coli* is one of the most common diseases in children. Presence of four virulence genes of *pap*, *sfa*, *hly* and *cnf* have important role in organism pathogenicity and adhesion to epithelial cell. The present study was aimed to evaluate the prevalence of these four important virulence genes in *E. coli* strains isolated from urine samples of children with UTI and their correlation with clinical data.

Materials and Methods: *E. coli* strains were isolated from urine samples of children with UTI who presented during 2005-2006 in Motahary hospital, Jahrom, Iran. The isolates were then studied for presence of genes *hly*, *cnf-1*, *pap* and *sfa* by PCR technique.

Results: Totally 96 *E. coli* strains were isolated from urine samples of children with UTI aged from 1 month to 14 years (mean 21.8± 26.9 months). Cystitis was diagnosed in 49.2% and pyelonephritis in 50.8% of these patients. Prevalence of genes *pap*, *sfa*, *hly* and *cnf-1* among the strains was 27.1%, 14.6%, 13.5% and 22.9 %, respectively. Overall 32 samples (33.3%) were positive for at least one of the genes and 6 samples (6.3%) were positive for all four genes. *pap* and *sfa* were more common in ages over 36 months but *hly* was more detected in age under 48 months (P<0.05). *cnf-1* gene was significantly more common in samples of the patients with abnormal kidney sonography (P=0.049).

Conclusion: This study showed that the prevalence of virulence genes *hly*, *cnf-1*, *pap* and *sfa* in *E. coli* isolates was similar to the results of other studies. Because of higher prevalence of pyelonephritis in presence of these genes, rapid detection of the genes in urine samples may help in more suspicious and rapid management of pyelonephritis.

Key words: *E. coli*, PCR, pyelonephritis, cystitis, virulence genes

Evaluation of antibody response to outer membrane proteins of *Brucella abortus* S99 by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Karami S¹, Siadat SD^{*2}, Tabaraie B², Norouzian D², Harzandi N¹,
Aghasadeghi MR³, Izadi Mobarakeh J³, Razavi MR³, Kheirandish M⁴, Sadat SM¹,
Nejati M², Sharifat Salmani A³

- 1) Department of Microbiology, Isalmic Azad University, Karaj Branch, Iran
- 2) Bacterial vaccine and antigen preparation unit, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 3) Department of hepatitis and aids, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 4) Research center, Iranian Blood Transfusion Organization

Corresponding author: Siadat SD, Bacterial vaccine and antigen preparation unit, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. Tel:+98 21 66968850 E.Mail: d.siadat@gmail.com

ABSTRACT

Background and objectives: Currently, antigenic determinants of *Brucella* cell wall such as outer membrane proteins (OMPs) and lipopolysaccharide (LPS) are considered as potential candidates to develop subunit vaccines. It has been shown that OMPs of *Brucella abortus* along with other bacterial components could stimulate synthesis of specific IgG antibody in rabbits. The aim of present study was evaluation of antibody response to OMPs of *Brucella abortus* S99 by ELISA method.

Materials and Methods: OMPs were extracted by deoxycholate extraction technique and further purification performed by sequential centrifugation and ultracentrifugation. Protein concentration determined by using the Nano drop ND – 10000. Sodium dodecyle sulfate polyacryl amid gel electrophoresis (SDS – PAGE) was used to produce a profile of OMPs proteins which these were further differentiated on the basis of molecular weight. By using this method, the class II proteins belongs to porins, which comprised the major OMPs in *B. abortus* were purified. The groups consisted of 3 rabbits were immunized with three different compounds comprises of OMPs only, combined with LPS and combined with complete Freund's adjuvant (CFA). Sera from immunized animals were then evaluated for specific antibody response.

Results: the most immunogenic compounds were LPS+ porins and CFA+ porins and could promoted specific antibody response in experimental animals. The level of specific antibodies in rabbits immunized with above mentioned combinations was significantly higher compared to immunized rabbits with porins only (P<0.05).

conclusion: Based on the results, the combination of LPS+ porins can produce long term protective immunity against *Brucella*. So it could be probably considered for developing of subunit vaccine for prevention of human brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus* S99, outer membrane proteins , ELISA ,LPS, Vaccine.

Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with diarrhea by use of multiplex PCR and study of their adherence ability to epithelial cells

Davoodabadi A¹, Abaszadeh M¹, Alavi M¹, Jafari A¹, Bouzari S^{*1}

1)Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding author: Boozari S, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Tel:+98 21 66953311-20 (ext. 2223) E. mail: saeidbouzari@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging pathogen that cause acute and chronic infantile diarrhea. The stacked – brick appearance of EAEC strains to HeLa or Hep-2 cells is the gold standard assay for the detection of EAEC strains and is different from adherence pattern of EPEC and DAEC. In the present study, a multiplex PCR (mPCR) assay was used for detection of EAEC strains and its results was compared to HeLa cells adherence assay.

Materials and Methods: In this study the *E.coli* strains isolated from diarrheal children from Tehran children medical center were used. The isolates were identified according to standard procedure. The 170 strains were subjected to mPCR assay. This assay is based on the presence of three plasmid borne genes i.e aaP, aggR , aatA. The mPCR positive and negative strains were further checked for their adherence patterns on HeLa cells.

Results: the results of mPCR of these strains revealed that 114 (67%) of these strains were identified as EAEC by this mPCR assay. The frequency of occurrence of these genes was 100 %, 96.4 % and 70% for the aaP, aggR, and aatA genes respectively. The 86.9% of mPCR positive strains were HeLa cell adherent (stacked-brick) and only 13.1% of mPCR positive strains were not adherent. On the other hand 27.2% of strains that on mPCR assay were negative, adhered to HeLa cells in a characteristic manner of EAEC isolates (stacked –brick).

Conclusion:the overall results obtained in this study, showed that the mPCR assay used here is able to detect the strains with HeLa cells adherence characteristic of EAEC isolates. Moreover some strains non-adherent on HeLa cells was positive with the mPCR visa-versa. In conclusion it seems this mPCR assay is rapid and specific assay for detection of EAEC strains and especially is suitable for screening large number of isolates in epidemic situation.

Keywords: Multiplex PCR, EAEC, HeLa cell, stacked –brick adherence

Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (*SHV* type) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz

Mobasher Kare Jeddi AR¹, Nahaei MR^{*2,3}, Mobayyen H⁴, Pornour M¹, Sadeghi J²

- 1) Department of Microbiology, Zanjan Islamic Azad University, Zanjan, Iran
- 2) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of medical.scinces, Tabriz, Iran
- 3) Drug Applied Research Center, Tabriz University of medical.scinces, Tabriz, Iran
- 4) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Corresponding author: Nahaei MR, Dept. of Medical Microbiology, Faculty of Medicine and Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences. TEL: + 98 411 3364661 E.mail : nahaeimr@tbzmed.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives: Nowadays, there is an emerging increase in drug resistance in medical centers due to extended use of third generation cephalosporins. This study was conducted to evaluate antibiotic sensitivity profiles of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates collected from four medical centers (Imam Khomeini, Sina, Shohada and Pediatrics) in Tabriz and detection of presence of *bla_{SHV}* gene among the isolates.

Materials and methods: In total 41 isolates of *Escherichia coli* and 47 isolates of *Klebsiella pneumoniae* were collected from medical centers. The antibiotic sensitivity pattern of the isolated were determined by using drug susceptibility test according to Kirby-Bauer method. Combined disk test was also used as confirmatory test, and the findings were adapted with CLSI standard. PCR technique was used for investigation of presence *bla_{SHV}* gene in final step .

Results: Among the *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, 33 (80.49%) and 43 (91.48%) were resistant to ceftazidime and 32(78.05%) and 42 (89.36%) were resistant to cefotaxime respectively. Forty out of 41 *E. coli* isolates (97.5%) were ESBL producers, which among them 7 isolates (17.0%) contained *bla_{SHV}* gene. Among 47 *K. pneumoniae* isolates, 46 (97.8%) were ESBL producers which 12 isolates (25.5%) contained *bla_{SHV}* gene. All of the *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates were sensitive to imipenem.

Conclusion: The high resistance profiles encountered in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, underlines need for accurate sensitivity testing and also avoidance from inappropriate use of antibiotics in management of ESBL producing bacteria is recommended.

Keywords: Extended-spectrum beta-lactamase, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, Polymrase chain reaction, *bla_{SHV}* gene.

Design and construction a recombinant BCG containing cytosine deaminase suicide gene to increase the potency of intravesical BCG in treatment of bladder cancer

Feiz Barazandeh A¹, Khanahmad H^{2*}, Ebrahimipour GH¹,
Abolhassani M², Movassagh H², Sohrabi T²

- 1) Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- 2) BCG Department, Pasteur Institute of Iran

Corresponding author : Hossein Khanahmad, BCG Department, Pasteur Institute of Iran
E. mail: hossein_khanahmad@yahoo.com Mobael: 09131214031

ABSTRACT

Background and Objectives: Bladder cancer is the second common genitourinary tract cancer in the world. Immunotherapy with intravesical *Mycobacterium bovis* BCG is the selective treatment for superficial bladder cancer. CD/5FC Enzyme-Prodrug system of gene therapy is an alternative technique for controlling bladder cancer. This research is aimed at the design and construction of mycobacterial shuttle vector containing hsp60 promoter, alpha antigen signal sequence and cytosine deaminase (CD) and consequent transformation to *M. bovis* BCG by electroporation. It is assumed that converting of 5-FC to 5-FU via CD will kill more tumor cells and increase the efficacy of this therapeutic method.

Material and Method: After amplification of mycobacterial shuttle vector gene fragments containing hsp60 promoter, alpha antigen signal sequence and *Saccharomyces cerevisiae* CD gene by PCR and enzymatic digestion, they were cloned and subcloned in pBGGT and pVN2 respectively. The final plasmid was transformed to *M. bovis* BCG by electroporation method.

Results: Sequencing results confirmed the integrity and correctness of final vector which called pHARA. The cells which received pHARA, were cultured on Middlebrook 7H10 agar with 20µg/ml final concentration of kanamycin, and grown during 17 days.

Conclusion: Mentioned recombinant BCG (rBCG) secreting CD enzyme in addition to adjuvant property and stimulation of local immunity responses against tumor cells, can also destroy more tumor cells through converting 5-FC to 5-FU via CD enzyme that intensifies BCG efficacy in treatment of superficial bladder cancer.

Key Words: BCG, Bladder Cancer, Immunotherapy, Gene therapy, electroporation

Food Microbiology

Investigation of contamination of traditional non-pasteurized ice-creams with *E.coli* and *Staphylococcus aureus* in Semnan, Iran-year 2007-8

XI

Afraz V, Jazayery Moghadas A, Irajian GR

Health-care associated infections

Prevalence of and some risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in hospitalized children

XII

Sharifi M, Sareshtedari M, Hassani F, Reissi B, AlipourHeidary M

Table of Contents

Bacteriology

- Design and construction a recombinant BCG containing cytosine deaminase suicide gene to increase the potency of intravesical BCG in treatment of bladder cancer** **I**
Feiz Barazandeh A, Khanahmad H, Ebrahimipour GH, Abolhassani M, Movassagh H, Sohrabi T
- Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHV type) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz** **II**
Mobasher Kare Jeddi AR, Nahaei MR, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J
- Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with diarrhea by use of multiplex PCR and study of their adherence ability to epithelial cells** **III**
Davoodabadi A, Abaszadeh M, Alavi M, Jafari A, Bouzari S
- Evaluation of antibody response to outer membrane proteins of *Brucella abortus* S99 by Enzyme Linked Immunosorbent Assay** **IV**
Karami S, Siadat SD, Tabaraie B, Norouzian D, Harzandi N, Aghasadeghi MR, Izadi Mobarakeh J, Razavi MR, Kheirandish M, Sadat SM, Nejati M, Sharifat Salmani A
- Epidemiologic evaluation of virulence genes, *pap*, *sfa*, *cnf-1*, *hly* in *E. coli* strains isolated from children with urinary tract infection** **V**
Farshad S, Emamghorashi F, Amin Shahidi M
- Evaluation of nalidixic acid susceptibility testing for screening of clinical strains of *Salmonella* with decreased susceptibility to ciprofloxacin** **VI**
Iranshahi N, Ranjbar R, Siadat SD, Nejati M, Harzandi N, Norozian D, Naghoni A, Morovvati S, Safiri Z, Yousefi S, Tabaraie B
- The study of high level gentamicin resistance in *Enterococcus* species isolated from healthy human in Tehran, 2007-8** **VII**
Noohi N, Talebi M, Ebrahimipour GH, Pourshafie MR
- The survey of virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolated from urine samples** **VIII**
Ahmad Ghasemi, Rezvan Moniri, Ahmad Khorshidi, Gholam Abbas Musavi
- Antibiotic resistance patterns of enteropathogenic *E.coli* (EPEC) serogroups isolated from stool of under 5 years old children with diarrhea in Tehran:2007- 2008** **IX**
Shirazi MH, Akbari A, Sharifi Yazdi MK, Hosseini M, Fard Sanei F, Bakhtiari R, Soltan Dallal MM
- Serotyping of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Tehran, Iran** **X**
Mehrabi Tavana A, Ataee R, Najde Gerami E, Goya MM, Rahbar M

In the name of God

Iranian Journal of Medical Microbiology

The official publication of the Iranian society of microbiology

Volume 2, Numbers 3,4

Autumn and Winter

2008-2009

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

ISSN: 1735 - 8612



Owned and published by:

Iranian Society of Microbiology

Chairman:

Gholam Reza Irajian Ph.D

Editor in Chief:

Massoud Sharifi Ph.D

Executive Manager:

Reza Ranjbar Ph.D

Treasurer:

Mohammad Niakan Ph.D

Editorial Assistant:

Azar dokht Khosravi Ph.D

Editorial Bord:

Abdollahi, Hamid Ph.D- Alborzi, Abdolvahhab MD
Amir Mozafari, Nor Ph.D- Ataee, Ramezan Ali Ph.D
Fallah, Fatemeh Ph.D- Ghazi Saeedi, Kiumars Ph.D
Haji Abdolbaghi, Mahboubeh MD- Irajian, Gholam Reza Ph.D
Karimi, Abdollah MD- Mehrabi Tavana, Ali Ph.D
Mirsalehian, Akbar Ph.D- Nahae, Mohammad Reza 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:

Alikhani, Mohammad Yousef Ph.D- Ataee, Ramezan Ali Ph.D
bouzari, saeid Ph.D- Fallah, Fatemeh Ph.D
Feizabadi, Mohammad Mehdi Ph.D- Irajian, Gholam Reza Ph.D
Khosravi, Azar dokht Ph.D- Mirsalehian, Akbar Ph.D
Mobarez, Ashraf Ph.D- Nahae, Mohammad Reza Ph.D
Nateghian, Ali Reza M.D- Niakan, Mohammad Ph.D
Pourmand, Mhammad Reza Ph.D- Pourshafie, Mohammad Reza Ph.D
Rahbar, Mohammad Ph.D - Ranjbar, Reza Ph.D
Soltan Dallal, Mohammad Mehdi Ph.D- Sharifi, Massoud Ph.D
Tabaraie, Bahman Ph.D- Tavakoli, Akbar 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