



صاحب امتیاز:

انجمن علمی میکروب شناسی ایران

مدیر مسئول:

دکتر مهدی فیض آبادی

سر دبیر:

دکتر مسعود شریفی

جانشین سر دبیر:

دکتر محمدرضا پورمند

مدیر اجرایی:

دکتر رضا رنجبر

مدیر امور مالی:

دکتر محمد نیاکان

ویراستار:

دکتر محمدرضا پورمند

هیات تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر عبدالوهاب البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز- دکتر نور امیر مظفری، دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکتر غلامرضا ایراجیان، دانشگاه علوم پزشکی ایران- دکتر محمدرضا پورشفیعی، انستیتو پاستور ایران
دکتر محمدرضا پورمند، دانشگاه علوم پزشکی تهران- دکتر بهمن تیرائی، 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 محمد مهدی سلطان دلال، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مسعود شریفی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین- دکتر مروت طاهری کلانی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
دکتر حمید عبدلهی، 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 سلطان احمد ابراهیمی، دکتر غلامرضا ایراجیان،
دکتر محمد رهبر، دکتر محمد حسین سالاری،
دکتر فرشته شاهچراغی، دکتر مسعود شریفی،
دکتر حمید عبدلهی، دکتر فریبا فیاض،
دکتر عزت... قائمی، دکتر شهاب مدرس گیلانی،
دکتر اکبر میر صالحیان، دکتر محمدرضا نهایی،
دکتر محمد نیاکان، دکتر سعید ولی زاده،
دکتر بابک ولی زاده، دکتر جلیل وند یوسفی

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

طراح و گرافیک: مینا آراین

نشانی: تهران، صندوق پستی ۱۶۴۶-۱۳۱۴۵

تلفکس: ۸۸۹۵۴۹۱۰

پست الکترونیک: jmicrobiology@gmail.com

آدرس سایت: www.ism.ir

طراحی جلد و چاپ:

گروه فیروز تجارت

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

قیمت: ۲۰۰۰۰ ریال

فهرست مندرجات

سخن سردبیر

باکتری شناسی

- ۱ شیوع ژن بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC در ایزوله های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*
محمد نیاکان ، محسن چیت ساز ، علیرضا مطوائی
- ۹ گزارش یک مورد جداسازی *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* مقاوم به متی سیلین از پرسنل
بخش های درمانی
زهرا عبدالصمدی ، محمدرضا پورمند ، مجتبی معمارستانی ، فاطمه فردصانعی
- ۱۵ تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت سلول به روش *PCR*
محمدحسن شاه حسینی ، زهرا حسینی ، بهمن تیرائی ، فاطمه اخلاقی ، محمد علی شکرگزار ، الهام مسلمی
- ۲۷ نا همگونی الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های بالینی سالمونلا در تهران
رضا رنجبر، علی ناغونی ، بهمن تیرائی
- ۳۵ بررسی وجود ژن *blaZ* و تولید بتالاکتاماز در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*
فرشته راعی ، فرشته افتخار
- ۴۳ مقایسه اثر ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد و لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا*
محسن میرزایی ، امیر قریب ، پرویز اولیاء
- ۴۹ صحت تشخیص آزمایشگاهی و آنتی بیوگرام باسیل های گرم منفی به صورت روتین در مقایسه
با روش های استاندارد در کرمان
ثمانه عباسی ، شهلا منصوری

ویروس شناسی

- ۵۵ شیوع آنتی بادی علیه ویروس های هیپاتیت و ایدز در دندانپزشکان شهر قزوین
مسعود شریفی ، کتابون برهان مجابی ، محمد رضا سلمانی ، رضا فرهنگ ، عظیم مستاجری ، محمود علیپور حیدری

سخن سردییر

میکروب‌شناسی علمی است که دستخوش تحول مستمر و در عین حال منشاء تحول علوم دیگر (بیوشیمی و ژنتیک)، و پیدایش علوم جدید (نظیر بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی) بوده است. هیچ علمی ایستا (استاتیک) نیست و اساساً علم پویا (دینامیک) است. به سخن دیگر، گسترش دامنه دانسته‌ها، ما را به زوایای ناشناخته علم آگاه می‌سازد. برای مثال، زمانی دانسته‌های ما به قدری بسط پیدا کرد که؛ چرخه کربس را شناختیم؛ DNA را تنها گنجینه اطلاعات وراثتی شناختیم و پذیرفتیم که واحد زنده (سلول) باید DNA و ملازم محتوم آن RNA را داشته باشد؛ بعد پذیرفتیم که بعضی فقط با DNA یا RNA، هم وراثت دارند؛ ناگزیر ویروس‌ها را موجودات زنده تلقی کردیم؛ به کسانی که اصول علمی پذیرفته شده آن زمان (اصل Central Dogma) را به هم ریختند (رتروویروس هم با RNA منفی و رمزدهی ترانسکریپتاز معکوس اطلاعات منتقل می‌کند) جایزه نوبل دادیم؛ علم به باورما نشانند که عناصر گلیکوپروتئینی ریز و غیر معمول، و بدون ساختار ژنومی، می‌توانند تکثیر شوند؛ ناگزیر پرویون هم ویروس آهسته تلقی شد، و جایگاهی در بین موجودات، آن هم از مقوله زنده آن پیدا کرد. این پویایی (دینامیسم) که در نهاد علم نهفته است، متضمن گسترش مرزهای دانش است. از سویی وقتی در قرون گذشته موضوع تازه‌ای کشف می‌شد تعدادی با سرسختی در مواضع قبلی پا می‌فشردند. این جدال متعصبانه به وضوح برسینه تاریخ علم سنگینی می‌کند: زمانی گالیله، اصول کپرنیکی را بهم ریخت و گویی دنیای کلیسا را به کاروزار فراخواند؛ لون هووک در راه دنیای Animalicula viva گشود، مجلس او را ترک کردند؛ پاستور تولید خود به خودی را زیر سؤال برد، با جنجال شیمی دانان مواجه گردید؛ موتانه LAV (Lymphadenopathy associated virus) را عامل نقص ایمنی انسان معرفی کرد، آن را آلودگی آزمایشگاهی گفتند، سال بعد پذیرفتند و سرانجام جایزه نوبل اش دادند. امروز با طرح موضوعی تازه، خیل عظیم دانش پژوهان، بی‌تعصب، به کنکاش‌های علمی در می‌آید. به بیانی دیگر، در این روند، علم با ایفای رسالت جانبی به تربیت علماء و دانشمندان پرداخت: علم را باید با زبان علم پاسخ داد و نه با زبان تعصب. ادب برای انسان، به ویژه اگر از قشر فرهیخته باشد، یک ضرورت است. علم به ما آموخت، هرچه علمای سلف رنج کشیدند از بی ادبی بی ادبان بود.

هرچه بر تو آید از ظلمات و غم
آن ز بی باکی و گستاخیست هم

به علماء آموخت، بی ادبی و گستاخی در علم راه به جایی نمی‌برد: گالیله بدانام است یا مخالفان؟

بی ادب تنها نه خود را داشت بد
بلک آتش بر همه آفاق زد

پویایی و اصل تربیت، ویژگی مشترک همه علوم از جمله میکروب‌شناسی است.

اما، در عمل شاید ارگاناسمی نیایم که دانسته‌های ما در باره آن برای مدت کوتاه متحول نشود و ثابت بماند. ویژگی اخیر در ماهیت زنده بودن میکروارگاناسم‌ها مستتر است. به بیانی، نقطه مشترک میکروب‌شناسی با سایر علوم در نخستین پویایی و اصل تربیت آن است، اما در پویایی دوم از آن‌ها متمایز است. پویایی اخیر در گرو زنده بودن میکروارگاناسم‌ها است. موجود زنده حق حیات دارد و برای آن تلاش می‌کند. تبلور این تلاش، به گسترده‌گی جهان هستی و در ابعاد زیر مشهود است:

۱- پیش از دهه ۱۹۴۰ (عصر پیش از آنتی‌بیوتیک) استرپتوکوک‌ها عامل عفونت‌های بیمارستانی بودند. با ورود سولفونامیدها و پنی‌سیلین (دهه‌های ۵۰-۱۹۴۰) جای آن را استافیلوکوکوس اورئوس اشغال کرد. بعد از آمینوگلیکوزیدها شاهد ورود باسیل‌های گرم منفی روده‌ای به این میدان شدیم و به تدریج با مکانیسم‌های مقاومت ضد میکروبی آشنا شدیم.

با سفالوسپورین‌های نسل سوم، شاهکار علم و فناوری در اوایل دهه ۱۹۸۰، باکتری‌ها که اجازه ندادند دهه به پایان برسد با مکانیسمی محیرالعقول ساز مقاوم زدند.

تلاش کردیم تا نسل چهارم و انواع جدید کلاس‌های آنتی بیوتیک‌ها را به رخ باکتری‌ها بکشیم. بعد از ظهور سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، و دامنه خاص مقاومتی آن، شاهد مقاومت حدواسط به ونکومایسین (VISA) بودیم. همزمان در دهه ۱۹۹۰ انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE) به مجموعه اضافه شد. باکتری‌ها هم با روند شتابان‌تری مکانیسم‌های مقاومت خود را یکی پس از دیگری به رخ ما کشیدند. اگر اعتراف کنیم سرخ‌بیش‌تر در دست باکتری‌ها است گزاف گفته ایم؟!

۲- به موازات مداخله ما، واریان‌ها و مکانیسم‌های جدید نقاب از چهره برگرفتند: MRSA با بیماری‌های جدید اکتسابی در جامعه و در بیمارستان، تغییر آنتی ژن‌های گنوکی

۳- ارگانسیم‌هایی که اساساً اهل پاتوژنز نبودند هم به تدریج اهل شدند: استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی

۴- نوپیدها از بازار آشفته سود جسته و عرض اندام کردند: HIV، E.coli O157:H7 و ...

دومین پویایی، این علم را آشکارا از سایرین متمایز می‌کند. شناخت میکروارگانسیم‌ها با هدف مقابله، تبدیل تهدید آنها به فرصت‌ها، بهره‌برداری از توانایی‌های بالقوه و استفاده از آنها به عنوان ابزاری سودمند در عرصه‌های بیوشیمی، ژنتیک و بیوتکنولوژی... همیاری همه اساتید و دانش پژوهان در تمام ابعاد این علم را طلب می‌کند. این گروه، دارایی‌های ارزنده و سرمایه ملی است، که رسالت آن، آموزش و تربیت دانشجویان است. به نسل جدید آموزش دهد که چگونه علمی بیندیشد، نقد کند، بپذیرد، رد کند و البته همه را با ادب علمی. این آموزش در سطح ملی و در محیطی همچون مجله حاضر تحقق می‌یابد. این همیاری باید با نگاه به مسائل و مشکلات بومی کشور باشد. زیرا ما در همه زمینه‌ها (اعم از مسائل پایه، اپیدمیولوژی، اشکال بالینی، مقاومت دارویی، درمان، عفونت‌های بیمارستانی، روش‌های متنوع آزمایشگاهی...) ضمن پای بندی به دیدگاه‌ها و ابزارهای جهانی به اطلاعات به روز و دقیق کشور خودمان نیاز داریم. این مهم مستلزم همیاری همه دانش پژوهان در همه ابعاد این علم گسترده اعم از باکتری‌شناسان، ویروس‌شناسان، انگل‌شناسان، فارچ‌شناسان، و حشره‌شناسان است. مجله میکروپزشکی ایران به همه علمی تعلق دارد که بدنه اصلی آن را می‌سازند. لذا، وظیفه خود می‌دانم که از فرهیختگان کشور دعوت کنم تا در این حرکت نرم افزاری میهنی فعالانه شرکت کنند. باشد تا به یاری باری تعالی شالوده‌ای پی‌ریزی کنیم که نقطه عطف حرکت نسل‌های آینده باشد. توفیق ادب طلب می‌کنم:

از خدا خواهیم توفیق ادب بی ادب محروم ماند از لطف رب

در خاتمه جا دارد از زحمات بی‌شائبه استاد فاضل و خستگی‌ناپذیر، جناب آقای دکتر عبدالعزیز رستگار لاری، که با سخت‌کوشی و صف‌ناپذیر سنگ بنای مجله میکروپزشکی ایران را بنیان نهاد از سوی خود و کلیه همکاران ارجمند مجله، مدیر مسئول محترم، هیئت محترم تحریریه و سایر همکاران گرامی سپاسگزاری و قدردانی نمایم. امید است در عین بهره‌مندی از ارشاد استاد، همکاران خلفی باشیم که مجله را به جایگاه شایسته و برحق آن رهنمون سازیم.

خدایا چنان کن که پایان کار تو خوشنود باشی و ما رستگار

و مورد تایید رستگار

دکتر مسعود شریفی

سردبیر

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)

Title : Times New Roman 14 (Bold)

Author: Times New Roman 10 (Bold)

Address: Times New Roman 10 (Bold)

Text: Times New Roman 11

اصل مقاله (فارسی)

عنوان مقاله : یاقوت ۱۶ (بولد)

نام نویسندگان : یاقوت ۱۲

چکیده : یاقوت ۱۴ (بولد)

عنوان چکیده : یاقوت ۱۱ (بولد)

متن چکیده : یاقوت ۱۱

متن مقاله : لوتوس ۱۱

عناوین متن مقاله : یاقوت ۱۴ (بولد)

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

بند ۳) در صورتی که تعداد نویسندگان بیش از یک نفر باشد ، باید قید شود که مقاله با همکاری همه مؤلفین تهیه ، خوانده و تأیید شده است .

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران از مقالات پژوهشی گروهی استقبال میکند .

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

چکیده به فارسی و انگلیسی حداکثر تا ۲۵۰ کلمه و به صورت چکیده های سازمان یافته فارسی(شامل چهار بخش: زمینه و اهداف، روش بررسی، یافته ها، نتیجه گیری) و انگلیسی (**Background and objectives, Material and Methods, Results, Conclusion**) و ۳ الی

۵ کلمه کلیدی (کلید واژه ها) از واژه های فهرست MeSH در اندکس مدیکوس باشد . گزارشهای موردی شامل چکیده غیر سازمان یافته حداکثر تا ۱۰۰ کلمه (به فارسی و انگلیسی) ، کلید واژه ها ، مقدمه ، گزارش مورد و بحث تفصیلی و فهرست مراجع خواهد بود .

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

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

مثال انگلیسی :

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

مثال فارسی :

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

۵-۲) سازمان به عنوان مؤلف ؛ مثال :

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

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

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

۵-۵) مجله همراه با ضمیمه تکمیلی :

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

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

مثال فارسی :

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

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

مثال انگلیسی :

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

شیوع ژن بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه

محمد نیاکان*، محسن چیت ساز، علیرضا مطوائی

گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده مسئول: محمد نیاکان، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ همراه: ۰۹۱۲۱۰۱۴۰۶۰ niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۸

چکیده:

زمینه و اهداف: مواد ضد میکروبی بتالاکتام در حال حاضر رایج ترین درمان برای عفونت های باکتریایی می باشند. استفاده از آنها منجر به بروز مقاومت باکتری های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام در سراسر جهان می شود. آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) آنتی بیوتیک های بتالاکتام راهبرولیز و غیرفعال می کنند. آنزیم های AmpC در کلاس C طبقه بندی ESBLs جای دارند. آنزیم های AmpC تیبیک که سفا لوسپورینازهای مقاوم به اسید کلوانینک می باشند باعث مقاومت در برابر اغلب اکسی آمینوسفالوسپورین ها می گردند. این آنزیم ها گروهی جداگانه از ESBLs می باشند، اما یک مشکل طبقه بندی درجهش یافته های AmpC رخ داده که منجر به افزایش فعالیت آنها در برابر سفپیم و سفپروم (سفالوسپورین های نسل چهارم) شده است. چنین جهش هایی در انواع کروموزومی جدایی ناپذیر AmpC رخ داده است، اما آنها می توانند به صورت همسان از انواع پلاسمیدی AmpC گسترش یافته و به طور فزاینده در گونه های کلبسیلا و اشریشیا کلی بسط پیدا کنند. هدف این مطالعه تعیین شیوع ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف AmpC در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه بود.

روش بررسی: ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه مربوط به سه بیمارستان امام خمینی، مصطفی خمینی و مرکز طبی کودکان در تهران بود. روش فنوتیپی که برای تشخیص سویه های بالینی مولد ESBLs مورد استفاده قرار گرفت روش آگار دایلوژن بود. برای جداسازی ژن های AmpC از روش مالتی پلکس PCR استفاده شد.

یافته ها: از ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه ۱۱۹ (۷۰/۸٪) ایزوله در غربالگری اولیه، از نظر تولید ESBLs مثبت بودند که ۹۹ (۸۳/۲٪) ایزوله در تست فنوتیپی تاییدی مثبت شدند و ۱۰ (۸/۴٪) ایزوله دارای ژن های AmpC بودند.

نتیجه گیری: مطالعه نشان داد که در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف و ژن AmpC وجود دارند، که بالطبع درمان را با مشکل مواجه می نماید. به نظر می رسد اینگونه مشکلات در بیمارستان های شهر تهران در حال گسترش باشد.

کلید واژه ها: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف، ژن AmpC

مقدمه :

ارگانسیم‌ها منتقل شده و مقاومتی شبیه به مقاومت بتالاکتام در انتروباکتر، به آنها ببخشند.

تاکنون بیش از بیست بتالاکتاماز مختلف نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناسایی شده‌اند. آنزیم AmpC نسبت به مهار با اسیدکلاولانیک مقاوم بوده و از نظر بیولوژیک مقاومت به سفامایسین‌ها را به خوبی مقاومت به اکسی‌آمینوبتالاکتام‌ها ایجاد می‌کنند (۹). بیشتر آنزیم‌های AmpC، سفالوسپوریناز هستند ولی تا حدی توانایی هیدرولیز سایر بتالاکتام‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها را نیز دارا می‌باشند (۱۰).

در اواخر دهه ۱۹۸۰ این ژن‌های کروموزومی قابل‌القاء روی پلاسمید آشکار شدند و به سایر باکتری‌های فاقد آنها نظیر کلبسیلا، اشریشیا کلی و یا گونه‌های سالمونلا انتقال یافتند. تشخیص فنوتیپی میکروارگانسیم‌های واجد AmpC دشوار است. این مسأله کار افرادی را که در آزمایشگاه بیمارستان کار می‌کنند، مشکل می‌سازد. زیرا این آنزیم‌ها نظیر ESBLs ممکن است با روش‌های رایج تعیین حساسیت شناسایی نشوند (۱۱). لذا این مطالعه به منظور تشخیص و تعیین شیوع ژن AmpC در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنو مونه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها :**۱) سویه‌های باکتریایی :**

از ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از سه بیمارستان امام خمینی، مصطفی‌خیمینی و مرکز طبی کودکان در تهران که از بخش‌های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه ارسال شده بود استفاده گردید.

۲) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی :

بر اساس دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standards institute) و از روش رقت در آگار برای اندازه‌گیری و تعیین MIC استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفوکسیتین به تنهایی و همراه با مهارکننده اسید کلاولانیک بود.

۳ - تست فنوتیپی غربالگری اولیه تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) :

برای انجام این تست از پودر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و سفنازیدیم (ساخت شرکت Glaxo Smith Klin) یک سریال

بتالاکتامازها آنزیم‌های باکتریایی هستند که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، یعنی پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها، را با هیدرولیز حلقه بتالاکتام غیرفعال می‌کنند (۱).

یکی از مشکل‌سازترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در رابطه با بتالاکتامازها می‌باشد. عوامل ضد میکروبی بتالاکتام شایع‌ترین درمان بر ضد عفونت‌های باکتریایی هستند (۴-۲). میزان مقاومت به عوامل ضد میکروبی به طور گسترده و جهانی در حال افزایش می‌باشد. تولید بتالاکتامازها شایع‌ترین مکانیسم مقاومت باکتریایی می‌باشد (۳، ۴). این آنزیم‌ها بی‌شمار هستند (تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع مختلف بتالاکتاماز در نمونه‌های بالینی تعریف شده‌اند) و به علت مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مداوم جهش می‌یابند که منجر به گسترش و توسعه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌شوند (۵، ۶). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) نخستین بار در سال ۱۹۳۸ شناسایی و تعریف شدند و به طور کلی عبارتند از بتالاکتامازهایی که قادر به هیدرولیز و غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رایج از قبیل پنی‌سیلین‌ها، اکسی‌آمینوسفالوسپورین‌ها، منوباکتام‌ها و حتی کارباپنم‌ها می‌باشد. اما سفامایسین‌ها را نمی‌توانند هیدرولیز کنند و اثر آنها توسط مهارکننده اسید کلاولانیک مهار می‌شود (۷، ۸).

عفونت با باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در انتشار وسیع این سویه‌ها، به ویژه در بیمارستان‌ها، باعث افزایش هزینه درمان و افزایش طول مدت بستری می‌گردد. امروزه وجود انتروباکتریاسه مولد ESBLs یک نگرانی بزرگ و در حال گسترش در دنیا محسوب می‌شود. بعلاوه، باکتری‌های مولد ESBLs به طور شایع به بسیاری از داروهای غیربتالاکتام مانند کینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول نیز مقاومت نشان می‌دهند که این امر باعث ایجاد مشکلات زیادی در درمان عفونت‌های ناشی از آنها می‌شود (۷).

مطالعه بر روی بتالاکتامازهای نوع AmpC از اواخر دهه ۱۹۷۰ شروع شد. آنزیم‌های AmpC که اغلب قابل‌القاء توسط بتالاکتام‌ها هستند به وسیله ژن‌های کروموزومی کد می‌شوند و در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی وجود دارند. جهش‌هایی که موجب افزایش بیان ژن AmpC می‌شود مسئول ظهور سریع و آسان سویه‌های مقاوم فراوان نسبت به سفالوسپورین‌ها در انتروباکتر کلوآکه می‌باشد. آنزیم AmpC در باکتری اشریشیا کلی به مقدار کم بیان می‌شود. کروموزوم‌های کلبسیلا و سالمونلا فاقد ژن AmpC هستند. اما آنزیم‌های AmpC با واسطه پلاسمید می‌توانند به این

ترکیب مخلوط واکنش PCR برای یک تست ۵۰ تایی مالتی پلکس PCR به قرار زیر است :

آب مقطر استریل: ۱۰۹۸ μl ، PCR buffer 10x : ۲۵۰ μl ، مخلوط dNTP : ۴۰۰ μl ، از هر جفت پرایمرهای MOXM و CITM و DHAM هر کدام ۶۰ μl ، از جفت پرایمر ACCM و EBCM هر کدام ۵۰ μl و از جفت پرایمر FOXM هر کدام ۴۰ μl و Taq DNA Polymerase : ۱۲/۵ μl .

برای تست PCR برای هر ایزوله از ۴۸ μl مخلوط واکنش به اضافه ۲ μl DNA الگو استفاده گردید . پرایمر ها از شرکت Roche آلمان تهیه شدند . برنامه PCR برای ۲۵ سیکل تکثیر به دستگاه ترموسایکلر داده شد که شامل مراحل زیر بود :

مرحله اولیه جداسازی یا باز شدن دو رشته به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴۰ C ، مرحله باز شدن دو رشته به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴۰ C (denaturation) ، مرحله اتصال پرایمر ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴۰ C (annealing) ، مرحله طولیل شدن یا ساخته شدن رشته هدف به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴۰ C (extention) ، مرحله طولیل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲۰C .

محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل آگاروز ۱/۵٪ در بافر TBE بررسی گردیدند. ژل ها با اتیديوم برماید رنگ آمیزی و سپس محصولات PCR با نور UV مشاهده گردیدند.

در این مطالعه از شش جفت پرایمر اختصاصی برای شش خانواده مختلف ژنی بتالاکتامازهای AmpC استفاده شد. خصوصیات این پرایمر ها در جدول ۱ آورده شده است.

یافته ها :

نتایج تست فنوتیپی غربالگری اولیه MIC: از کل ۱۶۸ ایزوله بالینی که توسط تست MIC جهت مقاومت به سفنازیدیم و سفتریاکسون مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱۹ (۷۰/۸٪) ایزوله بر اساس دستورالعمل CLSI به عنوان سویه های بالقوه تولید کننده ESBLs شناسایی شدند.

نتایج تست فنوتیپی تاییدی ESBLs :

در این مرحله MIC تمام ایزوله های بالینی در برابر آنتی بیوتیک سفنازیدیم و سفتریاکسون به همراه مهار کننده کلاولانیک مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد از بین ۱۱۹ ایزوله از ارگانسیم هایی که در تست غربالگری اولیه به صورت بالقوه تولید کننده ESBLs شناخته شده بودند، ۹۹ ایزوله (۸۳/۲٪) کاهش ۳

رقت ۱۵ تایی از ۰/۷۵ μl - ۱۲۸۰۰ μl تهیه شد.

۳-۱- قبل از انجام تست تعیین MIC برای آنتی بیوتیک ها به روش مایکرو برات دایلوژن تست کنترل کیفی انجام شد. جهت صحت تست از سویه های استاندارد زیر استفاده گردید (۱۳،۱۲) :

استافیلوکوکوس اورئوس: ATCC ۲۹۲۱۳

اشریشیا کلی: ATCC ۲۵۹۲۲

کلبسیلا پنومونیه: ATCC ۷۰۰۶۲۲

۳-۲- آزمایش های تاییدی فنوتیپی تولید ESBLs :

در این مرحله به وسیله آنتی بیوتیک های سفنازیدیم و سفتریاکسون به همراه اسید کلاولانیک برای ایزوله ها به روش رقت در آگار تست تعیین MIC انجام شد (۱۳و۱۲).

۳-۳- آزمایش فنوتیپی تاییدی تولید بتالا کتاماز وسیع الطیف نوع AmpC :

طبق تعریف ایزوله هایی که پس از انجام تست فنوتیپی غربالگری اولیه و تاییدی به عنوان تولید کننده ESBLs شناسایی شده و اثر بتالاکتاماز در آنها به وسیله مهار کننده کلاولانات مهار نمی شود و همچنین در برابر سفنامایسین ها مقاوم هستند، تولید کننده بالقوه بتالاکتاماز های وسیع الطیف نوع AmpC محسوب می شوند. از این رو، برای تمامی ایزوله ها به روش رقت در آگار تست تعیین MIC انجام گرفت .

۴- تعیین ژن های بتالاکتاماز نوع AmpC :

از روش مالتی پلکس PCR جهت شناسایی AmpC بتالاکتاماز های پلاسمیدی استفاده شد. برای استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن (boiling) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از یک پاساژ از نمونه ها بر روی محیط بلاد آگاریک کلنی تک از هر ایزوله به پنج میلی لیتر محیط کشت مایع لوریا برتانی تلقیح شد و در دمای ۳۷۰C به مدت ۲۰ ساعت بر روی شیکر انکوبه شد. پس از آن ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری درون لوله های اپندورف به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب آن به وسیله ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون در آمد و به وسیله دستگاه ترموبلاک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵۰C قرار گرفت . لوله های اپندورف مجدداً به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد . در این مرحله بقایای لاشه باکتری ها رسوب کرده و DNA آنها در مایع رویی به حالت محلول در می آید که برای تست PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۵و۱۴).

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای خانواده های مختلف ژنی AmpC بتالاکتامازها

Primer	PCR Product (bp)	Target(s)
MOXM	520	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11
CITM	462	LAT-1 to LAT-4, BIL-1, CMY-2 to CMY-7
DHAM	405	DHA-1, DHA-2
ACCM	346	ACC
EBCM	302	MIR-1, ACT-1
FOX M	190	FOX-1 to FOX-5b

برخی از آنها ممکن است یک خانواده جدید از AmpC بتالاکتامازها باشند که در اثر جهش های ژنی بوجود آمده اند. زیرا اساساً گسترش خانواده های مختلف ژنی AmpC بتالاکتامازها در گذشته به همین شکل بوده است. از آنجا که برای ما در این مطالعه امکانات تعیین توالی این باندهای ژنی جدید ویا تکرار تست ها با کیت متفاوت دیگر و حتی استفاده از الکتروفورز با ژل پلی آکرلامید وجود نداشت، نمی توانیم در مورد ماهیت آنها اظهار نظر مطمئنی داشته باشیم. تمام این ۱۰ ایزوله قبلاً در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین مقاوم گزارش شده بودند و به صورت بالقوه تولید کننده بتالاکتامازها AmpC شناخته شده بودند (تصویر ۱).

مرتبه یا بیشتر MIC در حضور مهار کننده کلاولانات نشان دادند. یعنی تولید ESBLs در آنها تایید گردید.

نتیجه آزمایش تایید تولید ESBLs نوع AmpC :

پس از انجام تعیین MIC سفوکسیتین مشخص شد که از کل ۱۶۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۲۶ ایزوله (۱۵/۴٪) در برابر این آنتی بیوتیک حساس و تعداد ۱۴۲ ایزوله (۸۴/۶٪) مقاوم می باشند. یعنی به صورت بالقوه می توانند تولید کننده AmpC بتالاکتامازها در نظر گرفته شوند. زیرا که مکانیسم های دیگری به غیر از تولید AmpC جهت بروز مقاومت در برابر سفوکسیتین در باکتری ها وجود دارد.

نتایج تست مالتی پلکس PCR :

تست تشخیص ژنوتیپی AmpC نشان داد که از میان ۱۶۸ ایزوله بالینی تعداد ۱۰ ایزوله (۵/۹۵٪) دارای ژن های کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند. این ژن ها به ترتیب متعلق به خانواده های زیر بودند:

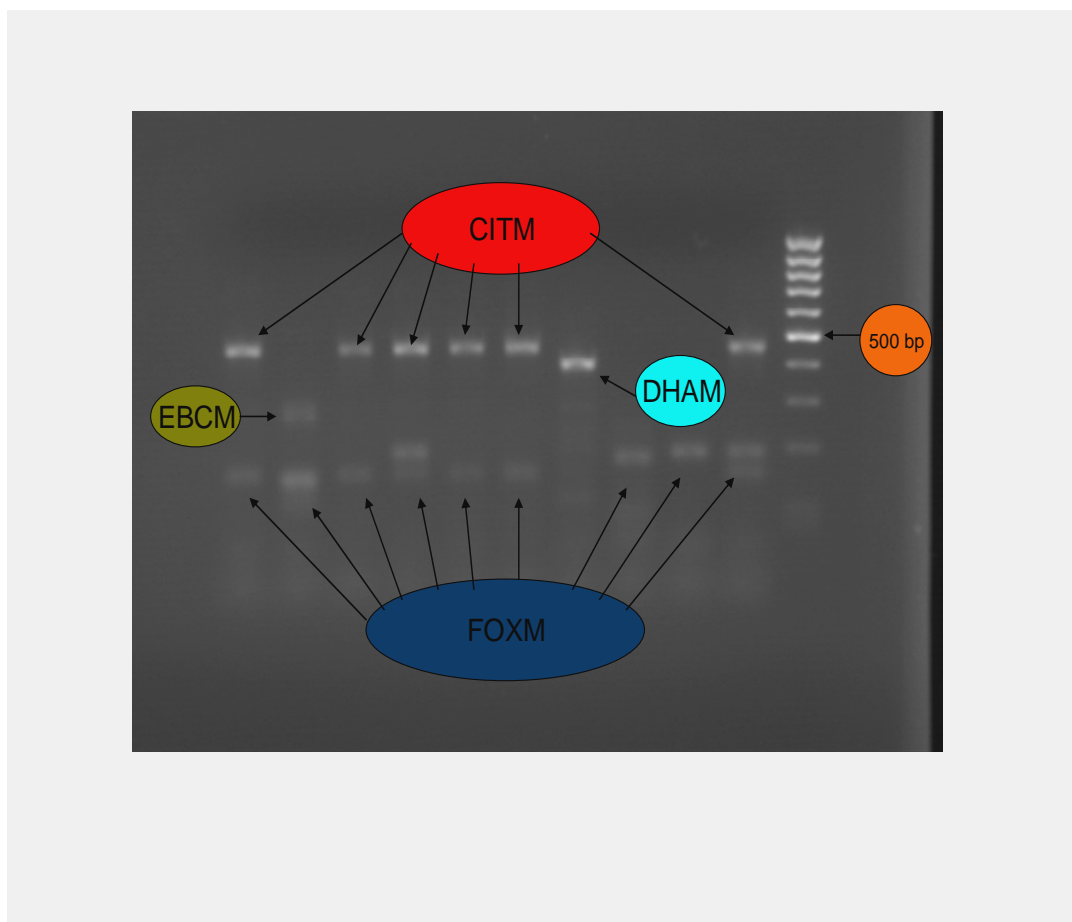
FOX M (n=9), EBCM (n=1), DHAM (n=1), CITM (n=6)

لازم به ذکر است که تعداد ۷ ایزوله واجد ۲ خانواده مختلف از AmpC بتالاکتاماز بودند از جمله خانواده های :

CITM- FOX M (n=6)

EBCM- FOX M (n=1)

در مورد خانواده ژنی FOX M لازم به ذکر است که برخی از باندها در جایگاه سایز ۱۹۰ جفت بازی قرار نداشتند. از آنجا که این باندها پس از تکرار تست مالتی پلکس PCR و الکتروفورز با ژل های جدید باز هم مشاهده شدند، این نظریه وجود دارد که



شکل ۱: تصویر ژل حاوی باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR استخراج شده از ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه

بحث :

سفالوسپورین ها عوامل ضد میکروبی هستند که رایج ترین درمان برای بسیاری از عفونت های باکتریایی می باشند (۱۸). امروزه وجود انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) یک نگرانی بزرگ و در حال گسترش محسوب می شود (۱۹).

از زمانی که پلاسمید های کد کننده ESBLs پدید آمدند ارگانسیم های واجد آن ها تا حد زیادی در هیدرولیز و غیر فعال کردن آنتی بیوتیک های بتالاکتام نظیر پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آرترونام موثر شدند (۲۰).

جداسازی ارگانسیم های مولد ESBLs می تواند دشوار باشد زیرا حضور ESBLs در باکتری ها همواره منجر به بروز مقاومت فنوتیپی نمی شود. خصوصا اگر از روش های سنتی تعیین MIC یا دیسک دیفیوژن ساده برای تفسیر نتایج حساسیت به آنتی بیوتیک ها استفاده شود (۲۰). در نتیجه سویه ای که از نظر ESBLs حساس

در این مطالعه ۱۶۸ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از سه مرکز بیمارستانی تهران از نظر وجود ESBLs به صورت فنوتیپی و از نظر وجود بتالاکتامازهای نوع AmpC به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شدند. تست های غربالگری و تاییدی فنوتیپی ESBLs نشان داد که ۸۴/۶٪ ایزوله ها در برابر هر سه آنتی بیوتیک سفالوسپورین نسل سوم یعنی سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوکسیتین مقاوم هستند. ۵/۹۵٪ ایزوله ها واجد ژن های کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز نوع AmpC بودند.

کلبسیلا پنومونیه یکی از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد که به عنوان پاتوژن فرصت طلب شناخته و معرفی می شود و می تواند عامل عفونت های شدیدی در نقاط مختلف بدن باشد. اما اغلب در دستگاه ادراری و تنفسی عفونت ایجاد می کند (۱۶). به طور کلی گفته می شود که کلبسیلا پنومونیه عامل حدود ۸٪ عفونت های بیمارستانی است (۱۷). آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز از جمله

عادی در دسترس آزمایشگاه های بالینی قرار ندارد. به همین خاطر یکی از عوامل مشکلات درمان و مرگ و میر از عفونت های بیمارستانی می تواند AmpC بتالاکتامازهای شناخته نشده می باشند .

نتیجه گیری :

با توجه به کم بودن تحقیقات در زمینه تعیین شیوع ESBLs در ایران و با توجه به گسترش روزافزون آن ها و اهمیت این گروه از آنزیم ها به خاطر اعطای سطح بالای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام به خصوص سفالوسپورین های نسل سوم که داروهایی بسیار رایج جهت درمان عفونت های بیمارستانی می باشند و به منظور جلوگیری از شکست های درمانی و کنترل عفونت های بیمارستانی ناشی از باکتری های حامل ESBLs ; توصیه می شود تحقیقات بیشتر و جامع تری در این زمینه انجام گیرد. با توجه به نتایج معتبر بدست آمده یک سری سیاست های کلی و عمومی جهت مقابله با گسترش و توسعه این آنزیم ها در پیش گرفته شود .

بهرتر است باکتری هایی که در برابر داروهای سفالوسپورین نسل سوم و کارباپنم مقاوم بوده و همچنین این مقاومت به وسیله مهارکننده های آنزیم های بتالاکتاماز از جمله اسید کلاولانیک مهار نمی شوند مورد بررسی مولکولی قرار گیرند و ژنوتیپ مقاومت آن ها مشخص گردد. این کار جهت جلوگیری از گسترش شیوع AmpC بتالاکتامازها که به وسیله پلاسمیدها براحتی به دیگر باکتری های حساس قابل انتقال هستند و ریسک درمانی بسیار بالایی را ایجاد می کنند، مفید و کارآمد می باشد.

گزارش می شود باید به وسیله تست های فنوتیپی استاندارد آزمایش شده باشد (۲۱). تشخیص فنوتیپی صحیح ESBLs روش خوبی جهت افتراق بین سویه های مولد ESBLs و سویه هایی است که از دیگر مکانیسم ها جهت مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام استفاده می کنند (۲۲).

مکانیسم های غیر آنزیمی مقاومت در برابر ESBLs نظیر نقص در کانال های پورینی غشاء خارجی باکتری و کاهش نفوذ پذیری آن در برابر آنتی بیوتیک ها و مکانیسم Efflux تفسیر حاصل از مقاومت باکتری ها را پیچیده می کند (۲۳). معمولا بسیاری از نمونه هایی که از عفونت های بیمارستانی بدست می آیند در برابر آنتی بیوتیک های متعددی مقاومت دارند (۲۴).

از نظر آماری شیوع ESBLs در ایران نسبت به سایر کشورهای جهان و حتی آسیا چشمگیرتر می باشد. یکی از مهم ترین دلایل آن می تواند استفاده بیش از حد و نابجا از داروهای بتالاکتام مخصوصا سفالوسپورین های وسیع الطیف باشد (۲۵). بنابراین یک اقدام مفید و موثر در زمینه کنترل عفونت های مقاوم به درمان می تواند کاهش مصرف نادرست این آنتی بیوتیک ها و استفاده اصولی از آنها باشد. تعدادی از ایزله ها در برابر اثر مهارکننده اسید کلاولانیک مقاوم بودند که به طور بالقوه می توانند واجد AmpC باشند و در تعدادی نیز ژن AmpC یافت شد، که از این نظر اهمیت زیادی دارند.

باید خاطر نشان کرد که امروزه راهنماهای قابل توجهی برای طراحی و اجرای تست های غربالگری و تایید AmpC در باکتری ها وجود ندارد . مثلا اگر یک ایزوله در برابر آنتی بیوتیک سفوکسیتین مقاوم باشد هر چند به طور کلی بالقوه می تواند دارای AmpC باشد

ولی این مسئله به طور کامل قطعیت ندارد و مقاومت می تواند ناشی از اختلال در نفوذپذیری غشاء خارجی باکتری باشد و منشا آنزیماتیک نداشته باشد (۲۶). بنابراین تشخیص و شناسایی مولکولی بتالاکتامازها به خصوص نوع AmpC برای بررسی مطمئن و دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی لازم و ضروری است. یکی از بهترین روش های مولکولی تکنیک PCR می باشد .

هر چند مدت زیادی از کشف AmpC بتالاکتامازهای با واسطه پلاسمید می گذرد ولی متأسفانه هنوز اهمیت بالینی این آنزیم ها بدرستی درک نشده و سویه های واجد این آنزیم ها در آزمایشگاه بالینی، جداسازی و تشخیص داده نمی شوند. هر چند که روش مالتی پلکس PCR به عنوان یک ابزار تحقیقی سودمند برای تشخیص این آنزیم ها در دسترس است اما به صورت یک روش

فهرست مراجع :

- Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*; 2001; **32**:1085-9.
- Albertini MT , Benoit C , Berardi L , Berroune Y , Boisivon A, and et al .Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase(ESBL) in Northern France : a five year multi-center incidences study. *J Hosp Infect*; 2002; **52**:107-13.
- Jawetz M. Ernest. *Medical Microbiology*, McGraw-Hill Company. Twenty-Third editions; 2004.
- Walker T. Stuart. *Microbiology*, Philadelphia USA, W.B. Saunders Company Chapter 3; 1998.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med*; 2005; **352**:380-91.
- Gniadwski M. Evaluation and epidemiology of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect*; 2001; **7**:597-608.
- Bradford PA . Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 2001; **14**:933-51.
- Jiang X, Ni Y, Jiang F, Yuan L, Han L and et al. outbreak of infection caused by Enterobacter cloacae producing the novel VEB-3 Beta-lactamase in china. *J Clin Microbiol*; 2005; **43**; 826-31.
- Hanson ND, Sanders CC.Regulation of inducible AmpC β -lactamases expression among Enterobacteriaceae. *Current pharmaceutical Design*; 1999; **5**:881-884.
- Matthew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW.The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol*; 1975 ; **88**:169-178.
- Barlow M , Hall , BG. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*, *Antimicrob Agents Chemother*; 2002; **46**:1190-1198.
- Pitout J.D.D, Hosain A, Hanson N.D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamase produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5715-21.
- Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 377-80.
- Pitout JDD, Thomson K, Hanson N, Ehrhardt A, Moland E, Sander C. β -lactamase responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:1350-1654.
- Moland E, Black J, Hanson N, Thomson K. Discovery of CTX-M like extended- spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:2382-83.
- Perilli M, Felici A, Franceschini N, De Santis A, Pagani L, Luzzaro F, Oratore A, Rossolini G, Knox J, Amicosante G. Characterization of a new TEM-derived beta-lactamases produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:2374-82.
- Marra AR, Pereira CA, Castela A. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae* – produced extended – spectrum beta – lactamases (ESBLs) in a hospital with high prevalence of this infection. *Int J Infect Dis*; 2006; **10** (1): 56-60.
- Colodner R. Extended – Spectrum β -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *J Clin Microbiol Infect Dis*; 2006; **25** (1):49-51.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document. Wayne, PA: NCCLS Press. January; 2001.M100-S11.
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase-production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**:90-103.
- Baquero MR, Nilsson AI, Sandvang D, Galan J, Martinez JL. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol*; 2004; **186**:5538-5542.

22. Barlow M, Hall, BG. Origin and evolution of the *AmpC* β -lactamases of *Citrobacter freundii*, *Antimicrob Agents Chemother*; 2002;**46**:1190-98.
23. Murray P, Jo baron E, H.Jorgensen J, A. faller M, H.Yolken R. Manual of clinical microbiology. 8th Ed. New York: ASM press; 2003. 110-120.
24. Ali Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics , epidemiology and clinical importance of gram negative bacilli producing extended – spectrum β –lactamases. *Research* ; **88**:304-317.
25. Lucet JC, Chevert S, Decre D, et al. Outbreak of multiply resistant enterobactriacae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clinical Infectious Disease*; 1996; **22**:430-436.
26. mangeney N , Niel P , Paul G. A 5 year epidemiological study of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a medium and long stay neurological unit. *J Appl Moicrobiol*; 2000
in Microbiology; 2004; **155**: 409-21.

گزارش یک مورد جداسازی استافیلوکوکوس اینترمدیوس مقاوم به متی سیلین از

پرسنل بخش های درمانی

زهرا عبدالصمدی^۱، محمدرضا پورمند^{۱،۲*}، مجتبی معمارایانی^۱، فاطمه فردصانعی^۱

(۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(۲) گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
نویسنده رابط: محمدرضا پورمند، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰ mpourmand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۶

چکیده:

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اینترمدیوس، یک باکتری قابل انتقال از حیوان به انسان (زئونوز) است. این باکتری در میان افراد سالمی که تماس مکرر با حیوان دارند به ندرت یافت می شود. چند گزارش موردی از ایجاد بیماری تهاجمی در حیوان و انسان گزارش شده است. هدف از این پژوهش، شناسایی استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت غیر گونه اورئوس در پرسنل بخش های بیمارستانی به دلیل اهمیت نقش حدواسط آنها در انتقال عفونت به بیماران بود.

روش بررسی: در این مطالعه که در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۷ انجام گرفت از تعداد ۱۵۰ نفر از پرسنل بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی تهران (بیمارستان های شریعتی، سینا و مرکز طبی کودکان)، با استفاده از سوآب استریل نمونه گیری از قسمت قدامی بینی انجام و جهت انجام آزمایش های میکروبی شناسی و بیوشیمیایی به آزمایشگاه ارسال شد. همچنین آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* انجام گرفت.

یافته ها: در مجموع از ۱۵۰ نفر پرسنل مورد مطالعه، ۳۸ (۲۵٫۳٪) ایزوله استافیلوکوک کوآگولاز مثبت جدا گردید. از این تعداد، یک ایزوله متعلق به گونه استافیلوکوکوس اینترمدیوس و سایر ایزوله ها صرفاً استافیلوکوکوس اورئوس بودند. همچنین وجود ژن *mecA* با استفاده از PCR در ایزوله فوق، مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه گیری: انتقال استافیلوکوکوس اینترمدیوس از حیوان به انسان، می تواند منجر به گسترش عفونت های غیر شایع و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های مشابه در استافیلوکوک شود. بنابراین، پرسنل بخش های مختلف بیمارستانی خصوصاً افرادی که با بیماران بخش های مراقبت های ویژه در ارتباط هستند، حتماً باید از نظر وضعیت حامل بودن، مورد بررسی قرار گیرند.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اینترمدیوس، مقاومت به متی سیلین، پرسنل بیمارستانی

مقدمه :

استافیلوکوکوس اینترمدیوس (*S. intermedius*)، فلور طبیعی پوست حیوانات گوشتخوار (*carnivora*) مانند سگ سانان است. این باکتری می تواند حیوانات اهلی را نیز به شکل گذرا کلونیزه نماید (۱). مطالعات مولکولی نشان می دهند که استافیلوکوکوس اینترمدیوس از نظر ژنتیکی شباهت بسیاری به استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس دارد. بنابراین، واژه اینترمدیوس را برای آن برگزیده اند (۲).

استافیلوکوکوس اینترمدیوس در میان افراد سالمی که دارای تماس مکرر با حیوانات می باشند به ندرت یافت می شود (۳). البته این میزان در افراد مرتبط با سگ های مبتلا به پیودرم شدید، بسیار بیشتر است (۴). استافیلوکوکوس اینترمدیوس به عنوان یک پاتوژن مهاجم، از زخم های ایجاد شده در اثر گازگرفتگی سگ و گربه جدا شده است (۵). همچنین مواردی از پنومونی (۶)، باکتری (۷) و اوتیت (۸) نیز در انسان گزارش شده است. با این وجود، شیوع بسیار پائین استافیلوکوکوس اینترمدیوس را می توان به تشخیص نادرست آن نسبت داد. زیرا این باکتری همانند استافیلوکوکوس اورئوس، از نظر تست کواگولاز و نوکلئاز مثبت می باشد (۹).

از سوی دیگر ممکن است ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس اینترمدیوس، پس از انتقال به میزبان انسانی، ژن های مقاومت را به سایر گونه های استافیلوکوک منتقل نمایند. در این رابطه، انتقال ژنوتیک ایزوله های استافیلوکوکوس اینترمدیوس مقاوم به متی سیلین (MRSI)، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. زیرا آنها می توانند موجب انتقال ژن *mecA* به استافیلوکوکوس اورئوس شوند. بنابراین، به عنوان منبعی برای گسترش سویه های مقاوم به متی سیلین مطرح می باشند (۴). هدف از این پژوهش، شناسایی استافیلوکوک های کواگولاز مثبت غیر از گونه اورئوس در پرسنل بیمارستانی بود. زیرا این ایزوله ها، معمولاً با استافیلوکوکوس اورئوس اشتباه گرفته می شوند. همچنین می توانند نقش مهمی در ایجاد عفونت های غیرشایع داشته باشند.

مواد و روش ها:

این مطالعه از ابتدای تابستان تا پایان پائیز سال ۱۳۸۷، بر روی ۱۵۰ نفر از پرسنل بخش های درمانی بیمارستان های شریعی، سینا و مرکز طبی کودکان انجام شد. پس از جمع آوری اطلاعات از پرسنل و کسب رضایت از آنها، توسط سوآب استریل از ناحیه

قدامی بینی نمونه گیری انجام و بر روی بلاگ آگار حاوی خون گوسفند کشت داده شد. پس از انجام رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، مانیتول و DNase؛ آزمون کواگولاز به روش اسلایدی و لوله ای انجام گرفت. سپس آزمون استوئین (VP)، تست β -گالاکتوزیداز، تخمیر قند تره هالوز و سوکروز و حساسیت نسبت به پنی سیلین (300 U) در مورد استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت انجام شد. همچنین از آنتی بیوتیک های ونکوماپسین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، ریفامپین، کوتریموکسازول، پنی سیلین، آگراسیلین، تتراسایکلین و سفازولین (MAST انگلستان) برای انجام تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن استفاده گردید (۱۰).

ژنوم ایزوله مربوطه با استفاده از کیت Bioneer (South Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. البته پیش از استخراج، ۱ μ l لیزواستفین به سوسپانسیون افزوده گردید. DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* شامل:

F: *mecA1* (5' -GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT- 3')

R: *mecA2* (5'- GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT- 3')

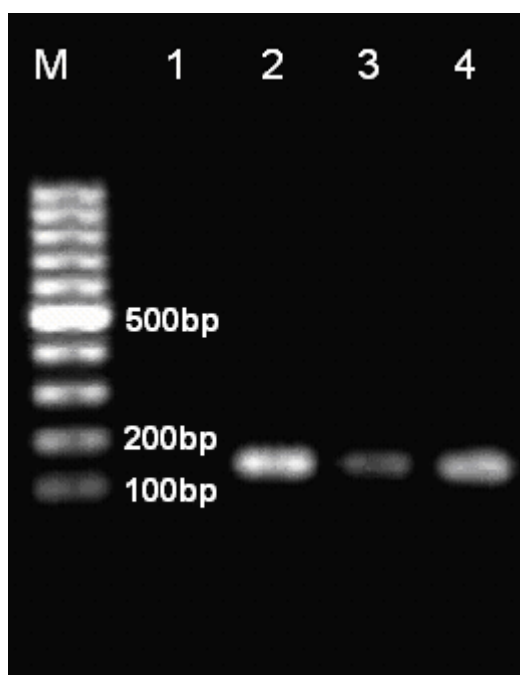
در واکنش PCR، وارد گردید. مخلوط واکنش شامل ۳۴،۲ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۳ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۲ میکرولیتر dNTPs، ۱،۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰،۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۲،۵ میکرولیتر DNA الگو بود. برنامه PCR، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن، سیکل اصلی با ۳۰ بار تکرار شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی در زیر نور UV جهت مشاهده قطعه با طول ۱۵۰ bp، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

در مجموع از ۱۵۰ نفر پرسنل مورد مطالعه، ۳۸ (۲۵،۳٪) ایزوله استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت جدا گردید. از این تعداد، یک ایزوله متعلق به گونه استافیلوکوکوس اینترمدیوس و سایر ایزوله ها

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA*/استافیلوکوکوس /اورئوس نشان داد که ژن فوق در ایزوله مربوطه وجود دارد (شکل ۱).

صرفاً/استافیلوکوکوس /اورئوس بودند. ایزوله مربوطه به ونکومايسين ، سيپروفلوکساسين ، اريترومايسين ، کلیندامایسین ، ریفامپین ، کوتریموکسازول حساس اما به پنی سیلین ، آگراسیلین ، تتراسایکلین و سفازولین مقاوم بود. همچنین نتایج حاصل از PCR



شکل ۱: بررسی حضور ژن *mecA* در استافیلوکوکوس /ایترمدیوس با استفاده از PCR. M: سایز مارکر 100 bp (Fermentase) ، ۱: کنترل منفی (آب مقطر) ، ۲: کنترل مثبت (سویه COL) ، ۳: ایزوله بالینی *S. aureus* دارای ژن *mecA* ، ۴: ایزوله *S. intermedius* جدا شده از بینی و دارای ژن *mecA*

بحث:

استافیلوکوکوس اینترمدیوس به دو شکل همزیست (commensal) و مهاجم در حیواناتی مانند سگ و گربه دیده شده است (۱۱ و ۱۲). Tallo و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که استافیلوکوکوس اینترمدیوس جدا شده از سگ ها ، همیشه به عنوان یک ایزوله همزیست نبوده و می تواند در بعضی از شرایط ، موجب بروز علائم بالینی شود. شکل مهاجم بیماری معمولاً در سگ ها به دو صورت پیودرم و اوتیت تظاهر می نماید (۱۳). تاکنون بررسی های اندکی در رابطه با عفونت های استافیلوکوکوس اینترمدیوس در انسان انجام گرفته است. بیشتر این مطالعات، تنها به گزارش های موردی (case reports) ، اکتفا نموده اند. در همین رابطه ، مواردی از آسسه مغزی و باکتری می به دنبال عفونت کاتتر، در انسان گزارش شده است (۱۴ و ۷). استافیلوکوکوس اینترمدیوس به دلیل داشتن مخزن حیوانی و از سوی دیگر، شباهت زیاد آن از نظر ویژگی های بیوشیمیایی به استافیلوکوکوس اورئوس ، به ندرت از موارد انسانی گزارش شده است (۹). در بیشتر بررسی ها ، ایزوله های جدا شده حساس به متی سیلین بودند (۱۴) درحالیکه ایزوله به دست آمده در تحقیق ما ، مقاوم به متی سیلین بود. ضمناً سویه مربوطه از فردی جدا شد که با سگ در ارتباط بوده است.

در مطالعه ای که در بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی اتریش انجام گرفت، سویه هایی از استافیلوکوکوس اینترمدیوس که پس از جراحی در پنج سگ و یک گربه کلونیزه شده بودند ، با ایزوله های استافیلوکوکوس اینترمدیوس جدا شده از پرسنلی که کار جراحی و مراقبت از این حیوانات را بر عهده داشتند ، با استفاده از PFGE مورد مقایسه قرار گرفتند. هر ۶ ایزوله استافیلوکوکوس اینترمدیوس جدا شده از این حیوانات، مقاوم به متی سیلین بودند و با ایزوله های مقاوم به متی سیلین جدا شده از پرسنل مربوطه از نظر آنتی بیوتایپینگ و PFGE، الگوی مشابهی داشتند (۹). این امر نشان می دهد که این ایزوله ها از یک کلون باکتریایی مشترک منشأ گرفته اند و احتمال انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه ها به میزان بالایی وجود دارد.

در بررسی حاضر برای ، یک مورد استافیلوکوکوس اینترمدیوس از پرسنل شاغل در بخش دیالیز بیمارستان جدا گردید. در بررسی منابع گزارش مشابه یافت نشد. از سوی دیگر ، ایزوله مربوطه از نظر ژن *mecA* مثبت بود. از آنجایی که ایزوله های MRSI می تواند

به راحتی موجب انتقال ژن *mecA* به سایر گونه های استافیلوکوک شوند ، بسیار حائز اهمیت می باشد (۴). با در نظر گرفتن این که یکی از مهم ترین راهکارها جهت کنترل عفونت ، نظارت دائم بر میکروارگانیسم های موجود در بیمارستان است ، بنابراین تعیین هویت دقیق میکروارگانیسم ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها جهت کنترل عفونت نقش بسزایی خواهد داشت. لذا، علاوه بر بیماران بهتر است از افرادی که در ارتباط با آن ها هستند نیز نمونه گیری انجام شود تا بتوان در صورت امکان، منشأ عفونت را ردیابی و جهت جلوگیری از انتشار عفونت اقدام نمود.

نتیجه گیری:

جداسازی سویه استافیلوکوکوس اینترمدیوس حاوی ژن *mecA* از پرسنل بخش های مختلف بیمارستانی خصوصاً افرادی که با بیماران بخش های مراقبت های ویژه در ارتباط هستند، نشان می دهد که پرسنل حتماً باید از نظر وضعیت حامل بودن ، مورد بررسی قرار گیرند. این افراد بایستی مد نظر داشته باشند که می توانند به عنوان حامل در گسترش عفونت های بیمارستانی نقش داشته باشند. بنابراین بهتر است تا حد امکان از نگهداری حیوانات خانگی در محل سکونت جلوگیری نمایند. در غیر این صورت ، شاهد گسترش عفونت های غیرشایع و نوظهور (emerging) بیمارستانی خواهیم بود.

تقدیر و تشکر:

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره قرارداد ۷۷۱۰ مورخ ۸۷/۱۰/۲۵ می باشد. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری صمیمانه خانم صدیقه قورچیان کارشناس آزمایشگاه گروه پاتوبیولوژی ابراز می دارند.

فهرست مراجع:

1. Hartmann FA, White DG, West SHE, Walker RD and Deboer DJ. Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. *Vet Microbiol* 2005; **108**:119-131.
2. Pottumarthy S, Schapiro JM, Prentice JL, Houze YB, Swanzy SR, Fang FC, et al. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:5881-5884.
3. Talan DA, Staatz D, Staatz A, Goldstein EJC, Singer K, and Overturf GD. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly a recognized zoonotic pathogen. *J Clin Microbiol* 1989; **27**:78- 81.
4. Guardabassi L, Loeber ME. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet Microbiol* 2004; **98** (1) :23-27.
5. Lee J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *J Infect* 1994; **29**:105-118.
6. Gerstadt K, Daly JS, Mitchell M. Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clin Infect Dis* 1999; **29**:218-219.
7. Vandenesch F, Celard M, Arpin D, Bes M, Greenland T and Etienne J. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *staphylococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:2508-2510.
8. Tanner MA, Everett CL, Youvan DC. Molecular phylogenetic evidence for non-invasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:1628-1631.
9. Duijkeren E, Houwers DJ, Schoormans A. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Vet Microbiol* 2008; **128**:213-215.
10. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 12th informational supplement. NCCLS document M100-S14. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
11. Lilenbaum W, Nunes ELC, Azeredo MAI. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Appl Microbiol* 1998; **27**:224-228.
12. Patel A, Lloyd DH, Lamport AI. Antimicrobial resistance of feline staphylococci in south-eastern England. *Vet Dermatol* 1999; **10**:257-261.
13. Morris DO, Rook KA, Shofer FS and Rankin SC. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance : a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *European Society of Veterinary Dermatology* 2006; **17**:332-337.
14. Atalay B, Ergin F, Cekinmez M, Caner H, and Altinors N. Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochirurgica* 2005; **47**:347-348.

تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت سلول به روش PCR

محمدحسن شاه حسینی^{۱*}، زهرا حسینی^{۱،۲}، بهمن تبرائی^۲، فاطمه اخلاقی^۲، محمد علی شکرگزار^۳، الهام مسلمی^۴

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی. واحد شهریار/شهر قدس

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی. واحد کرج

۳) موسسه رازی/حصارک کرج - بخش کنترل کیفی

۴) انستیتو پاستور ایران-بخش بانک سلول

۵) گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی. واحد تهران شرق

نویسنده رابط: محمدحسن شاه حسینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهر قدس، گروه میکروبیولوژی shahhosseiny@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۶

چکیده:

مقدمه و اهداف: آلودگی کشت های سلولی در شرایط آزمایشگاه با گونه های مایکوپلازما می تواند به مشکلاتی در ارگانیزم های زنده منجر شود. بنابراین، تهیه یک پروتکل تشخیص روتین برای عفونت های مایکوپلاسمایی، جهت به دست آوردن نتایج تحقیقاتی قابل اعتماد، ضروری و انکارناپذیر است. به دلیل محدودیت در روش های متواتر، این اواخر تکنولوژی هایی بر پایه اسید نوکلئیک خصوصاً روش های بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی و تشخیص تمامی گونه های جنس مایکوپلازما، به عنوان روشی سریع و ویژه ارائه شده اند. هدف از انجام این مطالعه ارائه روشی بر پایه PCR جهت آشکار کردن مایکوپلازماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فرآورده های بیولوژیک مانند واکسن ها بود.

روش بررسی: با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس *SHAH-GPO-3* و *MGSO* و گونه های استاندارد، روش PCR بهینه شد و از جهت حساسیت و ویژگی بررسی گردید. سپس از کشت های سلولی *DNA* استخراج و با PCR آزمایش شد. محصول تکثیری کلون و تعیین توالی گردید.

یافته ها: در این مطالعه، روش حساسی از PCR تهیه و جهت تشخیص جنس مایکوپلازما در آلودگی های فرآورده های بیولوژیک توسعه داده شد. ژن *16S rDNA* به دلیل داشتن سکانس های مشترک و ثابت به عنوان ژن هدف، جهت تکثیر با پرایمرهای تغییر یافته مورد استفاده قرار گرفت. این روش حساس توسعه داده شده، با محصولی به اندازه *272 bp* دارای حساسیتی در حد ۱۰ کپی از *DNA* ژنوم هدف بوده و با *DNA* بسیاری از میکروارگانیزم ها، رده های سلولی انسان، واکنش متقاطع ندارد. از این جهت، پرایمرها دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی هستند.

نتیجه گیری: سنجش PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک موجود در *16S rRNA*، یک تکنیک مفید، قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، و دقت بالا جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است. البته تحقیقات بیشتری در زمینه استخراج *DNA*، روش های تغلیظ نمونه، سکانس های هدف، روش شناسایی محصول تکثیری باید انجام گیرد.

کلید واژه ها: مایکوپلازما، PCR، آلودگی، تشخیص مولکولی، کشت سلول

مقدمه:

مایکوپلاسمها یکی از کوچکترین میکروارگانیسم های زنده آزاد و توانا در خود تکثیری هستند. این باکتری ها مهم ترین و جدی ترین آلوده کننده های کشت سلول، فرآورده های بیولوژیک و بیوتکنولوژیک تولیدی در کشت های سلولی، و مخرب نتایج آزمون های بیولوژیک و تست های تشخیصی هستند که در کشت سلولی انجام می شود. مشکل آلودگی در حال حاضر به طور گسترده ای در ۱۵ الی ۸۰ درصد کشت های سلولی، بسته به رده سلولی، آزمون مورد استفاده، و کیفیت تست های کنترل کیفی، گزارش شده است (۱ و ۲). ۵ گونه مایکوپلاسم آرگینینی (*Mycoplasma arginini*)، اکولپلاسم لیدلاوی (*Acholeplasma laidlawi*)، مایکوپلاسم هیورینیس (*M. hyorhinis*)، اورال (*M. Orale*) و مایکوپلاسم فرمنتانس (*M. fermentans*) عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی های کشت سلولی است (۳-۵). مشخصا آلودگی کشت های سلولی با مایکوپلاسم موجب اثرات و تغییراتی در رشد سلولی، مورفولوژی، متابولیسم آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک، ویژگی های ایمنونولوژیک و بیوشیمیایی، نقص کروموزومی و در نتیجه بدست آوردن نتایج غیر قابل اعتماد می گردد (۵ و ۲۵).

منشاء اصلی آلودگی کشت های پاک، کشت های عفونی شده با مایکوپلاسم است (۳). منبع آلودگی ها (برای مثال منابع مستقیم) اغلب پرسنل آزمایشگاه (مایکوپلاسم اورال و مایکوپلاسم سالواریوم از اوروفارنکس ۸۰-۲۵ درصد افراد سالم جدا می شود؛ مایکوپلاسم فرمنتانس هم به ندرت جدا می گردد)، و سرم های حیوانی تجارتي مورد استفاده در محیط های کشت سلولی (مایکوپلاسم آرگینینی، اکولپلاسم لیدلاوی، مایکوپلاسم هیورینیس) است (۴ و ۶).

مایکوپلاسمها باکتری هایی پلئومورف، با قطری حدود ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر، و فاقد دیواره سلولی هستند. بنابراین، به سهولت از منافذ فیلترهای ۴۵۰ و ۲۲۰ نانومتر که برای کشت سلول استفاده می شود، عبور کرده و از این طریق باعث آلودگی می گردند. وقتی از فیلتراسیون با فشار بالا استفاده شود برخی مایکوپلاسمها از فیلترهای با تخلخل ۱۰۰ نانومتر هم عبور کرده و آلودگی ایجاد می نمایند (۷). سرم های آلوده به ندرت از طریق بازدید بصری یا میکروسکپی، در غیاب علائم و آثار روشن عفونت (برای مثال تیرگی سرم یا محیط، تغییرات PH، یا اثرات سیتوپاتیک روی دودمان های سلولی) قابل تشخیص هستند. به علاوه، سرم شرایط

مساعدی برای رشد مایکوپلاسم را به دلیل فقدان سلول های زنده و کمبود عناصر رشد و همچنین داشتن اجزاء سمی و ممانعت کننده رشد، ندارد. آلودگی کم و کاهش میزان آلودگی ها به وسیله فیلتراسیون، موجب عدم تشخیص مایکوپلاسم در سرم های تجارتي می گردد.

روش های تشخیص مایکوپلاسمها را می توان به دو دسته (۱) روشهای بر پایه کشت، و (۲) روشهای غیر کشتی، که از جهت سرعت، قابلیت اعتماد، ویژگی و حساسیت تفاوت هایی چند با هم دارند تقسیم بندی نمود (۹ و ۴ و ۲ و ۱). روش های بر پایه کشت، وقت گیر (چندین هفته) با حساسیت نسبتا پایین و نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است. برخی از مایکوپلاسمها هم مانند مایکوپلاسم هیورینیس (*M. hyorhinis*) به سختی در محیط کشت رشد می کنند (۸). روش های غیر کشتی شامل (۱) غربالگری آدنوزین فسفوریلاز (*Adop*)، تکنیک نشانگر کشت سلول، (۳) رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم، (۴) دو رگه سازی اسید نوکلئیک و (۵) واکنش زنجیره ای پلیمرز یا PCR می باشد (۱۱ و ۱۰ و ۲ و ۱). روش های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز فاقد ویژگی اند. زیرا برخی باکتری ها مانند باسیلوس سوبتیلیس، اشیریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، نوکلئوزید فسفوریلاز را تولید کرده و در ضمن برخی گونه های مایکوپلاسم، مانند مایکوپلاسم پنومونه *FH*، مایکوپلاسم پیروم، مایکوپلاسم لیپوفیلوم در عمل چیزی تولید نمی کنند (۱۲). روش های بر پایه تلقیح به کشت های سلولی فاقد مایکوپلاسم و حاوی اندیکاتور هم، به دلیل سه پاساژ و تکنیک نهایی تشخیصی (برای مثال رنگ آمیزی DNA با رنگهای فلئوئورسنت مانند ۴' ، ۶-دی آمیدینو-۲-فنیل ایندول دی هیدروکلراید یا بیس بنز ایمیدازول فلوروکروم هوخست ۳۳۲۵۸، یا سنجش های بر پایه الایزا با آنتی بادی های ویژه) وقت گیر می باشد (۱۳). روش های بر پایه رنگ آمیزی و دو رگه سازی هم دارای حساسیت کم و نوعا ویژگی پایین هستند. بنابراین اکثریت روش های در دسترس شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی، جهت شناسایی همزمان اکثریت وسیع گونه های مایکوپلاسمایی آلوده کننده مناسب نیستند (۱۴). جهت غلبه بر این مشکلات، روش های تکثیر اسید نوکلئیک مانند PCR، در دهه اخیر توسعه فراوانی یافته است (۱۵ و ۱۶) و روش های مناسبی جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامل آلوده کننده، خصوصا مایکوپلاسمها هستند (۱۷ و ۱۰ و ۱ و ۲ و ۱). ثابت شده که روش های

بر پایه تکثیر، برای شناسایی برخی قطعات خاص *DNA* ژنوم مایکوپلازما دارای سرعت و ویژگی است (۲۰-۱۸)، معادلک، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به (۱) روش استخراج *DNA* (۲) ژن هدف، (۳) پرایمرهای طراحی شده، (۴) روش شناسایی محصول، (۵) نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد. پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخش های مشترک ژن *S rRNA* ۱۶، یا بخش های *23S rRNA - S* ۱۶ (۲۴-۲۰)، و یا هدف های دیگر طراحی شده است. سکانس ژن های *rRNA* در تعداد زیادی از گونه های مایکوپلازما، تعیین ترادف شده است. مطالعات فیلوژنتیک سیستماتیک این ارگانیسم ها و همینطور بررسی های کامپیوتری مقایسه ای این ترادف های ریبوزومی، مویده بخش های بشدت ثابت و مشترک در همه انواع مایکوپلازمایی است که جهت طراحی پرایمرهای *PCR* مناسب بکار می روند.

در این مطالعه سعی شده است جهت پی بردن به آلودگی های مایکوپلازمایی در نمونه های مختلف روشی مولکولی با حساسیت بالا طراحی کنیم. در واقع یک روش بر پایه *PCR* جهت آشکار کردن مایکوپلازماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فرآورده های بیولوژیک مانند واکسن ها توسعه داده شود.

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی: گونه های بکار رفته عبارت بودند از: مایکوپلازما پنومونیه (NCTC 10119)، مایکوپلازما آرچینینی، مایکوپلازما هیورنیس، مایکوپلازما اورال، مایکوپلازما سینوویه، مایکوپلازما گالیناروم (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، مایکوپلازما گالیستیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلازما اویاپنومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلازما آگالاتیسا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلازما اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکول پلازما لیدلوی. به علاوه، میکروارگانیسم های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*S. pneumoniae*)، باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*)، و باسیلوس میکوئیدس (*B. mycoides*)، گونه های کورینه باکتریوم، گونه های کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*)، اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، گونه های سالمونلا، گونه های شینگلا، گونه های پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*)، ساکارومیسس سروریزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)، گونه های اسپرئیلوس، کاندیدا آلبیکنس

از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در *PCR*، مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفتند.

کشت های سلولی: کشت های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران/ایران بدست آمد. تعداد ۴۷ رده سلولی انسانی و حیوانی از جهت آلودگی و به طریق مولکولی مورد بررسی واقع شد.

استخراج DNA: ژنومیک گونه های مایکوپلازمایی از طریق کیت استخراج *DNA* به نام *DNG-Plus* (سیناژن) استخراج گردید. از سلول های انسانی و موشی هم به طریق فوق *DNA* استخراج شد.

ژنومیک باکتری های غیر مایکوپلازمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیر یونی ترایتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم)، بدست آمد. *DNA* یک کلنی از باکتری فوق بدین روش استخراج گردید و در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد. از نمونه های کشت سلول و سایر نمونه های مورد آزمایش هم به طریق فوق، *DNA* استخراج گردید.

۱۰ میکرولیتر از *DNA* بدست آمده با روش *DNG*، با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر راهنما در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. هم

چنین با استفاده از اسپکترومتر میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ آن نیز (خلوص آن ۱/۸ - ۱/۶) بدست آمد.

پرایمر و شرایط PCR: پرایمرهای مورد استفاده، پرایمرهای مخصوص جنس *GPO-3* و *MGSO* (۲۶ و ۲۵ و ۲۱) بود که پرایمر جلویی یعنی *GPO-3* آن در این مطالعه از طریق افزودن دو نوکلئوتید *GT* در ۵' آن تغییر پیدا کرد. بنابراین ترادف پرایمرهای

مورد استفاده عبارتند از: پرایمر جلویی
 ۳'-GTGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCT-5'
GPO-3 و پرایمر عقبی
 ۳'-TGCACCATCTGTACTCTGTAAACCTC-5'
MGSO-۵ میکرولیتر از *DNA* ژنومیک حاصل در میکس ۲۵ میکرولیتری *PCR*، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص نواحی مشترک یا همسان *S rRNA* ۱۶، با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر *PCR* (*10X*) (سیناژن)، ۱/۵ میلی مولار *MgCl₂* (از غلظت ۵۰mM (سیناژن))، ۰/۲ میلی مولار مخلوط *dNTP* (*10mM*) (سیناژن) و با استفاده از ۲ واحد آنزیم *Taq*

گردید. از پلاسמידهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همینطور جهت تعیین توالی استفاده شد.

حساسیت و ویژگی: جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، از دو روش استفاده شد. (۱) تهیه رقت از سوسپانسیون مایکوپلازما پنومونیه با واحد کلنی ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت ها و انجام آزمون PCR؛ (۲) رقیق سازی پلاسמיד *pSHA-272-1* و انجام PCR بر روی محلول های حاوی مقادیر مشخص از پلاسמיד.

آزمون ویژگی با استفاده از تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها، غیر از مایکوپلازماها که در سویه های باکتریایی نام آنها ذکر شد و همینطور DNA سلول های یوکاریوت پست، رت و انسان انجام شد.

توالی یابی (Sequencing): توالی DNA در جهت جلویی با استفاده از امکانات سکانس اتوماتیک ترمیناتور رنگی به روش ختم زنجیره *Dideoxy-Chain Termination* انجام و محصول تایید گردید.

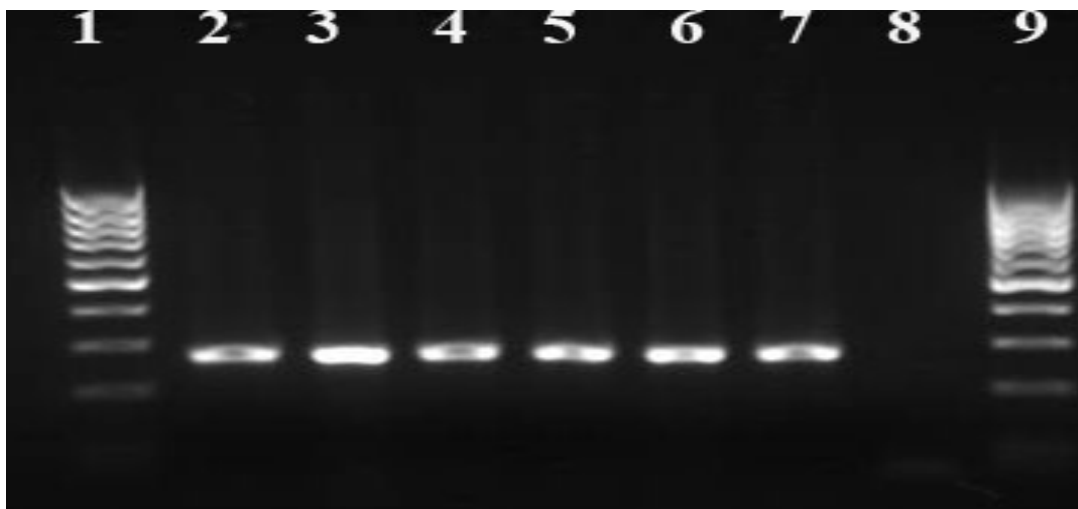
یافته ها:

برای طراحی روش مولکولی با حساسیت بالا با تغییر دادن پرایمرهای GPO-3 و اضافه کردن دو باز در ابتدای آن، و نزدیک کردن دمای چسبیدن پرایمر *SHAH-GPO-3* به *MGSO*، حساسیت و در عین حال ویژگی آن را افزایش دادیم. همینطور با افزایش دمای چسبیدن پرایمرها به سکانس های مکمل (حدود 70°C)، شرایط سختی را نیز بالا بردیم. سکانس *S rRNA* ۱۶ انواع و اقسام گونه های مایکوپلاسمایی را از *GeneBank* به دست آورده و پرایمرهای تغییر یافته را بر اساس این ترادف ها و شماره های دسترسی (*Accession number*)، بررسی نمودیم. بنابراین با تغییر پرایمر *GPO-3* و طراحی *SHAH-GPO-3* و با استفاده از DNA سویه های مولیکوت، که در سویه های باکتریایی نام برده شد، تکنیک PCR را بهینه نمودیم. با تمام مایکوپلازماهای مورد آزمایش، جفت پرایمر مورد استفاده منتج به محصول ۲۷۲ جفت بازی گردید (شکل ۱).

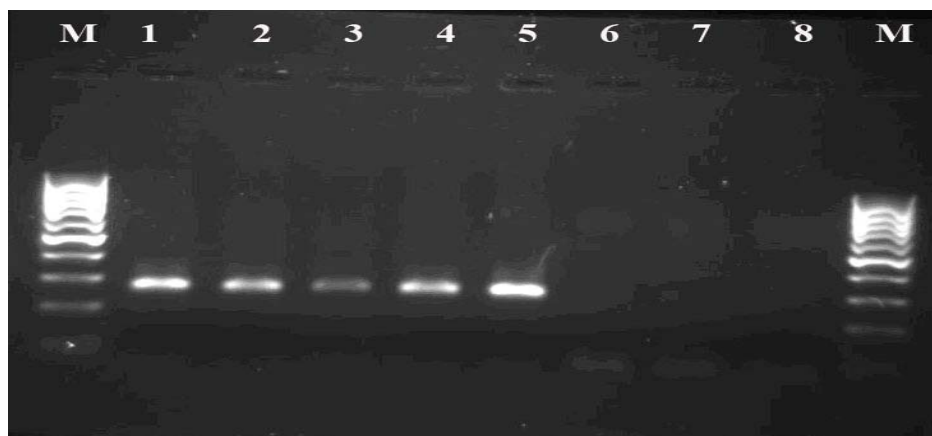
مایکوپلازما در ۴۷ رده سلولی مورد آزمایش به وسیله PCR مخصوص جنس بهینه شده جستجو شد. از این تعداد، ۲۵ رده سلولی آلوده (۵۳٪)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد (شکل ۲).

(*Taq DNA Polymerase*)، ($5\mu/1\mu\text{L}$)، و چرخه های حرارتی ۹۴ درجه سانتی گراد دودقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و طی ۴۰ سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی ۷ دقیقه، تکثیر یافتند. محصول PCR با سایز مورد نظر ۲۷۲ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز ۲ درصد و با استفاده از اتیدیوم بروماید و نور UV بررسی گردید.

ساخت کنترل مثبت از طریق *PCR-CLONING*: عمل کلون کردن قطعه ۲۷۲ جفت بازی با استفاده از کیت *T/A Cloning* کمپانی فرمتانس (*K1214*) و در وکتور *pTZ57R* این کیت، انجام گرفت. به طور خلاصه در ابتدا محصول PCR مورد نظر را روی ژل برده و پس از اطمینان از خالص بودن آن مستقیماً برای عمل کلونینگ استفاده شد. سپس با استفاده از محیط *C-medium* این کیت، سلول های مستعد سویه *DH5-alfa* باکتری اشریشیا کلی آماده شد. سپس عمل *Ligation* با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (22°C درجه سانتی گراد) انکوبه گردید. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ترانسفورماسیون انجام گردید. کلنی های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین ($50\mu\text{g/ml}$) به علاوه ماده *X-Gal* و *IPTG* انتخاب شدند. کلنی های سفید حاوی ژن مورد نظر می باشند. سپس به صورت تصادفی ۱۰ عدد از کلنی های سفید انتخاب گردیده و کشت خطی بر روی پلیت *LB agar* واجد آمپی سیلین داده شد و مجدداً در 37°C به یک شب انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به لوله های $1/5\text{cc}$ حاوی 50 میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و یک قطره روغن معدنی استریل به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس در لوله ها با پارافیلیم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند، تا غشاء باکتری ها پاره و پلاسמיד خارج گردد. لوله ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت 12000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع رویی برای PCR استفاده شد. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد، و محصول بر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده گردید. تمامی کلنی ها واجد قطعه مورد نظر بودند. لذا دو عدد از آن ها به نام *pSHA272-1* و *pSHA272-2* به صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از روش لیز قلیایی از آنها پلاسמיד استخراج و در مرحله بعد PCR را با پلاسמידهای استخراج شده انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی



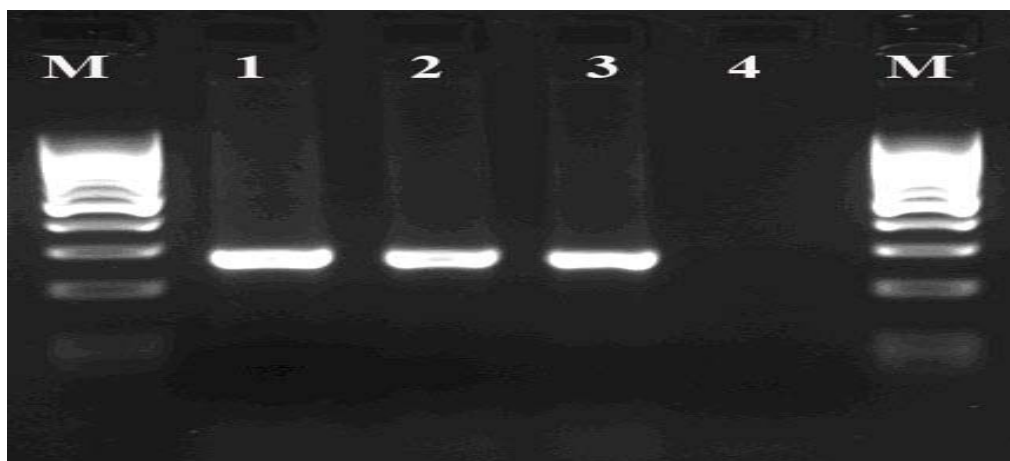
شکل ۱: ژل آگاروز الکتروفورز نتایج تکثیر *PCR* با استفاده از پرایمرهای *SHAH-GPO-3* و *MGSO*: ستون ۱، سایز مارکر *100 bp DNA Ladder* (فرمتاس)؛ ستون ۲، مایکوپلازما آرجینینی؛ ستون ۳، مایکوپلازما هیورینیس؛ ستون ۴، مایکوپلازما اورال؛ ستون ۵، مایکوپلازما فرمتاس؛ ستون ۶، اکولپلازما لیدلوی؛ ستون ۷، مایکوپلازما پنومونیه؛ ستون ۸، کنترل منفی (آگاروز ۰.۲٪ و بافر *TBE 0.5X*).



شکل ۲: نتایج الکتروفورز تکثیر *PCR* تعدادی از رده های سلولی مورد آزمایش: ستون *M*، سایز مارکر *100 bp DNA Ladder* (فرمتاس)؛ ستون ۱، کنترل مثبت؛ ستون ۲ الی ۵، چهار رده سلولی آلوده؛ ستون ۶ و ۷، دو رده سلولی غیر آلوده؛ ستون ۸، کنترل منفی (آگاروز ۰.۲٪ و بافر *TBE 0.5X*).

تعیین ترادف استفاده گردید. ترادف حاصل با سکانس های موجود از طریق برنامه *BLAST*، مطابقت و *Identity* حدود صد در صد به دست آمد. بنابراین نتایج تعیین ترادف ما با سکانس های موجود در بانک ژنی مطابقت داشت.

جهت بررسی و تأیید ویژگی سنجش *PCR* مخصوص گروه مایکوپلازما، قطعه ۲۷۲ جفت بازی در پلاسمید *pTZ57R* و باکتری اشریشیا کلی *DH5-alfa* کلون و پلاسمیدهای *pSHA272-1* و *pSHA272-2* ساخته شد (شکل ۳). از این پلاسمید حاوی اینسرت، به عنوان کنترل مثبت و همینطور جهت



شکل ۳: نتایج *PCR* قطعه ۲۷۲ جفت بازی کلون شده و ساخت پلاسمیدهای *pSHAH272-1* و *pSHAH272-2*. ستون *M*، سایز مارکر *DNA Ladder* ۱۰۰ *bp* (فرمتاس)؛ ستون ۱، کنترل مثبت؛ ستون ۲ و ۳، پلاسمیدهای به ترتیب *pSHAH272-1* و *pSHAH272-2*؛ ستون ۴، کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر *TBE 0.5X*).

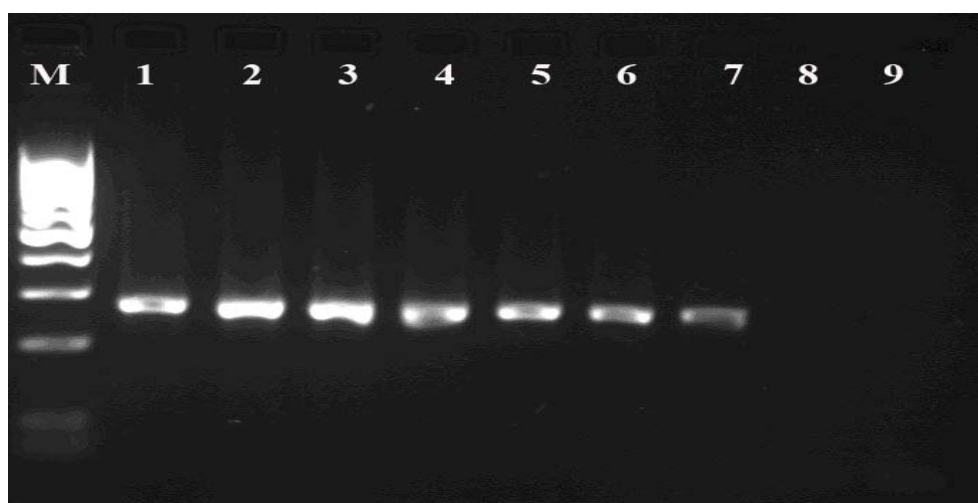
گونه های مولیکوتس ایجاد نمود. به علاوه، وقتی که این جفت پرایمر با طیف وسیعی از میکروارگانسیم های نام برده شده در قسمت روش ها و با *DNA* رت و انسان انجام شد، هیچ محصول تکثیری ایجاد نمود.

فقط یک بخش، یعنی نوکلئوتیدهای ما بین ۱۰۲۹ تا ۱۰۵۵ سکانس *rRNA S 16* مایکوپلازماها پتانسیل و معیارهای مناسب جهت پرایمر مخصوص جنس را دارد. مطابقت این بخش با سکانس *rRNA* چندین میکروارگانسیم، کلروپلاست ها و همینطور یوکاریوت ها موید تعداد زیادی اتصال ناجور در قسمت ۵ این بخش (که مطابق انتهای '۳ پرایمر *MGSO* است) می باشد. اطلاعات به دست آمده تطبیق این بخش با چندین میکروارگانسیم، شامل اعضای جنس های خویشاوند و منسوب با مایکوپلازماها، یعنی استریتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، باسیلوس، کلاستریدیوم و اریزیپلوتریکس تأیید کننده این موضوع است که اختلافات زیادی ما بین آنها وجود دارد. همینطور تطبیق این بخش با گونه های متعدد موجود در مولیکوت، موید هومولوژی و اختلافات کم، در حد یک یا دو نوکلئوتید، و آن هم به طور غیر

در این مطالعه سعی شد از روش استخراج *DNA* ساده و سریع استفاده شود لذا از روش جوشاندن به همراه یک دترجنت غیر یونی مانند *Triton X 100*، که حضورش در مقادیر نسبتا بالاتری از دترجنت های یونی مانند *SDS*، در مرحله تکثیر قابل تحمل است، استفاده گردید. بنابراین مرحله استخراج *DNA* این بررسی روشی سریع و نسبتا حساس است.

جهت ارزیابی حساسیت آزمون، از پلاسمید حاوی اینسرت با تعداد مشخص استفاده شد و بدین ترتیب از طریق رقت سازی پلاسمید حاوی اینسرت، حساسیت تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش به دست آمد. حساسیت از طریق رقیق سازی کشت مایکوپلازما پنومونیه با واحد سازنده کلنی مشخص هم انجام شد و نتایج مشابهی (در حد پیکوگرم از *DNA* مایکوپلازما پنومونیه) حاصل شد (شکل ۴).

در آزمون ویژگی پرایمرهای *SHAH-GPO3* و *MGSO*، هیچ محصول خواسته ای (۲۷۲ *bp*) با *DNA* باکتری های غیر مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همینطور *DNA* انسان و موش و یوکاریوت های پست، دیده نشد. در دمای چسبیدن $70^{\circ}C$ ، جفت پرایمر مورد بررسی یک باند اختصاصی ۲۷۲ جفت باز با همه گونه های مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همینطور با همه



شکل ۴: آزمون حساسیت PCR بهینه شده با استفاده از نمونه های مشخص کلنی کانت شده (CFU مشخص).

ستون M، سایز مارکر *DNA Ladder* ۱۰۰ bp (فرمتاس)؛ ستون ۱، کنترل مثبت؛ ستون ۲ الی ۸ حاوی نمونه های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (۳۱۲۵۰ CFU)، ستون ۳ (۶۲۵۰ CFU)، ستون ۴ (۱۲۵۰ CFU)، ستون ۵ (۲۵۰ CFU)، ستون ۶ (۵۰ CFU)، ستون ۷ (۱۰ CFU)، ستون ۸ (۲ CFU)، ستون ۹، کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر TBE 0.5X).

کاربرد روش های سرولوژیک می باشد (۲۹-۳۱). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روشی مولکولی و حساس، بازده تعیین هویت مایکوپلاسمای آلوده کننده کشت های سلولی و فرآورده های بیولوژیک افزایش یابد. نتایج به دست آمده در این مطالعه، دلالت بر این موضوع دارد که می توان از سکانس های ثابت و مشترک *S rRNA* ۱۶ موجود در مایکوپلاسمها، به عنوان یک هدف مناسب جهت تشخیص گونه های متعدد و آلوده کننده سرم های حیوانی، کشت های سلولی و فرآورده های بیولوژیک، استفاده نمود.

به طور ایده آل، این روش بایستی نه تنها قادر به شناسایی ۵ گونه تیپیک آلوده کننده (مایکوپلاسمای هیورینیس، آرچینی، اورال، فرمتانس و اکولپلاسمای لیدلوی) و عامل بیش از ۹۸٪ آلودگی ها باشد (۲، ۳، ۳۰) بلکه بایستی سایر گونه های آلوده کننده مولیکوت ها و متعلق به جنس های مایکوپلاسمای اکولپلاسمای، اوره آپلاسمای و اسپیروپلاسمای (که عامل باقیمانده ۲٪ آلودگی است) را هم شناسایی نماید. در این مطالعه سعی شده است یک سنجش PCR بر پایه پرایمرهای مخصوص گروه مایکوپلاسمای و هدف ژنی *S rRNA* ۱۶ که مقاصد بالا را مهیا کند توسعه داده شود. بر این مبنا با انتخاب سکانس های *S rRNA* ۱۶S تعداد زیادی مایکوپلاسمای و صف بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانس های دیگر پروکاریوت ها،

متمرکز و دور از ناحیه ۳' پرایمر طراحی شده می باشد. بنابراین اعضاء جنس مولیکوت به وسیله کاربرد این پرایمر، تکثیر می گردند. در ضمن این تطبیق ها نشان دهنده آن است که پرایمر به کار رفته برای جنس مایکوپلاسمای منحصر نمی باشد و اعضاء جنس اوره آپلاسمای، اسپیروپلاسمای و اکول پلاسمای نیز در استفاده از این پرایمرهای بخش *S rRNA* ۱۶، تکثیر می یابند. به دلیل اینکه فقط یک بخش مخصوص مایکوپلاسمای تعیین هویت شد لذا الیگونوکلوتید *Shah-GPO3* به عنوان پرایمر ۵'، در جفت پرایمر مخصوص جنس مورد استفاده واقع شد.

بحث:

عفونت مایکوپلاسمایی کشت های سلولی موجب تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیکی و نتیجتاً تفسیر نامتناسب نتایج آزمایش بر روی کشت های سلولی آلوده می گردد. بنابراین، جستجوی آلودگی مایکوپلاسمایی به طور دوره ای در آزمایشگاه هایی که با کشت سلول سروکار دارند بایستی انجام شود (۲۷ و ۲۸).

تلفیق نتایج سرولوژیک و بیوشیمیایی اغلب وسیله ای مفید جهت تعیین هویت مولیکوت ها می باشد. معذالک، داده های بیوشیمیایی حاصل اغلب فاقد قدرت شناسایی بوده و همینطور مسئله واکنش متقاطع سرولوژیکی و حساسیت کم، همیشه یکی از سدهای مهم

درست قبل از تهاجم عفونت، بعد از روش های زدودن مایکوپلازما، یا در حضور سرم با تعداد کم عامل).

علی رغم مراقبت های زیاد و فضا سازی مناسب جهت تکنیک های تکثیر هم چون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث مثبت های کاذب می گردد. البته تجربه نشان داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در مناطق (زون های) پیش بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می گردد. لذا کار بست کنترل های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعا کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر و مرحله تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان دادن آن می نماید.

نتایج PCR منفی عمدتا به دو دلیل: (۱) تعداد کم مایکوپلازما در نمونه و (۲) عدم توزیع مایکوپلازما (بدین معنی که به بخشی از سلول های کشت، مایکوپلازما چسبیده و بنابراین وقتی که برای اولین بار نمونه تقسیم می شود حضور مایکوپلازما در برخی لوله ها بیشتر است) به وجود می آید.

یکی از راه ها جهت افزایش حساسیت PCR، کاربرد روش تغییر یافته ای از آن به نام Nested-PCR است. Spaepen (۳۴) با استفاده از دوجفت پرایمر جهت هدف ژنی *S rRNA* ۱۶، آلودگی های مایکوپلاسمایی را با حساسیت بالایی شناسایی نمود. اما دور دوم PCR در این روش ریسک آلودگی سیستم با DNA و ایجاد مثبت های کاذب را افزایش می دهد. حساسیت و قابلیت اعتماد دو شرط لازم یک تکنیک تشخیص میکروبی بر مبنای PCR می باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که شناسایی جنس مایکوپلازما از طریق PCR در مقایسه با روش های کلاسیک برتری هایی دارد. اما این موضوع از جهت حساسیت و ویژگی هنوز قابل بحث است. بهینه نمودن سکانس پرایمر و شرایط واکنش در این بررسی موجب تشدید حساسیت، ویژگی و همینطور قابلیت تکرار و اعتماد بیشتر شده است. مشخصا ویژگی ارائه شده روش اخیر جهت تفریق مابین آلودگی مایکوپلاسمایی از دیگر عوامل آلوده کننده احتمالی شامل اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و مخمرهای جوانه زن بیشتر است.

هدف اولیه در این بررسی ارائه یک روش قابل اعتماد برای شناسایی مایکوپلازماها در کشت سلول، سرم های حیوانی، فرآورده های بیولوژیک و بر مبنای کاربرد تکنولوژی PCR بود. به همین منظور بخش های ثابت و مشترک ژن *rRNA* را به عنوان

پرایمرهای *Shah-GPO-3* و *MGSO* انتخاب شدند. تکثیر *in-vitro* به وسیله PCR و با استفاده از این جفت پرایمر، منتج به تکثیر سکانس اعضاء مولیکوت ذکر شده در بالا، و عدم تکثیر هیچ نوع محصول با سایر پروکاریوت ها گردید و البته در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها و سنجش جهت تشخیص آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول ثابت گردید. در عین حال نتایج سنجش PCR حاضر به وسیله تکنیک تعیین ترادف تأیید گردید.

مقایسه ما بین تکنیک PCR با کشت میکروبی، روش های رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم، و تکنیک هیبریدیزاسیون موید این موضوع است که PCR روشی حساس، سریع و کارآمد است. روش های کشت میکروبی مستلزم یک تا ۴ هفته وقت در آزمایشگاه می باشد. به علاوه، می دانیم که هنوز برخی از سویه های مایکوپلازما علی رغم پیشرفت های زیاد در کشت میکروبی غیر قابل رشد و یا به سختی زیاد (مانند *M. hyorhinis*) رشد می نمایند (۳۲). در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش های دیگر مثل روش PCR استفاده شده نشان داده شده است که تکنیک کشت دارای نتایج منفی کاذب زیادی می باشد (۲۱ و ۳۰). در مورد کشت ها، تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون و رنگ آمیزی DNA به دلیل آلودگی باکتریایی غیر ممکن است.

مهم ترین عیب تکنیک رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم، مشکل تفسیر نتایج است. این اشکال ناشی از حضور باکتری های آلوده کننده یا اسید نوکلئیک تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلوروسانس خارج هسته ای شده و بدین ترتیب حضور مایکوپلازما پنهان می گردد ناشی می شود (۳۲).

تکنیک هیبریدیزاسیون (دورگه سازی) بر پایه همان اصول PCR بنا نهاده شده است. اگر چه هر دو روش به طور نسبی سریع هستند اما فرق هایی هم دارند. به طور مثال، گاهی تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون به دلایلی مشکل می شود. بدین معنی که نوعا تفریق بین سیگنال های مخصوص و سیگنال های غیر ویژه، به دلیل حضور واکنش متقاطع ما بین باکتری های گرم مثبت مشکل می گردد (۳۳). بنابراین، نتایج مثبت هیبریدیزاسیون، فقط زمانی مورد استناد است که کشت میکروبی هیچ باکتری گرم مثبت دیگری را نشان ندهد. مزیت دیگر PCR حساسیت بالاتر آن نسبت به تکنیک های دو رگه سازی است. حساسیت روش هیبریدیزاسیون *rRNA* با DNA که حدود 10^3 تا 10^4 ارگانیزم است در مواردی مانع از تشخیص مایکوپلازما در نمونه های آلوده می گردد. بنابراین موارد فوق مبین برتری های تکنیک PCR نسبت به روش های کلاسیک، خصوصا در مواردی است که تعداد عامل در نمونه کم است (مانند

نتیجه گیری:

نتایج نشان دادند که سنجش *PCR* بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک موجود در *۱۶S rRNA*، یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، و دقت بالا جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است. البته تحقیقات بیشتری بایستی در زمینه استخراج *DNA*، روش های تغلیظ نمونه، سکانس های هدف، روش شناسایی محصول تکثیری انجام گردد.

تقدیر و تشکر:

از آقای دکتر محسن لطفی و خانم سهیلا مرادی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی و میکروبی شناسی برای در اختیار گذاشتن سوش های مایکوپلاسمها، آقای وحید ملاکاطمی و آقای شهرام آذری از بخش کشت سلول انستیتو پاستور ایران به دلیل در اختیار گذاشتن کشت های سلولی و راهنمایی های علمی صمیمانه سپاس گزاری می شود.

هدف تکثیری، به دلیل فراوانی سکانس های آن و همینطور ثابت و مشترک بودن آنها در بین اعضاء مولیکوت ها در طول تکامل، انتخاب نمودیم. به طور معمول، آنالیز *PCR* آلودگی های مایکوپلاسمایی نیازمند پرایمرهایی است که اجازه شناسایی مولیکوت ها و تفریق آنها از سایر آلودگی های غیر مایکوپلاسمایی را بدهد. به علاوه، این رویه بایستی فارغ از واکنش متقاطع با *DNA* دودمان های سلولی باشد. تکنیک ارائه شده حاضر که به صورت یک پروتکل تک مرحله ای است قادر به شناسایی حداقل ۱۰ کپی از مولکول *DNA* هدف در نمونه های بیولوژیک بوده و شواهد موید عدم واکنش متقاطع با *DNA* ژنومیک دیگر ارگانسیم ها شامل انسان، موش، ساکارومیسس سرویزیه، و اشریشیا کلی است. پروتکل های دیگر ارائه شده توسط محققین دارای حد شناسایی بین ۱ الی ۱۰۰ مایکوپلاسمها، بسته به (۱) گونه مایکوپلاسمای آزمایش شده، (۲) هدف ژنی *PCR*، (۳) نوع و طراحی پرایمر، و (۴) شرایط *PCR*، بیان شده است (۳۸-۳۵).

فهرست مراجع:

1. Wang H, Kang F, Jelfs P, James G, and Gilbert GL. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strain by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**(3): 1483-1486.
2. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of Mycoplasma species. *J Microbiol* 2006; **44**(1): 42-49.
3. McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells, in: Manillof J, Mcelhaney N, Finch LR, Baseman JB (ed)., Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. *American Society for Microbiology*, Washington, D. C.; 1992: 445-454.
4. Dussurget O, Dussiox DR. Rapid and, sensitive PCR-based detection of Mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl Environ Microbiol*; 1994; **60**(3): 953-959.
5. Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaya P, Maes D, Naessens A, Claeys G, Ganck CD, Haesebrouck F, Vanechoutte M. Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. *J Clin Microbiol* ;2005; **43**(9): 4558-4566.
6. Barile MF. Mycoplasma-tissue cell culture interactions. In: Tully GJ, Whitcomb RF (ed), the Mycoplasmas, vol.2. Academic Press, New York; 1979: 425-474.
7. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma infection of cultures cells. *Nature(London)* 1989; 487-488.
8. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, Macleod R, Quentmeier H, Steube, etal. Sensitivity and specificity of five different Mycoplasma detection assays. *Leukamia* 1992. 335-341.
9. loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4915-4923.
10. Eldering JA, Felton C, Veillux A, Potts BJ. Development of a PCR method for Mycoplasma testing of chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biological* 2004; **32**(4): 183-193.
11. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of Mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; **38**(2): 79-85.
12. Bonissol C, traincard F, Stoiljkovic B, Hosli P. Adenosine phosphorylase activity as a

- technique for detection of Mycoplasmas in biological media. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1984; 135A: 63-72.
13. jurmanova K, hajkova M, Fischer O. Detection of Mycoplasmas in cell cultures. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr* 1990; **20**: 947-948.
 14. Mardassi BB, Mohamad RB, Gueriri I, Boughattaas S, Mlik B. Duplex PCR to differentiate between Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 948-958.
 15. Shahhosseiny MH, Polymerase chain reaction. 1th eds, Tehran, Islamic Azad University Press; 1384: 1-25.
 16. Shahhosseiny MH, Basic molecular diagnosis. 1th eds, Tehran, Islamic Azad University Press; 1384: 1-30.
 17. Hart MK, Delgiudice RA, Korch GW. Absence of Mycoplasma contamination in the anthrax vaccine. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**(1): 94-96.
 18. Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P, Stallock J, et al. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia(chlamydophila) pneumoniae*, *legionella pneumophila*, *legionella micdadei*, and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 565-571.
 19. Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert GL. Species-specific PCR for identification of common contaminant Mollicutes in cell culture. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 3195-3200
 20. Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res Microbiol* 1993; **144**: 489-493.
 21. Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; **58**: 2606-2615.
 22. Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR methods Appl* 1995; **4**: 199-208.
 23. Quirk JT, Kupinski JM, Dicioccio RA. Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. *Gynecol Oncol* 2001; **83**: 560-562.
 24. Tang J, Hu M, Lee S, Robin R. A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods* 2000; **39**: 121-126.
 25. Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg-Arskam, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP, and Van Loon AM. Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2122-2128.
 26. Ossewaarde JM, Veris AD, Bestebroes T, and Angulo AF. Application of a Mycoplasma Group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. Strains. *Applied Environ Microbiol* 1996; **62**(2): 328-331.
 27. Razin S, DNA probes and PCR in diagnosis of Mycoplasma infections. *Mol. Cell Probes* 1994; **8**: 497-511.
 28. Harasawa R. 1995. Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In Razin, S. and Tully, J. G. Editors.(1995). *Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasmology* (Vol.2) Academic Press, London.
 29. Salih BA, Rosenbusch RF. Cross-reactive proteins among eight bovine Mycoplasmas detected by monoclonal antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol* 2001; **24**: 103-111.
 30. Rodriguez F, Fernandez A, Ball HJ. Detection of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides by growth-inhibition using monoclonal antibodies. *Res. Vet. Sci.* 1997; **63**: 91-92.
 31. Been-Abdelmoumen B, Roy RS. Antigenic relatedness between seven avian Mycoplasma species as recovered by western blot analysis. *Avian Dis.* 1995; **39**: 250-262.
 32. Bolske G. Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 1988; **A269**: 331-340.

33. Johansson KE, Johansson I, Gobel UB. Evaluation of different hybridization procedures for the detection of *Mycoplasma* contamination in cell cultures. *Mol. Cell. Probes*. 1990; **4**: 33-42.
34. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ. Detection of bacterial and *Mycoplasma* contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; **99**: 89-94.
35. Buck GE, Ohara LC, Summersgill JT. Rapid sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30**: 3280-3283.
36. Grau O, Kovacic R, Griffais R, Montagnier L. Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; **106**: 327-334.
37. Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K, Ozawa A. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1993; **38**: 166-170.
38. Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and non-radioactive hybridization in microtiter plates. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31**: 1088-1094.

ناهمگونی الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های بالینی سالمونلا در

تهران

رضا رنجبر^{۱*}، علی ناغونی^۲، بهمن تبرائی^۳

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

۲) گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۳) بخش واکسن های باکتریایی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: رضا رنجبر، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

تلفن: ۸۸۰۲۹۸۸۳ ranjbar@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۳

چکیده:

زمینه و اهداف: گونه های سالمونلا یکی از مهم ترین عوامل بیماریزای قابل انتقال از غذا، در سراسر جهان محسوب می شوند. مقاومت آنتی بیوتیکی، یک مسئله رو به افزایش در ایزوله های سالمونلا بوده و مشکلات گسترده ای را جهت درمان آنتی بیوتیکی بیماری های ناشی از این گروه باکتری ها ایجاد کرده است. هدف از انجام این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های سالمونلای جدا شده از برخی بیمارستان های شهر تهران بود

روش بررسی: سویه های سالمونلا از بیمارستان های مختلف شهر تهران در طی سال های ۸۷-۸۶ جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. این ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی و سرولوژیک تعیین هویت گردیدند. حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی بر اساس روش استاندارد تعیین شد.

یافته ها: مقاومت کلی بین ۱۳۶ ایزوله جداسازی شده به شرح زیر بود: ۶۰ ایزوله (۴۴/۱٪) مقاومت به استرپتومایسین، ۳۱ ایزوله (۲۲/۸٪) مقاومت به کانامایسین، ۲۶ ایزوله (۱۹/۱٪) مقاومت به نئومایسین و ۱ ایزوله (۰/۷٪) مقاومت به توبرامایسین. هیچ کدام از ایزوله ها به جنتامایسین مقاومتی نشان ندادند. همچنین وجود الگوی متفاوتی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی به تفکیک سروگروه های مختلف سالمونلا در این مطالعه مشهود بود. به طوریکه میزان بالای مقاومت (۸۰٪) به استرپتومایسین در سالمونلای گروه B و به میزان کمتر (۶۹٪) در سالمونلای گروه C و بسیار کم (۱۰٪) در گروه D وجود داشت. این مسئله در مورد کانامایسین صادق بود زیرا میزان مقاومت ناهمگون در گروه های B، C و D به ترتیب ۱۴/۳٪، ۴۷/۲٪ و ۴/۸٪ بود. در مورد نئومایسین نیز نسبتاً همین تناسب وجود داشت. اما فقط ۴/۷٪ ایزوله های گروه B سالمونلا به توبرامایسین مقاوم بودند و در مورد جنتامایسین هیچ مقاومتی بین ایزوله هامشاهده نگردید.

نتیجه گیری: این مطالعه الگوی ناهمگونی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی را در میان پنج آنتی بیوتیک مورد بررسی در بین ایزوله های سالمونلا نشان داد. به طوریکه مقاومت به استرپتومایسین و تا اندازه ای کانامایسین قابل توجه بود، اما نسبت به توبرامایسین و جنتامایسین بسیار پایین و یا صفر بود. همچنین الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان سروگروه های مختلف متفاوت بود که نشان از اهمیت بررسی آنتی بیوگرام به تفکیک سروگروه ها و سرانجام اتخاذ تصمیم درمان آنتی بیوتیکی خاص هر سروگروه دارد.

کلمات کلیدی: گونه های سالمونلا، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، تست حساسیت آنتی بیوتیکی

مقدمه:

باکتری سالمونلا، یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است که به صورت باسیل های گرم منفی با فلاژله های پری تریش دیده می شود (۱). این باکتری یکی از شایع ترین باکتری های فابل انتقال از حیوانات به انسان است که به دلیل تنوع مخازن حیوانی، یکی از مهم ترین عوامل بیماری های فابل انتقال از غذا و یکی از مشکلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می گردد (۲). عفونت سالمونلا در انسان به صورت انتروکولیت، تب روده ای و عفونت سیستمیک بروز می کند (۳).

طبقه بندی این گروه پیچیده است. زیرا به جای یک گونه مشخص، مجموعه ای از گونه های مختلف را تشکیل می دهند. اعضای جنس سالمونلا اساساً بر مبنای اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش های بیوشیمیایی و ساختار آنتی ژن های H، O و Vi (در صورت وجود) طبقه بندی می شوند (۳). تاکنون در حدود ۲۵۰۰ سروتایپ سالمونلا بر اساس آنتی ژن های H و O شناسایی شده است (۴).

مقاومت های آنتی بیوتیکی در سالمونلا به مانند سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه شایع می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی، یک مسئله رو به افزایش در ایزوله های سالمونلا بوده و مشکلات گسترده ای را جهت درمان آنتی بیوتیکی بیماری های ناشی از این گروه باکتری ها ایجاد کرده است. یکی از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت ناشی از موتاسیون های کروموزومی است که در غیاب آنتی بیوتیک نیز رخ می دهد، و کاربرد آنتی بیوتیک باعث نابودی ایزوله های حساس و گزینش ایزوله های مقاوم می شود (۵). مکانیسم دوم مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت ناشی از تبادلات ژنتیکی است که غالباً به وسیله پلاسمیدها ایجاد می شود. این نوع مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی استرپتومایسین، نئومایسین، کانامایسین و غیره گزارش شده است (۵). هدف ما از انجام این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های سالمونلای جدا شده از برخی بیمارستان های شهر تهران بود.

مواد و روش ها:

این مطالعه توصیفی طی سال های ۸۷-۸۶ انجام شده است. نمونه مدفوع بیماران بستری شده در چند بیمارستان شهر تهران، بلافاصله بعد از نمونه گیری به محیط های کشت غنی کننده مثل سلنیت F انتقال یافته و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. از محیط سلنیت F بر روی محیط های اختصاصی

و افتراقی مانند XLD (Xylose lysine deoxycholate agar) و agar و SS agar (*Salmonella and Shigella* agar) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. روز بعد، کلنی های مشکوک به سالمونلا جداسازی شدند. از هر تک کلنی خالص، در شرایط استریل، بر روی محیط های TSI (Triple sugar iron agar)، اوره، لیزین آیرون آگار، سیترات و MRVP (Methyl red voges proskauer) کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند.

پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی و بررسی واکنش های بیوشیمیایی جهت جداسازی و تأیید سالمونلا، آزمون سروتایپینگ جهت مشخص نمودن آنتی ژن H، O و Vi با آنتی سرم مربوطه انجام گردید. بدین ترتیب که پس از تهیه سوسپانسیون باکتری و مجاور کردن آن با آنتی سرم (بهار افشان و کوشا فناوریگیتی)، در صورت مثبت بودن به مدت ۱ تا ۲ دقیقه آگلوتیناسیون مشاهده گردید.

دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق شامل آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (۱۰µg)، جتتامایسین (۱۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg)، نئومایسین (۳۰µg) و کانامایسین (۳۰µg) بودند. جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن آگار (Kirby- Baure disk diffusion method) استفاده شد. آزمون با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با استاندارد نیم مک فارلند انجام گردید. سوسپانسیون تهیه شده به وسیله سواب پنبه ای استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار ساخت کارخانه مرک آلمان به صورت متراکم کشت داده شد، سپس دیسک های آنتی بیوتیک با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند. پلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. سپس با توجه به قطر منطقه ممانعت از رشد و اندازه گیری آن به وسیله خط کش و با استفاده از جدول استاندارد (Clinical and laboratory standards institute) CLSI مقاومت و یا حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های مورد نظر مشخص گردید. در این تحقیق از ارگانسیم استاندارد اشرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان ارگانسیم کنترل در انجام آزمایش استفاده شد.

یافته ها:

۱۳۶ ایزوله سالمونلا جداسازی شد. نتایج کلی مقاومت دارویی ایزوله های جداسازی شده بدین شرح است: ۶۰ ایزوله (۴۴/۱٪) مقاومت به استرپتومایسین، ۳۱ ایزوله (۲۲/۸٪) مقاومت به کانامایسین، ۲۶ ایزوله (۱۹/۱٪) مقاومت به نئومایسین و ۱ ایزوله (۰/۷٪) مقاومت به توبرامایسین. هیچ کدام از ایزوله ها به جنتامایسین مقاومت نشان ندادند.

جدول ۱ نشان دهنده توزیع فراوانی سرگروه های سالمونلا جدا شده بر حسب نتیجه آنتی بیوگرام می باشد. جدول ۲ نیز نشان دهنده فراوانی الگوهای مقاومت یگانه و چندگانه آنتی بیوتیکی در بین سرگروه های سالمونلا جداسازی شده می باشد. در این مطالعه وجود الگوی متفاوتی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی به تفکیک سرگروه های مختلف سالمونلا مشهود بود.

جدول ۱: توزیع فراوانی سرگروه های سالمونلا جدا شده بر حسب نتیجه آنتی بیوگرام

نوع	استرپتومایسین			کانامایسین			نئومایسین			توبرامایسین			جنتامایسین		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
سالمونلا سرگروه B	تعداد	۱۶	۲	۲	۳	۳	۱۵	۳	۳	۱۶	۷	۳	۱۶	۱	-
	درصد	۸۰	۱۰	۱۰	۱۴/۳	۱۴/۳	۷۱/۴	۱۶/۵	۱۱/۵	۲۷	۴/۷	۰	۹۵/۳	۵/۵	۰
سالمونلا سرگروه C	تعداد	۳۸	۸	۹	۲۵	۱	۲۷	۲۱	۲۱	۲۱	-	۵۴	۱	-	
	درصد	۶۹	۱۴/۵	۱۶/۵	۴۷/۲	۱/۸	۵۱	۳۸/۹	۲۲/۲	۳۸/۹	۰	۱۰۰	۱/۷	۰	۰
سالمونلا سرگروه D	تعداد	۶	۱۵	۴۰	۳	۲	۵۷	۳	۲	۵۱	-	۶۱	-	-	
	درصد	۱۰	۲۴/۵	۶۵/۵	۴/۸	۳/۲	۹۲	۳/۷	۵/۳	۹۱	۰	۱۰۰	۰	۰	۰
جمع	تعداد	۶۰	۲۵	۵۱	۳۱	۶	۹۹	۲۶	۲۲	۸۸	۱	۱۳۵	۲	-	
	درصد	۴۴/۱	۱۸/۴	۳۷/۵	۲۲/۸	۴/۴	۷۲/۸	۱۹/۱	۱۶/۲	۶۴/۷	۰/۷	۹۹/۳	۱/۵	۰	۰

*S:susceptible, I: Intermediate, R: Resistant

جدول ۲: فراوانی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سرگروه های سالمونلا

تعداد ایزوله ها	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	سرگروه سالمونلا
۱	KAN, STR, NEO, TOB	B
۱	KAN, STR, NEO	
۱	KAN, NEO	
۱۴	STR	
۲	عدم مقاومت	
۱۶	KAN, STR, NEO	C
۲	KAN, NEO	
۱	KAN, STR	
۱۷	STR	
۲	KAN	
۹	عدم مقاومت	D
۲	KAN, STR, NEO	
۴	STR	
۱	KAN	
۴۰	عدم مقاومت	

KAN (کانامایسین)، STR (استرپتومایسین)، NEO (نئومایسین) و TOB (توبرامایسین).

بحث:

به طوریکه مقاومت به استرپتومایسین و تا اندازه ای کانامایسین قابل توجه است در صورتیکه نسبت به توبرامایسین و جنتامایسین بسیار پایین و یا صفر می باشد. همچنین الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان سرگروه های مختلف متفاوت است. به طوریکه میزان بالای مقاومت (۸۰٪) نسبت به استرپتومایسین در سالمونلای گروه B و به میزان کمتر (۶۹٪) در سالمونلای گروه C و بسیار کم (۱۰٪) در گروه D وجود دارد. این مسئله در مورد کانامایسین هم صادق است. زیرا میزان مقاومت ناهمگون در گروه های B، C و D به ترتیب ۱۴/۳٪، ۴۷/۲٪، و ۴/۸٪ است. در مورد نئومایسین نیز نسبتاً همین تناسب وجود دارد. اما فقط ۴/۷٪ ایزوله های گروه B سالمونلا به توبرامایسین مقاوم هستند و در مورد جنتامایسین هیچ مقاومتی بین ایزوله هامشاهده نگردید. مطالعات دیگری مقاومت اندک نسبت به آمینوگلیکوزیدها را نشان داده اند. Asaker روند ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های مختلف سالمونلا متعلق به گروه های B و C و D را در ترکیه مقابل ۸ آنتی بیوتیک از جمله جنتامایسین طی سال های ۱۹۸۷ تا ۱۹۹۴ بررسی نموده و به ترتیب نشان داد که مقاومت در سال ۱۹۸۷ نسبت به این آنتی بیوتیک حدود ۵۲٪، در سال ۱۹۸۸ حدود ۶۰٪، در سال ۱۹۸۹ حدود ۲۹٪، در سال ۱۹۹۰ حدود ۱۷٪، در سال ۱۹۹۱ حدود ۲۳٪،

در حال حاضر فلوروکینولون ها نظیر افلوکساسین یا سپیروفلوکساسین، سفالوسپورین های نسل سوم نظیر سفتریاکسون و همچنین آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، آموکسی سیلین، آمپی سیلین و تری متوپریم سولفامتوکسازول جهت درمان بیماری های ناشی از سالمونلا از جمله تیفوئید به کار می روند. اما در نقاطی از جهان سویه هایی هر چند نادر با مقاومت سطح بالا به سفالوسپورین های نسل سوم و فلوروکینولون ها گزارش شده است (۶) از این رو، توجه به آنتی بیوتیک های قدیمی که حساسیت باکتریایی هنوز هم به آنها وجود داشته و یا ظهور نموده است همیشه به عنوان یک رویکرد درمانی می بایستی مدنظر باشد. آمینوگلیکوزیدها آنتی بیوتیک های وسیع الطیفی هستند که اثر ضد باکتریایی را از طریق اتصال اختصاصی به ریبوزوم باکتریای و تداخل در سنتز پروتئین اعمال می کنند. این آنتی بیوتیک ها داروهای استاندارد طلایی برای باکتری های بیماریزای جدی محسوب می شوند. اما قابلیت استفاده درمانی در عفونت های ناشی از عفونت های درون سلولی مانند بیماری های کلامیدیایی و یا باکتری های درون سلولی را ندارند. این مسئله به کاهش نفوذپذیری این آنتی بیوتیک ها در غشای سلول های یوکاریوتی نسبت داده شده است (۷). در مطالعه ما، نتایج حکایت از وجود الگوی ناهمگونی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ۵ آنتی بیوتیک مورد بررسی در بین ایزوله های سالمونلا دارد.

در سال ۱۹۹۲ حدود ۱۵٪، در سال ۱۹۹۳ حدود ۲۰٪ و در سال ۱۹۹۴ به صفر درصد رسیده است (۸).

نسبت مقاومت پایین به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله های سالمونلا گروه D (سالمونلا انتریتیدیس) در یک گزارش در برزیل که در سال ۲۰۰۶ منتشر شد به ترتیب ۱۲/۵٪ و ۳۱/۷٪ جهت آنتی بیوتیک های کانامایسین و نئومایسین بود (۹).

در مطالعه دیگری در آمریکای جنوبی، در سائوپائولو برزیل، هم تفاوت حساسیت نسبت به آمینوگلیکوزیدها نشان داده شد. به طوریکه به ترتیب ۱۸/۵٪، ۱۷/۹٪، ۲/۴٪، ۳۱/۲٪ از ایزوله های سالمونلا اینفانتیس (گروه C)، دوبلین (گروه D)، تاییفی موریوم (گروه B)، انتریتیدیس (گروه C)، و آگونا به تورامایسین مقاوم بودند. این نسبت در مورد آمیکاسین ۳/۷٪، ۱/۷٪، ۶/۲٪، ۰/۸٪ و ۱۵٪ و در مورد جنتامایسین ۱۶/۷٪، ۳/۵٪، ۷٪، ۷/۴٪ و ۳۰٪ به ترتیب در ایزوله های سالمونلا اینفانتیس (گروه C)، دوبلین (گروه D)، تاییفی موریوم (گروه B)، انتریتیدیس (گروه C)، و آگونا بود (۱۰).

در قاره دیگر، Friedlan و همکاران در بخش نوزادان یک بیمارستان بزرگ در آفریقای جنوبی وضعیت مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از جمله آمیکاسین، جنتامایسین و تورامایسین را در بین ایزوله های گرم منفی از جمله سالمونلا که به شکل بیمارستانی و یا کسب شده از جامعه بودند، بررسی کردند. این مقاومت را طی ۲ دوره یعنی زمان استفاده از جنتامایسین (فوریه ۱۹۸۹ تا ژانویه ۱۹۹۰) و زمان استفاده از آمیکاسین (فوریه ۱۹۹۰ تا ژانویه ۱۹۹۱) بررسی نمودند. نشان داده شد که در دوره استفاده از جنتامایسین، از میان ۲۳ ایزوله سالمونلای کسب شده از جامعه هیچ کدام به سه آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزید فوق مقاوم نبودند. اما تنها یک ایزوله (از مجموع ۵ ایزوله) کسب شده از بیمارستان به جنتامایسین مقاوم بود. در دوره دوم یعنی زمان استفاده از آمیکاسین از مجموع ۲۴ ایزوله سالمونلا، مقاومت نسبت به جنتامایسین و تورامایسین در ۱ ایزوله و نسبت به آمیکاسین در هیچ ایزوله ای مشاهده نشد. این وضعیت در میان سویه های کسب شده بیمارستانی نیز مشاهده شد (۱۱).

در اروپا نیز Antunes و همکاران در طی یک مطالعه بر روی ۱۱۸۳ سویه سالمونلا جدا شده از منابع مختلف انسانی، غذایی و محیطی در طی سال های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ در کشور پرتغال نشان

دادند که ۱۷٪ ایزوله ها به استرپتومایسین، ۱٪ به جنتامایسین و ۰/۲٪ به کانامایسین مقاوم بودند (۱۲). در آسیا و کشور همسایه پاکستان، Asghar و همکاران در یک مطالعه در اسلام آباد نشان دادند تمام ایزوله های بالینی سالمونلا جز یک ایزوله که به جنتامایسین مقاوم بود، همگی به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی از جمله تورامایسین، آمیکاسین و جنتامایسین حساس بودند (۱۳).

همچنین در کشور دیگری از این قاره پهناور، مقاومت در ۹۳ ایزوله سالمونلا گروه D (سروتایپ تاییفی) جدا شده از کودکان زیر ۱۲ سال در مطالعه Kumar در هند در فاصله سال های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۴ نسبت به آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۸/۷٪ و ۹/۷٪ بود (۱۴). مقاومت یکسان نسبت به این دو آنتی بیوتیک در ۳ مطالعه دیگر به ترتیب ۱۵٪، ۰٪ و ۳٪ گزارش شده است (۱۵، ۱۶).

اما مقاومت بالا نیز نسبت به آمینوگلیکوزیدها در برخی مطالعات گزارش شده است به طوریکه در مطالعه ای که در شیلی انجام شد، نشان داده شد که در میان ۱۳۹ ایزوله سالمونلا پاناما، بیشتر آنها (۱۰۷ ایزوله) به استرپتومایسین مقاوم بودند که ناشی از وجود یک پلاسمید ۲۱۸ کیلوگفت بازی بوده است. همچنین نشان داده شد که مقاومت موارد اندکی از ایزوله ها نسبت سایر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی از جمله جنتامایسین و کانامایسین ناشی از وجود یک پلاسمید ۱۲۰ کیلوگفت بازی در حال تکامل می باشد (۱۷).

Randall و همکاران در طی یک گزارش در سال ۲۰۰۴، ۳۹۷ ایزوله سالمونلا انتریکا با منشأ انسانی یا حیوانی از بریتانیا را از نظر وجود مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی و وجود اینتگرون ها بررسی کردند. آنها نشان دادند که ۲، ۱۴ و ۱۱۹ ایزوله به ترتیب به جنتامایسین، کانامایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۱۸).

Peirano نشان داد که از میان ۱۳۵ ایزوله سالمونلا انتریکا با منشأ مختلف طی سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۳ به ترتیب ۲۷، ۲۶ و ۱۰۳ ایزوله نسبت به جنتامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۱۹).

Musgrove و همکاران در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۶ منتشر شد نشان دادند که از ۴۱ ایزوله سالمونلا جدا شده از منابع مختلف، ۶۳/۴٪ به استرپتومایسین، ۶۱٪ به کانامایسین، ۶۱٪ به جنتامایسین و ۰٪ به آمیکاسین مقاوم هستند (۲۰).

در سال ۱۹۹۲ حدود ۱۵٪، در سال ۱۹۹۳ حدود ۲۰٪ و در سال ۱۹۹۴ به صفر درصد رسیده است (۸).

نسبت مقاومت پایین به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله های سالمونلا گروه D (سالمونلا انتریتیدیس) در یک گزارش در برزیل که در سال ۲۰۰۶ منتشر شد به ترتیب ۱۲/۵٪ و ۳۱/۷٪ جهت آنتی بیوتیک های کانامایسین و نئومایسین بود (۹).

در مطالعه دیگری در آمریکای جنوبی، در سائوپائولو برزیل، هم تفاوت حساسیت نسبت به آمینوگلیکوزیدها نشان داده شد. به طوریکه به ترتیب ۱۸/۵٪، ۱۷/۹٪، ۲/۴٪، ۳۱/۲٪ از ایزوله های سالمونلا اینفانتیس (گروه C)، دوبلین (گروه D)، تاییفی موریوم (گروه B)، انتریتیدیس (گروه C)، و آگونا به تورامایسین مقاوم بودند. این نسبت در مورد آمیکاسین ۳/۷٪، ۱/۷٪، ۶/۲٪، ۰/۸٪ و ۱۵٪ و در مورد جنتامایسین ۱۶/۷٪، ۳/۵٪، ۷٪، ۷/۴٪ و ۳۰٪ به ترتیب در ایزوله های سالمونلا اینفانتیس (گروه C)، دوبلین (گروه D)، تاییفی موریوم (گروه B)، انتریتیدیس (گروه C)، و آگونا بود (۱۰).

در قاره دیگر، Friedlan و همکاران در بخش نوزادان یک بیمارستان بزرگ در آفریقای جنوبی وضعیت مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از جمله آمیکاسین، جنتامایسین و تورامایسین را در بین ایزوله های گرم منفی از جمله سالمونلا که به شکل بیمارستانی و یا کسب شده از جامعه بودند، بررسی کردند. این مقاومت را طی ۲ دوره یعنی زمان استفاده از جنتامایسین (فوریه ۱۹۸۹ تا ژانویه ۱۹۹۰) و زمان استفاده از آمیکاسین (فوریه ۱۹۹۰ تا ژانویه ۱۹۹۱) بررسی نمودند. نشان داده شد که در دوره استفاده از جنتامایسین، از میان ۲۳ ایزوله سالمونلای کسب شده از جامعه هیچ کدام به سه آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزید فوق مقاوم نبودند. اما تنها یک ایزوله (از مجموع ۵ ایزوله) کسب شده از بیمارستان به جنتامایسین مقاوم بود. در دوره دوم یعنی زمان استفاده از آمیکاسین از مجموع ۲۴ ایزوله سالمونلا، مقاومت نسبت به جنتامایسین و تورامایسین در ۱ ایزوله و نسبت به آمیکاسین در هیچ ایزوله ای مشاهده نشد. این وضعیت در میان سویه های کسب شده بیمارستانی نیز مشاهده شد (۱۱).

در اروپا نیز Antunes و همکاران در طی یک مطالعه بر روی ۱۱۸۳ سویه سالمونلا جدا شده از منابع مختلف انسانی، غذایی و محیطی در طی سال های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ در کشور پرتغال نشان

نتیجه گیری:

ناشی از این باکتری ها قابلیت استفاده را دارند. نکته دیگری که می بایستی به آن توجه داشت ناهمگونی الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان سروگروه های مختلف است که نشان از اهمیت بررسی آنتی بیوگرام به تفکیک سروگروه ها و سرانجام اتخاذ تصمیم درمان آنتی بیوتیکی خاص هر سروگروه دارد.

همسو با نتایج حاصل از بسیاری از مطالعات، به جز استرپتومایسین، مقاومت نسبت به سایر آمینوگلیکوزیدها به ویژه جنتامایسین در میان سالمونلا انتریکا در ایران پایین است. در صورت وجود اندیکاسیون دارویی، این آنتی بیوتیک ها در درمان بیماری های

فهرست مراجع:

1. Sherris RK. *Medical Microbiology*. 4th ed. New York; McGraw-Hill. 2006; PP: 343-373.
۲. امیر مظفری ن، تهرانی ه، نیاکانی م. بررسی میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید در سالمونلاهای تیفوئیدی و غیر تیفوئیدی جدا شده از بیماران بستری در یک دوره یکساله ۸۵-۱۳۸۴، *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران پاییز ۸۶*، دوره چهاردهم، شماره ۵۶، صص ۴۳ تا ۵۱.
3. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 23th ed. The United States of America; McGraw-Hill. 2004; PP:256-261.
4. Pelayo JS, Delicato ER, Mikcha JMG, Fernandes SA. Resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* spp. Isolated from human infections. *Brazilian Arch of Bio and Tech* 2004; **47**(2): 193-197.
۵. شریف زاده ع، همت زاده ف، نامجو ع، آذر دانش. بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از موارد اسهال کودکان (۲-۰ ساله) در شهرستان شهرکرد و بررسی پدیده انتقال مقاومت در باکتری اشرشیاکلی K₁₂، *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بهار ۸۳*، دوره ششم، شماره ۱، صص ۱ تا ۶.
6. Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ* 2006; **333**: 78-82.
7. Menasha O, Kaganskaya E, Baasov T, Yaron S. Aminoglycosides affect intracellular *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Virchow. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**(3): 92-96.
8. Asaker EA, Yurdak K. Analysis of antibiotics resistance detected in 415 strains of *Salmonella* isolated in stool culture of Turkish patients with diarrhea. *PMJ* 2006; **2**(1): 71-75.
9. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LR, Pilotto F, Moraes HLS, Salle CTP, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella enteritidis* isolated from broiler carcasses. *Brazilian J of Micro* 2006; **37**: 368-371.
10. Castro FA, Santos VR, Gomes Martins CH, Fernandes SA, Zaia JE, Martinez R. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Serotypes in Patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. *BJID* 2002; **6**: 244-251.
11. Friedland IR, Funk E, Khoosal M, Klugman KP. Increased resistance to amikacin in a neonatal unit following intensive amikacin usage. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**(8): 1596-1600.
12. Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *JAC* 2006; **58**(2):297-305.
13. Asghar U, Saba N, Samad A, Qazilbash AA. Identification, Characterization and antibiotic susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* species isolated from blood and stool samples of patients. *J Med Sci* 2002; **2**(2): 85-88.
14. Kumar R, Gupta N, Shalini. Multidrug-resistant typhoid fever. *Indian J of Paediatr* 2007; **74**: 39-42.
15. Kabra SK, Kabra M, Talati A, Soni N, Patel S, Modi RR. Multidrug-resistant typhoid fever. *Trop Doct* 2000; **30**: 195-197
16. Agarwa KS, Singh SK, Kumar N. A study of current trends in enteric fever. *J Commun Dis* 1998; **30**: 171-174.
17. Cordano AM, Virgilio R. Evolution of drug resistance in *Salmonella panama* isolates in Chile. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**(2): 336-341.

18. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK. Antibiotic resistance genes, Integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **53**: 208-216.
19. Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, Moura Falavina dos Reis E, Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *JAC* 2006; **58**(2): 305-310.
20. Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK, Cox NA, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poultry Sci* 2006; **85**: 1665-1669.

بررسی وجود ژن *blaZ* و تولید بتالاکتاماز در ایزوله های بالینی

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

فرشته راعی، فرشته افتخار*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

نویسنده رابط: فرشته افتخار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

f-eftekhar@cc.sbu.ac.ir

فکس: ۲۲۴۳۱۶۶۴

تلفن: ۲۹۹۰۳۲۰۸

تاریخ دریافت مقاله: ۸/۸/۸۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۶

چکیده:

مقدمه و اهداف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان مهم ترین عضو گروه استافیلوکوک های کوآگولاز منفی، در دهه اخیر سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از متداول ترین عوامل عفونت خون مطرح گردیده است. برای درمان اغلب عفونت های ناشی از این باکتری از داروهای بتالاکتام استفاده می شود. ترشح آنزیم بتالاکتاماز نه تنها باعث ایجاد مقاومت به داروهای بتالاکتام می شود بلکه ترشح زیاد آن در برخی سویه های فاقد ژن مقاومت به متی سیلین، موجب مقاومت کاذب به متی سیلین می شود.

هدف از این پژوهش، تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به داروهای بتالاکتام، بررسی فنوتیپی حضور آنزیم بتالاکتاماز و در نهایت حضور ژن بتالاکتاماز (*blaZ*) در نمونه های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود.

روش بررسی: تعداد ۶۹ سویه استافیلوکوک کوآگولاز منفی از ۳ بیمارستان در شهر تهران جمع آوری شدند که از میان آنها ۵۵ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شناسایی شدند. حساسیت آنها نسبت به ۸ آنتی بیوتیک بتالاکتام با روش Disc diffusion تعیین شد. تولید آنزیم بتالاکتاماز توسط کلنی با تست یدومتری انجام شد و در نهایت حضور ژن *blaZ* با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی و روش PCR مطالعه شد.

یافته ها: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی حاصل از آزمایش آنتی بیوگرام نشان داد که ۵۴ ایزوله (۹۸/۱٪) به پنی سیلین، ۵۰ ایزوله (۹۰/۹٪) به متی سیلین، ۲۹ ایزوله (۵۲/۷٪) به سفتریاکسون، ۲۷ ایزوله (۴۹/۱٪) به سفتری زوکسیم، ۲۰ ایزوله (۳۶/۳٪) به سفوتاکسیم، ۱۹ ایزوله (۳۴/۵٪) به آموکسی سیلین، ۱۷ ایزوله (۳۰/۹٪) به سفازولین و ۱۳ ایزوله (۲۳/۶٪) به سفالکسین مقاوم بودند. تست های یدومتری کلنی حضور بتالاکتاماز و نتایج حاصل از PCR نیز حضور ژن *blaZ* را در کلیه ایزوله ها تایید کرد. **نتیجه گیری:** روش آنتی بیوگرام نشان داد که ۲۴٪ تا ۵۳٪ از ایزوله ها به انواع بتالاکتام های نسل سوم مقاوم هستند. حال آنکه روش یدومتری کلنی، تولید آنزیم بتالاکتاماز را در کلیه ایزوله ها و روش PCR حضور ژن *blaZ* را در همه ایزوله ها نشان می دهد، اما میزان بیان آن متفاوت است. نتیجه گیری می شود که روش آنتی بیوگرام به تنهایی برای تعیین استراتژی درمانی عفونت های ناشی از این ارگانیسم مناسب نیست.

کلید واژه ها: بتالاکتاماز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ژن *blaZ*

مقدمه:

داد. روش های فنوتیپی تولید آنزیم بتالاکتاماز، نظیر روش های یدومتري، اسیدومتري و سفالوسپورین های رنگ زا (نیتروسفین) فقط حضور این آنزیم را گزارش می کنند (۴).

ترشح آنزیم های بتالاکتاماز نه تنها باعث ایجاد مقاومت باکتری در برابر داروهای بتالاکتام می شود، بلکه ترشح زیاد آن در برخی سویه های فاقد ژن مقاومت به متی سیلین، موجب مقاومت کاذب به متی سیلین می شود (۶).

هدف از انجام این پژوهش، تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نسبت به داروهای بتالاکتام، تعیین فنوتیپی حضور آنزیم بتالاکتاماز و در نهایت تعیین وجود ژن بتالاکتاماز (*blaZ*) بود.

مواد و روش ها:**جمع آوری و شناسایی نمونه ها:**

تعداد ۶۹ نمونه بالینی CoNS از بیمارستان های طالقانی، امام حسین و بوعلی در شهر تهران جمع آوری شدند. نمونه ها شامل ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه، سر سوند و *GV line* (رگ تغذیه کننده قلب) بودند. در آزمایشگاه ایزوله های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی استاندارد نظیر کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول، DNase، مقاومت به باسیتراسین و حساسیت به نوویوسین شناسایی شدند. برای کلیه تست ها از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل استفاده شد.

تست آنتی بیوگرام:

تعیین حساسیت ایزوله های بالینی به ۸ آنتی بیوتیک بتالاکتام شامل پنی سیلین، متی سیلین، آموکسی سیلین، سفتریاکسون، سفتریام، زوکسیم، سفوتاکسیم، سفازولین و سفالکسین (شرکت پادتن طب ایران) با استفاده از روش Kirby-Bauer انجام شد. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع مولر-هیئتون تهیه و به وسیله سواب استریل روی سطح آگارمولر-هیئتون تلقیح می گردید. سپس دیسک ها با فواصل مناسب روی سطح پلیت قرار داده می شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۵ °C قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری می گردید (۷).

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مهم ترین عضو گروه *استافیلوکوک* های کوآگولاز منفی (CoNS) و عامل ۷۵٪ از عفونت های این گروه می باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکرو فلور طبیعی پوست انسان بوده و در مخاط بینی و بخش فوقانی مجاری تنفسی مستقر می باشد (۱). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تا مدت ها به خاطر طبیعت همه جایی و بیماریزایی نسبتاً ضعیف به عنوان ساپروفیت معرفی می شد. ولی در طی دهه های اخیر با گسترش استفاده از وسایل پزشکی تعبیه شونده در بدن (*indwelling medical devices*)، نظیر انواع سوندها و پروتزها، به عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی ظهور کرده است (۲). در دهه گذشته، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از شایع ترین عوامل عفونت خون مطرح و شناخته شده است. همچنین به دفعات از عفونت های زخم، خون، مجاری ادرار، اندوکاردیت، باکتری، پنومونی، عفونت های پوستی و بافت نرم جدا شده است (۳).

برای درمان اغلب عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از داروهای بتالاکتام به خصوص نسل های جدید سفالوسپورین ها استفاده می شود. اما، افزایش سریع مقاومت به این داروها موجب ناموفق بودن درمان عفونت های وابسته به این ارگانیسم شده است. اصلی ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در *استافیلوکوک* ها تولید آنزیم های بتالاکتاماز و یا تغییر پروتئین های دیواره (*Penicillin Binding Proteins, PBPs*) می باشد که تمایل کاهش یافته ای به دارو دارند و منجر به مقاومت وسیعی نسبت به پنی سیلین های نیمه سنتزی، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها می شود. بتالاکتامازها به طور انتخابی، حلقه بتالاکتام را باز می کنند به نحوی که ساختار تغییر یافته دارو نمی تواند اتصال موثری با *PBP* ها برقرار نماید. بنابراین سنتز دیواره سلولی ادامه می یابد (۴).

همبستگی بین مقاومت به پنی سیلین در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و تولید β -لاکتاماز اولین بار در سال ۱۹۴۴ گزارش شد. طبق آمار سویه های مقاوم باکتری از میزان ۵٪ در سال ۱۹۴۶، به ۵۰٪ در سال ۱۹۵۰ و به بیش از ۹۰٪ در حال حاضر رسیده است (۵).

از آنجایی که نواحی رمز کننده ۴ نوع بتالاکتاماز *استافیلوکوک* همپوشانی دارند، تنها با روش های سرولوژیکی و تفاوت در هیدرولیز سوبسترا می توان نوع بتالاکتاماز را در باکتری تشخیص

تست یدومتری کلنی:

تولید آنزیم بتالاکتاماز با تست یدومتری کلنی برای تمام ایزوله ها انجام شد. کاغذهای حاوی نشاسته به ابعاد ۵×۲ سانتی متر بریده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی ۰/۱ گرم پنی سیلین G در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم M ۰/۱ خیسانده می شدند. سپس به وسیله لوپ استریل، کلنی های ایزوله از کشت های یک شبه باکتری به سطح کاغذ منتقل و پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای °C ۳۷، محلول ید گرم به کاغذها اضافه گردید. ایجاد هاله سفید در اطراف کلنی نشانه تولید آنزیم بتالاکتاماز بود. این هاله ها در نتیجه تخریب حلقه بتالاکتام به وسیله آنزیم و ایجاد پنی سیلینیک اسید به وجود می آیند که کمپلکس بنفش رنگ نشاسته- ید در اطراف کلنی را بی رنگ می کند (۸).

استخراج DNA و آزمایش PCR:

استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط آگار مغذی در °C ۳۷ استفاده شد. سپس یک لوپ کامل از کشت باکتری به یک لوله اپندورف

محتوی ۲۵۰µl آب مقطر استریل انتقال و پس از ۲۰ دقیقه گرماگذاری در حمام آب جوش، به مدت ۵ دقیقه و با سرعت x ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. از مایع رویی حاوی DNA به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد (۹ و ۱۰).

تست PCR برای تشخیص حضور ژن مقاومت به بتالاکتاماز (*blaZ*) انجام شد. جداول ۱ و ۲ برنامه به کار گرفته شده در دستگاه ترموسایکلر و مخلوط واکنش ها را نشان می دهند. پرایمرهای Forward و Reverse که برای آمپلیفیکاسیون ژن بتالاکتاماز استفاده شدند به ترتیب ترادف های ACT TCA ACA CCT و GCT GCT TTC و TGA CCA CTT TTA TCA و GCA ACC بودند. برای مشاهده محصول PCR، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. تعیین سایز محصول با استفاده از مارکر 100 bp ladder (Fermentas) صورت گرفت (۱۱). طول محصول تکثیر شده با این جفت پرایمر، ۱۷۰ bp بود.

جدول ۱: برنامه دمایی و زمانی PCR

مراحل	دما (°C)	زمان (دقیقه)
Initial-Denaturation	۹۴	۲
Denaturation	۹۴	۱
Annealing	۵۵	۱
Extension	۷۲	۲
Final-Extension	۷۲	۵
Cycle Count	۳۰	

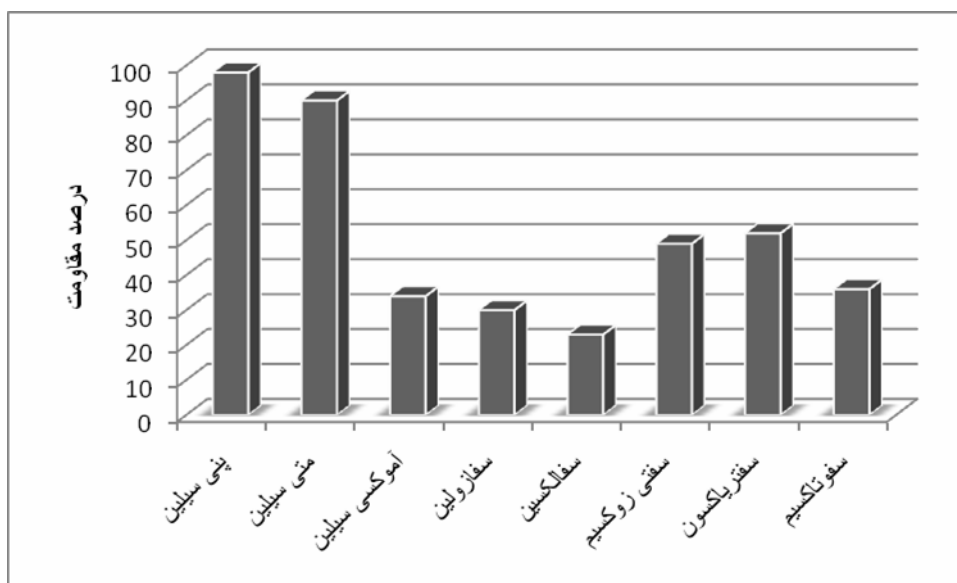
جدول ۲: غلظت های مخلوط PCR

غلظت	مواد
mM ^۱ /۵	MgCl ₂
unit ^۱	Taq polymerase
pM ^{۲۰}	(mix R+F) Primer
X ^۱	Reaction Buffer
μM ^{۲۰۰}	dNTP (mix)
۱۰	DNA- template

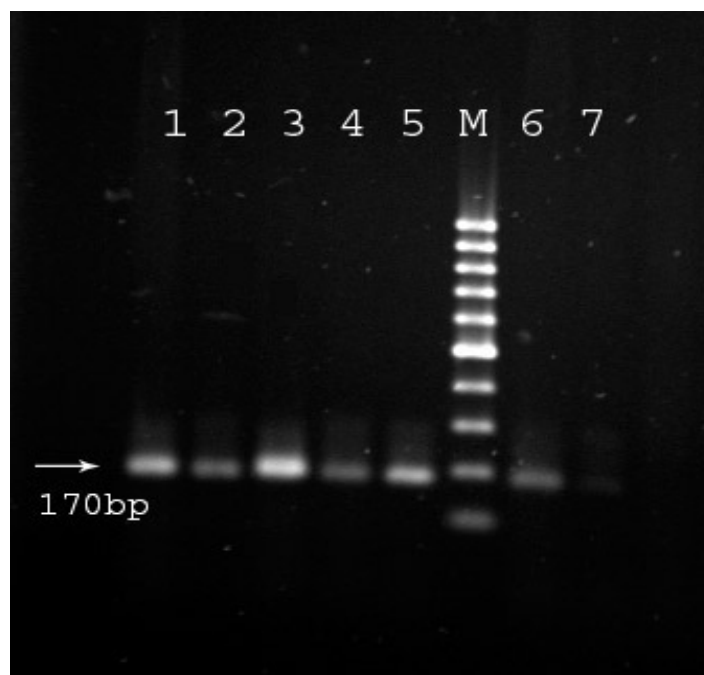
نتایج:

تست یدومتری کلنی، حضور بتالاکتاماز را در کلیه سویه ها نشان داد. هر چند، اندازه هاله های سفید اطراف کلنی ها متفاوت بود که نشان می دهد میزان تولید آنزیم در سویه های مختلف متفاوت است. نتایج نشان داد که ایزوله های حساس به پنی سیلین و متی سیلین نیز آنزیم را هر چند به طور ضعیف تولید کردند. واکنش PCR برای بررسی حضور ژن *blaZ* حضور ژن را در کلیه ایزوله ها تایید کرد. این نتایج با نتایج تست تولید بتالاکتاماز به وسیله کلنی همخوانی داشت. شکل ۱ اندازه قطعه حاصل از تکثیر ژن *blaZ* در روش PCR را نشان می دهد.

سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به دست آمده از بیمارستان های طالقانی، بوعلی و امام حسین به ترتیب ۹۲/۵٪، ۱۰۰٪ و ۶۲/۵٪ از نمونه های CoNS دریافتی بودند. در مجموع ۵۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جمع آوری شد که اغلب آنها از عفونت های خون و ادرار به دست آمده بودند. نتایج حاصل از تست های آنتی بیوگرام نشان داد که ۵۴ ایزوله (۹۸/۱٪) به پنی سیلین، ۵۰ ایزوله (۹۰/۹٪) به متی سیلین، ۲۹ ایزوله (۵۲/۷٪) به سفتریاکسون، ۲۷ ایزوله (۴۹/۱٪) به سفتی زوکسیم، ۲۰ ایزوله (۳۶/۳٪) به سفوتاکسیم، ۱۹ ایزوله (۳۴/۵٪) به آموکسی سیلین، ۱۷ ایزوله (۳۰/۹٪) به سفازولین و ۱۳ ایزوله (۲۳/۶٪) به سفالکسین مقاومت نشان دادند. به طور کلی، حدود ۲۴٪ تا ۵۳٪ از ایزوله ها به انواع بتالاکتام های نسل سوم مقاوم بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱: الگوی مقاومت ایزوله های *S. epidermidis* به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز. محصول آمپلیفیکاسیون ژن *blaZ* (۱۷۰bp) در ۷ نمونه بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس. M: مارکر.

بحث:

CLSI، تنها استفاده از پنی سیلین و آگساسیلین برای بررسی حساسیت استافیلوکوک ها به داروهای بتالاکتام کافی است (۷). پژوهش های انجام شده در ایران بر روی مقاومت استافیلوکوک ها به داروهای بتالاکتام، اکثراً بر پایه روش های فنوتیپی مانند آنتی بیوگرام، MIC و تولید بتالاکتاماز می باشد و مطالعاتی که به طور اختصاصی بر روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس باشد، محدود است.

صادقیان و همکاران در سال ۲۰۰۳، با استفاده از پرایمرهای TEM-1 در میان استافیلوکوک های کوآگولاز منفی و مثبت، ۲۶٪ مقاومت را گزارش کردند. پایین بودن این مقاومت احتمالاً به علت استفاده از پرایمرهایی بوده که برای استافیلوکوک ها کمتر اختصاصی است (۱۵).

نتیجه گیری :

تولید بتالاکتاماز یک خطر جدی برای درمان عفونت هایی است که مشکوک به ارگانیزم های تولید کننده بتالاکتاماز هستند. انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای تعیین استراتژی درمانی این عفونت ها اغلب بر پایه انجام آزمایش های آنتی بیوگرام عملی نیست و تدابیر دیگری لازم به نظر می رسند. استفاده از تست یدومتری بجای آزمایشات PCR برای تشخیص تولید بتالاکتاماز با توجه به ساده و ارزان بودن روش و اینکه به زمان زیادی احتیاج ندارد، ممکن است در تشخیص تولید کننده های بتالاکتاماز در ایزوله های بالینی مفید واقع شود.

شیوع استافیلوکوک ها در عفونت های بیمارستانی در سراسر جهان گسترش زیادی پیدا کرده است. بررسی های آماری در اغلب کشور های جهان نشان داده اند که استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس غالب ترین عامل شایع عفونت های خون و از عوامل شایع عفونت های دستگاه ادراری می باشد (۱۲). نتایج این پژوهش نیز هر چند در تعداد محدودی انجام گرفته است، با این آمار همخوانی دارد.

درصد مقاومت به پنی سیلین های حساس به بتالاکتاماز استافیلوکوک در میان ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۹۰-۸۰٪ و گاهی تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (۱۳). پژوهش حاضر نیز در ۹۸٪ مقاومت به پنی سیلین را نشان داد.

در سال ۲۰۰۷ بیان شد که ممکن است سطح پایین ولی معنادار تولید بتالاکتاماز در استافیلوکوک ها با روش دیسک های سفیناز شناسایی نشود و در این موارد بهتر است از تست یدومتری استفاده شود (۱۳). دانش منفرد در سال ۱۳۸۲، تولید آنزیم بتالاکتاماز را در ایزوله های بالینی استافیلوکوک کوآگولاز منفی با روش یدومتری و دیسک نیتروسفین بیش از ۹۰٪ گزارش کرد (۱۴). در مطالعه حاضر، ۱۰۰٪ ایزوله ها مولد بتالاکتاماز و حامل ژن *blaZ* بودند. هر چند، تست کلنی میزان بیان متفاوت ژن را در سویه های مختلف نشان داد. این یافته با نتیجه آنتی بیوگرام همخوانی نشان نمی دهد. این اختلاف اغلب به علت حساسیت کاذب و غیر واقعی در سویه های مقاوم به متی سیلین می باشد. در بسیاری از موارد روش آنتی بیوگرام برای تعیین استراتژی درمانی این عفونت ها مناسب نیست و بنابر توصیه

فهرست مراجع:

- Jawetz E, Melnick GL, Adelberg EA. In :Medical Microbiology. 24th ed, Mc Graw Hill Inc. Columbus, OH, USA. 2007; 224-230.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006; **24**(1): 25-26.
- Dieckema DJ, Pfaller M., Schmitz FJ, Smeyevsky J, Jones RN. Survey of infections due to susceptibility of isolates collected in the Unites States, Canada, Latin America, Europe and the Western region for the SENTRY pacific antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect.* 2001; Dis.32:S114-S132.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup F M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**(3): 450-460.
- Lyon BR, Skurray RA. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987; **51**: 88-134.
- Niemeyer DM, Pucci MJ, Sharma VK, Archer GL. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1996; **178**(18): 5464-5471.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS. Performance Standards For antimicrobial Susceptibility Testing, 15th information supplement (M100-S15). Wayne, Pa. 2005.
- Llanes R, Gonzalez M, Martinez I, Sosa J, Guzman D, Gutierrez O, Llop A, Sanches L. Evaluation of four methods for detecting

- the beta- lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; **98**(8): 1089-1091
9. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knoblock JKM, Zander AR, Mack O. Detection of virulence – associated genes and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from bonemarrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 5614-5619.
 10. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iran Biomed J.* 2007; **11**(3):161-167.
 11. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Trial E, Bergeron MG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J Antimicrob Chemother.* 2000; **46**, 527-533.
 12. Marshal SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; **30**:205-214.
 13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. In: Bailey & Scott ' diagnostic microbiology. 12th edition, Mosby Inc, USA. 2007; 607-618.
۱۴. دانش منفرد سمیه، افتخار فرشته. بررسی الگوی مقاومت استافیلوکوکها به داروهای بتالاکتام با استفاده از دیسک های پنی سیلین و اکساسیلین. مجله بیماری های عفونی و گرمسیری ۱۳۸۲، شماره ۲۳، ص ۶-۱
15. Sadeghian S, Neyestani TR, Burnie JP. Detection of bacterial, methicillin resistance and beta-lactamase genes found in wound swabs by multiplex polymerase chain reaction. *Acta Medica Iranica.* 2004; **42**(1): 19-25.

مقایسه اثر ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد و لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا*

محسن میرزایی^۱، امیر قریب^۱، پرویز اولیاء^{۲*}

^۱ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

^۲ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده رابط: پرویز اولیاء، تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدا... زاده، پلاک ۲۹، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی.

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ powlia@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۸

چکیده:

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* از عوامل مهم بیماریزای فرصت طلب است که با داشتن فاکتورهای بیماریزایی متعدد قادر است طیف وسیعی از عفونت ها را ایجاد کند. سیستم های حامل دارویی موجب کاهش سمیت داروها شده و شاخص های درمانی را به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می دهند. استفاده از لیپوزوم ها برای این منظور بسیار مفید است. لیپوزوم ها گویچه های کلوئیدی هستند که قطر آنها از کمتر از چند نانومتر تا چندین میکرومتر متغیر است. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با فرم آزاد دارو بر سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* بود. روش بررسی: در این مطالعه، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) آمیکاسین در فرم لیپوزومی و آزاد بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، از روش رقت در برات مطابق دستورالعمل (CLSI) Clinical and laboratory standards institute استفاده شد. برای تهیه لیپوزوم ها از روش سونیکاسیون استفاده شد. تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت معادل MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد مورد بررسی قرار گرفت و با تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت های مختلف آمیکاسین در فرم آزاد، مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که آمیکاسین در فرم لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا* اثر ضد میکروبی دارد و مقدار MIC آن معادل ۴ $\mu\text{g/ml}$ و مقدار MIC در فرم آزاد ۲ $\mu\text{g/ml}$ بدست آمد. مقایسه تغییرات کاهش تعداد باکتری ها در حضور آمیکاسین در فرم لیپوزومی با آمیکاسین در فرم آزاد نشان داد که بعد از گذشت ۸ ساعت آمیکاسین در فرم لیپوزومی با غلظت ۴ $\mu\text{g/ml}$ دارای اثری برابر در مواجهه با غلظت ۶ $\mu\text{g/ml}$ آمیکاسین به فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت است.

نتیجه گیری: باتوجه به مقاومت بالای *پسودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک های متداول، احتمال دارد که با مطالعات بیشتر بتوان از سیستم های حامل دارویی، از جمله لیپوزوم های حاوی آمیکاسین به عنوان دارو استفاده کرد.

کلید واژها: *پسودوموناس آئروژینوزا*، لیپوزوم، آمیکاسین

مقدمه :

هیدروکسید، ۲- پروپانول، اسید بوریک، ۲- مرکاپتو اتانل، متیل کلراید، کلروفرم، اتانل و اورتوفتال دی آلدئید از شرکت مرک-آلمان تهیه شدند. محلول آنتی بیوتیکی در آب مقطر استریل تهیه می‌شد و به صورت تازه در روز مورد استفاده، تهیه می‌گردید.

روش تهیه لیپوزوم ها :

برای تهیه لیپوزوم های حاوی آمیکاسین مقادیر مشخصی از لسیتین و کلسترول به یک بالن ته گرد منتقل شد و توسط کلرفرم به صورت کامل حل می‌شد. سپس به دستگاه روتار متصل شد و با استفاده از دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و تحت فشار کم طی مدت کوتاهی کلرفرم حذف می‌گردید و لایه نازکی از چربی بر دیواره داخلی بالن ایجاد می‌شد. به منظور هیدراته کردن فیلم حاصله و تشکیل لیپوزوم ها، مقدار ۶۰ میلی گرم پودر آمیکاسین در ۶ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به آرامی به فیلم حاصل افزوده شد. سپس مجدداً بالن به دستگاه روتار متصل شد و در دمای اتاق بدون خلاء هیدراته شدن فیلم صورت گرفت. برای جدا سازی داروی محصور نشده از سوسپانسیون لیپوزومی از روش سانتریفوژ استفاده شد. برای این منظور سوسپانسیون لیپوزومی ۳ بار و هر بار ۴۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰۰g سانتریفوژ و بعد از هر بار سانتریفوژ مایع رویی جدا شده و رسوب لیپوزومی دوباره با آب مقطر به حالت سوسپانسیون در می‌آمد. رسوب نهایی با استفاده از ۶ میلی لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد و به منظور تعیین درصد محصور سازی و روند آزاد سازی مورد بررسی قرار گرفت (۷).

تعیین درصد محصور سازی :

برای این منظور پس از جداسازی داروی محصور نشده مقدار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون لیپوزومی به یک مزور انتقال یافت. برای شکستن غشاء لیپوزومی و آزاد سازی آمیکاسین محصور شده مقدار ۴ میلی لیتر تریتون X-100 (۱۰٪) V/V داخل مزور ریخته شد و بعد با تکان دادن شدید و قرار دادن آن در حمام آب گرم ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد، انحلال غشاء لیپوزومی صورت پذیرفت. حجم محلول حاصل با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد، سپس بعد از انجام مراحل مشتق سازی، میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق به دستگاه HPLC تزریق شد و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد آمیکاسین و تعیین غلظت آن، کارایی محصور سازی با استفاده از رابطه ذی ربط محاسبه گردید (۸).

پسودوموناس آنروژینوزا یک باکتری بیماریزای مهم است که به خصوص با عفونت هایی از قبیل پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و عفونت زخم سوختگی در ارتباط می‌باشد. این باکتری دارای مکانیسم های متفاوت مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها از قبیل غیر فعال سازی آنزیماتیک دارو، تغییر در جایگاه هدف دارو و سیستم های برون ریز (efflux) آنتی بیوتیک ها است (۱ و ۲). با این حال نفوذ پذیری کم غشاء خارجی این باکتری مهم ترین عامل در ایجاد مقاومت دارویی محسوب می‌شود (۳). پسودوموناس آنروژینوزا به صورت ذاتی نسبت به بسیاری از عوامل ضد میکروبی دارای مقاومت می‌باشد و ایجاد سویه های مقاوم و اغلب بروز مقاومت های چندگانه دارویی (Multidrug resistance) سبب شده است که درمان عفونت های ناشی از این باکتری در بیشتر موارد، با شکست مواجه شود (۳). یکی از روش های جدید دارو درمانی استفاده از دارو رسانی (Drug delivery) با استفاده از لیپوزوم ها می‌باشد. حاملین دارو می‌توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن درون بدن کاسته می‌شود. همچنین حاملین دارویی باعث می‌شوند که نیمه عمر دارو در بدن بیشتر شود (Long - circulation) و از این طریق موجب می‌شوند که به منظور درمان بیماری دوز کلی کمتری از دارو نیاز باشد. این امر نیز به کاهش اثر جانبی دارو و اثرات تخریبی آن روی بافت های مختلف منجر می‌شود (۵ و ۴). هدف از انجام این مطالعه، مقایسه آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با آمیکاسین در فرم آزاد بر پسودوموناس آنروژینوزا بود.

مواد و روش ها :

در این مطالعه از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد پسودوموناس آنروژینوزا (ATCC 27853) استفاده شد. برای این منظور از کشت باکتری بر روی محیط مولر - هیتون آگار، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند در نرمال سالین ۰/۸۵ درصد تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری ها حدود $10^8 \times 1/5$ CFU/ml می‌باشد. از این سوسپانسیون در مراحل بعدی آزمایش ها استفاده می‌شد (۶). پودر آنتی بیوتیک آمیکاسین با پتنتی معادل ۰/۹۰۷ میلی گرم و تریتون X-100 از شرکت سیگما؛ لسیتین و کلسترول از شرکت Lipoid آلمان تهیه شدند. متانل، کربنات سدیم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم

برابر باکتری پseudomonas آئروژینوزا نداشتند در جدول شماره ۱ نتایج حاصل از آزمایش های MIC آورده شده است .

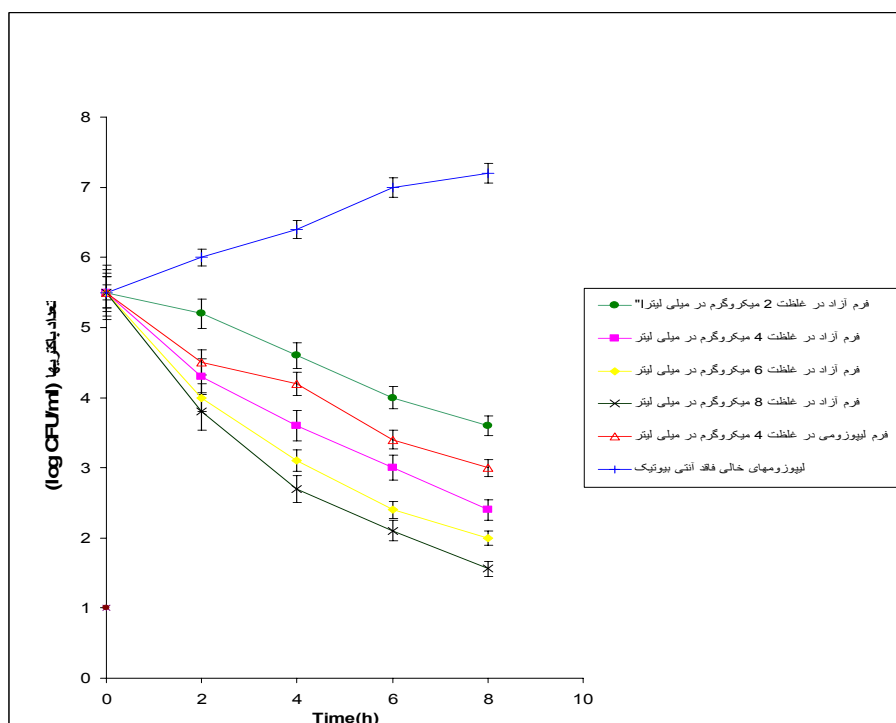
همچنین در بررسی اثر لیپوزوم های خالی روی رشد باکتری ها مشخص شد، که لیپوزوم های خالی هیچ فعالیت ضد میکروبی در

جدول ۱: اثر ضد میکروبی آمیکاسین در فرمهای آزاد و لیپوزومی روی پseudomonas آئروژینوزا در برون تن

حداقل غلظت مهار کنندگی دارو			
باکتری	آمیکاسین در فرم آزاد	آمیکاسین در فرم لیپوزومی	آمیکاسین آزاد + لیپوزومهای خالی
پseudomonas آئروژینوزا	۲ μg/ml	۴ μg/ml	۲ μg/ml

کاهش بیشتری در تعداد باکتری ها نسبت به نمونه آمیکاسین به فرم آزاد می شوند، به طوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت با غلظت MIC فرم لیپوزومی (۴ μg/ml) بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری ها در غلظت ۶ μg/ml آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می گردد.

نتایج حاصل از آزمایش سینتیک مرگ در نمودار شماره ۱ آورده شده است. در این نمودار تغییرات تعداد باکتری ها در زمان های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت مجاورت با غلظت MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی و غلظت های مختلف آمیکاسین آزاد و لیپوزوم فاقد آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده این نکته بود که لیپوزوم های حاوی آمیکاسین با افزایش زمان باعث



نمودار ۱: مقایسه اثر آمیکاسین در فرم آزاد در غلظت های مختلف و آمیکاسین در فرم لیپوزومی با غلظت برابر با MIC در تغییر تعداد باکتری ها در زمان های مختلف

بحث:

جنتامایسین به روش تهیه رقت در برات روی رشد *پسودوموناس آئروژینوزا* در زمان‌های مختلف بررسی شده است. ایشان مشخص کرده‌اند که میزان MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد کمتر بوده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، در این مطالعه نیز اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین تأیید شده است (۱۳). با انجام همین آزمایش با غلظت های مختلف آمیکاسین آزاد و بررسی تغییرات تعداد باکتری‌ها در زمان‌های مختلف و مقایسه نتایج آن با آزمایش قبل، اطلاعاتی حاصل می‌آید که می‌توان تا حدودی مقایسه کرد که میزان عملکرد لیپوزوم های حاوی آمیکاسین، اثری برابر با چه مقدار آنتی‌بیوتیک را دارد. به طوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت باغلظت MIC، $2 \mu\text{g/ml}$ فرم لیپوزومی بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری‌ها در غلظت $6 \mu\text{g/ml}$ آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می‌گردد. در مطالعه دیگری که توسط Omri و همکاران روی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مختلف انجام گرفته است، نشان داده شده که مقدار MIC لیپوزوم های حاوی آمیکاسین و آمیکاسین در فرم آزاد به ترتیب برابر ۱۶ و ۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد. تفاوت مطالعه اخیر با مطالعه ما نوع و میزان فسفولیپیدهای بکار رفته است. بنحوی که در بررسی ما میزان MIC بدست آمده برای فرم لیپوزومی ۱ برابر پایین تر از مطالعه ایشان است (۱۴). با توجه به تاثیر فرم آزاد و لیپوزومی آمیکاسین در غلظت MIC مشاهده می‌شود که اثر ضد میکروبی فرم لیپوزومی به کندی و دیرتر از فرم آزاد صورت می‌گیرد. همچنین در مقایسه نتایج حاصل از آزمایشات MIC حداقل غلظت مهار کنندگی فرم آزاد در مقایسه با فرم لیپوزومی افزایش می‌یابد. این امر اینگونه توجیه می‌شود که کلیه داروی محصور در لیپوزوم با باکتری وارد واکنش نمی‌شوند. در عین حال لیپوزوم های حاوی آمیکاسین توزیع متفاوتی نسبت به فرم آزاد در بدن داشته لذا از تجمع دارو در ارگان هایی نظیر گوش و کلیه جلوگیری نموده و عوارض جانبی کاهش می‌یابد (۱۲).

نتیجه گیری:

هرچند اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین بر *پسودوموناس* دیده شد، اما تکرار آزمایش با روش‌ها و مواد مختلف لازم می‌باشد. همچنین اثر خوب لیپوزوم های حاوی آمیکاسین

مشکل عمده در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، مقاومت بسیار زیاد آن در برابر مواد ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها است. معمولاً این مقاومت ناشی از مقاومت ذاتی و عدم نفوذپذیری مواد ضد میکروبی به درون باکتری است. پیدایش سویه‌های دارای مقاومت چندگانه، این مشکل را چند برابر کرده است و باعث ایجاد معضل بسیار زیادی شده است (۳). این حالت خصوصاً در برخی بیماری‌ها از قبیل فیروز سیستمیک و مواردی مانند سوختگی‌ها به خوبی مشاهده می‌شود (۱۱ و ۱). با توجه به رویکرد جدیدی که نسبت به استفاده از سیستم های حامل دارویی ایجاد شده، از این سیستم‌ها ممکن است در درمان عفونت‌ها استفاده شود. در این راستا *پسودوموناس آئروژینوزا* همواره یکی از باکتری‌های مورد بررسی است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین و مقایسه آن با اثر آمیکاسین به فرم آزاد پرداخته شده است. تا به حال مطالعات فراوانی روی لیپوزوم های حاوی آنتی‌بیوتیک های مختلف و اثرات ضد میکروبی آنها صورت گرفته است. از جمله آنها می‌توان به مطالعه Omri اشاره کرد. در این مطالعه اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین بر باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است که MIC دارو در فرم لیپوزومی آمیکاسین نسبت به فرم آزاد افزایش نشان داد. مقدار MIC نیز که به دست آورده است برابر ۸ میلی گرم در لیتر برای باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* بود (۱۲). همانطور که ملاحظه می‌شود در این مطالعه مانند مطالعه حاضر، مقدار MIC تعیین شده است، اما تفاوت آن در دو قسمت اصلی است. اولاً در این تحقیق مقادیر فسفولیپیدهای بکار برده شده با مقادیر فسفولیپیدهای ما متفاوت بوده است. همانطور که مشاهده می‌شود ما توانسته ایم با تغییراتی که در مقادیر و ترکیب فسفولیپیدها انجام داده ایم میزان MIC را نسبت به مطالعه ایشان به صورت محسوسی کاهش دهیم و این نوید وجود دارد که با مطالعات بیشتر روی نوع و مقادیر فسفولیپیدها بتوان میزان MIC را از فرم آزاد نیز کمتر نمود. ثانیاً روش تعیین MIC در مطالعه Omri، رقت در آگار بوده است، در صورتی که در روش حاضر، تهیه رقت در برات اصلاح شده بکار رفته است. اشکال روش تهیه رقت در آگار در خصوص کار با لیپوزوم‌ها در این نکته است که جامد بودن محیط کشت مانع از انتشار و ادغام موثر لیپوزوم‌ها با جداره باکتری‌ها می‌شود. مطالعه دیگر مربوط به Mugabe و همکاران است. در این مطالعه اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین، توبرامایسین و

فرمولاسیون های آنتی بیوتیک های مختلف به فرم لیپوزومی بر پseudomonas آئروژینوزا و سایر میکروارگانیزم ها، بررسی اثرات سمی آن در کشت سلولی و اثرات درمانی آن در مدل های حیوانی، توصیه می شود.

می تواند این نوید را بدهد که دریچه های جدید به سمت مبارزه با این میکروارگانیزم فرصت طلب برای ما باز شده است. البته برای رسیدن به هدف نهایی مراحل متعدد دیگری باقی مانده است که در تحقیقات بعدی باید مد نظر قرار گیرد. بررسی اثر

فهرست مراجع:

- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 93-99.
- Hauser AR, Sriram P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the conundrum of drug resistance. *Postgrad. Med* 2005; 117: 41-48.
- Hill DBR, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005. 43: 5085-90.
- Moghimi, SM, Hunter AC, Murrug JC. Long – circulating and target – specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol.Rev* 2001; 53: 283-318.
- Deamer W, Uster S, 1993. Liposome preparation: Methods and mechanisms in: “Liposomes”, edited by Marc, J. Ostro. Marcksl Dekker, Inc. pp: 510-27.
- Baron EJ and Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*. 11th ed. Mosby company, New York, 171- 86.
- Ravaoarino M, Toma E, Agbaba O, Morisset R. Efficient entrapment of amikacin and teicoplanin in liposomes. *J Drugs Targeting* 1993; 26: 239-250.
- Poyner EA, Alpar HO, and Brown MRW. Preparation and the effects of free and liposomal tobramycin on siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 43-52.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2003. Approved standard-6th ed. M7-A6. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
- Beauillac C, Sachetelli S, Lagace J. In vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposome-encapsulated antibiotic agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 35-41.
- Omri, A., and M. Ravaoarino. 1996. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 170-176.
- Omri, A, Ravaoarino. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 42: 170-6.
- Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharma* 2006; 307: 244-50.
- Omri, A, Ravaoarino, M. Preparation properties and the effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation on agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Agent* 1996; 7: 9-14.

صحت تشخیص آزمایشگاهی و آنتی بیوگرام باسیل های گرم منفی به صورت روتین در مقایسه با روش های استاندارد در کرمان

ثمانه عباسی ، شهلا منصوری*

گروه میکروبی شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

نویسنده رابط: شهلا منصوری ، گروه میکروبی شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

همراه: ۰۹۱۳۱۴۲۳۳۸۴ shmansouri_1000@yahoo.com

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

چکیده:

زمینه و اهداف: باسیل های گرم منفی معمول ترین باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی در دنیا می باشند. تشخیص صحیح و به موقع این باکتری ها در درمان مناسب و قطعی بیماری های عفونی نقش کلیدی دارد. مقاومت همزمان به چند آنتی بیوتیک (Multiple Drug Resistance=MDR) در این باکتری ها افزایش یافته و به فراوانی گزارش می شود. با توجه به اینکه در اکثر مراکز درمانی آزمایشات استاندارد آنتی بیوگرام انجام نمی شود و از تست های محدودی برای تشخیص ایزوله ها استفاده می گردد، هدف از این مطالعه تعیین صحت تشخیص آزمایشگاهی و آنتی بیوگرام باسیل های گرم منفی به صورت روتین در مقایسه با روش های استاندارد بود.

روش بررسی: مطالعه بر روی ۹۴۸ نمونه بالینی مربوط به بیماران بستری یا سرپایی در سه بیمارستان بزرگ شهر کرمان که فنوتیپ MDR را در روش دیسک گذاری نشان داده بودند، انجام شد. تشخیص باکتری ها با تست های معمول بیوشیمیایی انجام گرفت. از روش رقت در آگار برای تعیین مقاومت و تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (Minimal Inhibitory Concentration) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای استفاده شد.

یافته ها: فراوانی MDR با روش رقت در آگار ۷۶٪ موارد گزارش شده در روش دیسک گذاری بود. مقاومت در روش دیسک گذاری بیشتر از روش رقت در آگار گزارش شده بود و در مورد تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آموکسی سیلین، سفالوسپورین ها (سفتی زوکسیم، سفتازیدیم) و تری متوپریم-سولفامتوکسازول اختلاف معنی دار بود ($P=0.002$). در مراکز درمانی فراوانی سیتروباکتر و انتروباکتر کمتر و /شریشیا کلی و کلبسیلا با فراوانی بیشتر از مقدار واقعی گزارش شده بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان دهنده اعتبار نسبی آزمایشات آنتی بیوگرام در مراکز درمانی مورد بررسی است. لیکن در مواردی علاوه بر تشخیص نادرست نوع باکتری ، عدم گزارش درست آنتی بیوتیک می تواند در روند درمان اثرات نامطلوبی داشته باشد. لذا لازم است تا روش دیسک با متد استاندارد در آزمایشگاه های تشخیص طبی انجام گیرد.

کلید واژه ها: باسیل های گرم منفی ، گزارشات آزمایشگاهی، تشخیص ، مقاومت دارویی

مقدمه :

بیمارستان بزرگ شهر کرمان مورد بررسی قرار گرفته و با روش دقیق تر باکتری های شناسایی گردیده و آنتی بیوگرام مجدداً انجام گردیده است. هدف ما در این بررسی مقایسه گزارشات روزانه با روش های دقیق تر و استاندارد آزمایشگاهی در این منطقه می باشد.

روش بررسی:**الف) نمونه برداری:**

در این بررسی جمعاً ۹۴۸ ایزوله باسیل گرم منفی روده ای از تاریخ آبان ۸۵ لغایت تیر ۸۶، از نمونه های آزمایشگاهی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان یا بیماران سرپایی مراجعه کننده به مراکز درمانی، سه بیمارستان بزرگ شهر کرمان جمع آوری گردید. منابع نمونه های آزمایشگاهی شامل: خون، ادرار، مدفوع، زخم و ترشحات مختلف بدن (ترشحات واژن، منی، مایع مغزی نخاعی و ...) بود. در مورد همه نمونه ها در صورت امکان، نوع نمونه، بخش بستری بیمار یا افراد سرپایی مراجعه کننده، جنسیت بیمار، تاریخ جمع آوری نمونه و شناسایی اولیه باکتری توسط پرسنل آزمایشگاه ثبت گردید. در مرحله بعد هاله عدم رشد باکتری ها (Inhibition Zone) نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با خط کش مخصوص HiAntibiotic Zone Scale-C از شرکت (Himedia) اندازه گیری و با جدول استاندارد آنتی بیوتیک ها مقایسه شد. براساس قطر هاله عدم رشد، موارد حساس (Sensitive)، نیمه حساس (Intermediate) و یا مقاوم (Resistance) نسبت به آنتی بیوتیک ها یادداشت شد. در مراکز مختلف درمانی از آنتی بیوتیک های مختلفی استفاده شده بود که ما مقاومت به هر یک از آنتی بیوتیک های یک گروه را براساس فرضیه class disk concept، به عنوان مقاوم به کل آنتی بیوتیک های گروه، بجز سفالوسپورین های نسل دوم و سوم در نظر گرفتیم (۴).

ب) جداسازی باکتری ها:

به منظور تأیید تشخیص و جداسازی باکتری ها، در آزمایشگاه تمامی باکتری های گرم منفی آنتی بیوگرام شده در مراکز درمانی را با لوپ استریل بر روی محیط آئوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم. تست های افتراقی معمول تا حد شناسایی جنس و گونه بر روی کلنی تک و خالص باکتری انجام شد (۵). برای باکتری های آنتی بیوگرام شده ای که به سه یا چند آنتی بیوتیک از کلاس های مختلف آنتی بیوتیکی مقاوم گزارش شده بودند، حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) با

خطاهای آزمایشگاهی بدون شک جزء جدایی ناپذیر آزمایشگاه های تشخیص طبی هستند که متأسفانه در ایران گزارش دقیقی از وجود این خطاها در دسترس نیست. در ناحیه جنوب شرقی ایران و شهر کرمان نیز تحقیقی مبنی بر صحت گزارشات آزمایشگاهی وجود ندارد و اطلاعی در دست نیست که آزمایشگاه های فعال در سطح شهر و مراکز درمانی تا چه میزان نتایج درست و دقیقی ارائه می نمایند. خطاهای آزمایشگاهی به دو صورت کمی و کیفی طبقه بندی می شوند، بعضی از خطاها اجتناب ناپذیرند و اثری در بهبودی و یا وخیم کردن وضع بیمار ندارند، در حالیکه اشتباهات اساسی ممکن است به ضرر حال بیمار تمام شود.

شناسایی نوع باکتری و آزمایشات آنتی بیوگرام از آزمایشات مهم آزمایشگاه های تشخیص طبی می باشند که می توانند در درمان و کنترل بیماری های عفونی نقش عمده ای داشته باشند. با توجه به مقاومت روزافزون باکتری ها به داروهای ضد میکروبی درمان بدون در نظر گرفتن حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های رایج، می تواند سبب تاخیر در بهبودی و یا عدم درمان گردد (۱). از آنجا که گزارش صحیح آزمایشگاهی به عوامل متعددی چون نوع مواد مصرفی، نحوه نگاهداری و تجربه و مهارت کادر درمانی دارد بررسی مرتب مراکز آزمایشگاهی می تواند نقش مهمی در کاهش خطاهای آزمایشگاهی داشته باشد. در مطالعه ای که عباسی و همکاران در تهران بر اساس کنترل کیفی خارجی (External quality assessment scheme) در سال ۲۰۰۲ در تهران انجام دادند، سویه های استاندارد میکروبی جهت شناسایی و آنتی بیوگرام به آزمایشگاه های تهران فرستاده شده و نتایج تشخیص و آنتی بیوگرام مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است (۲). در بررسی مورد نظر برخی آزمایشگاه ها همکاری نکرده و در برخی موارد دیگر شناسایی و یا آنتی بیوگرام صحیح نبوده است. باید متذکر شد که در چنین مواردی، شرکت کنندگان به علت شرکت در نوعی امتحان از روش روتین و معمول استفاده نکرده و به طور حتم با دقت بیشتر و همکاری با سایر آزمایشگاه ها نتایج خود را گزارش می کنند. بررسی حاضر به صورت کاملاً "محرمانه و با روش های روزمره آزمایشگاهی و گزارش دهی معمول روزانه انجام گرفته و تعداد نمونه مورد بررسی نیز در مقایسه با مقالات مشابه بیشتر می باشد (۱،۳). در این مطالعه گزارشات مربوط به تشخیص و آنتی بیوگرام باکتری های گرم منفی به عنوان معمول ترین باکتری های جدا شده از نمونه های کلینیکی در سه

یافته ها:

در مراکز مورد بررسی شناسایی باکتری ها به جز *اشریشیا کلی* تا مرحله جنس بوده و غالباً گونه باکتری شناسایی نشده بود. در ۲۳ (۲/۴٪) مورد نمونه ها مخلوط بوده و از کشت خالص جهت تست آنتی بیوگرام استفاده نشده بود. فراوانی *اشریشیا کلی* و کلبسیلا در بررسی اولیه بیشتر و سیتروباکتر و انتروباکتر کمتر از مقدار واقعی گزارش شده بودند (جدول شماره ۱). در مورد سایر باکتری های معمول اختلافی در شناسایی نمونه بین آزمایشگاه های مورد بررسی و تشخیص دقیق تر دیده نشد. گزارش موارد مقاومت در روش دیسک گذاری در بیشتر موارد بیشتر از روش رقت در آگار بوده است (جدول شماره ۲). به طوریکه مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، سفالوسپورین ها، تری متوپریم-سولفامتوکسازول، آموکسی سیلین و تتراسایکلین به طور معنی داری بیشتر از روش رقت در آگار برای تعیین MIC بوده است در حالیکه در مورد جنتامایسین موارد مقاومت کمتر از روش MIC گزارش شده بود. در مورد نالیدیکسیک اسید اختلاف معنی داری بین مقاومت در دو روش مشاهده نشد.

روش استاندارد رقت در آگار (agar dilution) و با استفاده از آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، آموکسی سیلین، ایمپنم، سفتری زوکسیم، سفنازیدیم از شرکت MAST انگلستان، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین، سفالکسین از شرکت هایمدیا (هند) و آنتی بیوتیک تری متوپریم-سولفامتوکسازول از شرکت داروسازی داروپخش ایران انجام شد (۶،۴).

در مورد هر آنتی بیوتیک از دو یا سه غلظت، برای تعیین دسته حساس، نیمه حساس و غلظت مقاوم به ترتیب استفاده شد (۶). سویه های استاندارد *اشریشیا کلی* با شماره ATCC ۲۵۹۲۲ و *پسودوموناس آئروژینوزا* با شماره استاندارد ATCC ۲۷۸۵۳ جهت کنترل کیفی روش آنتی بیوگرام مورد بررسی قرار گرفتند. جهت عمل تلقیح باکتری به روی سطوح محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی آنتی بیوتیک از دستگاه Hand Inoculator ساخت شرکت MAST استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

جدول ۱: نتایج شناسایی اولیه باکتری های گرم منفی جدا شده از آزمایشگاه های بیمارستان های مورد بررسی در مقایسه با شناسایی ثانویه

باکتری	شناسایی اولیه تعداد (در صد)	شناسایی ثانویه تعداد (در صد)	P-value
<i>اشریشیا کلی</i>	۶۳۸ (۶۷/۳)	۵۶۹ (۶۰)	۰،۰۰۱
کلبسیلا	۱۳۶ (۱۴/۳)	۹۹ (۱۰/۴)	۰،۰۱۲
سیتروباکتر	۱۷ (۱/۸)	۹۵ (۱۰/۱)	۰،۰۰۰
انتروباکتر	۳ (۰/۳)	۳۳ (۳/۴)	۰،۰۰۰
پسودوموناس	۸۸ (۹/۳)	۱۰۵ (۱۱/۱)	۰،۲۲۴
استینوباکتر	۵ (۰/۵)	۸ (۰/۸)	۰،۵۸۰
پروتئوس	۳۱ (۳/۳)	۳۳ (۳/۵)	۰،۸۹۹
سراشیا	۴ (۰/۴)	۴ (۰/۴)	۱،۰۰۰
شیگلا	۲ (۰/۲)	۲ (۰/۲)	۱،۰۰۰
جمع	۹۴۸ (۱۰۰)	۹۴۸ (۱۰۰)	

جدول ۲: مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی در روش دیسک گذاری مراکز درمانی با روش رقت در آگار و تعیین MIC با روش رقت در آگار

P-value	فراوانی مقاومت با روش تعداد (درصد)		آنتی بیوتیک
	MIC m g L ⁻¹	دیسک دیفیوژن	
0.37	(۳۰/۴)۲۸۹	(۳۲/۴)۳۰۸	نالیدیکسیک اسید
0.001	(۲۴/۶)۲۳۴	(۳۷/۸)۳۵۹	سیپروفلوکساسین
0.001	(۵۳/۴)۵۰۷	(۶۴/۳)۶۱۰	سفالوسپورین ها
0.001	(۵۵/۲)۵۲۴	(۶۷/۲)۶۳۸	تری متو پریم - سولفامتوکسازول
0.001	(۴۴/۳)۴۲۰	(۷۲/۶)۶۸۹	آموکسی سیلین
0.002	(۲۹/۸)۲۸۳	(۲۳/۵)۲۲۳	جتنامایسین
0.002	(۴۲/۶)۴۰۴	(۴۹/۷)۴۷۲	تتراسایکلین
	۹۴۸	۹۴۸	تعداد کل باکتری

بحث:

که بسیار فراوان است. برای مثال در مورد استرپتوکوک های گروه B در اهواز میزان مقاومت به پنی سیلین 56٪ و نسبت به آمپی سیلین 5۰٪ گزارش شده است (۱۰)، در حالیکه هنوز ایزوله استرپتوکوک های گروه B مقاوم به پنی سیلین و آمپی سیلین در دنیا گزارش نشده است (۱۱،۱۲)

حاجیا و همکاران در تهران تعداد ۱۰۰ نمونه باسیل گرم منفی شامل *پسودوموناس آئروژینوزا*، *استینوباکتر بومانی* و *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه های کلینیکی بیماران بیمارستانی را با دو روش دیسک دیفیوژن و E-test مورد آزمایش قرار داده و گزارش نموده اند که تمامی ایزوله ها به ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و امیکاسین با روش دیسک مقاوم بوده ولی نتایج E-test موارد حساسیت بیشتری داشته است (۳). در این بررسی میزان مقاومت واقعی به ایمی پنم در باکتری های مورد بررسی ۳۶٪ گزارش شده که با بررسی های انجام شده در تهران که تمام و یا اکثر سویه های باسیل های گرم منفی را حساس به ایمی پنم گزارش نموده اند مغایرت دارد (۱۳،۱۴،۱۵). با توجه به عدم همخوانی گزارشات داده شده از تهران در مورد آنتی بیوتیک ایمی پنم جا دارد که مطالعاتی از این نوع با تعداد بیشتر نمونه انجام شود.

صحت گزارشات آزمایشگاهی اهمیت زیادی در درمان بیماران داشته و از جنبه های انسانی، اخلاقی و اقتصادی حائز اهمیت می باشد. تشخیص نادرست عفونت ایجاد شده توسط یک باکتری می تواند به بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان و افزایش خطر عفونت های بیمارستانی در یک عفونت ساده منجر گردد، از طرف دیگر درمان ساده و نادرست یک عفونت جدی و مقاوم در بیمار نیازمند به درمان، می تواند خطر جدی برای فرد مبتلا ایجاد نماید. در کشورهای پیشرفته به علت دست یابی به متدها و وسایل پیشرفته و گاهها "کاملا اتوماتیک و همچنین وجود کیت های تجارتي برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد نظیر روش های میکرودیلوژن میزان خطا بسیار کمتر و محدود است به طوریکه میزان خطا های آزمایشگاهی در حد ۱٪ و یا کمتر از آن است (۸،۷). اگر چه حتی در امریکا نیز خطای کارخانه سازنده کیت های تجارتي می تواند سبب بروز اشکالات عمده در گزارشات آزمایشگاهی گردد (۹). در کشور ما متأسفانه بررسی بر روی گزارشات آزمایشگاهی انجام نشده و با توجه به اینکه بسیاری از مقالات بر گرفته از دفاتر آزمایشگاهی است گاهی اطلاعات نادرست در مورد شناسایی و یا مقاومت باکتری ها گزارش می شود

نتیجه گیری:

شناسایی باکتری ها، غالباً در سطح جنس است و در مواردی با ارگانسیم واقعی مغایرت دارد. گزارش موارد مقاومت در روش دیسک گذاری در بیشتر موارد بیش از روش رقت در آگار است.

اشتباهات انسانی، عدم تمرکز کافی و بی دقتی پرسنل به علت کار زیاد و پر مشغله، زمان اندک برای پاسخگو بودن به ارباب رجوع، همچنین نامرغوب بودن مواد مورد استفاده و نگهداری نادرست از مواد مرغوب را می توان از علل تشخیص نادرست آزمایشگاهی ذکر نمود. همچنین عدم ایجاد شرایط استاندارد و نظارت و کنترل بر تولید و توزیع مواد آزمایشگاهی و فقدان سویه استاندارد در هنگام کار را می توان از عوامل دخیل در خطاهای آزمایشگاهی در ایران ذکر کرد.

از راهکارهای پیشنهادی برای جلوگیری از ایجاد خطاهای آزمایشگاهی می توان؛ به نظارت کیفی آزمایشگاه های مرجع بر گزارشات آزمایشگاهی، به تهیه و توزیع سویه های استاندارد شده با روش دیسک دیفیوژن، کنترل بر دیسک های آنتی بیوتیک ساخت ایران، جلوگیری از توزیع آنها در صورت اشکال داشتن، و همچنین تهیه و توزیع کیت های تشخیصی با قیمت مناسب و قابل دسترسی را نام برد.

تقدیر و تشکر:

از پرسنل آزمایشگاه های مورد بررسی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند قدردانی می نمایم. هزینه انجام این پژوهش توسط مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمان تامین گردیده است.

در بررسی حاضر /شریشیا کلی بیشتر و سیتروباکتر کمتر از حد واقعی گزارش شده بود. هر دو باکتری قادر به ایجاد جلای فلزی بر روی محیط EMB می باشند ولی غالباً /شریشیا کلی به این عنوان تشخیص داده می شود، از طرف دیگر موارد جدا سازی کلبسیلا به طور معنی داری بیشتر از اتروباکتر گزارش شده است. در تهران نیز در بررسی که بر روی باکتری های جدا شده از خون کودکان گزارش شده است در بیشتر موارد مشابه با بررسی حاضر تنها جنس باکتری گزارش شده و گونه شناسایی نشده است. همچنین فراوانی کلبسیلا بیش از دو برابر اتروباکتر گزارش شده، /شریشیا کلی ۱۳۰ مورد بوده در حالیکه هیچ موردی از سیتروباکتر گزارش نشده است (۱۶) که با نتایج این بررسی هماهنگی دارد. گذاشتن حداقل یک تست آزمایشگاهی نظیر اندول می تواند به راحتی /شریشیا کلی با اندول مثبت را از سیتروباکتر با اندول منفی متمایز نماید. در مورد کلبسیلا و اتروباکتر نیز گذاشتن یک تست حرکت می تواند سبب جدا سازی باکتری متحرک اتروباکتر از کلبسیلا گردد. هر چند که این دو آزمایش زیاد دقیق نیست لیکن تا حد زیادی در تشخیص اولیه و از جنبه پزشکی با اهمیت است. در بررسی ممیشی و همکاران نیز میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها به طور معنی داری در ایزوله های سیتروباکتر در مقایسه با /شریشیا کلی و کلبسیلا به خصوص کلبسیلا پنومونیه در مقایسه با اتروباکتر بیشتر بوده است (۱۶). کلبسیلا پنومونیه و سیتروباکتر جزو باکتری های مهم در ایجاد عفونت های بیمارستانی بوده و به خصوص کلبسیلا پنومونیه به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم است (۱۷،۱۵،۱۳،۱). لذا شناسایی درست این باکتری می تواند نقش مهمی در درمان عفونت های بیمارستانی مقاوم به آنتی بیوتیک ها داشته باشد.

فهرست مراجع:

1. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *AJIC* 2006; **34**(5S): 20-28.
2. Abbasi E, Rahbar M, Hekmat Yazdi S, Rashed Marandi F, Sabourian R, Saremi M. Evaluation of the 10th External Quality Assessment Scheme results in clinical microbiology laboratories in Tehran and districts. *East Mediterr Health J* 2006;**12**(3/4): 311.
3. Hajia M, Qorbanalizadehgan M, Rahbar M, Izadi M. Laboratory Evaluation of Iranian Commercially Provided Antibiotic Disks With Conventional E-Test Method for Susceptibility Testing in Three Most Isolated Multi-drug Resistant Organisms. *Int J Microbiol* 2008; **5**(1).
4. Tilton RC, Howard BJ. Antimicrobial susceptibility testing. In: Carson, D, Birchers S(ed), *Clinical and Pathogenic Microbiology*. CV., st. Louis, Washington, Toronto, Mosby Company. 1987. pp:121-26.

5. MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria Third ed. Philadelphia, Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, pp:225-28.
6. Amsterdam D. Interpretive guidelines for susceptibility or resistance. In: Lorian V, editor. Antibiotics In Laboratory Medicine. Fifth ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 113-25.
7. Yuan S, Astion ML, Schapiro J, Limaye AP. Clinical impact associated with corrected results in clinical microbiology testing. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(5): 2188-93.
8. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem*. 1997; **43**(8) :1348-51.
9. Carmeli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, DeGirolami P, et al. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(2): 595-7.
۱۰. شهبازیان ن، رجب زاده ع، علوی م. بررسی میزان کلونیزاسیون استرپتوکوک گروه B در واژن و رکتوم زنان حامله در هفته ۳۷-۳۵. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اهواز* ۱۳۸۶، شماره ۵۴، دوره ۶، ص ۲۹۴ تا ۲۹۸.
11. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R, et al. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008; **87**(3): 260-71.
12. Mansouri S, Ghasami E, Sahabi Najad N. Vaginal colonization of group B *Streptococci* during late pregnancy in southeast of Iran: incidence, serotype distribution and susceptibility to antibiotics. *J Med Sci* 2008; **8**(6):574-78.
13. Feizabadi MM, Etemadi G, Yadegarinia D, Rahmati M, Shabanpoor S, Bokaei S. Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. *Med Sci Monit* 2006; **12**(11): 362-5.
14. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. *Med Sci Monit* 2007; **13**(11): 247-50.
15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrobial agents*. 2008; **31**(2):147-51.
16. Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani MH, Hashemi FB. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at children's medical center, Tehran. Iran. 1996-2000. *Int J Antimicrobial agents* 2005; **26**: 373-79.
۱۷. عباسی ثمانه. فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده و تعیین مقاومت انتروباکتریاسه های جدا شده از نمونه های کلینیکی بیمارستانهای افضلی پور، باهنر و کاشانی در شهر کرمان سال ۸۶-۸۵. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته میکروبی شناسی. دانشکده افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، تیر ۱۳۸۷.

شیوع آنتی بادی علیه ویروس های هپاتیت و ایدز در دندانپزشکان شهر قزوین

مسعود شریفی^{*}، کتایون برهان مجابی^۲، محمد رضا سلمانی^۳، رضا فرهنگ^۴، عظیم مستاجری^۴، محمود علیپور حیدری^۵

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

۲) گروه تشخیص، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۳) دندانپزشک عمومی

۴) پایگاه انتقال خون قزوین

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

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

تلفن: ۰۲۸۱-۳۳۳۶۰۰۱ همراه ۰۹۱۲۳۸۱۹۰۵۴ همراه dr_m_sharifi2002@yahoo.com

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

چکیده:

زمینه و اهداف: ویروس های هپاتیت و ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) شایع ترین عفونت های قابل انتقال از خون در کارکنان مراقبت های بهداشتی درمانی هستند. هدف از انجام این پژوهش تعیین شیوع آنتی بادی علیه ویروس های هپاتیت و ایدز در دندانپزشکان شهر قزوین بود.

روش بررسی: جامعه مورد مطالعه کلیه دندانپزشکان شاغل در شهر قزوین بود که ضمن تکمیل پرسشنامه در ارائه نمونه خون همکاری نمودند. نمونه سرم در پایگاه انتقال خون قزوین به روش الیزا از نظر anti-HBs، HBsAg و تعیین تیتراژ آن، anti-HCV و anti-HIV آزمایش شد. anti-HIV و anti-HCV مثبت به ترتیب با روش های RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) و وسترن بلات (Western blot) تایید می شدند. اطلاعات با نرم افزار SPSS پردازش و تجزیه و تحلیل داده ها با آزمون مجذور کای انجام شد.

یافته ها: از ۷۷ نفر دندانپزشک شاغل ۷۴ نفر (۹۶٪) با تکمیل پرسشنامه و ارائه نمونه خون همکاری نمودند. این گروه شامل ۴۹ نفر (۶۳/۶٪) دندانپزشک عمومی و ۲۸ نفر (۳۶/۴٪) متخصص بود. نتایج آزمایش های anti-HBs، HBsAg، anti-HCV و anti-HIV منفی بود. ۴۰ نفر (۸۳/۳٪) دندانپزشک عمومی و ۲۴ نفر (۹۲/۳٪) متخصص دوز کامل واکسن هپاتیت B (HBV) را دریافت کرده بودند. دندانپزشکان عمومی بیش از ۱/۵ برابر متخصصین، مراجعه کننده مبتلا به هپاتیت داشتند. در مجموع ۶۴ نفر (۸۶/۵٪) دوره کامل واکسن را دریافت نموده اند. تیتراژ anti-HBs در ۸ نفر (۱۰/۸٪) که همگی دندانپزشک عمومی بودند کمتر از ۱۰ mIU/ml، در ۱۲ نفر (۱۶/۲٪) ۱۰-۱۰۰ mIU/ml، در ۲۳ نفر (۳۱/۱٪) ۱۰۰-۵۰۰ mIU/ml و در ۳۱ نفر (۴۱/۹٪) بیش از ۵۰۰ mIU/ml بود. آزمایش آنتی بادی در ۲ نفر دندانپزشک عمومی (۲/۷٪) بدون سابقه واکسیناسیون مثبت بود (۱۰-۱۰۰ mIU/ml). بین تیتراژ آنتی بادی با تعداد دوز واکسن (P=0.04) و افزایش سطح تحصیلات (عمومی و متخصص) (P=0.03) رابطه معنی دار یافت شد.

نتیجه گیری: نتایج anti-HIV، anti-HCV و HBs Ag منفی است. رعایت دوره کامل واکسن HBV و نیز تیتراژ anti-HBs رضایت بخش است. اما، وجود آنتی بادی بدون سابقه واکسیناسیون از خطر مستمر عفونت HBV در دندانپزشکان و در واقع خطر پاتوژن های قابل انتقال از خون حکایت می کند. تیتراژ anti-HBs با تعداد دوز واکسن و نیز افزایش سطح تحصیلات رابطه دارد. مراجعه بیشتر بیماران مبتلا به هپاتیت به دندانپزشکان عمومی، از مواجهه بیشتر این گروه با پاتوژن های قابل انتقال از خون حکایت می کند و تاکید است بر آموزش مداوم موازین کنترل عفونت و نظارت بر جامعه دندانپزشکی از طریق آزمایش پاتوژن های قابل انتقال از خون.

کلید واژه ها: anti-HIV، anti-HCV، anti-HBs، HBs Ag، دندانپزشک

مقدمه :

از نظر آنتی بادی (anti-HCV) مثبت هستند (۹). نظیر HBV ، با HCV هم حالت حامل مزمن روی می دهد. بسیاری از عفونت های HCV بدون علامت و یا خفیف هستند و فقط با وجود آنتی بادی مشخص می شوند. تشخیص آنتی بادی به روش الیزا و تالیید آن به روش (Recombinant Immunoblot Assay) RIBA است (۱۰).

بعد از آلودگی ۶ بیمار به ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) از طریق یک دندانپزشک آمریکایی ، به کارکنان مراقبت های بهداشتی درمانی HIV مثبت توجه زیادی مبذول شد (۱۱). انتقال HIV معمولاً از الگوی HBV تبعیت می کند با این تفاوت که میزان انتقال عفونت HIV بسیار کمتر است . تشخیص احتمالی عفونت HIV با تشخیص آنتی بادی به روش الیزا است. تشخیص قطعی با آزمایش وسترن بلات (Western blot) انجام می گیرد. برای HIV، واکسن وجود ندارد. پیشگیری از ایدز بر پایه موفقیت هایی است که در جهت آموزش تغییرات رفتاری انجام می شود. از جمله موازین پیشگیری، استریل کردن دستگاه ها و وسایل دندانپزشکی در بین بیماران به کمک حرارت است (۱۰). ایدز در سال ۱۹۹۸ چهارمین علت مرگ و میر در دنیا گزارش شد (۱۲).

در یک مطب دندانپزشکی با ۲۰ بیمار در روز ، در هر ۷ روز کاری یک بیمار حامل HBV دو بیمار با تبخال دهانی و تعداد نامشخصی مبتلا به ایدز می توانند جزو مراجعه کنندگان باشند (۱۳). با توجه به اهمیت جامعه دندانپزشکی به عنوان گروه پرخطر در ابتلا و انتقال عفونت های قابل انتقال از خون (HBV و HCV و HIV) مطالعه حاضر با هدف تعیین شیوع آنتی بادی علیه ویروس های هپاتیت و ایدز در دندانپزشکان شهر قزوین انجام پذیرفت.

روش بررسی:

جمعیت مورد مطالعه در این بررسی توصیفی- تحلیلی شامل کلیه دندانپزشکان شاغل در شهر قزوین بود (سرشماری). اطلاعات مربوط به دندانپزشکان از معاونت درمان دریافت و ضمن مراجعه به محل کار آنها اهداف پژوهش بیان شد. در صورت تمایل به مشارکت ، پرسش نامه توسط دندانپزشک تکمیل و نمونه خون از ورید فوقانی جمع آوری شد. پرسشنامه شامل دو قسمت اطلاعات دموگرافیک (سن، جنس، سطح تحصیلات و...) و اطلاعات مربوط به سابقه واکسیناسیون ، پذیرش بیماران مبتلا به هپاتیت و...بود.

ویروس های هپاتیت و نقص ایمنی انسان (HIV) شایع ترین عفونت های قابل انتقال از خون هستند که به کارکنان مراقبت های بهداشتی درمانی منتقل می شوند (۱). هر چند بعضی از اشکال هپاتیت های ویروسی بیش از ۵۰ سال است که شناخته شده اند، اما درمان دندانپزشکی همچنان تحت تاثیر بیماری هپاتیت قرار دارد (۲).

هپاتیت ویروسی B (HBV) مشکل جدی سلامت جهانی است و عامل عمده هپاتیت مزمن ، سیروز ، کارسینوم سلول کبد (۳) و دومین عامل مهم سرطان شناخته شده است (۴). برآورد می شود که حدود ۲ میلیارد نفر شواهد سرولوژیک دال بر HBV داشته باشند (۳). ۵٪ تا ۱۰٪ از بیماران به حاملین مزمن تبدیل می شوند که اکثر آن ها بیماری بدون علامت دارند. تعداد حاملین (HBsAg مثبت) در دنیا بیش از ۴۰۰ میلیون نفر (۵ درصد جمعیت دنیا) و در ایران به طور متوسط ۳ درصد گزارش شده است (۴) . تقریباً ۷۵٪ از حاملین مزمن در آسیا و غرب اقیانوس آرام زندگی می کنند. پیشگیری از عفونت اولیه به کمک واکسیناسیون راهکار مهم کاهش خطر عفونت مزمن و عوارض جدی آن (۳) و اولین واکسن در برابر سرطان محسوب می شود. بعد از تزریق ۳ دوز واکسن بیش از ۹۰ درصد افراد زیر ۵۰ سال تیترا آنتی بادی بالایی پیدا می کنند (۵). مطالعات در کشورهای مختلف نشان داده که شیوع HBV در میان دندانپزشکان در مقایسه با جمعیت عمومی به ویژه در بین متخصصین جراح زیاد است (۶) به نحوی که برای کارکنان دندانپزشکی خطر تبدیل شدن به حامل مزمن ۱۰ برابر میانگین افراد جامعه می باشد (۷). بررسی در بین دندانپزشکان از وجود حاملین HBsAg و نیز عدم واکسیناسیون حکایت می کند. بررسی ۲۱۵ دندانپزشک در برلین نشان داد که ۷ درصد شواهد سرولوژیک دال بر عفونت قبلی با HBV دارند و فقط ۷۴ درصد گزارش نموده اند که واکسیناسیون ضد HBV را انجام داده اند (۸) .

امروزه هپاتیت ویروسی نوع C به دلایل مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است. درصد کثیری از عفونت های HCV به بیماری مزمن تبدیل می شود، اکثر موارد آن برای مدت های مدید بدون علامت هستند که بسیاری از آن ها عامل خطر شناخته شده ای ندارند، در حال حاضر واکسن برای آن موجود نیست، موضوع بیماران آلوده به HCV چالش مراقبت و درمان محسوب می شود زیرا عاقبت به اختلال عملکرد شدید کبدی مبتلا می گردند. در حال حاضر عفونت HCV شایع ترین علت پیوند کبد است (۲). در ایران ۰/۳ درصد خون دهندگان داوطلب تهرانی

کلیه نمونه ها از نظر HBsAg منفی بودند. تیترا anti-HBs در ۸ نفر (۱۰/۸٪) که همگی دندانپزشک عمومی بودند کمتر از ۱۰ mIU/ml در ۱۲ نفر (۱۶/۲٪) ۱۰-۱۰۰ mIU/ml ، در ۲۳ نفر (۳۱/۱٪) ۱۰۰-۵۰۰ mIU/ml و در ۳۱ نفر (۴۱/۹٪) بیش از ۵۰۰ mIU/ml بود (جدول ۲).

تیترا آنتی بادی در متخصصین در مقایسه با دندانپزشکان عمومی به مراتب بالاتر بود. تیترا آنتی بادی در ۵۰٪ از متخصصین بیش از ۵۰۰ mIU/ml بود و در هیچکدام از آنها منفی نبود. بالاترین تیترا در گروه متخصصین اطفال و جراحی و کمترین آن در گروه اندودتست بود.

در ۲ نفر (۴/۲٪) دندانپزشک عمومی آزمایش آنتی بادی بدون سابقه واکسیناسیون مثبت بود (۱۰-۵۰۰ mIU/ml) . ۳۴ نفر (۷۰/۸٪) از دندانپزشکان عمومی و ۱۲ نفر (۴۶/۱٪) از متخصصین اظهار کردند که مراجعه کننده مبتلا به هیپاتیت داشته اند. بین تیترا آنتی بادی با تعداد دوز واکسن دریافتی (P=0.04) و افزایش سطح تحصیلات (عمومی و متخصص) (P=0.03) رابطه معنی دار یافت شد.

در آزمایش anti-HCV در مرحله اول ۵ نمونه مثبت بود که در آزمایش مجدد ۳ مورد منفی شد. در آزمایش تاییدی به روش RIBA همه نمونه ها منفی بودند. بنابراین، آزمایش anti-HCV برای تمام نمونه ها منفی بود. در آزمایش anti-HIV کلیه نمونه ها منفی بودند.

نمونه های سرم خون در پایگاه انتقال خون قزوین به روش الیزا، از نظر HBsAg ، anti-HBs و تعیین تیترا آن ، anti-HCV و anti-HIV آزمایش شدند. تیترا anti-HBs مساوی یا بیشتر از ۱۰ mIU/ml حاکی از مصونیت فرد در برابر HBV بود. آزمایش موارد مثبت anti-HCV تکرار می شد و در صورت مثبت ماندن نتایج آزمایش تاییدی RIBA انجام می شد. در صورت مثبت بودن anti-HIV از تست تاییدی وسترن بلات استفاده می شد. اطلاعات با نرم افزار SPSS پردازش و داده ها با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها :

از ۷۷ نفر دندانپزشک شاغل، ۷۴ نفر (۹۶٪) با تکمیل پرسشنامه و ارایه نمونه خون با انجام این پژوهش همکاری نمودند. این گروه شامل ۴۹ نفر (۶۳/۶٪) دندانپزشک عمومی و ۲۸ نفر (۳۶/۴٪) دندانپزشک متخصص بود. ۳۹ نفر (۸۱/۳٪) از دندانپزشکان عمومی و ۱۱ نفر از متخصصین (۴۲/۳٪) مرد، ۹ نفر (۱۸/۷٪) از دندانپزشکان عمومی و ۱۵ نفر (۵۷/۷٪) از متخصصین زن بودند (جدول ۱). ۸ نفر (۱۰/۸٪) از دندانپزشکان در گروه سنی زیر ۳۰ سال ، ۴۷ نفر (۶۳/۵٪) در گروه ۳۱ تا ۴۰ سال و ۱۹ نفر (۲۵/۷٪) در گروه سنی ۴۱ سال و بالاتر قرار داشتند. ۲ نفر (۴/۲٪) دندانپزشک عمومی واکسن دریافت نکرده بودند. ۶ نفر (۱۲/۵٪) دندانپزشک عمومی و ۲ نفر (۷/۷٪) متخصص دوز ناقص (۱ تا ۲ دوز) ، ۴۰ نفر (۸۳/۳٪) دندانپزشک عمومی و ۲۴ نفر (۹۲/۳٪) متخصص دوز کامل واکسن را دریافت کرده بودند (جدول ۲).

جدول ۱: توزیع فراوانی دندانپزشکان به تفکیک جنس و سطح تحصیلات

جمع تعداد (%)	متخصص تعداد (%)	عمومی تعداد (%)	سطح تحصیلات جنس
۵۰ (۶۷/۶٪)	۱۱ (۴۲/۳٪)	۳۹ (۸۱/۳٪)	مرد
۲۴ (۳۲/۴٪)	۱۵ (۵۷/۷٪)	۹ (۱۸/۷٪)	زن
۷۴ (۱۰۰٪)	۲۶ (۱۰۰٪)	۴۸ (۱۰۰٪)	جمع کل

جدول ۲: توزیع فراوانی تیتراژ anti-HBs دندانپزشکان به تفکیک سطح تحصیلات و تعداد دوز واکسن دریافتی

تعداد دوز anti- HBs تیتراژ	عمومی				متخصص				جمع			
	۰	۱-۲	۳	جمع (%)	۰	۱-۲	۳	جمع (%)	۰	۱-۲	۳	جمع (%)
-۱۰	۰	۴	۴	۸(۱۶/۷)	۰	۰	۰	۰(۰)	۰	۴	۴	۸(۱۰/۸)
۱۰-۱۰۰	۱	۱	۷	۹(۱۸/۷)	۰	۰	۳	۳(۱۱/۵)	۱	۱	۱۰	۱۲(۱۶/۲)
۱۰۰-۵۰۰	۱	۰	۱۲	۱۳(۲۷)	۰	۱	۹	۱۰(۳۸/۵)	۱	۱	۲۱	۲۳(۳۱/۱)
+۵۰۰	۰	۱	۱۷	۱۸(۳۷/۶)	۰	۱	۱۲	۱۳(۵۰)	۰	۲	۲۹	۳۱(۴۱/۹)
جمع	۲	۶	۴۰	۴۸	۰	۲	۲۴	۲۶	۲	۸	۶۴	۷۴
(%)	(۴.۲)	(۱۲.۵)	(۸۳.۳)	(۱۰۰)	(۰)	(۷.۷)	(۹۲.۳)	(۱۰۰)	(۲.۷)	(۱۰.۸)	(۸۶.۵)	(۱۰۰)

بحث

(۱۷) ، McCarthy و MacDonald در بررسی ۵۱۷۶ دندانپزشک کانادایی که ۷۰ درصد همکاری داشته اند آن را ۹۲،۳ درصد اعلام می کنند (۱۸). Barreto و Martins (۲۰۰۳) هم این میزان را برای ۲۹۹ دندانپزشک در جنوب غربی برزیل ۷۴،۹ درصد گزارش می نمایند (۶). غیر از مطالعه ای که در کانادا انجام شده میزان واکسیناسیون کامل بیشتر از بقیه مطالعاتی است که در بالا به آن ها اشاره شد. هر چند میزان واکسیناسیون کامل در مطالعه حاضر زیاد است اما ایده آل نیست. علت بالا بودن این میزان را می توان به جوان بودن جامعه دندانپزشکی مورد مطالعه، که بالطبع اطلاعات بیشتر و به روز در باره کنترل عفونت دارند، نسبت داد. زیرا قریب ۷۵٪ جامعه مورد مطالعه در گروه سنی کمتر از ۴۰ سال قرار دارند.

Westmorland و همکاران در مورد کارآمدی واکسن HBV بر روی ۱۳۲۰ نفر که در معرض خطر اکتساب شغلی HBV بودند مطالعه ای را در انگلستان انجام دادند (۱۹). در این مطالعه ۷۶،۴ درصد به عنوان پاسخ دهنده خوب (تیتراژ آنتی بادی بیش از ۱۰۰ mIU/ml) ، ۲۳،۶ درصد پاسخ دهنده ضعیف (کمتر از ۱۰۰ mIU/ml) و ۹،۵ درصد هم به عنوان افرادی که به واکسن پاسخ نداده اند (کمتر از ۱۰ mIU/ml) شناخته شدند. براین اساس، ۷۳ درصد دندانپزشکان در مطالعه حاضر پاسخ دهنده

نتایج نشان داد که آزمایش های HBsAg ، anti-HCV و anti-HIV برای تمام دندانپزشکان منفی است و اکثریت دوره کامل واکسن HBV را دریافت کرده اند. تیتراژ anti-HBs در تعدادی از دندانپزشکان عمومی کمتر از ۱۰ mIU/ml است. آزمایش anti-HBs در تعدادی از دندانپزشکان عمومی، بدون داشتن سابقه واکسن، مثبت (۱۰-۵۰۰ mIU/ml) است. تیتراژ anti-HBs با تعداد دوز واکسن و با افزایش سطح تحصیلات رابطه دارد. در مطالعه بر روی ۱۲۶ نفر پرسنل دندانپزشکی (دندانپزشکان عمومی و متخصص و دستیاران جراحی دندان) بیمارستان نظامی ریاض در عربستان انجام که در سال ۱۹۹۹ منتشر شد ۸۸،۲ درصد همکاری نمودند (۱۴). این میزان مشارکت، با توجه به موقعیت جغرافیایی نزدیک، با میزان مشارکت دندانپزشکان شهر قزوین قابل مقایسه است که حاکی از مشارکت بالا (۹۷/۵ درصد) در مطالعه حاضر می باشد.

۸۳،۳ درصد دندانپزشکان عمومی و ۹۲،۳ درصد متخصصین (در مجموع ۸۶،۵ درصد) دوره کامل واکسن HBV را دریافت کرده اند. Grace و Cohen (۱۹۹۲) گزارش نمودند که ۶۷،۷ درصد دندانپزشکان عمومی و ۷۴،۱ درصد متخصصین در ایالت مریلند واکسینه شده اند (۱۵). Razak و Lathifeh این میزان را برای ۷۲۷ دندانپزشک مالزیایی ۴۸،۸ درصد (۱۶)، Scully و Pentlin برای ۱۴۸ دندانپزشک در ۳ منطقه لندن ۷۴ درصد

جامعه پژوهش ، دندانپزشکان عمومی بیش از ۱/۵ برابر متخصصین بیمار مبتلا به هپاتیت دارند. لذا، این امر خطر را برای دندانپزشکان عمومی افزایش می دهد. بررسی شیوع anti-HCV در جراحان دهان و دندانپزشکان امریکا به ترتیب ۲ و ۰.۷ درصد است. این شیوع در دندانپزشکانی که شواهد سرولوژیک دال بر عفونت قبلی HBV دارند ، بیشتر است. ارتباط بین anti-HCV و عفونت قبلی HBV تعجب آور نیست ، زیرا هر دو ویروس از راه خون منتقل می شوند(۱۲). مثبت شدن آزمایش آنتی بادی (10-100 mIU/ml) در تعدادی از دندانپزشکان عمومی بدون داشتن سابقه واکسیناسیون گواه بر استمرار خطر آلودگی در این گروه از دندانپزشکان و احتمال انتقال سایر پاتوژن های قابل انتقال از خون همراه با HBV می باشد.

تیتراژ آنتی بادی با افزایش سطح تحصیلات هم رابطه معنی دار نشان داد که حاکی از اطلاعات بیشتر و بالطبع توجه خاص دندانپزشکان متخصص به امر واکسیناسیون می باشد. در این باره مطالعه مشابه یافت نشد تا مورد بحث قرار گیرد اما نتایج بررسی حاضر از مصونیت کلیه دندانپزشکان متخصص و مصونیت ۸۳/۳ درصد دندانپزشکان عمومی حکایت می نماید. در مجموع متخصصین نسبت به دندانپزشکان عمومی به مراتب تیتراژ بالاتری دارند. به نحویکه این میزان در نیمی از متخصصین بیش از 500 mIU/ml است و در هیچ کدام منفی نیست، اما در دندانپزشکان عمومی به ترتیب ۳۷،۶ و ۱۶،۷ درصد است.

عفونت HCV با برخی تظاهرات خارج کبدی از جمله بیماری های دهان نظیر lichen planus همراه است. بنابراین دندانپزشکان با تعداد فزاینده بیماران با تشخیص عفونت HCV مواجه می باشند (۲۴). در ۱۹۹۶ ، در گرد همایی ملی جامعه دندانپزشکان امریکا ۳۴۳ نفر جراح دهان و ۳۰۵ نفر دندانپزشک عمومی جهت بررسی خطر شغلی عفونت های قابل انتقال از خون از طریق پرسش نامه و جمع آوری نمونه خون بررسی شدند. anti-HCV در ۲ درصد جراحان دهان و ۰/۷ درصد دندانپزشکان عمومی مثبت بود . آنتی بادی در دندانپزشکان مسن تر شایع تر بود (P<0.01) (۲۵). آزمایش ۷۰ نفر دندانپزشک قاهره نشان داد که میزان مواجهه با عفونت HCV ۱/۴درصد است (۲۲). چون دندانپزشکان تعداد زیادی مراجعه کننده دارند و در مواجهه با خون هستند، لذا بیشترین خطر متوجه آن ها است.

آنتی بادی HCV در ۴ نفر (۹/۳٪) از ۴۳ نفر جراح دندان در مقایسه با ۴ نفر (۰/۹۷٪) از ۴۱۳ نفر دیگر از دندانپزشکان ، گزارش شده است. مطالعه نشان داد دندانپزشکان در معرض خطر

خوب، ۱۶،۲درصد پاسخ دهنده ضعیف و ۱۰،۸ درصد بدون پاسخ شناخته می شوند. میزان پاسخ دهندگان خوب ، اندکی کمتر از مطالعه Westmorland و همکاران است. بررسی بر روی دانشجویان و دندانپزشکان واکسینه شده شهرستان یزد بدون تعیین تیتراژ آنتی بادی نشان داد که ۹۳،۵ درصد از نظر anti-HBs مثبت بوده اند (۲۰). این میزان که در مطالعه حاضر ۸۹،۲ درصد است و کمتر از مطالعه یزد می باشد اما بیشتر از مطالعه ای است که بر روی ۴۷۴ نفر دندانپزشک در برزیل انجام شده و برابر ۷۹،۱ درصد است (۲۱).

وجود حاملین HBsAg در این گروه پر خطر از مناطق مختلف گزارش شده است. مطالعه دانشجویان دندانپزشکی و دندانپزشکان شهرستان یزد نشان داد که ۳،۳ درصد حامل HBsAg هستند (20) . تعداد حاملین در بین ۷۰ دندانپزشک شهر قاهره ۷،۱ درصد (۲۲) و در بین ۲۱۵ دندانپزشک در برلین ۷ درصد است (۸) . در حالیکه در بررسی حاضر هیچ یک از دندانپزشکان حامل HBsAg شناخته نشدند. این امر از موقعیت رضایت بخش جامعه مورد مطالعه در قبال HBV حکایت می کند.

تیتراژ آنتی بادی با تعداد دوز واکسن رابطه معنی دار نشان داد. Batista و همکاران (۲۰۰۶) گزارش می نمایند از میان ۱۲۲۲ دندانپزشک در برزیل ۴۷۴ نفر را به طور تصادفی انتخاب و آزمایش anti-HBs انجام داده اند. آزمایش در افراد واکسینه مثبت بود که در صورت استفاده از ۳ دوز واکسن به ۷۹،۱ درصد می رسد (۲۱). این میزان در مطالعه حاضر بالغ بر ۸۹،۲ درصد است. Cleveland و همکاران هم با بررسی ۵۰۷ دندانپزشک نشان دادند از جمله عواملی که به مقدار زیاد با پاسخ به واکسن همراه می باشد، تعداد دوز واکسن است. به بیان دیگر با افزایش تعداد دوز واکسن احتمال میزان پاسخ مناسب هم بیشتر است (۲۳). بنابراین تیتراژ آنتی بادی در ۱۰،۸درصد دندانپزشکان عمومی مطالعه حاضر به دلیل واکسیناسیون ناقص منفی (کمتر از 10 mIU/ml) است و لذا همچنان در معرض خطر HBV می باشند. هرچند این میزان در مقایسه با مطالعات مشابه نظیر آنچه از برزیل (۲۰۰۳) و برابر ۱۶ درصد گزارش شده (۶) بسیار کمتر است، اما باید توجه داشت که وجود همین تعداد اندک دندانپزشک غیر مصون هم برای سلامت جامعه دندانپزشکی و خطری که از این طریق جامعه را تهدید می کند، زیاد است . این دسته از دندانپزشکان در گروه سنی بالای ۴۱ سال قرار دارند. به بیان دیگر دندانپزشکان جوان تر که به نظر می رسد بیشتر با موازین کنترل عفونت آشنا هستند همگی با داشتن تیتراژ قابل قبول مصون می باشند. اما فراموش نکنیم طبق اظهارات

نتیجه گیری:

نتایج نشان دادند هیچ یک از دندانپزشکان anti-HIV ، anti-HBsAg و HCV مثبت نیستند. رعایت دروه کامل واکسیناسیون HBV و نیز تیترا anti-HBs رضایت بخش است. اما، وجود تیترا anti-HBs بدون سابقه واکسیناسیون از مواجهه دندانپزشکان با HBV و به بیانی با ویروس های قابل انتقال از خون حکایت می کند. مواجهه، استمرار خطر عفونت برای این گروه را نشان می دهد و بر لزوم آموزش مداوم در زمینه کنترل عفونت (به ویژه برای دندانپزشکان عمومی) و نظارت از طریق آزمایش (HBsAg و آنتی بادی پاتوژن های قابل انتقال از خون) برای کلیه دندانپزشکان تاکید می نماید.

تقدیر و تشکر:

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین در تامین هزینه این طرح و همکاری کلیه دندانپزشکان شهر قزوین صمیمانه سپاسگزاری می نماید.

فزاینده عفونت با HCV هستند (۲۶). خطر انتقال HCV از بیمار به کارکنان تقریباً ۷ برابر بیش از HIV است (۲۵). در شرایطی که واکسن مؤثر و یا پروفیلاکسی بعد از مواجهه وجود ندارد، انتقال شغلی HCV در دندانپزشکی همچنان بر رعایت احتیاط های همگانی از جمله احتیاط سدهای محافظتی و دستکاری بی خطر ابزار تیز و برنده تکیه می نماید (۷). در پژوهش حاضر از نظر HCV هیچ مورد مثبت یافت نشد. طغیان ۲۴ مورد عفونت HIV در کلمبیا نشان داد فراگرد های دندانپزشکی با انتقال HIV به طور معنی دار همراه بوده است. زیرا انتقال از بیماری به بیمار دیگر و از طریق وسایل دندانپزشکی رخ داده است (۲۷). بررسی پرسنل ۲۶ مرکز از ۳۸ مرکز دندانپزشکی از نظر HIV در سنگال نشان داد هر ۳ مورد مثبت HIV-1، جراح دندانپزشک بودند (۲۸). در هر حال، از ژوئن ۱۹۹۹، ۳۱۹ گزارش از اکتساب شغلی HIV در بین کارکنان مراقبت های بهداشتی درمانی در جهان گزارش شده است. از این تعداد ۱۰۲ مورد تایید شده است. از ۲۱۷ مورد احتمالی ۹ مورد مربوط به کارکنان دندانپزشکی بود. مسلم است که خطر انتقال ویروس در مطب دندانپزشکی بسیار واقعی است. (۲۷). در پژوهش حاضر از نظر HIV هیچ مورد مثبت یافت نشد.

فهرست مراجع:

1. Ashri NY, Al Sulimani RS. Prevalence of serological markers for viral hepatitis B and C in female dental patients. *Saudi Dent J* 2007; **10**: 171-5.
2. Anders PL, Fabiano JA, Thines TJ. Hepatitis : still a concern ? *Spec Care Dentist* 2000; **20**: 209-13.
3. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci* 2005; **2**: 50-57.
4. شریفی مسعود، آصف زاده مینا، لالوها فاطمه، علیپور حیدری محمود، اشتیاق بشری. شیوع حاملین آنتی ژن سطحی هپاتیت B در زنان باردار قزوین (۸۰-۱۳۷۹). *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین*. ۱۳۸۵، ۱۰، ۷۸-۷۲.
5. شریفی مسعود، طالبی طاهر مهشید، صادقی مریم. پاسخ آنتی بادی به واکسیناسیون هپاتیت B در بیماران تحت همودیالیز. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین*. ۱۳۸۲، ۲۵، ۵۲-۴۷.
6. Martins AM, Barreto SM. Hepatitis B vaccination among dentists surgeons. *Rev Saude Publica* 2003; **37**: 333-8.
7. Araujo MW, Andreana S. Risk and prevention of transmission of infectious diseases in dentistry. *Quintessence Int* 2000; **33**: 376-82.
8. Ammon A, Reichart PA, Pauli G, Petersen LR. Hepatitis B and C among Berlin dental personnel: incidence, risk factors, and effectiveness of barrier prevention measures. *Epidemiol Infect* 2000; **125**: 407-13.

۹. ابراهیمی دریانی، میر مومن شهرام . هپاتیت ویروسی. طب و تزکیه. ۱۳۸۰، ۸۰، ۳۱-۶۱.
۱۰. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology* . 6th edition-Mosby.2009; 645-659.
۱۱. Campos MA. The HIV-positive health care worker: Lessons for biosafety and ethics. *Rev Asso Med Bras* 1999; **45** (2):163-8.
۱۲. Cleveland JL, Gooch BF, Shearer BG, Lyster RL. Risk and prevention of hepatitis C virus infection: implication for dentistry. *J Am Dent Asso* 1999; **130**: 641-7.
۱۳. Wood PR. Cross infection control in Dentistry. Wolfe. London.1992;10.
۱۴. Paul T , Maktabi A , Almas K , Saeed S. Hepatitis B awareness and attitudes among dental health care workers in Riyadh; Saudi Arabia. *Odontostomatol Trop J* 1999; **22**: 9-12.
۱۵. Grace EG , Cohen LA . Attitudes of Dentists concerning hepatitis B and hepatitis B vaccination . *Compend Conntin Edu Dent* 1992; **12**: 197-200.
۱۶. Razak IA , Lathifeh RJ , Nasruddin J. Awareness and attitudes toward Hepatitis B among Malaysian dentists . *J Clinical Preventive Dentistry* 1991; **13**: 22-24
۱۷. Scully C, Pentlin L. Increasing acceptance of hepatitis B vaccine by dental personnel , but reluctance to accept hepatitis B carrier patients. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1990; **69**:345-7.
۱۸. McCarthy GM , Mac Donald K. The infection Control practices of general dental practitioners. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; **18**: 699-703.
۱۹. Westmorland D, Player V, Heap DC , et al. Immunization against hepatitis B. What we expect? Results of a survey of antibody response to immunization in persons at risk of occupational exposure to hepatitis B. *Epidemiol Infect* 1990; **104**: 499-509.
۲۰. مشرفیان شهرام. ارزیابی وضعیت HBsAg در دانشجویان دندانپزشکی و دندانپزشکان واکسینه شده در شهر یزد. پایان نامه دوره دکترای پزشکی . دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی یزد ۱۳۷۹
۲۱. Batista Sonia MF, Andreasi Marcia SA, Borges Ana MT, Lin denberg Andrea SC, et al. Seropositivity for hepatitis B virus , vaccination coverage , and vaccine response in dentists from Campo Grande , Mato Grosso do Sul , Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz , Rio de Janiro*2006 ; **101**: 263-7.
۲۲. Hindy AM, Abdolhaleem ES, Aly RH. Hepatitis B and C viruces among Egypt dentists. *Egypt Dent J* 1995; **41**:1217-26.
۲۳. Cleveland JL, Siew C, Lockwood SA, Gruninger SE, Chang SB, Neidle EA, et al. Factors associated with hepatitis B vaccine response among dentists. *J Dent Res* 1994; **173**:1029-35.
۲۴. Lodi G, Porter SR, Scully C. Hepatitis C virus infection: Review and implications for the dentist. *Orl Surg Orl Med Orl Pathol Radiol Endo* 1998; **81**:22-8.
۲۵. Bartlett JG. The Hopkins HIV report. <http://www.hopkins-aids.edu/publications/report/Jan00-3html>.
۲۶. Klein RS, Freeman K, Taylor PE, et al. Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York city dentists. *Lancet* 1991; **338**: 1539-42.
۲۷. McCarthy GM. Risk of transmission of viruses in the Dental office. *J Can Dent Assoc*2000; **66**:554-7.
۲۸. Faty Nadiaye C, Diallo B, Dia Tine S, Larroque G, Mboup S, Coll Seak Am. HIV infection: a new concern in dental public health. *Dakar Med* 1994;**39**:47-50.

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 antibodies to hepatitis and AIDS viuses among dentists in Qazvin

Sharifi M^{*1}, Borhan Modjabi K², Salmani M³, Farhang R³, Mostadjeri A⁴, Alipour Heidary M⁵

- 1) Department of Microbiology , School of Medicine , Qazvin University of Medical Sciences
- 2) Department of Oral Medicine & Diagnosis, School of Dentistry , Qazvin University of Medical Sciences
- 3) Dentist
- 4) Qazvin Transfusion Center
- 5) 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: Hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus (HIV) are the most common blood-borne infections transmitted to healthcare workers. This study was performed to determine the prevalence of antibodies to hepatitis and AIDS viruses among dentists in Qazvin.

Materials and Methods: All dentists in the city of Qazvin were asked to complete a questionnaire and donate a blood sample for analysis of hepatitis B surface antigen (HBsAg), anti-HBs titer, anti-HCV, and anti- HIV antibodies by ELISA. Positive samples for anti-HCV, and anti- HIV were assessed by RIBA and Western blot. Data analysis was carried out through SPSS software and Chi-square test.

Results: From 77 dentists who completed the questionnaire, 74 dentists (93.7%), including 49 general dentists (63.6%) and 24 specialists (36.4%) supplied blood samples. All blood samples were HBsAg, , anti-HCV and anti- HIV negative, and 40 general dentists (83.3%) and 24 specialists (92.3%) have used complete doses of vaccine. Among dentists, 34 general dentists (69.4%) and 12 specialists (24.9%) have visited patients suffering with hepatitis (1.5 times for general dentists) . Antibody titer in 8 general dentists (10.8 %) was less than 10 mIU/ml , in 12 dentists (16.2%) was 10-100 mIU/ml in 23 dentists (31.1%) 100-500 mIU/ml and in 31 dentist (41.9%) was more than 500 mIU/ml . This level in 2 general dentists (2.7%) without prior vaccination was positive (10-500 mIU/ml). Between antibody level and vaccine dose ($P= 0.04$), as well as the education status (general and specialist) ($P= 0.03$) there was a significant correlation.

Conclusion: The findings indicate HBsAg,, anti-HCV and anti- HIV are negative. Compliance of complete doses of vaccine and anti-HBs titers is satisfactory. But, antibody titer without prior vaccination indicates the continuous risk of HBV infection for dentists and in fact the risk of blood borne pathogens. There is a correlation between anti-HBs titer with vaccine doses and also with education status. Regarding with more hepatitic patients visited by general dentists, this group is more exposed to blood borne pathogens and emphasis the continuous education about control infection and surveillance of dentists by blood borne pathogens tests.

Keywords: HBsAg, anti-HBs, anti-HCV, anti- HIV, Dentist

Accuracy of identification and susceptibility tests of gram negative bacilli performed routinely by clinical laboratories compared to the standard procedures in Kerman.

Abbasi S¹, Mansouri S^{*1}

1)Department of Microbiology, Medical Sciences University of Kerman

Corresponding author: Mansouri S, Department of Microbiology, Medical Sciences University of Kerman
Mobile:0913-142-3384 E-mail: shmansouri_1000@yahoo.com

ABSTRACT

Background and aim: Gram –negative rods are the most common bacterial isolates in clinical laboratories around the world. Quick and accurate identification of these bacteria is a key to the effective therapeutic intervention and optimal clinical outcome of infections caused by these bacteria. Multiple drug resistance gram-negative bacteria (MDR) are on increase and are reported frequently. Since in many clinical laboratories the standard antibiogram tests are not performed and very few tests are used for identification. The aim of this study was to evaluate the accuracy of identification and the susceptibility tests of gram negative bacilli performed by clinical laboratories compared to the standard procedures in Kerman.

Materials and Methods : This study was performed on 948 clinical isolates reported to have the MDR phenotypes by disk diffusion method. The isolates were identified to species level by conventional biochemical tests. Sensitivity of the isolates to antibacterial agents and the Minimum Inhibitory concentration (MIC) of the isolates were determined using agar dilution method. For statistical analysis, χ^2 test was used.

Results: The rate of isolation of MDR bacteria by agar dilution methods was 76% of those reported by disk diffusion methods. For all antibiotics disk diffusion showed higher rate of resistance compared with agar dilution. The difference in case of tetracycline, gentamicin, ciprofloxacin, amoxicillin and cephalosporins (ceftizoxime, ceftazidime) and trimethoprim-sulfamethoxazole were significant ($P=0.002$). In the centers under study lower rate was reported for the isolation of *Enterobacter* spp and *Citrobacter* spp, while *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp were reported more than their actual presence.

Conclusion: These results showed that the laboratory reports were relatively accurate. However since higher rate of bacterial resistance were reported by the disk diffusion methods, in case of serious and life threatening infections suitable drug for treatment should be confirmed by more sensitive tests. In the absence of suitable and low cost detection kits for the identification of gram negative bacilli, inaccurate identifications is avoidable, therefore immediate action to design the accurate and low cost kits for the identification of these bacteria is recommended in the country.

Keywords: enteric bacilli, laboratory reports, identification, drug resistance.

Comparison of antimicrobial effect of free and liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*

Mirzaee M¹, Gharib A¹, Owlia P^{*2}

- 1) Department of Lab. Sciences, Faculty of Medicine, Azad University, Borujerd, Iran.
2) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Corresponding author. Owlia P. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, No. 29, Abdollahzadeh St., Keshavarz Blvd., Tehran- Iran.

P.O. Box: 14155-7435, Tel. 009821 88964792 Fax: 009821 88966310, owlia@shahed.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives : *Pseudomonas aeruginosa* is important opportunistic pathogen and to produce widespread infection by numerous virulence factors. Drug delivery system that reduces the drugs toxicity while increasing their therapeutic index is a great interest and liposomes can provide the benefits. Liposomes are colloidal vesicles ranging from a few nanometers to several micrometers in diameter. The present in vitro study was designated to evaluate the antimicrobial activity of free and liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Materials and methods: The minimal inhibitory concentrations (MICs) of free and liposomal amikacin for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were determined by broth macro-dilution technique as recommended by CLSI (Clinical and laboratory standards institute). We therefore, encapsulated this drug in to liposome prepared by sonication. Change of number of bacteria in equal minimal inhibitory concentration of liposomal amikacin was compared with the change of number of bacteria in the present of various concentrations of free amikacin.

Results: The results showed that of liposomal amikacin had antimicrobial effect and MIC of liposomal amikacin were equal of 4µg/ml however minimal inhibitory concentration of free amikacin was 2µg/ml. Comparison of change of number of bacteria had shown that the effect of liposomal amikacin (4 µg/ml) after 8 h is equal of 6 µg/ml free amikacin after 4h.

Conclusion: According to the results we can probably to use of liposomal amikacin for *Pseudomonas* infections, but we need more study and research.

Key word: *Pseudomonas aeruginosa*, Amikacin, Liposom

Studying the presence of *blaZ* gene and β -lactamase production in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*

Raei F¹, Eftekhar F*¹

1) Department of Microbiology , Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, GC

Corresponding author : Eftekhar F, Microbiology Department, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, GC . Email: f_eftekhar@cc.sbu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives: *Staphylococcus epidermidis* is the most important member of coagulase negative staphylococci. This organism has been reported as the third cause of nosocomial infections in the last decade and one of the most important causes of bacteremia. New generation β -lactam antibiotics are commonly used to cure these infections. Overproduction of β -lactamases not only results in bacterial resistance against β -lactams, but also causes false methicillin resistance in some strains lacking methicillin resistance gene. The aims of this study was to determine the susceptibility of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* to some β -lactam antibiotics, to screen the isolates for β -lactamase production and detect the presence of the β -lactamase gene (*blaZ*).

Materials and Methods: Sixty-nine clinical isolates of coagulase negative staphylococci were collected from three hospitals in Tehran. Susceptibility to 8 β -lactam antibiotics was determined using disc diffusion. β -lactamase production was screened by the iodometric colony test and presence of the *blaZ* gene was detected using specific primers and PCR.

Results: The antibiotic sensitivity results showed that 54 isolates (98.1%) were resistant to penicillin, 50 isolates (90.9%) to methicillin, 29 isolates (52.7%) to ceftriaxon, 27 isolates (49.09%) to ceftizoxime, 20 isolates (36.3%) to cefotaxim, 19 isolates (34.5%) to amoxicillin, 17 isolates (30.9%) to cefazolin and 13 isolates (23.6%) to cefalexin. The iodometric assay showed that all the isolates were β -lactamase producers and the PCR results confirmed the presence of *blaZ* gene in all isolates

Conclusion: Overall, 24-53 % of the clinical isolates of *S. epidermidis* were resistant to the third generation β -lactam antibiotics by disc diffusion. On the other hand, iodometric colony tests showed that all isolates produced β -lactamase and the presence of the *blaZ* gene was confirmed in all by PCR. The results obtained in this study suggest that despite the presence of the β -lactamase gene, enzyme expression is variable in different isolates and disc susceptibility test alone is not often suitable for determining the course of antibiotic therapy.

Key words: β -lactamase, *Staphylococcus epidermidis* , *blaZ* gene

The diversity of aminoglycoside resistance pattern among *Salmonella* spp. isolated from clinical cases in Tehran

Ranjbar R ^{*1}, Naghooni A ², Tabaraie B ³

- 1) Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences
- 2) Department of Microbiology, Faculty of Science , Islamic Azad University-Karaj Branch
- 3) Pasteur Institute of Iran

Corresponding author: Ranjbar R, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran Tel: +98(21)88039993 Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives: *Salmonella* is recognized as a major food-borne pathogen in humans worldwide. Antimicrobial drug resistance is increasing among *Salmonella* spp. and causes significant therapeutic problems in the treatment of diseases caused by this organism. The aim of this study was to determine the aminoglycoside resistance pattern of *Salmonella* spp. isolated from clinical cases in Tehran.

Material and Methods: *Salmonella* spp. strains were isolated from several hospitals in Tehran during 2007-2008. The strains were identified by standard biochemical methods and serology. The susceptibility of the isolates to aminoglycoside antibiotics was determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

Results: The results showed that 44.1% of the strains were resistant to streptomycin, 22.8% to kanamycin, 19.1% to neomycin, 0.7% to tobramycin and 0% to gentamycin.

Conclusion: We found a diverse pattern of aminoglycosides resistance among *Salmonella* spp., the resistance to streptomycin and kanamycin was considerable, whereas to tobramycin and gentamycin was very low. While aminoglycoside resistance varied by *Salmonella* serogroups, continuous monitoring of resistance patterns and the use of antibiotic agents according to individual serogroup is recommended.

Keywords: *Salmonella* spp., Aminoglycoside resistance, Antibiotic susceptibility testing

PCR detection of *Mycoplasma* spp. contamination in cell culture

Shahhosseiny MH*¹, Hosseiny Z^{1,2}, Tabarraii B², Akhlaghi F³, Shokrgozar MA⁴, Moslemi E⁵

- 1) Department of Microbiology, Islamic azad university, Shahryar unit/Quds branch
- 2) Department of Microbiology, Islamic azad university, Karaj unit.
- 3) Razi institute- Quality control Unit
- 4) Pasteur institute of IRAN-Cell Bank Unit.
- 5) Department of Biology , Islamic azad university, Eest unit

Corresponding author: Shahhosseiny MH, Islamic azad university, Shahryar unit/Quds branch, Department of Microbiology Tehran, Iran Email: shahhosseiny@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Infections with *Mycoplasma* species can induce a variety of problems in living organisms and in *in vitro* cell cultures. Therefore, it is necessary to establish a routine diagnostic protocol for *Mycoplasma* infection in order to ensure reliable research results, as well as the safety of commercial biological products. In order to circumvent those limitations, many nucleic acid technology-predicated procedures have been developed. PCR-based methods for detection of certain DNA regions of the *Mycoplasma* genome have proven both rapid and specific.

Material and Methods: Using SHAH-GPO-3, MGSO primers and standard *Mycoplasma* species PCR optimized and sensitivity and specificity evaluated by Known CFU samples and different strains. Cell culture DNA extracted and then tested by optimized PCR. Amplicon (272 bp) cloned by PCR-cloning and then sequenced by dideoxy chain termination.

Results: In this study, we describe our newly-developed sensitive PCR procedure for the detection of *Mycoplasma* genus contaminants. For amplification, the DNA regions of 16S rDNA were targeted using general *Mycoplasma* primers. The PCR, which generated DNA fragments of 272 bp, was found to be able to detect 10 copies of the target DNA, and evidenced no cross-reactivity with the genomic DNA of related microorganisms or of human cell lines, thereby confirming the sensitivity and specificity of the primers used. 25 from 47 cell lines infected with *Mycoplasmas*.

Conclusion: The improved 16S rRNA based PCR method for identification of *Mycoplasma* in cell culture and biological products, based on common and constant sequences is accurate and useful technique with high specificity and sensitivity. However, more researches should be developed in case of DNA extraction, samples concentration and target sequences and identification of PCR products.

Keywords: *Mycoplasma*, PCR, Contamination, Molecular diagnosis, Cell culture

Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* among health care workers

Abdossamadi Z¹, Pourmand MR*^{1,2}, Memariani M¹, Fardsanei F¹

1)Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2)Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

ABSTRACT

Background and objectives: *Staphylococcus intermedius* is a zoonotic bacteria which has been rarely found even among individuals with frequent exposures to animals. There were some reports on invasive infections in animals and humans. The objective of this study was identification of positive coagulase staphylococci other than *S. aureus* in health care workers.

Material and methods: This descriptive cross sectional study was carried on 150 health care workers in three medical centers of Tehran University of Medical Sciences (TUMS) from July 2008 to December 2008. The samples were collected from anterior nasal region of cases using cotton swabs and sent to laboratory for identifying organisms by microbial and biochemical tests. Moreover, PCR was carried out with *mecA* specific primers to detect methicillin resistance.

Results: Out of 150 health care staff, 38 (25.3%) strains of coagulase positive staphylococci were isolated. Of these isolates, one strain was *S. intermedius* and the others were *S. aureus*. The presence of *mecA* gene in *S. intermedius* was confirmed by PCR.

Conclusion: Transmission of *S. intermedius* from animals to human may result in expansion of uncommon infections and increasing of antibiotic resistance. Hence, identification of microbial colonization in health care staff has very important role for prevention of nosocomial infections.

Keywords: *Staphylococcus intermedius*, resistance to methicillin, hospital staff

Prevalence of AmpC type extended spectrum beta lactamases genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Niakan M ^{*1} , Chitsaz M ² , Metwaei AR ³

1) Department of Microbiology , School of Medicine , Shahed University

2) Department of Microbiology , School of Medicine , Shahed University

3) Department of Microbiology , School of Medicine , Shahed University

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

ABSTRACT

Background and objectives: β -lactam antimicrobial agents represent the most common treatment for bacterial infections and continue to be the leading cause of resistance to β -lactam antibiotics among Gram negative bacteria world wide. Extended β -spectrum β -lactamases(ESBLs) enzyme hydrolyze and inactivated β -lactam antibiotics. AmpC enzymes are in class C of ESBLs. Typical Ampc enzymes as clavulanate resistant cephalosporinases confer resistance to most oxyimino cephalosporins. AmpC enzymes are counted separately from ESBLs, but a taxonomic problem arises with AmpC mutants that have increased activity against cefepime and cefepirome, fourth generation of cephalosporins. Such mutants have arisen from inherent chromosomal AmpC types, but they could equally evolve from the plasmid AmpC types that are increasingly circulating in *Klebsiella* spp and *E. coli*. The aim of this study was to determine the Prevalence of AmpC type extended spectrum beta lactamases genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Material and Methods: Phenotypic detection of ESBLs was used for screening of isolates by agar dilution method. The multiplex PCR assay was used for detection of AmpC genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Results: Of 168 clinical isolates, 119 isolates were positive for ESBL in initial screening tests and from them 99 isolates were positive in phenotypic confirmatory tests. 10 isolates (5/95 %) were positive for AmpC genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Conclusion: In this study, the existence of ESBLs and AmpC genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* was shown.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, ESBLs, AmpC genes.

Table of Contents

Bacteriology

- Prevalence of AmpC type extended spectrum beta lactamases genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*** I
Niakan M , Chitsaz M , Metwaei AR
- Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* among health care workers** II
Abdossamadi Z , Pourmand MR , Memariani M, Fardsanei F
- PCR detection of *Mycoplasma* spp. contamination in cell culture** III
Shahhosseiny MH , Hosseiny Z , Tabarraii B, Akhlaghi F, Shokrgozar MA, Moslemi E
- The diversity of aminoglycoside resistance pattern among *Salmonella* spp. isolated from clinical cases in Tehran** IV
Ranjbar R , Naghooni A, Tabaraie B
- Studying the presence of bla_Z gene and β-lactamase production in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*** V
Raei F, Eftekhari F
- Comparison of antimicrobial effect of free and liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*** VI
Mirzaee M, Gharib A, Owlia P
- Accuracy of identification and susceptibility tests of gram negative bacilli performed routinely by clinical laboratories compared to the standard procedures in Kerman.** VII
Abbasi S, Mansouri S

Virology

- Prevalence of antibodies to hepatitis and AIDS viruses among dentists in Qazvin** VIII
Sharifi M , Borhan Modjabi K , Salmani M , Farhang R , Mostadjeri A , Alipour Heidary M

In the name of God

Iranian Journal of Medical Microbiology

The official publication of the Iranian society of microbiology

Vol.2, No.2
Summer 2008
Quarterly

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



ISSN: 1735 - 8612

Owned and published by:

Iranian Society of Microbiology

Chairman:

Mohammad Mehdi Feizabadi Ph.D

Editor in Chief:

Massoud Sharifi Ph.D

Deputy Editor in Chief:

Mohammad Reza Pourmand Ph.D

Executive Manager:

Reza Ranjbar Ph.D

Treasurer:

Gholamreza Irajian Ph.D

Editorial Assistants:

Mohammad Reza Pourmand 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- Pourmand, Mhammad Reza Ph.D
Pourshafie, Mhammad Reza Ph.D - Rahbar, Mohammad Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D- Sharifi, Massoud Ph.D
Soltan Dallal, Mohammad Mehdi Ph.D- Tabaraie, Bahman Ph.D
Taheri Kalani, Morovat Ph.D

Consultants of this Issue:

Abdollahi, Hamid Ph.D- Ebrahimi, Soltan Ahmad Ph.D
Fayaz, Fariba Ph.D- Ghaemi, Ezzt Allah Ph.D
Irajian, Gholam Reza Ph.D- Mirsalehian, Akbar Ph.D
Modarres Gilani, Shahab Ph.D- Nahae, Mohammad Reza Ph.D
Niakan, Mohammad Ph.D- Rahbar, Mohammad Ph.D
Salari, Mohammad Hossein Ph.D- Shacheraghi, Fereshteh Ph.D
Sharifi, Massoud Ph.D- Valizadeh, Babak Ph.D
Valizadeh, Saeed Ph.D- Vande Usefi, Jalil Ph.D

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

Designer:

Mina Arian

Address: P.O.Box: 13145-1646, Tehran, Iran

Telfax: +98(21)88954910

E-mail: jmicrobiology@gmail.com

Website: www.ism.ir

Cover design & Print: Firooz Group