مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹

تعیین میزان کلینیزاسیو ن لیستریا منو سیتوژنزدر موش نژاد B la b / c هاپلوئید H -i d و اثر آن بر بافت ریه مادر و جنین ۱
پرویندخت بیات ، عنایت الله کلانتر هرمزی

جداسازی استرپتوکوکوس اینیه و تشخیص آن توسط PCR ۸
مهرنوش نوراده کیکاوسی، مژگان بنده پور، جمیله نوروزی، بهرام کاظمی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریهای گرم منفی غیرتخمیری (سودوموناس ، آئروژینوزا اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا) جداشده از نمونه های کلینیکی درکرمان ۱۳
مژده رضوی، شهلا منصوری،فاطمه نوروزی

فعالیت ضدمیکروبی نیسین روی باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس در مدل غذایی و بررسی فوق ریز بینی آنها ۱۸
محمدرضا پژوهی، حسین تاجیک، امیر عباس فرشید

بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به جای سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۲۷
جعفر نویدمهر ، سعید زیبایی، مسعود صالح مقدم ، فضل الدین فهیمی مقدم

ارزیابی بقاء لیستریا مونوسیتوژنز طی فرآیند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید پروبیوتیک دار ایرانی ۳۱
رزاق محمودی،علی احسانی

وضعیت تولیدات علمی محققین ایرانی رشته انگل شناسی در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی ۳۸
علی اکبر خاصه ، مهدی فخار ، مسعود سوسرایی ، سمانه صادقی

مقایسه تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین ۴۸
ابوالفضل امینی، خسرو عیسی زاده، سمیه رحیمی النگ، حمید واعظ، سپیده بخشنده
نصرت، فاطمه چراغعلی، عزت الله قائمی

مقایسه نتایج تشخیص ازمایشگاهی عفونتهای باکتریال بیمارستانی با استفاده ازروشهای استاندارد ۵۵
سعید عابدیان ، محترم نصرالهی ، محمد خادملو، مریم سرابی جماب ، فرشیده عابدیان، عرازمحمد میرابی، محمود دودانگه

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۷-۱

تعیین میزان کلینیزاسیو ن لیستریا منو سیتوژنزدر موش نژاد B la b / c هاپلوئید H -i d و اثر آن بر بافت ریه مادر و جنین

پروین‌دخت بیات[۱] ، عنایت الله کلانتر هرمزی[۲]

۱)دکتری تخصصی علوم تشریحی-استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک
۲) دکتری تخصصی میکروبشناسی-استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک
نویسنده رابط: پروین‌دخت بیات ، اراک سردشت میدان بسیج مجتمع دانشگاه علوم پزشکی ،دانشکده پزشکی
همراه: ۰۹۱۸۳۶۱۳۶۲۶ Bayatanat@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۶/۲۶

چکیده:

زمینه و اهداف: لیستریومنوسایتوژنز باسیلی داخل سلولی و فاقد اسپور است و از طریق سبزیجات ولبنیات آلوده به انسان منتقل میشود مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است این باکتری عامل سقط جنین و نا هنجاریهای جنینی در انسان میشود در آزمایشات تجربی به بررسی ایمونولوژیک لیستر یوز در دوران بارداری پرداخته اند که نیازاست به مطالعه از دیدگاه باکتریو لوژی و هیستولولوژی لیستریوز در دوران بارداری پرداخته شود برای رسیدن به نتایج تجربی جهت اثبات نظرات اپیدمیولوژی، از موش از Ba l b/ c هاپلوئید H -i d که نسبت به لیستریومنو ژنز حساس است، استفاده شد تا اثرات این باکتری بر بافت ریه و نحوه آلودگی جنین مطالعه گردد.

روش بررسی: به موشهای باردار در دو گروه شاهد و تجربی که در شرایط یکسان آزمایشگاهی قرار داشتند بترتیب۲۰۰ µL سرم نرمال سالین و ۱۰/۲ LogFCU/lm از استرینb ٤ لیستریا منو سیتوژنز بصورت داخل صفاقی تزریق شد.در روزهای ۳۰-۰ بارداری از هر گروه بصورت تصادفی تعدادی انتخاب وسی سی خون گرفته و درروز یازده بارداری نخاعی شدند سپس رحم و پلاسنتا جهت تعیین کلی نیزاسیون برداشته شد تعدادی از مادران باردار در روز ٢٤ بارداری سزارین شدند و میزان آلودگی ریه مشخص گردید وهمینطور از جنینهای که به مرحله فول ترم رسیده بودند ریه در ساعت اول تولد برداشته و مقاطع بافتی تهیه شد

یافته ها: با استفاده از دوز غیر کشنده سوسپانسیون استرینهای لیستریامنوسیتوژنزb٤ نشانداده شد که تا روز سی پس از تزریق دربافتهای موش باکتری وجود دارد و اندازه وزنی /حجمی بافتهای بررسی شده نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری دارد و در مقاطع بافتی ریه ، دژنراسیون الوئولها وافزایش ضخامت جداره آنها انسدادو پرخونی دیده شد.

نتیجه گیری : با توجه به ثابت شدن اثر لیستریا منوسایتوژنز بر سقط جنین نقش فاکتورهای که در سقط جنین در ارتباط با عفونت لیستریومنوسایتوژنز میباشند از قبیل بافتهای جنینی و تداخل عمل پاسخهای ایمنی بین بافتهای مختلف جنینی در دوران بارداری مطالعه گردد.

کلید واژه ها: لیستریومنوسایتوژنز ،بافت ریوی ، فول ترم،موش آزمایشگاهی

مقدمه

لیستریامونوسایتوژنز باسیلی کوتاه ،گرم مثبت ،انگل اختیاری داخل سلولی وفاقد اسپور است ووسیله ای است برای درک تداخل عمل بین میکروب و میزبان که از طریق سبزیجات آلوده ،شیر ،پنیر و گوشت آلوده به انسان یا دام منتقل میشود(۱) مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که این باکتری یکی از عوامل باکتریمی ،سپتی سمی مننگوانسفالوسیت،اسپلنو مگالی و هپاتومگالی بویژه در دوران بارداری است که منجر به سقط یا مرگ جنین یا تولد زودرس جنین وتخریب بافتی در ارگانها ومرگ نوزاد پس از تولد میشود(۲)بدلیل اینکه امکان تحقیق تجربی برای ارزیابی فاکتورهای موثر در ایجاد ناهنجاری های جنینی پس از آلودگی توسط لیستریامونوسیتوژنز در انسان بدلیل ملاحظات اخلاقی وجود ندارد لذا ضرورت یافته تا اثرات ناشی از آلودگی در طول بارداری بر روی جنین در یک مدل حیوانی که از جهت بارداری مشابه انسان میباشد، مورد تحقیق قرار گیرد. در آزمایشات تجربی اخیر بیشتر به بررسی جنبه های ایمنولوژیک لیستریوز دردوران بارداری پرداخته و به نتایجی نیز دست یافته اند که لازم است با دیدگاه باکتریولوژی و هیستولوژی لیستریوز دردوران بارداری مورد مقایسه و تحلیل قرار گیرند تا از نتایج به تحلیلهای جدید دست یافت نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که عفونت لیستریوز در افرادی که سیستم ایمنی ضعیف دارند و در زنان بارداری که سیستم ایمنی سلولی و هومرال آنها به جهت حفظ جنین تضعیف شده است ،دیده میشود (۳) همینطور در آزمایشاتی که بر روی موش در دوران بارداری انجام گرفته ، نشان داده شده است که مادران باردار و جنین آنها نسبت به باکتری حساسیت بیشتری داشته و باکتری در آنها بیماری های حادتری ایجاد میکند (٤) وهمینطور نشانداده شده است که عفونت میتواند از طریق مجاری هوایی منتقل شده ،بافت ریه را درگیر کند. در نوزادان تازه بدنیا آمده (٥) هم تعدادزیادی باکتری لیستریا در ریه دیده می شود که بیشتر مربوط به انتقال باکتری از طریق مایع آمنیوتیک است (٤-٥) اما بیشترین میزان انتقال باکتری با تزریق خونی یا داخل صفاقی صورت میگیرد. مشکل جدی در مراحل اولیه نوزادی و زمانیکه باکتری از طریق نای وارد میشود، ایجاد میگردد(٦) برای دستیابی به اهداف زیر از موش B a l b/ c هاپلوئید H -i d که نسبت به لیستریامنوسیتوزنز حساس میباشد استفاده شد:در این مطالعه تجربی به بررسی میزان کلی نیزاسیون باکتری در بافتهای خونی و ریوی در مادر و جفت و اثرات لیستریامونوسیتوژنز دربافتهای ریه مادر و جنین پرداخته شده و اثرات احتمالی سموم باکتری برروی جنین مطالعه شده است.

روش بررسی:

به موشهای باردار که با دیدن پلاک واژینال روز صفر بارداری تعیین میشد، در دو گروه شاهد وتجربی و در دسته های ۳۵تایی که در شرایط نوری ،دمایی و آب و غذایی یکسان نگهداری میشدند،تقسیم شد. از ۳۵ سرموش بعنوان موشهای شاهد در روز ۱۰ بارداری به میزان µL ۲۰۰ سرم نرمال سالین وبه ۳۵ سر هم بعنوان موشهای تجربی µL ۲۰۰ از دوز غیر کشنده باکتری LogFCU/lm ۱/۲ لیستریامونو سیتوژنز از استرین ٤b به بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. بمدت سی روز هر روز از تعدادی از موشها مورد خون گرفته میشد و وجود باکتری مورد بررسی قرار میگرفت .ازموشهای مورد حامله در۷۲ ساعت پس از تزریق ml ٥ خون گرفته شد سپس آنها را نخاعی کرده ودر شرایط کاملا استریل رحم جداشده و در زیر استریومیکروسکوپ شاخهای رحم تشریح شده وجنین و پلاسنتا، وریه مادرا ن جهت تعیین میزان کلینیزاسیون جمع اوری شدوتعداد۳۵ سر از مادران باردار درروز ٢٤ حاملگی سزارین شده و جنین خارج گردیده وریه در محیط کاملا استریل جداشده و جهت تهیه مقاطع هیستولوژی در فرمالین ۱۰٪ قرارداده شد وهمینطورنوزادان ۳۵ سرمادر که به مرحله فول ترم رسیده بودند وبطور طبیعی زایمان انجام میگرفت در ساعت اول تولد ریه بطور کامل خارج شده و در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفته و همینطور از ریه مادران هم نمونه بصورت برداشتن یک بلوک ۱×۱ سانتیمتری از ریه راست انجام گرفت و در فرمالین قرارداده شد.با روش روتین آزمایشگاه بافت پاساژداده شد و مقاطع mu ٥ برش داده شد و با روش H& E یا Gram- wigert رنگ آمیزی شد

یافته ها:

نتـایج بدسـت آمـده از تزریـق داخـل صـفاقی ۲۰۰ µL ۵/4LogFCU/lmاز غلظت سوسپانسیون میکروبی لیستریا منو سیتوژنز استرین 4bکه در مطالعه قبلی این گروه مشخص شد کـه غیرکشنده است، به موشهای ماده بار دار در طول یک مـاه از زمـان تزریق نشان داد که کلنیزاسـیون لیـستریا منـو سـیتوژنز در ،خـون ،پلاسنتا و ریه موشهای مادرباردار دیده شد. وکلونی کانـت آن در اعضا فوق در ۷۲ ساعت پس از تزریق داخـل صـفاقی در مـادر – نمودار شماره ۱- وهمینطور در ریه جنین ۲٤ روزه سزارین شـده و فول ترم که در روز دهم حاملگی مادر در معـرض بـاکتری قـرار گرفتـه انـد ، نـشان داده شـده اسـت(جـدول شـماره۱)و مـشخص میکندکه در مادر بیشترین میزان کلـونی کانـت در خـون وکمتـرین میزان در ریه است.

جدول شماره ۱ درصد وزنی /حجمی ریه موشهای ماده باردار b/ c Ba l و جنین ۲٤ روزه سزارین شده و جنـین فـول تـرم الـوده از طریـق تزریـق داخـل صـفاقی سوسپانـسیون میکروبـی حـاوی ۵/٤ LogFCU/lm لیـــستریامونوسیتوژنز b ٤ در روز دهـــم بارداری نسبت به ارگانهای طبیعی (غیر آلوده) را نشان می دهد که افزایش دیده شده واختلاف آماری معنا دار اسـت p<0/001 کـه بیشترین مربوط به ریه مادر و کمترین در ریه جنین فول تـرم دیـده میشود.

و در بررسی دقیق نمونه های میکروسکوپی ریه مـادران آلـوده ودر مقایسه آنها باریه طبیعی مادران حامله این نتایج حاصل شد.

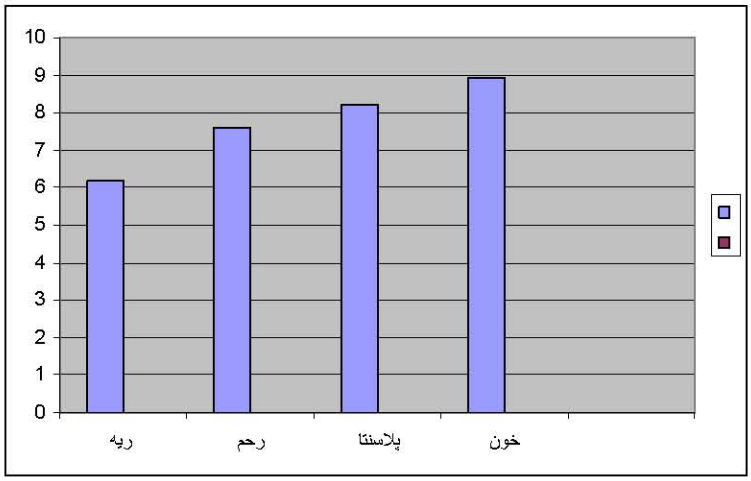
۱- اول باکتری در مجـاورت اپیتلیـوم برونـشها و سـپس در ناحیـه الوئولار دیده شد

۲-بـاکتری در بیـشتر مـوارد در اطـراف برونـشیول دیـده شـدو و ماکروفاژها محتوی باکتری بودند

۳- تعدادباکتری در مویرگهای بافت الوئولار کـم ودر فـضای بـین بافتی ویا در مجاورت سلولهای اپیتلیال الوئولی بسیار زیاد بود.

٤- در سلولهای اپیتلیـال بـاکتری دیـده نـشد امـا در لایـه اپیتلیـال برونکوس باکتری دیده شد

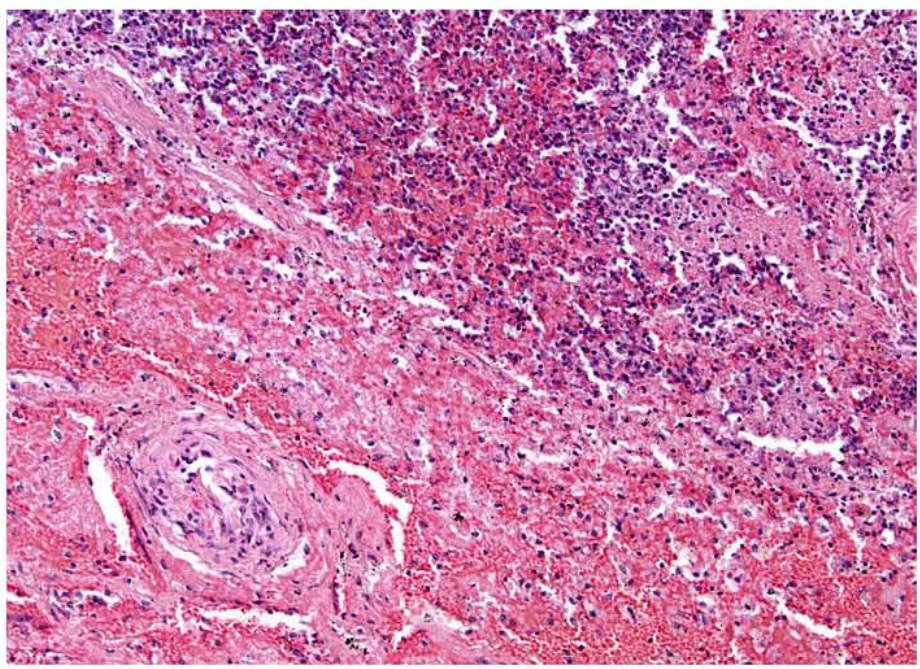
۵- تخریب ساختمان الوئولی و افزایش ضخامت جداره الوئولها در بافت ریه دیده شد.تصاویر۱و۲



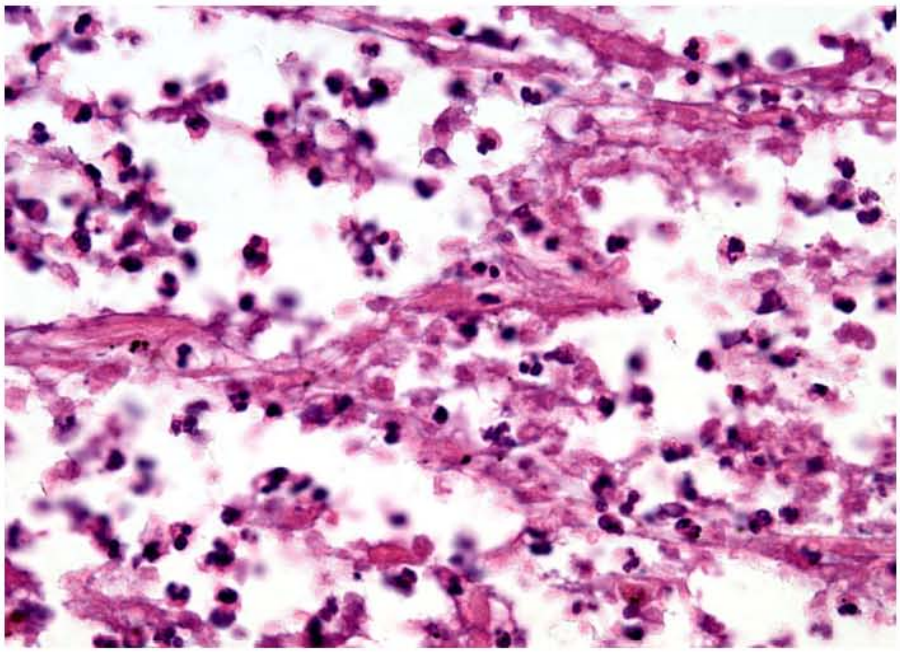
نمودارشماره۱: میزان کلنیزاسیون لیستریا منوسیتوژنز در ریه،رحم،پلاسـنتاوخون موشـهای مادربـاردار Ba l b / c در۷۲ سـاعت پـس از تزریـق داخـل صـفاقی سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵/۴ LogFCU/lm لیستریامونوسیتوژنز b ۴

جدول شماره ۱: درصد وزنی /حجمی و میزان کلنیزاسیون لیستریا منوسیتوژنز LogFCU/lm درریه جنین ۲۴ روزه سزارین شده و جنین فول ترم الوده و موش ماده باردار Ba l b/ c از طریق تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵/۴ LogFCU/lm لیستریامونوسیتوژنز b ۴

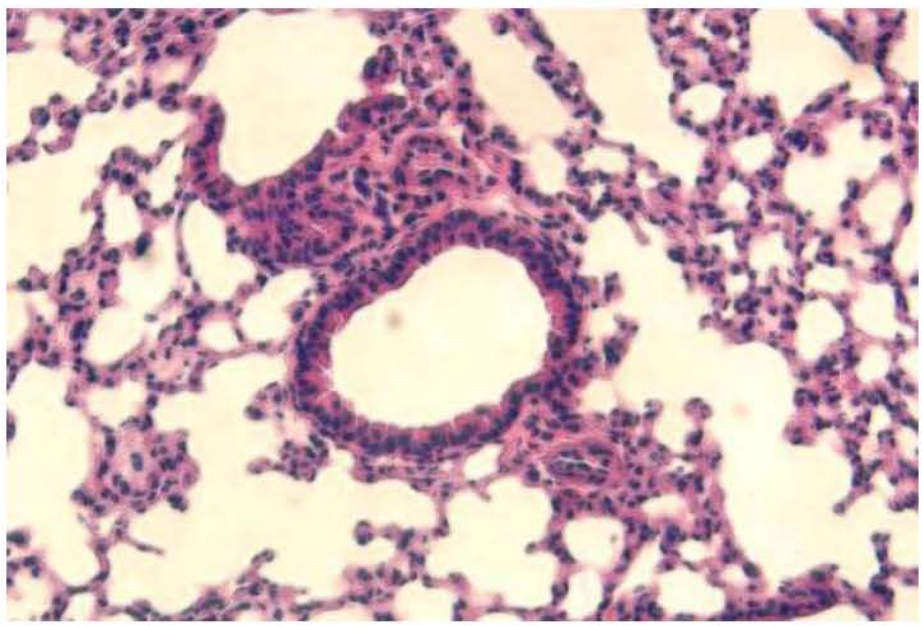
ریه	موش مادر آلوده	جنین سزارین شده در ۲۴ روزه گی آلوده	جنین فول ترم آلوده
درصدافزایش وزنی/ حجمی در ارگان (%v)Δgr/Δ	۴۶/۹۵±۴/۱۸	۳۸/۲۱±۲/۵۶	۳۵/۱۱±۲/۳۲
میزان کلنیزاسیون لیستریا منوسیتوژنز LogFCU/lm	۶/۱۷±۰/۲۲	۶/۳۲±۰/۷۴	۵/۱۴±۰/۲۲



شکل شماره ۱:مقطع میکروسکپی بافت آلوده ریه موش Ba l b/ c بارور یکهفته بعد از تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵/۴ LogFCU/lm لیستریومنوسیتوژنز ۴ (رنگ امیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین و مشاهده با بزرگنمائی ۴۰)مدرکی دال بر افزایش ضخامت جداره آلوئولها،انسدادو پر خونی منتشر را نشان می دهد



شکل شماره ۲:مقطع میکروسکپی بافت آلوده ریه موش Ba l b/ c بارور یکهفته بعد از تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵/۴ LogFCU/lm لیستریومونوسیتوژنز ۴ (رنگ امیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین و مشاهده با بزرگنمائی ۱۰۰)مدرکی دال بر تخریب آلوئولها ،انسدادو پر خونی منتشر را نشان می دهد



شکل شماره 3مقطع میکروسکپی بافت آلوده ریه موش Ba l b/ c بارور یکهفته بعد از تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵/۴ LogFCU/lm لیستریومونوسیتوژنز ۴ (رنگ امیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین و مشاهده با بزرگنمائی ۱۰۰)مدرکی دال بر تخریب آلوئولها ،افزایش ضخامت جداره آلوئولها را نشان می دهد

بحث:

در این تحقیق اثرات آلودگی با استرین4b لیستریامونوسیتوژنز در کلی نیزاسیون باکتری در پلاسنتا و خون و ریه موش آلوده بارور ، و کلی نیزاسیون باکتری در ریه جنین ٢٤ روزه سزارین شده و فول ترم آلوده بررسی شدند. بررسی میزان کلی نیزاسیون باکتری در ارگان های مختلف در موش مادر ٧٢ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی نشان داده است که میزان استقرار باکتری در ارگان های مختلف بترتیب از کم به زیاد ریه ،پلاسنتا و خون میباشد . میزان کلی نیزاسیون باکتری در پلاسنتا بالاست. با توجه به نتایج بدست آمده توسط Slutsker و همکاران در موش در مورد میزان کلینیزاسیون باکتری در پلاسنتا موش نتایج ما را مورد تایید قرار میدهد(7) و تفاوت موجود در بافتهای مختلف میتواند احتمالا مربوط به تکثیر بیشتر باکتری در خون بعلت وجود شرایط رشدی مناسب برای باکتری باشد ضمن اینکه سلولهای دفاعی در خون بعلت توقف کوتاه مدت،فرصت مقابله با میکرب تزریقی را ندارند در حالیکه در ارگان های دیگر بعلت مدت زمان طولانی تر مهاجرت باکتری ازموضع تزریق به آن ارگان ها ،سلولهای دفاعی بطور موضعی فرصت کافی برای مقابله با باکتری و حذف آنرا دارند در نتیجه میزان کلینیزاسیون آنرا پایین میاورند. پلاسنتا نیز بعلت آنکه هم محل تکثیر باکتریهایی است که از رحم میایند و هم باکتریهای تکثیریافته در جنین به آن وارد میشوند در نتیجه میزان کلینیزاسیون باکتری در پلاسنتا بالا میباشد.

یافته های این تحقیق در مورد کلی نیزاسیون باکتری در ریه جنینهای ٢٤روزه و فول ترم آلوده نشان داد که میزان کلی نیزاسیون باکتری در جنین های ٢٤روزه بیشتر از جنینهای فول ترم است این یافته با نتایج Abram و همکاران که درروی موش انجام گرفته ، تایید میشود(8) این تفاوت در میزان کلینیزاسیون باکتری مرتبط با اختلاف در مراحل ارگانوژنز و سیستم دفاعی در طی مراحل رشد جنین می باشد. در ریه کلونی باکتری دیده شد که هنوز مشخص نیست که لیستریومنوسیتوژنز چگونه از سد اپیتلیال عبور میکند ٥ از این طریق باکتری از طریق جریان خون منتشر شده و بلافاصله در مویرگهای ریوی دیده می شود که شدت عفونت براساس مقاومت باکتری در داخل ریه و انتشار آن به ارگانهای دیگر است واین دلیلی است که چرا پنومونی نوزادی بوسیله مایع آمنیوتیک آلوده به لیستریا ایجاد می شود(9). علت تجمع باکتری در مجاورت اپیتلیوم برونشیول و همینطور در فضای آلوئولی که در مقاطع دیده میشد ترشحات مخاطی مجاری تنفسی است که یافته های ما با نتایج Kato منطبق است (10) این تجمع باکتری در فضای آلوئولار بوسیله ماکروفاژها الوئولی محاصره میشوند سلولهای هدف در ریه ماکروفازها هستند و سلولهای اپیتلیال بندرت حاوی باکتری میباشند که یافته ما بوسیله Munder ,وهمکارانش مورد تایید قرار میگیرد بررسی مقاطع میکروسکوپی نشاندهنده ضایعات بافتی در ریه است که شامل تخریب ساختمان الوئول وافزایش ضخامت جداره الوئولهادر بافت ریه است(11). وجود باکتری در این بافتها نشاندهنده تهاجم این باکتری به سلولهای این ارگان است ومنشا تغییرات بافتی در سلولهای تشکیل دهنده این ارگان است(اشکال 1,2,3)یافته های این تحقیق نتایج مطالعاتی را که توسط Heymer و همکاران انجام گردید ه مورد تایید قرار میدهد.(12)

تشکر و قدردانی:

با تشکر و قدر دانی از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک که این تحقیق بشماره ٩٧ بوسیله آن بتصویب رسیده است .همینطور از جناب آقای پایانی کارشناس محترم گروه میکروبشناسی که ما را در این کار همراهی نمودند

فهرست مراجع:

1.Farber JM &PI Peterkin..Listeria monocytogenes,a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991:**55**:479-511.

2-Rocourt,J.Jacquet,C&Reilly,A.()Epidemiology of human listerriosis and sea food .J.food Microbiol. 2000:**62**:197-209

3-Meier,JandLopez,Llisteriosis:an emerging food-borne disease. Clin.Lab.Sci. 2003:**14**:187-192

4-Smith,G.J Food borne infections during pregnancy .J. Food Prot. 1999: **62**,818-829

5-M J Lefford, L Amell, and S Warner Listeria pneumonitis: induction of immunity after airborne infection with Listeria monocytogenes. Infect Immun. 1978 December: **22**(**3**): 746–751.

6-Conlan,J.W.andNorth,Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria mono cytogenes ,Francissella tularensis, and Salmonellatyphimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. Infect,Immun. 2002: **60**:5164-5171.

7- Slutsker,L.and A.Schuchat .Listerriosis in human.
InE.T.Ryser,andE.H.Marth,Listeria,listeriosis,and food safety,2nd ed.Marcel Drkker Inc,New York,N,Y.1999: p 75-95

8-Abram,M. and Doric,M.the influence of listeria monocytogenes infection on pregnancy in Balb/c mice In.III International meeting mechanisms in Local Immunity Opatija,Croatia.Abstract Perio.**Biol**998**:(Suppl.1)**:p.76

9-Marco,A.J.Altimira,N. Prats,s. Lopes,L. Dominguez, M.Domingues,and Domingo.Amicrobiologycal, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of Listerria mono cyto genes in mice.JComp. Pathol

.1992:.**107**;1-9

10- Kato K. Yamamoto K. Okuyama H. Kimura T.

Microbicidal activity and morphological characteristics of lung macrophages in Mycobacterium bovis BCG cell wall-induced lung granuloma in mice.Infect Immun. 1984 August: **45**(**2**): 325–331.

11-Munder A. Krusch S. Tschernig T. Dorsch M. Lührmann A. van Griensven M. Tümmler B. Weiss S. Hedrich H.J. Pulmonary microbial infection in mice: Comparison of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology ,Experimental and Toxicologic Pathology, 2002 July **54**(2):**7**: pp. 127-133

12-Heymer B.C.H و Wirsing von Konig H,. Emmerling P.Histomorphology of experimental listeriosis. Infection **16**;S106-S111.

13-Heymer B.C.H. Wirsing von Konig ,H.Hof,. Emmerling P.Histomorphology of experimental listeriosis. Infect.Immun. 1990:**30**:851

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات۱۲-۸

جداسازی استرپتوکوکوس اینیه و تشخیص آن توسط PCR

مهرنوش نوراده کیکاوسی[۱]، مژگان بنده پور[۲]، جمیله نوروزی[۱]، بهرام کاظمی[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲) مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
نویسنده رابط: مهرنوش نوراده کیکاوسی ، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
همراه: mkeykavosi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۵/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: استرپتوکوکوس اینیه بیماریزای مهم در آبزیان و انسان و عامل عفونت های سیستمیک در هر دو میزبان می باشد. علائم عفونت های حاصل از آن بسیار مشابه علائم ایجاد شده توسط استرپتوکوک های مهاجم ویژه انسان است. و قادر به انتشار به قلب، کبد، طحال و مغز می باشد. علی رغم انتشار جهانی آن در میان ماهی ها، در کشور ما توجه چندانی به این باکتری به عنوان عامل عفونت انسان و آبزیان نمی شود.

مواد و روش ها: جهت تشخیص استرپتوکوک اینیه، از بافت ماهی آلوده روی محیط آگار با خون گوسفند کشت داده شد. از کلونی های مشکوکو بافت مغز ماهی DNA استخراج و واکنش PCR برای ژن 16s rRNA باکتری انجام گرفت.

یافته ها: استرپتوکوکوس اینیه روی محیط آگار خون گوسفند پس از ۲۴ ساعت در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد، به صورت کلونی های موکوئید با همولیز بتا رشد کرد. سپس با تکنیک PCR آلودگی ماهیها به این باکتری تایید گردید.

نتیجه گیری : در این مطالعه، استرپتوکوکوس اینیه توسط روش حساس و سریع PCR در بافت ماهی و کشت حاصل از آن تشخیص داده شد.

کلید واژه ها: استرپتوکوکوس اینیه، PCR

مقدمه

استرپتوکوک اینیه (S. iniae)، پاتوژن شایع ماهی و بندرت عامل عفونت در انسان می باشد. S. iniae اولین بار در سال ۱۹۷۶ از آبسه های زیر جلدی دولفین (Inia geoffrensis) در آب شیرین از آمریکا جدا شد [۱, ۲] [۳]. ۲۰ سال پس از کشف آن در دولفین، در زمستان سال۱۹۹۶- ۱۹۹۵، اولین بار به عنوان عامل عفونت در انسان شناسائی شدکه شدکه در تورنتو، ۹ مورد از عفونت های تهاجمی استرپتوکوک اینیه در بیمارانی که اخیراً با ماهی تازه تماس داشته اند، گزارش شد . و هم اکنون به عنوان پاتوژن ماهی، ایجاد کننده عفونت های پراکنده در ماهی دم زرد، قزل آلای رنگین کمانی و ماهی آزاد coho می باشد و باعث زخمهای پوستی، میوزیت های نکروز شونده، منتژوانسفالیت و پان افتالمیا در ماهی می شود [۲]. گرچه بالا بودن سن و وجود بیماریهای زمینه ای به نظر می رسد که عامل خطری برای عفونت های تهاجمی *S. iniae* باشد، اما به علت مشکلات در تشخیص و جداسازی *S. iniae* در آزمایشگاههای میکروب شناسی بالینی، عفونت های انسانی حاصل از این باکتری شناخته شده نیست و آمار دقیقی از آن در دسترس نمی باشد [٤-٦].

عفونت استرپتوکوکی گر چه در ماهی ها معمول نمی باشد ولی در صورت وقوع بیماری می تواند خسارتهای جبران ناپذیری را وارد نماید. عفونت استرپتوکوکی در ماهی، اولین بار در سال ۱۹۵۷ درقزل آلای رنگین کمانی پرورشی در ژاپن توسط Hoshina و همکارانش گزارش شد [۷] عفونت استرپتوکوکی در آبزیان می تواند باعث مرگ و میر بالائی حدود بیشتر از ۵۰ درصد در مدت ۳ تا ۷ روز شود که معمولاً با رفتارهای غیر طبیعی در حین شنا کردن که غالبا به شکل شنای عمودی و مارپیچی ماهی به دور خود می باشد، شناخته می شود. عوامل محیطی و یا ضعف سیستم ایمنی موجب افزایش حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماریزا می گردد و این پدیده، اکثرا توسط استرس تسریع می یابد. استرس در اغلب موارد نقش مهمی در شیوع بیماریهای عفونی در جمعیت ماهی ها ایجاد می کند. بعضی از این استرس ها شامل: افزایش دمای آب (مثلاً در طول تابستان) اغلب بیش از ۱۷ درجه سانتی گراد [۸, ۹]، نا مناسب بودن کیفیت آب از جمله بالا بودن سطح آمونیوم یا غلظت نیترات و نیتریت و کاهش اکسیژن غیر محلول کمتر از ٤ میلی گرم در میلی لیتر [۱۰].

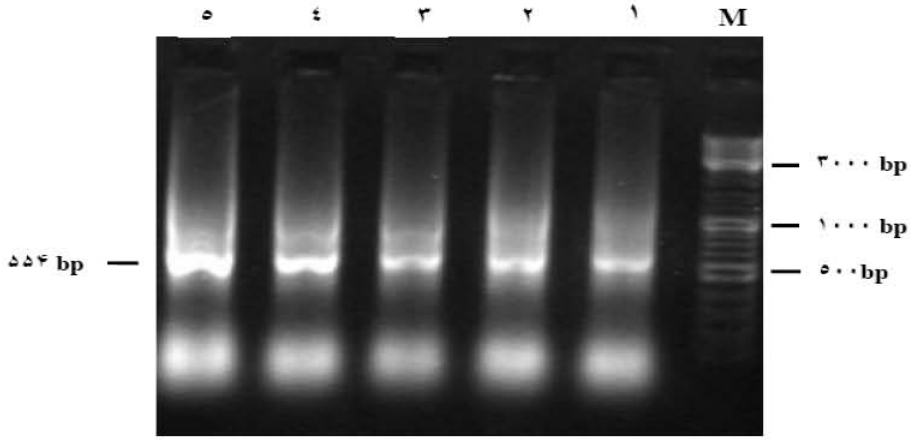
باکتری از ماهی آلوده از طریق پوست آسیب دیده یا زخم قادر به انتقال به انسان می باشد از آنجا که اکثر افراد در کشور ما نیز ماهی را بصورت تازه و غیر آماده از مغازه خریداری کرده و اقدام به پاک سازی پولک ها و جداسازی ارگانهای داخلی ماهی می کنند، بنابراین احتمال خراشیدگی پوست دست زیاد است. باکتری از طریق خراش پوست وارد شده و می تواند ایجاد سلولیت و عفونت سیستمیک کندکه افراد ماهیگیر و کسانی که با ماهی سر و کار دارند و افراد بزرگسال و به ویژه بیماران دیابتی و دارای مشکلات کبدی، کلیه و دچار نقص سیستم ایمنی، بیشتر در معرض خطرند. علی رغم انتشار جهانی آن در میان ماهی ها، در کشور ما توجه چندانی به این باکتری به عنوان عامل عفونت انسان و آبزیان نمی شود . هدف از این بررسی در مرحله اول جداسازی باکتری از ماهی آلوده و کشت و در مرحله بعد تائید توسط واکنش PCR می باشد. بدین منظور ابتدا باکتری را از بافت های مختلف ماهی ایزوله شده و روی محیط بلاد آگار کشت داده شد. سپس برای تائید استرپتوکوکوس اینیه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16S rRNA واکنش PCRانجام شد.

روش بررسی:

در مرحله اول نمونه گیری از ماهیانی که حداقل یکی از علائم بیماری از جمله شنای غیر طبیعی ، تیرگی پوست همراه با خونریزی، ادم و باد کردگی شکم، بیرون زدگی چشم و یا سایر علائم را داشتند، به عمل آمد. به این ترتیب که از بافت های مختلف ماهی مانند مغز، قلب ، عضله، اطراف چشم و اعماء و احشا توسط سواپ استریل در محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت انجام شد. و دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. پس از ظاهر شدن کلونی های سفید و موکوئیدی همراه با همولیز بتا و بعد از رنگ آمیزی گرم، استخراج DNA به روش دستی فنل – کلروفرم از کلنی های مشکوک انجام شد. سپس غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه گرفته شد. و با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA اختصاصی استرپتوکوکوس اینیه، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر کوربت و شرایط گرادیان دمایی جهت یافتن بهترین دما انجام شد. محصول PCR در حرارت اتاق روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار مارکر ۱۰۰bp (۱۰۰-۱۰۰۰۰bp) در محلول بافر TAE الکتروفورز شد. محلول بافر TAE شامل Tris ،EDTA و اسید استیک بود. ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در زیر نور ماورای بنفش مشاهده و عکس برداری گردید.

یافته ها:

پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در شرایط ۳۷ درجه، روی محیط بلاد آگار کلونی های سفید و موکوئیدی با همولیز بتای بسیار واضح مشاهده شدند. پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باکتری های کوکسی گرم مثبت که عمدتا به صورت زنجیرهای کوتاه بودند، شک به استرپتوکوزیس قطعی می نمود. در مرحله بعد، تجربه نشان داد که شرایط مناسب برای انجام PCR، غلظت ۱ µl کلرور منیزیم۵۰mM، ۰/۲۵ µl آنزیم Taq DNA polymerase در حجم نهایی ۳۰µl در حرارت ۹٤° سانتی گراد (primary denaturation) به مدت ۵ دقیقه، حرارت ۹٤°سانتی گراد ۳۰ ثانیه (denaturation)، ۵۱° سانتی گراد (annealing) به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲° سانتی گراد (extension) به مدت ٤۵ ثانیه (۳۰ چرخش) و ۷۲° سانتی گراد (Final extension) به مدت ۵ دقیقه می باشد. در الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، باند ۵۵٤ bp مشاهده شد (شکل ۲) و بدین ترتیب وجود استرپتوکوکوس اینیه تائید شد.



شکل ۴-۱- الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه در بافت های مختلف بدن ماهی در کنار مارکر وزن مولکولی بر روی ژل آگارز ۲ درصد

M- مارکر وزن مولکولی (۱۰۰۰۰-۱۰۰ bp)

۱- محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه از بافت مغز ماهی

۲- محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه از بافت قلب ماهی

۳- محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه از بافت عضله ماهی

۴- محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه از اعما و احشای ماهی

۵- محصول PCR ژن ۱۶s rRNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری استرپتوکوکوس اینیه از بافت اطراف چشم

بحث:

استرپتوکوک اینیه بعنوان پاتوژن مهم ماهی در دهه اخیر ظهور کرد. هر چند که S.iniae اولین بار از دولفین آب شیرین در سال ۱۹۷٦ جدا شد [۱, ۲] [۳]. ولی هم اکنون بعنوان مشکل اصلی سلامت و اقتصاد آبزیان در جهان و بخصوص مناطق گرم است. اخیراً نیز بعنوان یک پاتوژن زئونوزی بلقوه شناسایی شده که دست کم ۲۵ مورد از عفونت انسانی توسط *S.iniae* تأیید کننده این اطلاعات است [٤, ٦, ۱۱].

در سال ۱۹۹۷ تخمین سالانه از زیان حاصل از عفونت توسط این باکتری روی صنعت آبزیان در آمریکا به تنهایی ۱۰ میلیون دلار و تخمین جهانی آن ۱۰۰ میلیون دلار برآورد شده بود [۱۲]. از آنجا که این باکتری تقریباً باکتری جدیدی است و اخیراً بعنوان باکتری

پاتوژن و تهاجمی شناخته شده و عدم آگاهی پزشکان کلینیکی و همچنین تکنسین‌های آزمایشگاه میکروبیولوژی از این باکتری و به دلیل ایجاد سلولیت و همچنین واکنش بتا همولیز معمولاً به اشتباه *S.pyogenus* گزارش می‌شود. و روش های تشخیصی مرسوم ارزش چندانی برای تشخیص ندارند و به دلیل مقرون به صرفه نبودن تکنیک های مولکولی ، لذا آمار دقیقی از شیوع و فراوانی این باکتری در عفونتهای انسانی و آبزیان در آسیا و بویژه در ایران در دسترس نیست.

و چون آسیایی بودن، سن بالا و وجود بیماریهای زمینه‌ای از جمله دیابت ملتیوس و سیروز کبدی و همچنین سابقهٔ برخورد با ماهی، به نظر می‌رسد عامل خطری برای عفونت با *S.iniae* باشد [۱۳]. بهمین خاطر *S.iniae* هدف خوبی جهت مطالعات تحقیقاتی اخیرمی باشد. در تحقیقاتی که تاکنون روی استرپتوکوکوس اینیه انجام شده بود، جهت جداسازی این باکتری از محیط های TSA یا آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی استفاده می شد و بررسی همولیز بتا نیز روی محیط آگار خوندار انجام می گرفت.در این بررسی نیز از محیط آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی استفاده شد و با مشاهده کلونی هایی با همولیز بتای واضح و کاملا موکوئیدی ، مراحل بعدی تحقیق انجام شد.

اخیرا از چندین تکنیک مولکولی از جمله تعیین توالی s rRNA ۱۶ ،هیبریداسیون ژن چاپرون ۶۰ ،ردیابی ژن لاکتاز اکسیداز به عنوان ژن هدف در تشخیص استرپتوکوکوس اینیه استفاده می کنند که در مقایسه با روش های معمول آزمایشگاهی از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار می باشند [۱۴, ۱۵] [۱۶].

در این تحقیق نیز با طراحی پرایمرهای اختصاصی ۱۶s rRNA استرپتوکوکوس اینیه، پس از استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم با انجام واکنش PCR از کلونی های مشکوک، که روشی نسبتا ساده، با ویژگی بالا و در مقایسه با روش های دیگر ارزان تر می باشد ، استرپتوکوکوس اینیه تائید شد.

فهرست مراجع:

1. Pier, G.B. and S.H. Madin, *Streptococcus iniae sp. nov., a beta hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, Inia geoffrensis.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1976. 26(4): p. 545-553.
2. Pier, G.B., S.H. Madin, and S. Al-Nakeeb, *Isolation and characterization of a second isolate of Streptococcus iniae.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1978. 28(2): p. 311-314.
3. Bonar, C.J. and R.A. Wagner, *A third report of "golf ball disease" in an Amazon River dolphin (Inia geoffrensis) associated with Streptococcus iniae.* Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 2003. 34(3): p. 296-301.
4. Lau, S.K.P., et al., *Invasive Streptococcus iniae infections outside North America.* Journal of Clinical Microbiology, 2003. 41(3): p. 1004-1009.
5. Koh, T.H., A. Kurup, and J. Chen, *Streptococcus iniae discitis in Singapore [7].* Emerging Infectious Diseases, 2004. 10(9): p. 1694-1696.
6. Facklam, R., et al., *Identification and characterization of sporadic isolates of Streptococcus iniae isolated from humans.* Journal of Clinical Microbiology, 2005. 43(2): p. 933-937.
7. Hoshina, T., T. Sano, and Y. Morimoto, *A Streptococcus pathogenic to fish.* Journal of Tokyo University of Fisheries 1985. 44: p. 57-68.
8. Bercovier, H., C. Ghittino, and A. Eldar, *Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms.* Developments in biological standardization, 1997. 90: p. 153-160.
9. Inglis, V., R.J. Roberts, and N.R. Bromage, *Streptococcal Infections*, in *Bacterial Disease of Fish*. 1993, John Wiley & Sons: New York. p. 196-197.
10. Eldar, A., et al., *Steptococcus shiloi, the name for an agent causing septicaemic infection in fish, is a junior synonym of Streptococcus iniae.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1995. 45: p. 840-842.
11. Lau, S.K.P., et al., *Clinical isolates of Streptococcus iniae from Asia are more mucoid and b-hemolytic than those from North America.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2006. 54(3): p. 177–181.
12. Shoemaker, C.A., P.H. Klesius, and J.J. Evans, *Prevalence of Streptococcus iniae in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States.* American Journal of

Veterinary Research, 2001. 62(2): p. 174-177.
13. Sun, J.R., et al., *Invasive infection with Streptococcus iniae in Taiwan.* Journal of Medical Microbiology, 2007. 56(9): p. 1246-1249.
14. Berridge, B.R., et al., *Development of specific nested oligomucleotide PCR primers for the Streptococcus iniae 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer.* Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36(9): p. 2778-2781.
15. Goh, S.H., et al., *Streptococcus iniae, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin60 gene identification method.* Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36: p. 2164-2166.
16. Mata, A.I., et al., *Development of a PCR assay for Streptococcus iniae based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value.* Veterinary Microbiology, 2004. 101(2): p. 109-116.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات۱۷-۱۳

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریهای گرم منفی غیرتخمیری (سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا) جداشده از نمونه های کلینیکی درکرمان

مژده رضوی[۱]، شهلا منصوری*[۲]،فاطمه نوروزی[۲]

۱)گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
نویسنده رابط : دکترشهلا منصوری، استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
تلفن: ۰۳۴۱۳۲۲۱۶۶۵ آدرس پست الکترونیک:smansouri @ kmu.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۲/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۶/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: باسیلهای گرم منفی غیرتخمیری بعنوان فرصت طلب و عامل مهم عفونتهای بیمارستانی بوده و شایعترین آنها سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا میباشند،این باکتریها مقاومت بالایی به آنتی بیوتیکها داشته و یکی از مهمترین مکانیسمهای مقاومت درآنها،تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBL) است. بررسی حاضر با هدف شناسایی،میزان مقاومت و تولید ESBL به روش فنوتیپی در باسیلهای گرم منفی غیرتخمیری در شهر کرمان میباشد.

روش بررسی: جمعاً۱۱۰ باسیل گرم منفی غیرتخمیری از بیماران بستری و سرپایی جمع آوری و با روشهای بیوشیمیایی شناسایی شدند،شامل۹۳ سودوموناس آئروژینوزا،٦ اسینتوباکتر بومانی و۱۱ استنوتروفوموناس مالتوفیلیا. مقاومت این ایزوله ها به۱۱ آنتی بیوتیک رایج درمانی، به روش رقیق سازی در آگار تعیین شد. برای بررسی تولید آنزیم های بتالاکتاماز از تست نیتروسفین استفاده و شناسایی باکتری های تولید کنندهٔ ESBL با روش دیسک ترکیبی و دوتایی(DCDT) انجام گردید.

یافته ها: ۱۶ سودوموناس آئروژینوزا فراوانترین باکتری بود و عفونت ادراری بیشترین فراوانی را داشت، مقاومت به سفوتاکسیم، سفتی زوکسیم، نالیدیکسیک اسید، آموکسی سیلین و سفالکسین بسیار بالا بود (۷٤تا۱۰۰٪)و کمترین مقاومت نسبت به ایمیپنم،سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب با۰/۹٪،۱۳/٦٪ و ۲٤/٥٪ بود.تولید بتالاکتاماز در٤٥/۹٪ ایزوله ها مثبت بود و فراوانی تولید ESBL،۵۰/۹٪بود.میزان مقاومت آنتی بیوتیکی،تولید بتالاکتاماز وESBL در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی بیشتر از سایر گونه های مورد بررسی بود.

نتیجه گیری : باکتریهای گرم منفی غیرتخمیری خصوصاً اسینتوباکتر بومانی در این ناحیه با مقاومت بالایی به بسیاری از آنتی بیوتیکهای رایج درمانی دیده میشوند و برای کنترل عفونتهای ناشی از آنها میتوان ازآنتی بیوتیکهای مؤثری نظیر سفتازیدیم و ایمیپنم استفاده کرد.

کلید واژه ها: باکتریهای گرم منفی غیرتخمیری،نیتروسفین،بتالاکتامازهای با طیف گسترده

مقدمه

باکتریهای گرم منفی غیر تخمیری گروهی از باسیلهای گرم منفی هستند که گلوکز و بقیه قندها را تخمیر نکرده و در شرایط هوازی رشد میکنند و۱۵درصد باسیلهای گرم منفی جداشده از بیماران بیمارستانی را شامل میشوند. این باسیلها گوناگون هستند ، اما سه گروهی که اکثریت ایزوله های کلینیکی را شامل میشوند عبارتند از: سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا (۱).این باکتریها بیشتر زندگی آزاد داشته و قسمتی از فلور طبیعی بدن انسان را تشکیل میدهند(۲).سه گونه فوق، خصوصاً سودوموناس آئروژینوزا ،پاتوژن فرصت طلب هستند و به ندرت در افراد سالم عفونت ایجاد میکنند ولیکن اکثراً در افراد با سیستم ایمنی ضعیف یا بیمارانی که بیماریهای بدخیم دارند موجب ایجاد عفونتهای مختلفی شده و به همین دلیل عامل مهم عفونت های بیمارستانی محسوب میشوند(۳و٤).

این باکتریها مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیکها دارند که سبب اشکال در درمان عفونتهای تولید شده توسط این باکتریها میگردد. به دلیل وجود مکانیسمهای مختلف کسب مقاومت، پدیده مقاومت چند دارویی در این باکتریها شایع و به سرعت در حال افزایش است(۵).به صورتیکه سویه هایی از این باکتریهای گرم منفی غیر تخمیری در بسیاری از مناطق جهان شناسایی شده اند که به آنتی بیوتیکهای متعددی نظیر پنی سیلینها و سفالوسپورینهای ضد سودوموناسی، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلینها ،فلوروکینولونها ،کوتریموکسازول و کاربانمها مقاومند و این مسئله درمان عفونتهای ایجاد شده توسط این باکتریها را بسیار مشکل و پرهزینه ساخته است(۵). یکی از مهمترین عوامل ایجاد مقاومت در باکتریها استفاده کلینیکی زیاد و نامناسب آنتی بیوتیکها خصوصاً آنتی بیوتیکهای گروه بتالاکتام است (٦).این مسئله موجب القائ تولید آنزیمهای بتالاکتاماز و متعاقب آن بتالاکتامازهای با طیف گسترده Extended Spectrum β-Lactamases(ESBLs) میشود که این آنزیمها سبب ایجاد مقاومت به پنی سیلینها، سفالوسپورینهای نسل سوم و آزترونام میگردند(۷).در سالهای اخیر ESBLها بعنوان عامل مهم ایجاد کننده مقاومت باکتریایی در سراسر جهان گزارش شده اند.این آنزیمها بیشتر در اعضای خانواده انتروباکتریاسه وجود دارند اما اخیراً با فراوانی رو به افزایشی در غیرتخمیری ها نیز گزارش شده اند(۸ و۹).باتوجه به مقاومت بالا و اهمیت کلینیکی این باکتریها و همچنین نظر به اینکه تحقیقات در شهر کرمان تنها مربوط به سودوموناس آئروژینوزا در نمونه های سوختگی می باشد(۱۰) ، بررسی حاضر با هدف شناسایی باسیلهای گرم منفی غیرتخمیری شامل سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا،تعیین مقاومت چند دارویی در این باکتریها و تولید آنزیمهای بتالاکتاماز با طیف گسترده توسط این ایزوله ها انجام گرفت.

روش بررسی:

جدا سازی وتشخیص باکتریها: از دی ۱۳۸٦تا مهر ۱۳۸۷نمونه های سوختگی، خون، ادرار و مایعات بدن (مایع ریوی، مایع مغزی- نخاعی و...)از بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به چهار بیمارستان در شهر کرمان جمع آوری شد. جهت شناسایی اولیه از محیطهای مک کانکی آگار و EMB و ستریماید آگار(در ٤۲°c)استفاده شد و تستهای تشخیصی و افتراقی شامل واکنش در محیط های TSI و OF حاوی گلوکز انجام شد و از تستهای استاندارد تشخیصی جهت جداسازی باکتریهای گرم منفی غیر تخمیری شامل سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا استفاده شد(۱).تمامی ایزوله های تعیین هویت شده در محیط های TSB به اضافه ٤۰ درصد گلیسرول و نوترینت آگار نیم ظرفیت، به ترتیب در ۷۰- درجه سانتی گراد و در دمای آزمایشگاه برای آزمایشات بعدی ذخیره شدند(۱۱و۱۲).**بررسی مقاومت ضد میکروبی** : با استفاده از روش رقت در آگار(Agar dilution) میزان حساسیت ایزوله های گرم منفی غیرتخمیری نسبت به ۱۱ آنتی بیوتیک رایج درمانی براساس حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، تعیین گردید. سپس MICها بر طبق قوانین CLSI در ۲ محدوده حساس و مقاوم دسته بندی شدند(۱۳).تولید آنزیمهای بتالاکتاماز در ایزوله های مورد مطالعه با استفاده از روش نیتروسفین (MAST) به صورت دیسک انجام شد.از روش DCDT که ترکیبی از روشهای double disc test و combined disc test است، برای شناسایی ایزوله های تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده استفاده شد. در این روش دیسک های ۳۰ میکروگرمی(تهیه شده از شرکت MAST,England)سفتازیدیم ، سفوتاکسیم، سفپیم و سفپودوکسیم را به فاصله۲۵ میلی متر در ٤ طرف دیسک آموکسی سیلین(۳۰میکروگرم) /کلاوولانیک اسید(۱۰میکروگرم) و همچنین دیسک سفتازیدیم (۳۰میکروگرم) /کلاوولانیک اسید (۱۰میکروگرم) و دیسک سفوکسیتین (۳۰میکروگرم) با فاصله ۲۵میلی متر از هم و از سایر دیسکها بر روی محیط مولرهینتون آگار تلقیح شده ، قرار دادیم(۸).در این روش کشیدگی هاله عدم

رشد دیسکهای سفالوسپورین به سمت دیسک آموکسی سیلین / کلاوولانیک اسید ، نشان دهنده تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده است(تصویر شماره ۱). علاوه بر آن اگر قطر هاله عدم رشد دیسک سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید به میزان ۵ میلی متر یا بیشتر، بزرگتر از قطر هاله عدم رشد دیسک سفتازیدیم به تنهایی بود،این ایزوله نیز بعنوان تولیدکننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده در نظر گرفته شد(۸).

از سویه های استاندارد زیر جهت استاندارد کردن روشهای آنتی بیوگرام و شناسایی ESBL ها استفاده شد:

۱-سودوموناس آئروژینوزا ۲۷۸۵۳ ATCC ۲-اشریشیا کلی ۲۵۹۲۲ ATCC ۳-سودوموناس آئروژینوزا koas که در این سویه وجود ژن بتالاکتاماز با طیف گسترده نوع PER-1 توسط RCR تأیید شده بود.

از نرم افزار SPSS=18 جهت بررسی نتایج و تجزیه و تحلیل آماری و از مربع کای(Chi-square) برای بررسی تفاوت آماری داده ها استفاده شد و P value<۰/۰۵ به عنوان Significant در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در این مطالعه جمعاً ۱۱۰ باکتری گرم منفی غیرتخمیری شامل ۹۳ سودوموناس آئروژینوزا،٦ اسینتوباکتر بومانی و ۱۱ استنوتروفوموناس مالتوفیلیا ایزوله شد. از بیماران بستری در بیمارستانها ٦٥ ایزوله (٥٩/١٪)و از بیماران سرپایی ٤٥ (٤٠/٩٪) ایزوله گرم منفی غیرتخمیری جداسازی شد که فراوانی ایزوله ها در بیماران بستری بطور معنی داری بیشتر از بیماران سرپایی بود(P=۰/۰۱). باکتریهای مورد بررسی از ٦٨ زن (٦١/٨٪) ،٣٦ مرد (٣٢/٧٪) و٦ نوزاد (٥/٥٪) جداسازی گردیدند.(شیرخواران با سن کمتر از ٦ ماه بعنوان گروه نوزادان در نظرگرفته شدند.) بیشتر نمونه های گرفته شده از تمام مراکز درمانی مربوطه به کشت ادرار با فراوانی ٦٣ مورد(٥٧/٣٪) بود و پس از آن، نمونه های سوختگی با فراوانی ۱۹مورد (۱۷/۳٪) و خون با فراوانی ۱۳مورد (۱۱/۸٪) در مرتبه بعدی قرار داشتند.

از نظر مقاومت به آنتی بیوتیکها ،تعداد ۷٥ ایزوله(٦٧/٦٪)نسبت به حداقل سه آنتی بیوتیک از کلاسهای مختلف مقاوم بودند که بعنوان ایزوله های مقاوم به چند دارو(MDR) شناسایی شدند.تمامی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی،٦٦/٧٪ایزوله های سودوموناس آئروزینوزا و ٦٣/٧ایزوله های استنوتروفوموناس مالتوفیلیا MDR بودند.بیشترین مقاومت در ایزوله های گرم منفی غیرتخمیری نسبت به سفالکسین و آموکسی سیلین (به ترتیب با ۱۰۰٪ و ۹۹/۱٪) بود و در بین سفالوسپورین های نسل سوم (سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتی زوکسیم)بالاترین میزان مقاومت نسبت به سفوتاکسیم با ۸۲ مورد (۷٤/٥٪)مشاهده شد، درحالیکه مقاومت نسبت به سفتازیدیم ۱۳/٦٪ بود که بعد از ایمیپنم (۰/۹٪) کمترین میزان مقاومت مشاهده شده بود. از بین آنتی بیوتیکهای کینولونی که در این بررسی استفاده شدند، میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید بالا بود(۷٤/٥٪)، اما مقاومت به سیپروفلوکساسین ۲٤/٥٪بود که بعد از ایمیپنم و سفتازیدیم کمترین میزان مقاومت بود.بر مبنای این نتایج ایمیپنم مؤثرترین دارو بود. نمودار۱ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سه گونه گرم منفی غیرتخمیری این مطالعه را نشان میدهد که برطبق این نمودار اسینتوباکتر بومانی بیشترین مقاومت را داشت. همچنین در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی میانگین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد نسبت به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی به مراتب بیشتر از دو گونه گرم منفی غیرتخمیری دیگر بود(جدول ۱).

با روش نیتروسفین جمعاً ٤٥/٩٪ از ایزوله ها تولید کننده بتالاکتاماز شناسایی شدند. نمودار۲ فراوانی تست نیتروسفین مثبت و ESBL مثبت را در سه جنس گرم منفی غیرتخمیری مورد بررسی نشان می دهد.برمبنای روش DCDT ٥۲ ایزوله (٤٧/٣٪) ESBL مثبت بودند (تصویر۱).۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا و۱ ایزوله اسینتوباکتر بومانی هیچگونه هاله عدم رشدی برعلیه کلیه دیسکهای مورد بررسی نداشتند، این٤ ایزوله نیز بعنوان ESBL مثبت در نظرگرفته شدند و بنابراین فراوانی ایزوله های ESBL مثبت ٥٦ ایزوله (٥۰/۹٪) بود.

تولید ESBL در نمونه های ادرار، خون و سوختگی به ترتیب ٥٥/٥ ٪، ٥۳/۸ ٪ و۲۱ ٪ بود که درصد فراوانی ESBL در نمونه های سوختگی بطور معنی دار کمتر از نمونه های ادرار و خون بود(P=0.0).

بحث:

شیوع پدیده مقاومت در باکتریهای گرم منفی غیرتخمیری در کشورهای مختلف ، سلامت و اقتصاد جوامع را تحت تأثیر قرار میدهد و ازطرفی شناسایی و کنترل شیوع ارگانیسمهای با مقاومت چند دارویی مشکل بوده و از سوی دیگر مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله افزایش ویرولانس،محدود کردن انتخابهای درمانی و تأخیر

در اجرای درمان مناسب سرانجام بیماران را به مخاطره می اندازد(۵ و۱٤).

در بررسی حاضر فراوانی ایزولاسیون سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با دو گونه دیگر گرم منفی غیرتخمیری بیشتر بود(P=0.0). و همچنین عفونت ادراری شایعترین عفونت ناشی از این باکتریها بود(P=0.0). در مطالعه مشابهی که توسط Malini وهمکاران در سال ۲۰۰۵ در هند انجام شد نیز سودوموناس آئروژینوزا و عفونت ادراری بیشترین فراوانی را داشتند (۲).در مطالعات انجام شده در دنیا نیز عفونت بیمارستانی ادراری از نظر شیوع در رتبه نخست قرار دارد(۱۵).ایزوله های اسینتوباکتر بومانی بالاترین مقاومت به آنتی بیوتیکها را داشتند بطوریکه به عنوان مثال نسبت به سفوتاکسیم، سفتی زوکسیم،تتراسایکلین،جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به میزان ۱۰۰٪ مقاومت داشتند. در بررسی اکرامی و کلانتر در سال ۸۳ در اهواز نیز مقاومت ایزوله های اسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، سفالوتین، آمیکاسین، کاربنی سیلین و سفتازیدیم صد در صد گزارش شده است (۱٦). بطورکلی مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی در جنس اسینتوباکتر در دهه گذشته به میزان قابل توجهی افزایش یافته است(۱۷).مطالعه ژنومیک سویه های اسینتوباکتر با مقاومت چند دارویی یک ناحیه مقاومت به نام AbaR1 را نشان داده است که حاوی ژنهای مقاومت کسب شده از سودوموناس، سالمونلا و اشریشیا می باشد(۱۸). بنابراین میتوان ایزوله های اسینتوباکتر بومانی این تحقیق را نیز از نظر ژنومیک مورد مطالعه قرار داد. در این بررسی تمام ایزوله ها،به جز یک ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، نسبت به ایمیپنم حساس بودند .این مسئله در مورد استنوتروفوموناس مالتوفیلیا به دلیل حضور کارباپنماز کروموزومی L_1 برخلاف انتظار است و علت آن می تواند بیان متغیر کارباپنماز کروموزومی L_1 و سفالوسپورینار کروموزومی L_2 در این باکتری باشد که فنوتیپ مقاومت را در آن تغییر می دهند (۱۹).

فراوانی نیتروسفین مثبت در این بررسی با بررسی Aibinu وهمکاران در نیجریه همخوانی دارد (۲۰).در بررسی حاضر بیشترین موارد تولید بتالاکتاماز در ایزوله های اسینتوباکتر بومانی دیده شد و این مسئله به دلیل بالا بودن مقاومت این گونه به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام مورد بررسی تقریباً قابل انتظار بود ،این درحالی است که این ایزوله ها از نظر تولید ESBL با دو گونه دیگر تفاوت آماری معنی داری نداشتند. در بررسی که در سال ۲۰۰٦ توسط Al-Naiemi و همکاران در هلند انجام شد، به ترتیب ۹۸/۳ ، ۸۰ و ٦۰ درصد ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا ، اسینتوباکتر بومانی و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا،تولید کننده ESBL گزارش شدند (۹).که فراوانی تولید ESBL در تمامی ایزوله های بررسی فوق از تحقیق ما بیشتر است. اما در مطالعه ای که در سال ۸٦ در کرمان بر روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مربوط به عفونتهای سوختگی انجام شد ۳٤٪ ایزوله ها ESBL بودند(۱۰).که کمتر از بررسی ما بود و این نتایج بیانگر این مطلب است که متأسفانه شیوع ارگانیسمهای ESBL در این منطقه از ایران رشد داشته است. به دلیل حساسیت بالای ایزوله های ما به ایمیپنم، این آنتی بیوتیک میتواند به عنوان انتخاب طلایی برضد این ارگانیسمهای مقاوم استفاده شود.اما به دلیل اینکه افزایش مقاومت در گرم منفی های غیر تخمیری با افزایش استفادهٔ آنتی بیوتیکها مرتبط است (۵)،لذا بایستی در استفاده از این آنتی بیوتیک مؤثر نیز توجه و دقت شود تا از بروز مقاومت و تولید نوعی از ESBLها به نام متالوبتالاکتامازها جلوگیری گردد.از آنجاییکه یکی از مهمترین علل مقاومت باکتریهای گرم منفی غیر تخمیری بیان زیاد پمپهای افلاکس متعدد در آنها است (۲۱)و در بررسی حاضر تنها ٤۷٪از ایزوله های با فنوتایپ MDR ، ESBL مثبت بودند.در نتیجه میتوان انتظار داشت بخشی از این مقاومت چند دارویی به دلیل وجود این پمپها باشد که پیشنهاد میشود این ایزوله ها از نظر وجود پمپهای افلاکس مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه گیری:

یافته های این مطالعه نشان میدهد که ارگانیسمهای گرم منفی غیر تخمیری شیوع گسترده ای در منطقه مورد بررسی پیدا کرده اند و مقاومت بالایی به بسیاری از آنتی بیوتیکهای رایج درمانی دارند. از سوی دیگر بتالاکتامازهای با طیف گسترده که در حال حاضر نگرانی عمده مراکز بهداشتی- درمانی تمام کشورها هستند در ارگانیسمهای گرم منفی غیر تخمیری این ناحیه نیز شایع شده اند، لذا رعایت موازین بهداشتی به ویژه در بیمارستانها و تغییر و بهبود استراتژی مصرف آنتی بیوتیکها در جهت کنترل این ارگانیسمها میتواند مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق با هزینه دانشگاه علوم پزشکی افضلی پور کرمان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام گرفته که مؤلفین مراتب سپاس خود را اعلام میدارند.

فهرست مراجع:

1- Mohan CR,Lehman DC, Manuselis G.*Text book of Diagnostic Microbiology* .Third edition .Mosby Company. 2007;PP:564-574.

2- Malini A, Deepa E, Gokul B , Prasad S. Nonfermenting Gram Negative Bacilli Infections in a Tertiary Care Hospital in Kolar, Karnataka. *The Internet Journal of Microbiology*. 2009 .**7** (1).

3- Quinn JP.Clinical problems posed by multi resistant Nonfermenting gram negative Pathogens.*Clin. Infect. Dis.*1998;**27**(Suppl 1):S117-S124.

4- Vidal F, Mensa J, Almela M, Olona M, Martinez JA, Marco F,et al.Bacteremia in adults due to glucose non-fermentative gram-negative bacilli other than *P.aeruginosa.QJMed.*2003;**96**:227-234.

5- Mc Gowan JE Jr.Resistanc in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum .*The American Journal of Medicine.2006*;**119**(6A):S29-S36.

6- Higgins CS,Murtough SM,Williamson E.Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting gram- negative bacteria.*Clin. Microbiol. Infect.*2001;**7**:308-315.

7- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-lactamases:a clinical update.*Clin .Microbiol. Rev.* 2005;**18**(4):657-686.

8- Al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M Extended-Spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia.J. Med. Microbiol.*2006;**55**:1607-1608.

9- Al Naiemi N, Bart A, De Jong MD, Vondenbrouck-Grauls CM, Rietra PJGM, Debets-Ossenkopp YJ,et al.Widely distributed and predominant CTX-M Extended-Spectrum β-lactamases in Amsterdam,the Netherlands.*J. Clin. Micrbiol.* 2006;**44**(8):3012-3014.

10- Shakibaei MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N.Detection of TEM, SHV and PER type Extended-Spectrum β-lactamases genes among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa-Hospital,Kerman, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2008;**11**(2):104-111.

11- Prescott H.Laboratory exercises in Microbiology, 5th ed. Mc Graw-Hill companies. 2002 ;P:85.

12- Uzunova T, Donev T.Anabiosis and conservation of microorganisms.*J. Cult. Collection* . 2005;**4**(1):14-28.

13- Lorian V.Antibiotics in laboratory medicine,5th ed ,Baltimore; Williams & Wilkins. 2005;PP:114-120

14-Cosgrove SE,Carmeli Y.The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes.*Clin .Infect .Dis* .2003;**36**:1433-1437.

۱۵- قربانعلی زادگان م، رنجبر ر، ایزدی م، اسماعیلی د، احمدی ع ، گودرزی ز . ،بررسی میزان شیوع پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر با مقاومت چند دارویی در بیماران بستری شده در بیمارستان بقیه الله (عج)، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ۱۳۸٦، دوره پانزدهم، شماره اول.

16- Ekrami A, Kalantar E.Bacterial infections in burn patients in at a burn hospital in Iran.*Indian J.Med.Res.* 2007;**126**:541-544.

17- Maragakis LL, Perl TM.*Acinetobacterbaumannii*:Epidemiology ,Antimicrobial resistance,and treatment options.*Clin. Infect. Dis.* 2008;**46**:1254-1263.

18- Fournier PE ,Vallenet D, Barbe V, Audic C, Ogata H, Poirel L.Comparative genomics of Multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii.PLOS Genetics*. 2006;**2**(1): 0062-0071.

19- Avison MB, Higgins CS, Ford PJ, Von Heldreich CJ, Walsh TR, Bennett PM, et al.Differential regulation of L_1,L_2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia. J.Antimicrob. Chemother*. 2002;**49**(2):387-389.

20- Aibinu A, Nwanneka T, Odugbemi T.Occurrence of Extended-Spectrum β-lactamase and MBL in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Lagos,Nigeria. *Journal of American Science*. 2007;**3**(4):81-85.

21- Pool K.Efflux-mediated multi resistance in Gram-Negative bacteria .*Clin .Microbiol. Infect.* 2004;**10**(1):12-26.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات۲۶-۱۸

فعالیت ضدمیکروبی نیسین روی باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس در مدل غذایی و بررسی فوق ریز بینی آنها

محمدرضا پژوهی[۱]، حسین تاجیک*[۲]، امیر عباس فرشید[۳]

۱)دستیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۲) دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۳) دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی و سرپرست مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه ارومیه
نویسنده رابط: حسین تاجیک، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۵۷۱۵۳
تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸ تلفن همراه: ۰۹۱۴۱۴۵۳۲۸۷ نمابر: ۰۴۴۱۲۷۷۱۹۲۶ پست الکترونیک: H.tajik@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۱/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۵/۲۶

چکیده:

زمینه و اهداف: در این مطالعه تأثیر ضدمیکروبی نیسین بر روی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سرئوس در سوپ جو تجارتی در شرایط دمایی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ساختار سلولی باکتری های مورد مطالعه تحت اثر نیسین بوسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید.

روش بررسی: لگاریتم تعداد سلول های رویشی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر غلظت های µg/ml ۰، ۰,۱۲۵، ۰,۲۵ و ۰,۵ نیسین در دو درجه حرارت ۸ و ۲۵ درجه سانتیگراد در مدت ۲۱ روز نگهداری سوپ جو تجارتی ارزیابی و ساختار سلولی باکتری های مورد مطالعه در تماس با بالاترین غلظت نیسین استفاده شده در مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که نیسین در تمامی غلظت های استفاده شده در سوپ جو، میزان رشد و بقاء باکتری های مورد مطالعه را تحت تأثیر قرار می دهد. تأثیر دمای ۸ درجه سانتیگراد در مهار باکتری های مورد مطالعه در مدت نگهداری سوپ جو بیشتر ازدمای ۲۵ درجه سانتیگراد بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاکی از صدمه و آسیب به غشاء سیتوپاسمی باکتری های مورد مطالعه بود.

نتیجه گیری : با کاهش دما نیسین بطور معنی داری رشد باکتری های پاتوژن غذازاد را ممانعت می کند که می توان از فعالیت ضدمیکروبی آن در مواد غذایی آماده بهره برد.

کلید واژه ها: نیسین، باسیلوس سرئوس،باسیلوس سوبتیلیس،سوپ جو تجارتی

مقدمه

با توسعه فرایندهای حفاظت و نگهداری مواد غذایی، توجه روزافزونی به افزایش طول عمر نگهداری مواد غذایی شده است. اگر چه امروزه شرایط بهداشتی فرایند های مواد غذایی بهبود یافته اما هنوز روش های کنترل میکروارگانیسم ها در مواد غذایی نتوانسته بیماری های با منشاء غذا را محدود کند (۱). اکثر مصرف کنندگان بطور گسترده ایی نسبت به خطرات و عوارض ناشی از محافظت کننده های شیمیایی و سنتیک آگاه شده اند و خواهان جایگزینی آنها با نگهدارنده های طبیعی و بی خطر می باشند. از جمله ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی که بطور وسیعی در صنعت مواد غذایی کاربرد پیدا کرده، نیسین است. نیسین تنها باکتریوسین مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی (WHO) بعنوان یک محافظت کننده طبیعی در مواد غذایی می باشد که بوسیله سویه های خاصی از لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس تولید شده و جزء ترکیبات بی خطر (GRAS) نیز طبقه بندی می شود (۲ و ۳). نیسین تحت شرایط سرما و گرما پایدار بوده و توسط سیستم گوارشی براحتی هضم می شود. از این ترکیب در بیش از ۵۰ کشور بعنوان افزودنی غذایی استفاده می گردد (٤). نشان داده شده که نیسین اکثراً بر طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت موثر بوده و از رشد فرم رویشی اسپور آنها جلوگیری می کند و موجب لیز سلول های رویشی می شود (۵). باسیلوس ها باکتری های گرم مثبت، هوازی، میله ای اسپورزا با گسترش همه جایی می باشند. باسیلوس سرئوس یک پاتوژن غذازاد بوده که از عمومی ترین عوامل مسمومیت غذایی به شمار می رود. این باکتری انواع مختلفی توکسین تولید می کند که در میان آنها دو نوع به کررات با مسمومیت غذایی همراه هستند که شامل یک آنتروتوکسین حساس به حرارت مسوول سندرم اسهال زا و دیگری توکسین مقاوم به حرارت که همراه با سندرم استفراغ آور می باشد (٦ و ۷). سلول های رویشی آن به آسانی بوسیله حرارت غیر فعال می شوند اما اسپورهای آن قادر هستند تحت چنین تیمارهایی باقیمانده و بعد از تکثیر در ماده غذایی سبب مسمومیت غذایی شوند (۸). باسیلوس سوبتیلیس نیز همچون باسیلوس سرئوس بدلیل اسپورزا بودن تا حدودی دارای مقاومت در برابر پروسه های محافظتی مواد غذایی می باشد. این باکتری در صورت رشد و تکثیر در ماده غذایی توکسین مقاوم به حرارتی تولید می کند که علایم مشابه فرم استفراغ آور باسیلوس سرئوس دارد. از جمله علایم مسمومیت با باسیلوس سوبتیلیس می توان به استفراغ، درد های شکمی و تهوع ناگهانی اشاره کرد. بیشترین غذاهایی که درگیر و آلوده به گونه های باسیلوس هستند شامل محصولات گیاهی و سبزیجات، گوشت، ادویه ها، آرد غلات، فراورده های برنجی یا غذاهای نشاسته ای می باشد (٦). در چندین مطالعه فعالیت ضدمیکروبی نیسین در محیط کشت آزمایشگاهی و روی چندین باکتری پاتوژن غذازاد مورد بررسی قرار گرفته است (۹ و ۱۰). به منظور اثبات مزایای (فواید) بکارگیری محافظت کننده های ضدمیکروبی طبیعی، بایستی این ترکیبات به تنهایی و یا بصورت توأم با سایر فاکتورهای محافظتی مواد غذایی، برای ایجاد اثرات سینرژیستی مورد ارزیابی قرار بگیرند (۱۱). بنابراین در صورت بکارگیری مواد نگهدارنده در غلظت های پایین تر با توجه به قیمت بالای آنها، در یک سیستم ترکیبی (Hurdle Technology) می توان هم از صرفه اقتصادی تولید فراورده غذایی و هم از سلامت و بهداشت آن اطمینان حاصل کرد. در این مطالعه تأثیر نیسین بر روی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سرئوس در سوپ جو تجارتی بعنوان یک مدل غذایی، در شرایط دمایی مختلف مورد ارزیابی قرار می گیرد. همچنین مکانیسم اثر نیسین بر روی ساختار باکتری های مورد مطالعه بوسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی می شود.

روش بررسی:

نیسین:

پودر نیسین استفاده شده در این مطالعه حاوی ۲,۵ درصد نیسین فعال، از شرکت SIGMA–ALDRICH (United Kingdom, EC 215-807-5) خریداری شد. جهت آماده سازی نیسین از اسید کلریدریک ۰,۰۲ مول در لیتر (با pH حدود ۱,٦) استفاده گردید. سپس با عبور محلول از میکروفیلتر استرلیزه یکبار مصرف محلول استوک نیسین استریل گردید. لازم به ذکر است غلظت های نیسین در این مطالعه بصورت نیسین فعال بیان می شود.

باکتری های مورد مطالعه:

در این مطالعه باکتری های باسیلوس سرئوس ATCC 11778 و باسیلوس سوبتیلیس ATCC 6633 تهیه شده از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون فرم رویشی باکتری های مورد مطالعه با انتقال باکتری های لیوفیلیزه به محیط آبگوشت قلب و مغز استریل (BHI broth) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) و

گرمخانه گذاری آنها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت و تجدید کشت آنها برای حداقل دو بار متوالی انجام شد. در ادامه سویه های باکتریایی بر روی محیط آگار شیب دار (Streak Brain Heart Infusion agar) (Merck, KGaA) کشت گردیده و در دمای ٤ درجه سانتیگراد برای استفاده در طول آزمایش نگهداری شدند.

تهیه کشت باکتریایی:

از روش اسپکتروفتومتری (Spectrophotometer) برای تهیه و محاسبه میزان تلقیح باکتری های مورد مطالعه برای افزودن به مدل غذایی استفاده شد. سوسپانسیون فرم رویشی باکتری های مورد مطالعه با کشت آنها در محیط آبگوشت BHI برای حداقل دو بار متوالی به مدت ۱۸ ساعت و گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تهیه گردید. در ادامه از سوسپانسیون کشت باکتریایی رقت های مختلف تهیه شده و بعد از قرائت جذب نوری آنها بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia LKB-Nova Spacell England) در طول موج ٦۰۰ نانومتر، شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی (Spread Plate Count) در محیط آگار صورت گرفته و با توجه به جذب نوری بدست آمده تعداد 10^{7} CFU/ml باکتری محاسبه گردید. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری محاسبه شده، تهیه و جهت تلقیح در مدل غذایی استفاده گردید.

آماده سازی مدل غذایی:

در مطالعه حاضر از سوپ جو تجارتی بعنوان مدل غذایی استفاده گردید. سوپ جو با توجه به دستور العمل کارخانه تولید کننده آماده سازی شد. استریل سازی نمونه های سوپ جو در فلاسک های قابل اتوکلاو صورت گرفته و در ادامه غلظت های µg/ml ۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ نیسین به هر فلاسک افزوده شد.

تلقیح و نگهداری مدل غذایی:

مقادیر مناسب از سوسپانسیون فرم رویشی باکتری های مورد مطالعه بطور مجزا تحت شرایط استریل به داخل فلاسک ها تلقیح شدند به گونه ای که تعداد نهایی باکتری در هر نمونه CFU/ml 10^{3} بود که با کشت سطحی تأیید گردید. سپس هر تیمار برای بررسی رشد و بقاء باکتری های مورد مطالعه، در دو دمای ۸ درجه سانتیگراد (بعنوان دمای نامناسب یخچال) و ۲۵ درجه سانتیگراد (بعنوان دمای محیط)، به مدت ۲۱ روز نگهداری شد. نمونه های سوپ جو به منظور مقایسه زمان رسیدن تعداد باکتری های مورد مطالعه از میزان اولیه تلقیح (10^{3} CFU/ml) به 10^{6} CFU/ml و یا کمتر از 10^{1} CFU/ml در روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۹، ۱۲، ۱٥، ۱۸ و ۲۱ نگهداری، به روش کشت سطحی بر روی محیط BHI آگار مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمام آزمایشات سه بار تکرار گردید.

ارزیابی میکروسکوپ الکترونی:

سلول های رویشی باکتری های مورد مطالعه رشد یافته در محیط آبگوشت BHI، به مدت ۳ ساعت تحت تأثیر بالاترین غلظت نیسین استفاده شده در این مطالعه (۰/٥ µg/ml) در دمای ۲٥ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس نمونه های باکتریایی پس از برداشت از محیط کشت بوسیله محلول گلوترآلدهید ۲/٥ درصد به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد فیکس اولیه شدند. نمونه ها با محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (PBS) ۳ بار شستشو داده شده و با کمک سانتریفیوژ با دور پایین (۳۰۰۰rpm) به مدت ۱۰ دقیقه پلت های باکتریایی تهیه شد. به منظور فیکساسیون ثانویه نمونه ها به مدت یک ساعت در محلول تتروکساید اوسمیوم (osmium tetroxide) یک درصد قرار داده شدند. در ادامه نمونه ها ۳ بار بوسیله محلول PBS شستشو شده و پس از آبگیری در غلظت های الکل (استون) در رزین TAAB embedding قالبگیری وسپس. نمونه ها در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت حداقل ٤۸ پلیمریزه شدند. مقاطع با ضخامت ٥۰ نانومتر بوسیله دستگاه اولتراتوم مدل LKB 4801A تهیه شد و دو بار با محلول ۲۰ درصد استات اورانیل در متانول خالص و محلول Reynold (سیترات سدیم و نیترات نقره) به مدت ٤٥ دقیقه رنگ آمیزی شدند. در نهایت نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن (PHILIPS BIOTWIN100) در 75KV مورد مشاهده قرار گرفت و الکترون میکروگراف ها تهیه شد.

آنالیز آماری:

به منظور آنالیز داده های بدست آمده از نرم افزار SPSS 17.0 تحت ویندوز استفاده شد. ارزیابی لگاریتم تعداد باکتری های مورد مطالعه تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین، درجه حرارت و

مدت زمان نگهداری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) انجام گردید. کل آزمایشات سه مرتبه تکرار شد. حداقل اختلاف معنی دار با P <۰,۰۵ مورد پذیرش بود.

یافته ها:

تأثیر عوامل:

در مطالعه حاضر تأثیر بکارگیری نیسین در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتیگراد بر روی بقاء سلول های رویشی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس در سوپ جو تجارتی (بعنوان یک مدل غذایی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج لگاریتم تعداد باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری در نمونه های سوپ جو تجارتی در نمودارهای شماره ٤-١ نشان داده شده است. نمونه های کنترل فاقد نیسین در مدت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، در مورد هر دو باکتری از افزایش رشد ثابتی برخوردار بودند. تأثیر تمامی غلظت های مورد استفاده از نیسین در این مطالعه تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشتند(P<۰/۰۵). کمترین غلظت بکار رفته از نیسین (۰/۱۲۵ µg/ml) در این مطالعه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل از رشد فرم رویشی باسیلوس سرئوس کاست (P<۰/۰۵). اما بطور کلی نیسین در این دما نتوانست بطور کامل رشد باسیلوس سرئوس را مهار کند. درحالیکه در تمام غلظت های بکار رفته از نیسین، رشد سلول های رویشی باسیلوس سوبتیلیس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نسبت به گروه کنترل ممانعت شد. در دمای ۸ درجه سانتیگراد نمونه های حاوی غلظت های µg/ml ۰/۲۵ و µg/ml ۰/۵ نیسین نسبت به گروه کنترل توانستند بطور معنی داری از رشد باسیلوس سرئوس جلوگیری کنند. بالاترین غلظت استفاده شده از نیسین (µg/ml ۰/۵) در روز ٤ نگهداری نمونه های سوپ جو در دمای ۸ درجه سانتیگراد بطور کامل از رشد باسیلوس سرئوس ممانعت بعمل آورد. در مدت نگهداری نمونه های سوپ جو در دمای ۸ درجه سانتیگراد، نیسین در تمام غلظت ها رشد باسیلوس سوبتیلیس را مهار نمود. ممانعت از رشد باکتری توسط غلظت های µg/ml ۰/۲۵ و µg/ml ۰/۵ اختلاف آماری معنی دار را نشان نداد (P<۰/۰۵). در غلظت µg/ml ۰/۵ نیسین حساسیت سلول های رویشی باسیلوس سرئوس نسبت به باسیلوس سوبتیلیس در مدت نگهداری نمونه ها در دمای ۸ درجه سانتیگراد بیشتر بود. در حالی که در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نیسین اثر مهاری بیشتری را بر روی باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باسیلوس سرئوس از خود نشان داد.

جدول شماره ۱: لگاریتم تعداد سلول های رویشی باسیلوس سرئوس تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین (µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۸ درجه سانتیگراد

نیسین	روز های مختلف نگهداری											
	۰	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۰۸±۰/۰۱	۲/٦۹±۰/۰۰	۲/۱۱±۰/۰۳	۱/۹٥±۰/٥٥	۱/۸۸±۰/۰۳	۱/٦۹±۰/۰۰	۱/٤۱±۰/۱۰	۱/۱۰±۰/۱۷	۰/۷۷±۰/۰۰			
۰/۱۲٥	۳/۰۹±۰/۰۱	۲/٥٦±۰/۰۱	۲/۰۱±۰/۰٦	۱/۸۲±۰/۰۳	۱/٦۹±۰/۰۸	۱/۳۲±۰/۰٤	۱/۱۰±۰/۱۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/٥۱±۰/۰۰			
۰/۲٥	۳/۰٦±۰/۰۲	۲/۰۲±۰/۰۲	۱/۳۸±۰/۰۸	۱/۲۰±۰/۱۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۷۷±۰/۰۰						
۰/٥	۳/۰٥±۰/۰۱	۱/۷۹±۰/۰۸	۱/۲۲±۰/۰۲	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/٦۳±۰/۰۰							

جدول شماره ۲: لگاریتم تعداد سلول های رویشی باسیلوس سرئوس تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین(µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

نیسین	روز های مختلف نگهداری											
	۰	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۰۹±۰/۰۱	٦/٥۳±۰/۰۰										
۰/۱۲٥	۳/۰۷±۰/۰۰	۲/۹٥±۰/۰۰	۳/۱٤±۰/۰۰	۳/۸٥±۰/۰۰	٥/۲٥±۰/۰۰	٦/٥٥±۰/۰۰						
۰/۲٥	۳/۰٥±۰/۰۱	۲/۸٤±۰/۰۰	۳/۰۲±۰/۰۱	۳/۸۰±۰/۰۱	٤/۱۱±۰/۰۰	٥/۲۰±۰/۰۰	۷/۰۷±۰/۰۰					
۰/٥	۳/۰۲±۰/۰۱	۲/۲٤±۰/۰۱	۲/۰۹±۰/۰۲	۲/۸۰±۰/۰۰	۳/۱۱±۰/۰۱	٤/۰۳±۰/۰۰	٥/۳۰±۰/۰۰	۷/۳۹±۰/۰۰				

جدول شماره ۳: لگاریتم تعداد سلول های رویشی باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین(µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۸ درجه سانتیگراد

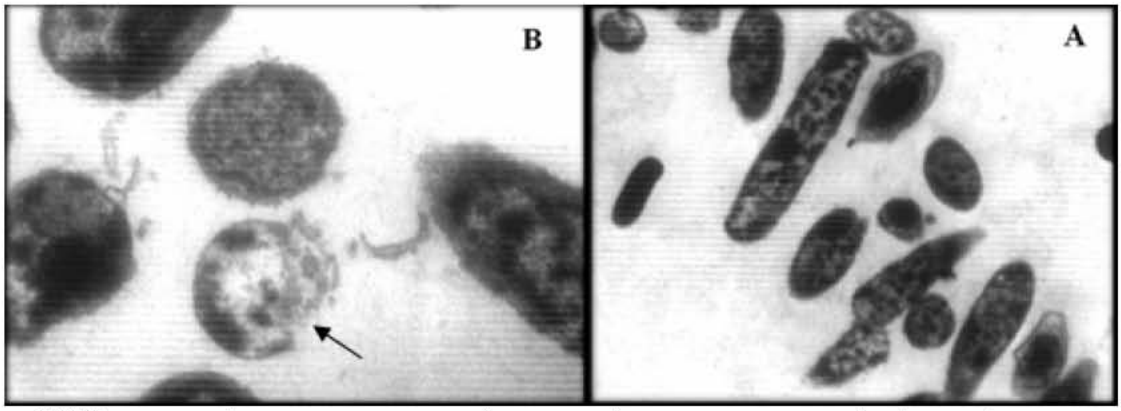
نیسین	روز های مختلف نگهداری											
	۰	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۱۰±۰/۰۰	۳/۱۹±۰/۰۰	۳/۰۰±۰/۰۰	۲/۸۷±۰/۰۰	۲/۰٤±۰/۰۳	۱/۸۰±۰/۰۳	۱/۷۷±۰/۰۷	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۷۱±۰/۰۵			
۰/۱۲۵	۳/۰۹±۰/۰۰	۲/۸۵±۰/۰۰	۲/٦۰±۰/۰۱	۲/۳۰±۰/۰۲	۱/۸٤±۰/۰٦	۱/۲۲±۰/۲۰	۰/٦۳±۰/۰۰					
۰/۲۵	۳/۰۱±۰/۰۲	۲/۸۲±۰/۰۰	۲/٤۹±۰/۰۱	۲/۱۷±۰/۰۲	۱/۱۷±۰/۱۰	۰/۵۱±۰/۰۰						
۰/۵	۳/۰۲±۰/۰۱	۲/۷۵±۰/۰۰	۲/٤۰±۰/۰۰	۲/۰٤±۰/۰۳	۱/۲۲±۰/۲۰	۰/٤۹±۰/۰۰						

جدول شماره ٤: لگاریتم تعداد سلول های رویشی باسیلوس سوبتیلیس تحت تأثیر غلظت های مختلف نیسین (µg/ml) نگهداری شده در سوپ جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

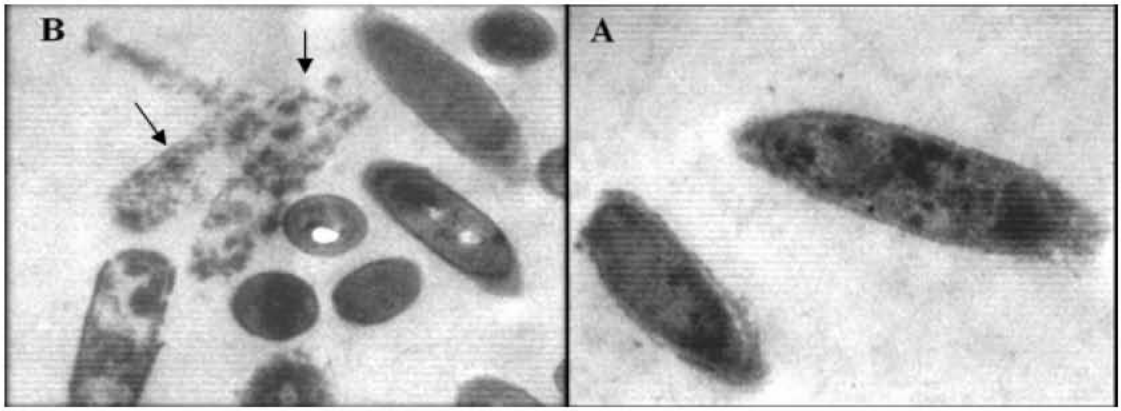
نیسین	روز های مختلف نگهداری											
	۰	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
۰	۳/۰۸±۰/۰۰	٦/۷٦±۰/۰۰										
۰/۱۲۵	۳/۰۲±۰/۰۰	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/٦۸±۰/۰۰									
۰/۲۵	۳/۰٤±۰/۰۱	۰/۳٦±۰/۰۰										
۰/۵	۳/۰۳±۰/۰۰	۰/۳٦±۰/۰۰										

ارزیابی فوق ریزبینی:

تصاویر باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس شامل گروه های کنترل (بدون تیمار) و تیمار شده (بالاترین غلظت نیسین) گرمخانه گذاری شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در محیط آبگوشت BHI در تصاویر شماره ۱و ۲ نشان داده شده است. در گروه کنترل ساختار کامل سلول های باکتری های مورد مطالعه با دیواره مشخص و سیتوپلاسم یکپارچه نشان داده شده است. نیسین موجب تخریب دیواره سلولی باکتری های مورد مطالعه و خروج محتویات سلولی آنها شده است. آسیب سلولی در باسیلوس سوبتیلیس بیشتر نمایان بوده به گونه ای که علاوه بر پارگی دیواره سلولی، سیتوپلاسم سلول های رویشی باکتری دچار از هم پاشیدگی شده است.



تصویر شماره ۱- الکترون میکروگراف باسیلوس سرئوس، گروه کنترل A، سلول با دیواره سالم و یکنواخت (x 3400) و تیمار نیسین B ، تخریب دیواره سلولی و خروج محتویات سلولی (فلش) (x 9700)



تصویر شماره ۲- الکترون میکروگراف باسیلوس سوبتیلیس، گروه کنترل A، دیواره سلولی کامل و سیتوپلاسم یکپارچه (x 7400) و تیمار نیسین B، ، تخریب کامل دیواره سلولی و از هم گسیخته سیتوپلاسم سلول (فلش) (x 7400)

بحث:

ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی بطور کاربردی، دارای نقش موثری در کنترل پاتوژن های غذایی می باشند. بنابراین برای تأیید اثر آنها می بایست فعالیت آنها به تنهایی و در ترکیب با سایر فاکتورهای محافظتی در محیط های غذایی مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۱ و ۱۲). مطالعات گسترده حاکی از تأثیر بالقوه بکارگیری نیسین به همراه سایر روش ها و ترکیبات در جهت محافظت از مواد غذایی می باشد (۱۵-۱۳). با توجه به نتایج این مطالعه نیسین در تمامی غلظت های مورد بررسی دارای اثر ممانعت کنندگی بر روی رشد فرم رویشی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس بود. اتیبی و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که غلظت های مورد نیاز برای کنترل رشد باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و لیستریا مونوسیتوژنز در صورت بکارگیری توأم نیسین با سایر ترکیبات ضدمیکروبی می تواند کاهش یابد (۱۶). هدف اولیه و اصلی نیسین برای ممانعت از رشد باکتری ها، لیپید نوع II غشاء سیتوپلاسمی باکتری های گرم مثبت می باشد که از طریق تأثیر بر روی آن سبب افزایش نفوذپذیری در غشاء و ایجاد روزنه در آن می گردد. در نهایت این مسئله منجر به خروج سریع مولکول های کوچک و ترکیبات حیاتی داخل سلولی و مرگ سلول می شود (۱۷ و ۱۸). در مطالعه صورت گرفته توسط پریاگو و موزلار (۲۰۰۱) تأثیر نیسین همراه با کارواکرول در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بیشتر از ۸ درجه سانتیگراد در محیط آبگوشت BHI بود. همچنین آنها نشان دادند که نیسین در درجه حرارت ۸ درجه دارای تأثیر کمتری بر روی سلول های رویشی باسیلوس سرئوس می باشد که این ناشی از تغییرات در غشاء سلولی باکتری بعنوان هدف نیسین، در این دما می باشد (۱۹). در حالیکه راجکویک و همکاران (۲۰۰۵)، نشان دادند که با کاهش دما اثر ممانعت کنندگی نیسین همراه با کارواکرول بر روی سویه های باسیلوس سرئوس در محیط کشت آزمایشگاهی افزایش می یابد. که با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیسین در دمای پایین موجب مهار هر دو باکتری نسبت به گروه کنترل شد اما میزان تأثیر نیسین روی باسیلوس سوبتیلیس در دمای بالا (۲۵ درجه سانتیگراد) به مراتب بیشتر بود که می تواند ناشی از تغییرات غشاء

باکتری در این دما و حساسیت آن باشد (۲۰). دما بعنوان یکی از فاکتورهای محافظتی در تکنولوژی هاردل می تواند رشد میکروارگانیسم ها در مواد غذایی را به تأخیر بیاندازد. در مطالعات متعدد صورت گرفته کاهش دما تأثیر ممانعت کنندگی نیسین روی باکتری های پاتوژن را کاهش داده است که این امر ناشی از کاهش سیالیت غشاء سلولی این باکتری ها می باشد (۲۱ و ۲۲). موسوی و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که با افزایش دما بطور معنی داری تأثیر ضدمیکروبی نیسین بر روی استافیلوکوکوس اورئوس کاهش می یابد (۹). در مطالعه حاضر اثر ممانعت کنندگی نیسین روی باکتری های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس در نمونه های سوپ جو حاوی غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ مشاهده گردید. سولوماکوس و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فعالیت ضدمیکروبی نیسین بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در گوشت چرخ شده گاو وابسته به فاکتور هایی مانند ترکیبات ممانعت کننده همراه، دمای نگهداری و سویه باکتری بکار گرفته شده در مطالعه می باشد (۲۳). نتایج بررسی ساختار باکتری مورد مطالعه تحت تأثیر نیسین بوسیله میکروسکوپ الکترونی (TEM) مبین آن است که نیسین با آسیب رسانی و تخریب غشاء سلولی باکتری ها و صدمه به سیتوپلاسم آنها زمینه را برای نابودی باکتری توسط سایر عوامل فراهم می کند. بدلیل وجود اختلاف در محتوای فسفولیپیدها و ترکیب اسیدهای چرب غشاء سلول باکتری که منجر به عدم توانایی نیسین در ایجاد روزنه در غشاهای سخت و محکم می شود، میزان اثر گذاری نیسین در سویه های مختلف باکتری ها متفاوت می باشد (۲۶-۲۴). چنانکه در این مطالعه باسیلوس سوبتیلیس نسبت به باسیلوس سرئوس بیشترین آسیب را از خود نشان داد. در صورت بکارگیری نیسین در مواد غذایی وجود برخی ترکیبات در غذا می تواند سبب تغییر در فعالیت ضدمیکروبی نیسین شود.

نتیجه گیری:

بعنوان نتیجه گیری کلی، مطالعه حاضر نشان داد که بکارگیری نیسین در دماهای پایین می تواند مانع از رشد سلول های رویشی باکتری های مورد مطالعه در سوپ جو تجارتی شود و در صورت استفاده توأم آن با سایر ترکیبات ضدمیکروبی می توان به یک اثر سینرژیستی در دماهای پایین دست یافت. با این وجود برای رسیدن به یک سیستم هاردل متشکل از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی نیاز به بررسی های بیشتری جهت بکارگیری نیسین در مدل های غذایی گوناگون بر علیه پاتوژن های غذایی می باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، جناب آقای هادی قاسم مهدی به خاطر همکاری های بی دریغشان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می آید.

فهرست مراجع:

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emer. Infect. Dis* 1999; 5:607–625.
2. Ray B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative. In: Ray B, Daeschel M, eds. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, Vol. 8. Florida: CRC Press. 1992; pp. 177-205.
3. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Ant. Van Leeuwen* 1996; 69: 193–202.
4. Delves-Broughton J, Gasson MJ. Nisin. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation* (eds V.M. Dillon and R.G. Board). Wallingford: Cab International. 1994; pp. 99–131.
5. Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Developments in nisin research. *Food Research International* 1992; 25:57–66.
6. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Modern food microbiology, 7th edition, Springer Science, Inc., New York, USA. 2005; pp: 583-590.
7. Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Food Microbiology: Fundaments and Frontiers, 3 rd ED. Edited by Doyle M. and Beuchat L. 3rd Edition, ASM Press, Washington, D.C. 2007; pp: 445-456.

8. Choma C, Clavel T, Dominguez H, Razafindramboa N, Soumille H, Nguyen-the C, Schmitt P. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int. J. Food Microbiol* 2000; 55:73–77.
9. Moosavi MH, Basti AA, Misaghi A, Karim G, Zahraei Salehi T, Mostafavi E. Effect of nisin on the growth of *staphylococcus aureus* in commercial barley soup. *Pharmaceutical Sciences* 2009; 15: 235- 240.
۱۰. نصر آ، کسری کرمانشاهی ر، نحوی آ. (۱۳۸٦). بررسی تأثیر اسیدهای آلی و نایسین در غلظت های کمتر از مهار کننده بر رشد سویه باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. دوره ۲، شماره ۱، صفحات: ۳۰-۲۱.
11. Lopez-Malo A, Alzamora SM, Argaiz A. Vanillin and pH synergistic effects on mold growth. *J. Food Sci.* 1998; 63: 143–146.
12. Beuchat LR, Clavero MRS, Jaquette CB. Effects of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. *Appl. Environ. Microbiol*, 1997; 63: 1953-1958.
13. Moosavi MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HA, et al. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International* 2008; 41: 1050–1057.
14. Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 2007; 18(9): 1043-1049.
15. Yamazaki K, Yamamoto T, Kawui Y, Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Int. J. Food Microbiol* 2004; 21: 283-289.
16. Ettayebi K, Yamani EIJ, Rossi-Hassani BD. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicroibial activities in *listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 183(1): 191-195.
17. Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 50: 511–519.
18. Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, De Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by the pore-forming peptide antibiotic. *Science* 1999; 286: 2361–2364.
19. Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol* 2001; 68: 141–148.
20. Rajkovic A, Uyttendaele M, Courtens T, Debevere J. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food microbiol* 2005; 22: 189-197.
21. Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L. Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60: 1962–1968.
22. Thomas LV, Wimpenny JWT. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. *Appl. Environ. Microbiol* 1996; 62: 2006-2012.
23. Solomakos N, Govaris A, Koidis p, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol* 2008; 25; 120-127.
24. Abee T. Pore-forming Bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms.

FEMS Microbiology Letters 1995; 129: 1-10.

25. Castellano P, Farias ME, Holzapfel W, Vignolo G. Sensitivity variations of Listeria strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnol. Lett.* 2001; 23: 605–608.
26. Singh B, Falahee MB, Adams MR. Synergistic inhibition of Listeria monocytogenes by nisin and garlic extract. *Food Microbiol* 2001; 18: 133–139.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۳۰-۲۷

بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به جای سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم

جعفر نویدمهر [۱]، سعید زیبایی [۱]، مسعود صالح مقدم [۲]، فضل الدین فهیمی مقدم [۲]

۱) هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
۲) هیأت علمی دانشگاه پیام نور مشهد
۳)آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان **حضرت ابوالفضل(ع) کاشمر**
نویسنده رابط:فضل الدین فهیمی مقدم، آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان حضرت ابوالفضل(ع) کاشمر
تلفن:۵-۰۵۳۲۸۲۳۸۳۰۰ و ۰۹۱۵۳۳۲۰۱۸٤ -fahimimf1@mums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۲/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۶/۲۰

چکیده:

زمینه و اهداف: از جنسهای مهم خانواده مایکوپلاسماتاسه، جنس اوره آپلاسما می باشد که حدود شش گونه را در خود جای داده است. در میان این شش گونه، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از انسان جدا شده است که به صورت فرصت طلبانه، قادر به ایجاد بیماریهایی چون اورتریت، سقط جنین، سندروم تنفسی در نوزادان و ناباروری در انسان می باشد. راه اصلی تشخیص این باکتری، کشت از نمونه های کلینیکی می باشد. اما به دلیل سخت و پرهزینه بودن کشت این ارگانیزم، آزمایشگاهها چندان راغب به انجام کشت برای تشخیص این باکتری نمی باشند. از دلایل مهم کشت مشکل و هزینه بر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، وجود سرم نرمال اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت این باکتری می باشد. در این مطالعه تلاش گردید تا با معرفی یک جایگزین ارزان و مناسب به جای سرم اسب از سختی و هزینه بری کشت این باکتری کاسته شود. در این تحقیق، شیرخشک انسانی به عنوان این ترکیب جایگزین معرفی و مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: جهت بدست آوردن باکتری اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از نمونه برداری واژینال و کشت بر روی PPLO Broth و PPLO Agar استفاده گردید .برای تأیید اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم جداشده از نمونه واژن و تأیید رشد آن بر روی محیط حاوی شیرخشک، علاوه بر توجه به ظاهر کلونی و استفاده از کلرور منگنز، از PCR استفاده گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که محیط حاوی شیرخشک(۱/۲۵ درصد) می تواند جایگزین مناسب برای کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم باشد.

نتیجه گیری : اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم قادر است شیرخشک را به عنوان منبع کلسترول به جای سرم نرمال اسب در محیط کشت خود بپذیرد.

کلید واژه ها: اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، مایکوپلاسما، شیرخشک انسانی، سرم نرمال اسب، PPLO

مقدمه

هرچند که عامل ۵۰ تا ۷۰ درصد از موارد اورتریت غیر گنوکوکي در ایالات متحده ، ناشناخته است اما به نظر مي رسد مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از عوامل معمول اورتریت باشند(۱). اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم تنها گونه اوره آپلاسمایي می باشد که تاکنون از انسان جدا شده و نقش آن در بیماریزایي مورد بررسي قرار گرفته است(۲،۳).این باکتری از زیرمجموعه خانواده مایکوپلاسماتاسه است که اولین بار توسط شپارد Shepard در سال ۱۹۵۴ از اورتریت غیر گنوکوکي مردان جدا گردید(۴،۵).این باکتریها براي رشد، نیاز به حضور مواد غني کننده همچون سرم اسب به عنوان منبع کلسترول در محیط کشت خود دارند. سرم اسب ماده اي است که استحصال و استریل کردن آن نسبتاً سخت و قیمت آن نیز نسبتاً بالا است. در این تحقیق سعي گردید تا با بررسي یك ترکیب جایگزین براي سرم اسب در تهیه محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، لااقل یکي از اصلي ترین مشکلات سر راه کشت و جداسازي این باکتري در آزمایشگاههاي تشخیص طبي مرتفع گردد. ترکیبی که در این مطالعه به عنوان جایگزین سرم اسب در محیط کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم استفاده شد، شیرخشك انسانی است که بسیار فراوان، ارزان و قابل دسترس براي کلیه آزمایشگاههاست.

روش بررسی:

۱- کشت آزمایشگاهي: نمونه هاي کلینیکي واژینال به صورت راندوم از تعدادی زن مبتلا به اورتریت غیرگونوکوکی(NGU) تهیه گردید. نمونه هاي گرفته شده توسط سوآب استریل از نواحي واژن و سرویکس، اخذ و در محیط ترانسپورت قرار داده شدند و به فاصله کمتر از ۲ ساعت در آزمایشگاه مورد آزمایش و بررسي قرار گرفتند. براي کشت نمونه ها از محیط PPLO Broth و PPLO Agar که حاوي عصاره مخمر، فنل رد، اوره و پني سیلین مي باشند و PH آنها روي حدود ۶ تنظیم شده است استفاده گردید. هر نمونه به وسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرون میلي پور به درون محیطهاي براث بطور جداگانه، فیلتر و تخلیه شد. محیطهاي کشت داده شده بلافاصله در انکوباتور ۳۷ درجه سانتي گراد قرار داده شدند و به مدت یك هفته، هر روز محیطهاي فوق مورد بررسي از جهت تغییر رنگ(از زرد به ارغواني) قرار گرفتند. بدست آوردن کلوني در مورد نمونه هاي مثبت بسیار حائز اهمیت است؛ چراکه ممکن است در اثر عوامل دیگري، تغییر PH و درنتیجه تغییر رنگ اندیکاتور PH در محیط حادث گردد. براي تأیید رشد اوره آپلاسما، از محیطهاي تغییر رنگ یافته به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روي محیطهاي جامد PPLO Agar مخصوص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم تلقیح شد. پلیتهاي کشت داده شده در جار مرطوب تأمین کننده ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند و ۴۸ ساعت پس از کشت، هر روز و به مدت یك هفته به لحاظ احتمال رشد باکتري مورد بررسي ماکروسکوپي و میکروسکوپي قرار گرفتند.

کلونیهاي مشاهده شده اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم(شکل۲) بر روي محیط PPLO Agar معمولاً به صورت پرگنه هایي با ظاهر گرانولار و بسیار کوچك بوده و شکل تیپیك «تخم مرغ نیمرویي» را نشان نمي دهند(۶). براي اطمینان بیشتر، کلونیهاي حاصله با محلول کلرور منگنز(که حاوي اوره نیز هست) مجاورت داده شد. در اثر فعالیت اوره آز اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، اوره این معرف مصرف شده و با تولید آمونیاك و واکنش با $MnCl_2$ سبب تولید اکسید منگنز سیاه رنگ و تیره شدن کلونی مي گردد.

۲- کشت بر روي محیط حاوي شیرخشك: بطور همزمان ۴ نمونه واژینال از بیماران مبتلا به NGU بر روي محیط حاوي سرم اسب و محیطهای حاوی درصدهاي مختلف شیرخشك (۲۰، ۱۰،۵، ۲/۵ و ۱/۲۵درصد)، کشت داده شد(مانند شماره۲).

۳- انجام PCR: براي انجام PCR از پرایمرهاي معرفي شده از ژن ساختماني آنزیم اوره آز اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم (ناحیه اي با ۴۲۹ جفت باز)استفاده گردید(۷،۸) پرایمرها از کشور دانمارك(شرکت TAG Copenhagen) تهیه شد. ترادف بازی پرایمرها عبارتنداز :

U5 Sense (forward; 5'-
CAATCTGCT CGTGAAGTATTAC-3').
U4 Antisense (reverse; 5'-
ACGACGTCCATAAGCAACT-3').

.در این تحقیق، براي استخراج DNA از نمونه هاي کشتي که ظاهراً مثبت بودند از روش استخراج DNA از نمونه بالیني براساس روش Cadieux (۴) استفاده گردید.: یك میلي لیتر نمونه براث تغییر رنگ یافته (ارغواني شده) که ظاهراً از لحاظ اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت بود، ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویي آن خالي گردید. سپس رسوب ته میکروتیوب توسط بافر PBS سه بار شستشو داده شد و پس از مخلوط نمودن رسوب مزبور با ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل، نمونه کاملاً هموژن گردید. سپس میکروتیوب مذکور، ۱۰ دقیقه در دماي ۹۶ درجه قرار داده شد و ۷ میکرولیتر از آن مستقیماً براي PCR استفاده گردید.PCR با استفاده از کیت خشك حاوی کلرور منیزیوم، دزوکسي نوکلئوتید تري فسفاتها و آنزیم Taq پلي مراز(که با نسبتهاي مشخصي با هم مخلوط گردیده اند) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر بافر به میکروتیوب آماده PCR افزوده شد. سپس ۲۰پیکومول از هریك از پرایمرها به همراه ۷ میکرولیتر از DNA استخراج شده به میکروتیوب مزبور اضافه گردید.

این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف) قرار گرفت و برنامه سیکل های حرارتی به قرار زیر تنظیم گردید: برنامه دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل با برنامه دناتوره شدن در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به DNA هدف در ۵۲ درجه به مدت ۱ دقیقه

و طویل شدن در ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه. مرحله extention نهايي ۱۰ دقيقه در ۷۲ درجه بود(۴).

يافته ها:

پس از کشت همزمان ۴ نمونه واژينال بر روي محيط حاوي سرم اسب و بر روی محیطهای حاوی غلظتهای مختلف شیرخشک(۲۰درصد، ۱۰درصد، ۵درصد، ۲/۵درصد و ۱/۲۵درصد)، در دو نمونه تغيير رنگ محيط(از زرد به قرمز در محيط سرم دار و ازسفيد شيري به قرمز کدر در محيطهاي شيرخشك دار) رخ داد. در هردوي نمونه هاي مثبت ذکر شده، الگوي رشد جالبي رخ داد. يعني پس از گذشت حدود ۶۰ ساعت، تغيير رنگ محيط در محيطهاي براث مشاهده شد اما فقط در محيط سرم دار و همزمان در محيط حاوي۱/۲۵درصد شير خشك. در روز چهارم تغيير رنگ محيط شير خشك دار ۲/۵ درصد و در روز پنجم تغيير رنگ محيط شير خشك دار ۵ درصد مشاهده گرديد. در روز ششم هيچ تغيير رنگي در محيط ۱۰ و ۲۰ درصد شيرخشك ديده نشد، تا اينكه در روز هفتم (در يكي از نمونه ها ابتداي روز و در نمونه ديگر با حدود ۴ ساعت تأخير)، در محيط ۱۰ درصد شيرخشك هم تغيير رنگ – هرچند نه به شدت لوله هاي ديگر – مشاهده گرديد. اما در محيط ۲۰درصد شيرخشك حتي با افزايش زمان گرمخانه گذاري تا ده روز هم تغييري در رنگ محيط مشاهده نشد.جالب اينجاست كه PH محيط هم فقط حدود ۰/۳ در لوله۲۰ درصد شيرخشك افزايش يافته بود كه اين تغيير PH اولاً مي توانست احتمالاً به دليل تغيير غلظت محيط در اثر تبخير و يا افزودن فيلتره نمونه ها صورت گرفته باشد و ثانياً آنقدر نبود كه بتواند تغييري در رنگ انديكاتور فنل رد ايجاد نمايد.

پس از شمارش کلونیهای حاصل از هر دو نمونه، نتایج آمده در جدول و نمودار ذیل(۱) حاصل شد.

در ادامه کار با توجه به کشت اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در محیطهای کشت با غلظتهای مختلف شیرخشک، رشد باکتری در غلظتهای ۱۰درصد، ۲/۵ درصد و ۱/۲۵درصد و نیز عدم رشد باکتری در غلظت ۲۰درصد شیرخشک، علاوه بر کشت و بررسی حضور کلونی، با PCR نیز مورد بررسی و تأیید نهایی قرار گرفتند. تصویر ۱، ژل اسکن شده حاصل از این بررسی را نشان می دهد.

بحث:

تلاشهايي براي جايگزين كردن ماده اي ارزان تر، سهل الوصول تر و فراوان تر از سرم اسب در محيط كشت مايكوپلاسما صورت پذيرفته است. از جمله مي توان به تحقيقاتي كه نويدمهر و همكاران براي جايگزيني شيرخشك و عصاره برخي دانه هاي گياهي(مانند كنجد و بادام) به جاي سرم اسب در محيط كشت مايكوپلاسما و زرده تخم مرغ در پرويز، ۱۳۷۵، ميكروبشناسي پزشكي، تهران، انتشارات نشر ايران، چاپ چهارم، صص ۳۰-۲۹.

محيط كشت اوره آپلاسما اوره آليتيكوم انجام داده اند اشاره نمود(۹). در مطالعه اي كه حكيمي در سال ۱۳۸۷ بر روي ميزان كلسترول موجود در منابع مختلف از جمله شيرخشك انجام داده است، ميزان كلسترول شيرخشك با دو روش مختلف حدود ۱۱/۹ ميلي گرم بر ميلي ليتر محاسبه نموده است(۱۰).در مطالعه اي كه توسط نويد مهر و همكاران صورت پذيرفته، نشان داده شده است كه با جايگزيني شيرخشك به جاي سرم نرمال اسب در محيط كشت مايكوپلاسما آگالاكتيه ميزان رشد اين باكتري تقريبا مشابه با محيط حاوي سرم اسب بوده و حتي قطر كلونيهاي رشد يافته برروي محيط حاوي شيرخشك از محيط سرم دار بزرگتر بوده است(۱۱).

رشد اوليه اغلب مايكوپلاسماها در محيط براث، با ايجاد كدورت جزئي تشخيص داده مي شود كه اين مسأله با توجه به كدورت زيادي كه شيرخشك در محيط ايجاد مي نمايد در تضاد بوده و عملاً تشخيص رشد اوليه باكتري را از روي وجود كدورت، غيرممكن مي سازد؛ و اين درحالي است كه رشد اوليه اوره آپلاسما اوره آليتيكوم در محيط براث، با تغيير رنگ محيط از زرد به قرمز ارغواني مشخص مي شود كه در اين تحقيق معلوم گرديد كه شيرخشك- و كدورت ناشي از آن- هيچ تأثيري در ايجاد و مشاهده اين تغيير رنگ ندارد. نتايج اين مطالعه حاكي از آن است كه اوره آپلاسما اوره آليتيكوم عليرغم توانايي رشد بر روي محيط كشت حاوي شيرخشك، توانايي خود را در تكثير بر روي محيط كشتهاي با غلظت زياد شيرخشك از دست مي دهد و نتيجتاً يافتن غلظت مناسب شيرخشك جهت استحصال بهترين رشد و با كمترين اختلاف نسبت به سرم اسب، كار تحقيقاتي جديد و گسترده تري را مي طلبد تا علاوه بر كشف شدن دليل ناتواني رشد اين باكتري در غلظتهاي بالاي شيرخشك، فرموله كردن اين تركيب به عنوان يك ماده جايگزين براي سرم نرمال اسب در محيط كشت اوره آپلاسما اوره آليتيكوم مورد بررسي قرار گيرد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در محیط فاقد سرم اسب که شیرخشک جایگزین آن شده است قادر به رشد بوده و این باکتری مشکل پسند، شیرخشک را به عنوان منبع کلسترول در محیط، به خوبی می پذیرد؛ نشان داده شد که اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در محیط حاوی غلظت ۱/۲۵ درصد شیرخشک(در بین دیگر غلظتهای مورد بررسی) بهترین رشد را داشته و نتایج تحقیق نشان می دهد که در محیط کشت این باکتری می توان از شیرخشک به جای سرم نرمال اسب استفاده نمود.

فهرست مراجع:

۱. ادیب فر، پرویز، ۱۳۷۵، میکروبشناسی پزشکی، تهران، انتشارات نشر ایران، چاپ چهارم، صص ۳۰- ادیب فر،

2. Blanchard A, Henstehel J , Duffy L, et al. Detection of Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin Infect Dis 1993;17(supplI):48-53.

۳- نويدمهر،جعفر،۱۳۸۰،معرفي جايگزينهاي مناسب براي سرم نرمال اسب در محيط كشت مايكوپلاسماها، چهارمين كنگره ميكروبشناسي، دانشگاه شاهد، دانشكده پزشكي.

4.Shepard, M.C; C.D. Lunceford, D. K. Ford, R. H.Purcell, D. Taylor-Robinson, S.Razin, and F.T.Black.1974. Ureaplasma urealyticum gen.nov; J. Syst. Bacteriol.24:160-171.

۵- حكيمي،عبدالمجيد،بهمن ۱۳۸۷، بررسي ميزان كلسترول و استخراج آن از منابع مختلف جهت مصارف بيولوژيك، پايان نامه كارشناسي ارشد بيوشيمي.

6.Cassell GH,Waites KB, Watson HL, Crouse DT , Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* interauterine infection: Role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993; *6*: 69-87.

7. Elisabeth Eilers, Annette Moter, Renate Bollmann, Dieter Haffner, and Uwe Querfeld.Journal of Clinical Microbiology, Intrarenal Abscesses Due to Ureaplasma urealyticum in a Transplanted Kidney ,March 2007, p. 1066-1068, Vol. 45, No. 3.

8. R A Almeida and R F Rosenbusch;Capsulelike surface material of Mycoplasma dispar induced by in vitro growth in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed in vivo. Infect Immun. 1991 September; 59(9): 3119–3125.

9. Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK. Ureaplasma urealyticum gen.nov:Proposed For the human T mycoplasma. Int J Syst Bacterial 1974;24:160-171.

10.Gerald W.Stemke and janet A.Robertson; Ureaplasma gallorale , an Isolate from Chickens, Is most closely related to the human isolate, Ureaplasma urealyticum; International Journal of Systematic Bacteriology, Oct.1996. p.1183-1184.

۱۱. نجار پيرايه ، شهين ؛ و همكاران ؛ مقايسه PCR با كشت براي تشخيص اوره آپلاسما اوره آليتيكوم در نمونه هاي تناسلي مردان نابارور. مجله پژوهشي حكيم ؛ پاييز ۸۶ ، دوره دهم ؛ شماره سوم.۵۲-۴۸.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۳۷-۳۱

ارزیابی بقاء لیستریا مونوسیتوژنز طی فرآیند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید پروبیوتیک دار ایرانی

رزاق محمودی [۱]، علی احسانی [۱]

۱) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
نویسنده رابط: : علی احسانی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
همراه: ۰۹۱٤٤٤۳۳۳۷۵ a.ehsani@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۲/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۵/۱۶

چکیده:

زمینه و اهداف: افزایش بیماریهای غذا زاد، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل از آن، سبب انجام تحقیقات گسترده‌ای برای تولید غذای سالم و توسعه عوامل ضدمیکروبی جدید شده است، که در این میان کاربرد پروبیوتیک ها و باکتریوسین ها، به عنوان افزودنی های بیولوژیک به طور گسترده ای حائز اهمیت می باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی رفتار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و نیز بررسی ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی در پنیر سفید پروبیوتیک ایرانی می باشد.

روش بررسی: رشد لیستریا مونوسیتوژنز و نیز ماندگاری باکتری پروبیوتیک مذکور در مراحل مختلف تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی با استفاده از محیط های کشت اختصاصی ارزیابی شد.

یافته ها: ۱۶ در تیمار پنیر دارای پروبیوتیک و فاقد استارتر بیشترین کاهش در شمارش لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد. همچنین در تیمار پنیر شاهد در مقایسه با تیمار پنیر حاوی لیستریا مونوسیتوژنز ماندگاری باکتری پروبیوتیک بالاتر بود.

نتیجه گیری : شمارش لیستریا مونوسیتوژنز درطول دوره رسیدن پنیر سفید پروبیوتیک کاهش یافته ولی با این حال در پنیر سفید پروبیوتیک بقاء می یابد، شمارش باکتری پروبیوتیک مذکور درطول دوره رسیدن پنیر سفید تنزل یافت اما میزان آن در انتهای دوره رسیدن و نگهداری به کمتر از 10^6 cfu/g نرسید.

کلید واژه ها: پنیر سفید ایرانی، لیستریا مونوسیتوژنز، پروبیوتیک، استارتر

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری Food born pathogen بوده، و مسمومیت‌های حاصل از آن بیشتر در اثر مصرف شیر و فرآورده های آن به ویژه پنیر اتفاق می افتد (۱). در ایالت متحده آمریکا بیش از ۲۵ درصد مرگ و میر حاصل از Food born disease را لیستریوز به خود اختصاص می دهد، که در این میان شیر و محصولات لبنی بسیار حائز اهمیت می باشند(۲). ویژگی‌هایی همچون پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دامنه وسیعی از pH، شرایط یخچال و تحمل مقادیر بالای نمک، این باکتری را به عنوان پاتوژن بسیار خطرناک در صنعت مواد غذایی مطرح نموده است. توجه به سلامت برخی نگاهدارنده های شیمیایی و عکس العمل منفی مصرف کنندگان به نگاهدارنده های شیمیایی، باعث افزایش تمایل به ترکیبات محافظت کننده طبیعی با منشا میکروبی و گیاهی شده است(۱). در همین راستا، راهکارهای مختلفی جهت کنترل این پاتوژن در صنایع لبنی پیشنهاد شده است، که در این میان کاربرد پروبیوتیک ها و باکتریوسین ها، به عنوان افزودنی های بیولوژیک به طور گسترده ای مورد مطالعه قرارگرفته است(۳). باکتری‌های لاکتیک و بیفیدوباکترها معمول‌ترین پروبیوتیک‌هایی هستند که در فرآورده های لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ویژگی های از قبیل مقاومت به شرایط اسیدی معده، فعالیت باکتریسیدی املاح صفراوی و نیز تولید اسید لاکتیک سبب بقا آنها در بخش دستگاه گوارش می گردد. از جمله مزایای بالقوه غذاهای پروبیوتیک در سلامتی انسان می توان به مواردی همچون بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، ممانعت از رشد میکروارگانیسم های پاتوژن، تقویت سیستم ایمنی، بر طرف کردن اختلالات گوارشی، بهبود سندرم روده تحریک پذیر، سم زدایی و محافظت در مقابل سموم اشاره نمود. فعالیت ضد میکروبی باکتری های پروبیوتیک، سبب گسترش استفاده آنها در تولید محصولات Functional Foods در جهت بهبود سلامتی مصرف کنندگان گردیده است(۵). باکتری های لاکتیک تولید کننده باکتریوسین بخشی از میکروفلور دستگاه گوارش بوده و در مقاومت میزبان نقش بسیار مهمی را ایفا می نمایند. این میکروارگانیسم ها از طریق رقابت در سایت چسبندگی در دستگاه گوارش، رقابت در جذب مواد مغذی و نیز از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند باکتریو سین ها و اسید های چرب زنجیر کوتاه مانع از رشد و کلنیزاسیون ارگانیسم های پاتوژن در دستگاه گوارش می گردند(٦). باکتری های لاکتیک تولید کننده باکتریوسین (از جمله لاکتوباسیلوس کازئی وسایر گونه‌های لاکتوباسیلوس ها) و باکتریوسین ها می توانند به عنوان محافظت کننده های زیستی جهت مهار رشد لیستریا مونوسیتوژنز در انواع مختلفی از مواد غذایی بویژه فرآورده های لبنی تخمیری همچون پنیر و ماست مورد استفاده قرار گیرند(۷،۸). هدف از این مطالعه ارزیابی رفتار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و نیز بررسی ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی در مراحل مختلف تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید پروبیوتیک ایرانی می باشد.

روش بررسی:

آماده سازی ومحاسبه میزان تلقیح باکتری لیستریا مونوسیتوژنز: باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 19118 تهیه شده از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده گردید. به منظور محاسبه میزان باکتری لازم (10^3 CFU/ml) جهت تلقیح در شیر از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٠٠ نانومتر و شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی استفاده گردید(۹).

آماده سازی استارتر پنیر و باکتری پروبیوتیک: استارتر پنیر Chr. Hansen R 704(استارتر مزوفیل شامل *Lactococcus lactis sub sp. cremoris* و *Lactococcus lactis subsp. diacetilactis* تهیه شده از شرکت کریستین هانس دانمارک) استفاده گردید. باکتری لاکتوباسیلوس کازئی تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، بعنوان پروبیوتیک استفاده شد. محاسبه میزان باکتری پروبیوتیک لازم (10^9 CFU/ml -10^8) جهت تلقیح در شیر طبق روش استاندارد انجام گرفت (۷).

تولید پنیر سفید ایرانی: برای تهیه پنیر سفید، ابتدا شیر تازه و کامل گاو (تهیه شده از دامداری صنعتی دانشگاه ارومیه) پاستوریزه گردید. سپس دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتیگراد رسانده و در هر یک از ظروف استریل مخصوص تهیه پنیر مقدار ۵ لیتر از شیر ریخته شد. سپس باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با دوز مورد نظر(10^3cfu/ml) به نمونه‌های شیر آماده شده تلقیح گردید. پس از آن، استارتر به مقدار ۰/۵ درصد (حجمی/ حجمی) و باکتری پروبیوتیک مورد مطالعه به میزان cfu/ml 10^9 - 10^8 همزمان به نمونه‌های شیر اضافه شدند، و پس از گذشت نیم ساعت مقدار ۰/۰۲ درصد (وزنی/ حجمی) از کلرید کلسیم اضافه گردید. نهایتاً پس از آنکه pH شیر به ۵/٦ رسید، رنت میکروبی (میتو، ژاپن) به مقدار ۰/۰۰۱ درصد (وزنی/ حجمی) پس از حل نمودن آن در آب مقطر استریل به شیر افزوده شد. به منظور کارایی بهتر رنت

میکروبی (Meito, Sangyo., Japon)، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتیگراد حفظ شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده، برش داده شده وطبق دستورالعمل پنیر سفید ایرانی آبگیری شد. سپس قطعات لخته آبگیری شده در آب نمک ۲۰ درصد (وزنی/ حجمی) استریل بمدت ۸ ساعت قرار گرفت. بعد از آن، نمونه های پنیر ضمن انتقال به آب نمک ۸ درصد استریل، تا ۱۵ روز در دمای ۱٤-۱۲ درجه سانتیگراد و پس از طی دوره رسیدن اولیه جهت دوره رسیدن نهایی نمونه‌ها به مدت ٤٥ روز در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

ارزیابی رفتار رشد لیستریا مونوسیتوژنز: به منظور شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در طی مراحل مختلف تولید و رسیدن پنیر سفید (بلافاصله پس از تلقیح، در انتهای مرحله آبگیری و روزهای ۷، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠) از محیط آگار انتخابی لیستریا پالکام به روش کشت سطحی و گرمخانه گذاری به مدت ۲٤ الی ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید.

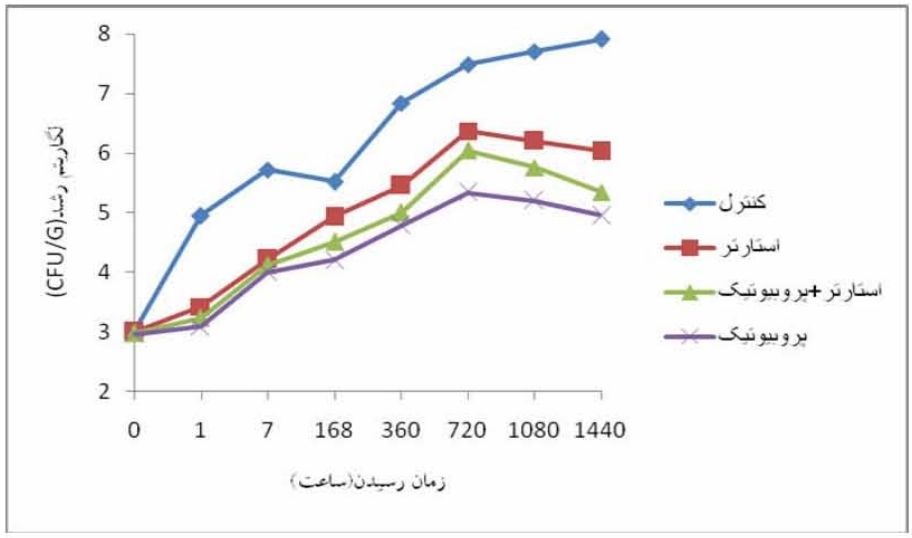
ارزیابی ماندگاری باکتری پروبیوتیک: ارزیابی ماندگاری باکتری پروبیوتیک در طی مراحل مختلف تولید و رسیدن پنیر سفید (بلافاصله پس از تلقیح، در انتهای مرحله آبگیری و روزهای ۷، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠) طبق روش استاندارد انجام گرفت(۷).

ارزیابی حسی: پنیر سفید تهیه شده (تیمار واجد پروبیوتیک و فاقد لیستریا و تیمار کنترل) به هفت قسمت (هر قسمت شامل ۵۰۰ گرم پنیر در ظروف سفید و تمیز) تقسیم گردید. ارزیابی حسی بوسیله یک پانل هفت نفره که عمدتاً از کارکنان و اعضای گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه بودند، صورت پذیرفت. برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن پروبیوتیک به پنیر سفید ایرانی از آزمایش پذیرش حسی استفاده گردید(۱۰).

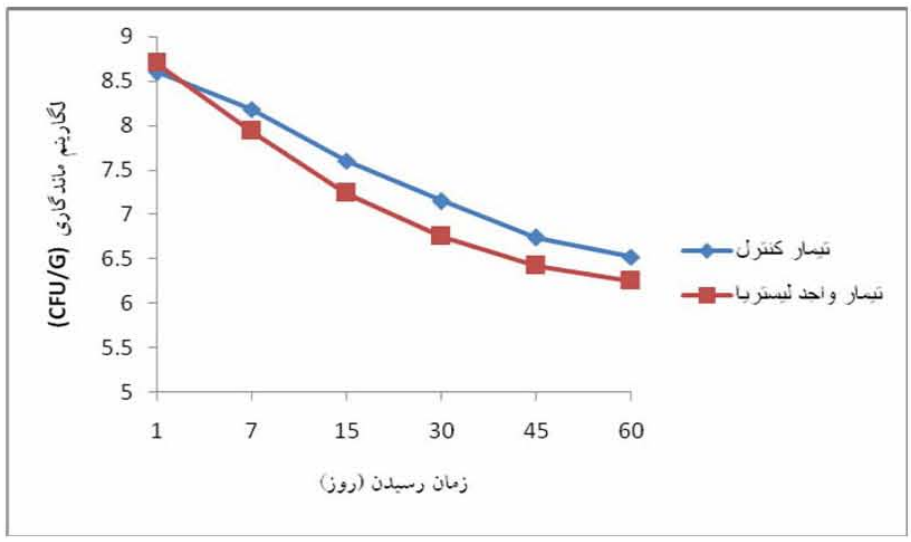
تحلیل آماری: کلیه آزمایش ها در سه تکرار انجام گردید. ارزیابی رفتار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و ماندگاری باکتری پروبیوتیک مورد مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و تفاوت در بررسی های ارگانولپتیک مورد نظر نیز با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و (Least Significant Difference Procedure) LSD صورت گرفت، لازم به ذکر است تمام تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS۱۷ انجام شد. نتایج معنی دار در $p< ۰/۰۵$ مد نظر قرار گرفت.

یافته ها

ارزیابی حاصل از شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در کلیه تیمار ها در طی دوره رسیدن پنیر در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در تیمار پنیر دارای باکتری پروبیوتیک و فاقد استارتر بیشترین کاهش در میزان شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با سایر تیمار ها مشاهده شد($p<۰/۰۵$). در تیمار مذکور در پایان دوره رسیدن پنیر سفید میزان کاهش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با گروه کنترل log ۲/۹٦ در هر گرم پنیر بود، در صورتی که در تیمار های پنیر دارای استارتر و پروبیوتیک و پنیر دارای استارتر میزان کاهش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با تیمار کنترل به ترتیب log ۲/۵۸، log ۱/۸۸ در هر گرم پنیر بود. ماندگاری باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در کلیه تیمارها در مراحل مختلف رسیدن پنیر سفید ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفت(نمودار شماره ۲). در تیمار پنیر کنترل در مقایسه با تیمار پنیر حاوی لیستریا مونوسیتوژنز میزان شمارش باکتری پروبیوتیک بالاتر بود. در تمامی موارد شمارش باکتری پروبیوتیک مذکور بیش از $۱۰^{٦}$ cfu/g پنیر بود($p<۰/۰۵$). ارزیابی خصوصیات حسی تیمار های مختلف پنیر سفید در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بالاترین و کمترین قابلیت پذیرش حسی به ترتیب مربوط به پنیر سفید حاوی لاکتوباسیلوس کازئی دارای استارتر و پنیر سفید فاقد استارتر و پروبیوتیک بود.



نمودار شماره۱- لگاریتم رشد لیستریا مونوسیتوژنز در طی دوره رسیدن پنیر سفید ایرانی در تیمار های مختلف (تیمار کنترل: فاقد استارتر و پروبیوتیک)



نمودار شماره۲- لگاریتم ماندگاری باکتری پروبیوتیک در دوره رسیدن پنیر سفید در تیمار های مورد مطالعه (تیمار کنترل: دارای پروبیوتیک و فاقد لیستریا)

جدول شماره۱- میزان میانگین پذیرش حسی تیمار های مختلف پنیر سفید(A: دارای پروبیوتیک، B: دارای پروبیوتیک و استارتر، C: کنترل، بدون پروبیوتیک و واجد استارتر)

تیمار ها	میانگین پذیرش± انحراف استاندارد
A	۸,۱±۰,۰۰
B	۸,٦٤±۰,۱٤
C	۷,٥٤ ± ۰,۱۱

بحث:

لیستریا مونوسیتوژنز در طی مراحل مختلف تولید و نگهداری محصولات لبنی از قبیل ماست و پنیر تولید شده با کشت های آغازگر به خوبی بقا می یابد(۱۱). با توجه به مطالعه صورت گرفته توسط دبویسر و همکاران (۲۰۰۱) ۱۰ مورد از ٦٤ مورد شیوع بیماری ناشی از مصرف فرآورده های لبنی بواسطه لیستریوز بوده، که در میان این محصولات، ۳۲/۸ درصد آنها از شیر پاستوریزه تهیه شده بودند(۱۱). حضور این باکتری پاتوژن در فرآورده های لبنی تخمیری به دلیل سازگاری آن به شرایط محیط اسیدی، بسیار محتمل می باشد(۱۲). مطالعات انجام شده بر روی پنیر های تولید شده از شیر آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که رفتار این باکتری (رشد، بقا و مهار) در پنیر اساسا به عواملی همچون طبیعت و فعالیت استارتر، میزان کاهش pH و شرایط دما و رطوبت در طی مراحل مختلف تولید، نگهداری و رسیدن وابسته می باشد(۱۳). در مرحله رسیدن پنیر cheddar و مرحله ذخیره سازی پنیر Colby شمار لیستریا مونوسیتوژنز بتدریج از ۳/٥log به ۱/٥ log در هر گرم پنیر کاهش یافت(١٤). در حالیکه در پنیر blue پس از گذشت مدت کوتاهی از تولید آن و در مراحل اولیه رسیدن، شمار آن کاهش یافته و سپس ثابت باقی ماند(۱٥). در طی تولید پنیر Camembert شمار این باکتری به میزان ۱۰ برابر افزایش یافته و در طی مدت ۱۸ روز نخست رسیدن کاهش یافت و در نهایت به دلیل افزایش میزان اسیدیته رشد این باکتری مهار شد(١٦). در زمینه فعالیت ضد میکروبی استارتر تولید کننده نیسین بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر Manchego تولید شده از شیر خام بز، نشان داده شد که در تیمار دارای استارتر مولد نیسین کاهش لیستریا در پایان روز ٦۰ نگهداری پنیر، log ٤/٦۲ و در تیمار دارای استارتر فاقد خصوصیت تولید نیسین log ۱/٦٦ و در تیمار ترکیبی دو حالت قبلی log ۳/۳۱ در هر گرم پنیر بود(۱۷). در مطالعه حاضر بالاترین میزان کاهش لیستریا مونوسیتوژنز در تیمار دارای پروبیوتیک و سپس در تیمار ترکیبی پروبیوتیک و استارتر بود، این یافته با گزارشات موجود در این زمینه تطابق دارد(۱۳،۱٤و ۱۷). ارزیابی ماندگاری باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در مراحل مختلف تولید، رسیدن و نگهداری پنیر soft lactic تهیه شده از شیر میش آلوده شده به این باکتری نشان داد که در طی مرحله رسیدن شمار این باکتری کاهش یافته ولی همچنان در انتهای دوره رسیدن پنیر نرم لاکتیکی قابل جداسازی می باشد(۱۸). در مطالعه حاضر شمار لیستریا مونوسیتوژنز در انتهای دوره رسیدن کاهش یافته ولی با این حال در پنیر بقاء دارد، یافته مذکور با گزارشات موجود در این زمینه مطابقت دارد(۱٥،۱۸). باکتری های لاکتیک مولد باکتریوسین در زمینه تولید غذاهای تخمیری، جهت بهبود خصوصیات حسی، همچنین ممانعت از فساد به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرند، در این میان لاکتو باسیلوس ها به علت داشتن خصوصیاتی از قبیل بهبود و ارتقاء سلامتی میزبان توجه زیادی را به خود جلب کرده اند(٤). جهت استفاده از پروبیوتیک ها در Functional Foods، این ارگانیسم ها باید به هنگام عبور از دستگاه گوارش باقی مانده و همچنین توانایی تکثیر در این بخش را نیز داشته باشند، در این زمینه لاکتوباسیلوس ها به عنوان باکتری های پروبیوتیک دارای توانایی ماندگاری در دستگاه گوارش بوده و همچنین توانایی بهبود تعادل میکروفلور آن را دارند(٤). کاربرد لاکتوباسیلوس کازئی در ترکیب با سایر استارتر های تجاری معمول در صنعت فرآورده های لبنی واجد اثرات ضد میکروبی، ضد توموری و محرک سیستم ایمنی می باشد(۱۹). تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس کازئی در موش های رت آلوده شده با لیستریا

مونوسیتوژنز سبب افزایش ایمنی سلولی گرید(۲۰). همچنین تجویز این باکتری پروبیوتیک در موش های آلوده شده با *E.coli* سبب ممانعت از رشد این باکتری پاتوژن و کاهش عفونت گردید(۲۲،۲۱). شمارش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی ۱۵ روز ابتدایی دوره رسیدن پنیر سفید کاهش بیشتری در مقایسه با سایر روز های دوره رسیدن نشان می دهد، که علت این مسئله را کاهش میزان رطوبت، افزایش میزان نمک و کاهش دمای نگهداری گزارش نمودند(۲۲). در مطالعه حاضر نیز گر چه میزان شمارش باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در طی دوره رسیدن پنیر سفید تنزل یافت اما میزان آنها در انتهای دوره رسیدن و نگهداری به کمتر از 10^6 cfu/g نرسید.

نتیجه گیری:

کاهش در میزان شمارش لیستریا مونوسیتوژنز در طی دوره رسیدن و نگهداری پنیر سفید پروبیوتیک می تواند در نتیجه اثر ترکیبی کاهش pH و فعالیت ضد میکروبی باکتری پروبیوتیک و استارتر مورد استفاده در این مطالعه باشد. با این وجود شرایط محیطی ایجاد شده جهت حذف کامل این پاتوژن در پنیر سفید کافی نمی باشد، بنابراین دست اندرکاران صنعت مواد غذایی جهت اطمینان از سلامتی و پایداری میکروبی محصولات لبنی تخمیری بویژه پنیر سفید نباید صرفا بر پاستوریزاسیون و تخمیر اکتفا نمایند، بلکه افزودنی های مجاز نیز جهت ایجاد شرایط مطلوب در مراحل مختلف تولید و ذخیره سازی مورد استفاده قرار گیرد. ماندگاری باکتری پروبیوتیک مورد مطالعه در انتهای دوره رسیدن پنیر در حد لازم جهت ایجاد اثرات مفید سلامتی بود. همچنین باکتری مذکور بر روی خصوصیات حسی پنیر تاثیرات مثبتی از خود نشان داد. بنابراین پنیر سفید ایرانی بعنوان یک ماده غذایی حامل باکتری های پروبیوتیک بسیار مناسب می باشد.

فهرست مراجع:

1- Smith p, Stewart J and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *J Food Microbiol* 2001; **18**: 463-70.

2- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United states. *Emerg Inf Dis* 1999; **5**: 607-25.

3- Benkerroum N, Oubel H, Zahar M, Dlia S, Filali-Maltouf A. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. lactis and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. *J Appl Microbiol* 2000; **89**: 960-9.

4- Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, FAO/WHO (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Co´rdoba, Argentina. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf

5- Gomes da Cruz A, Buriti FA, Batista de Souza CH, Fonseca Faria JA and Isay Saad SM. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. J Food Science & Technol 2009; **20**: 344-54.

6- Bernbom N, Licht TR, Saadbye P, Vogensen FK and Nørrung B. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *Listeria monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *Int J of Food Microbiol* 2006; **108**: 10 – 14.

7- Phillip SM, Kailasapathy K and Tran L. Viability of comrcial probiotic cultures(*L. aciduphillus*, *Bifidobacterium spp.* , *l. casei*, *l. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int J of Food Microbiol* 2006; **108**: 276-80.

8- Ong L, Henriksson A and Shah NP. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int Dairy J* 2006; **16**: 446–56.

9- Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora Boiss.* essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT- Food Science and Tecnol 2007; **40**(6): 973-81.

10- Meilgaard MC, Civille GV and Carr BT.. *Sensory evalution techniques*. 2nd edition. Crc prees, inc. bocaration, florida1991; PP: 123-130.

11- De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in

food-borne diseases in France and in different industrialized countries, Int J Food Microbiol 2001; **67**: 1-17.

12- Mazzotta AS. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli O157:H7*, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juice, J Food Prot 2001; **64:** 315-20.

13- Maisnier-Patin S, Deschamps N, Tatini SR and Richard J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 1992; **72**: 249-63.

14- Yousef AE, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. *J Food Prot* 1988; **51**: 12-15.

15- Papageorgiou DK, Marth EH. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. J *Food Prot* 1989; **52**: 459-65.

16- Ryser ET, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J Food Pro* 1987a; **50**: 7-13.

17- Rodrıguez E, Gaya P, Nunez M, Medina M. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. Int J of Food Microbiol 1998; **39**: 129–32.

18- Morgan F, Bonnin V, Mallereau MP and Perrin G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. Int J of Food Microbiol 2001; **64**: 217–21.

19- Matsuzaki, TR, Yamazaki S, Hashimoto o and Yokokura T.. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J Dairy Sci 1998; **81**: 48-53

20- de Waard RJ, Garssen GC, Bokken, and Vos JG. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. Int J Food Microbiol 2002; **73**:93-100.

21- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, et al.. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. Infect Immun 2001; **69**:1101-8.

22- Asahara T, Nomoto K, Watanuki M and Yokokura T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. Antimicrob Agents Chemother 2001; **45**:1751-60.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۴۷-۳۸

وضعیت تولیدات علمی محققین ایرانی رشته انگل شناسی در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی

علی اکبر خاصه[۱] ، مهدی فخار [۲]، مسعود سوسرایی[۳] ، سمانه صادقی [٤]

۱) گروه کتابداری دانشگاه پیام نور مرکز صومعه سرا
۲) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی ساری ومرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳) کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران -ساری و سازمان تامین اجتماعی استان گلستان
٤)گروه آمار دانشکده بهداشت ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران،ساری
نویسنده مسئول: دکتر مهدی فخار، ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد ،دانشکده پزشکی ، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ،صندوق پستی ٤٨١٧٥-١٦٦٥
موبایل : ۰۹۱۲۲۵۲۲۷۸۲ mahdif53@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۳/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۵/۱۷

چکیده:

زمینه و اهداف: از مباحث مهمی که در دهه کنونی بدان توجّه وافری شده است مسئله تولید علم می باشدو هدف از این مطالعه، بررسی وضعیت تولیدات علمی محققین ایرانی رشته انگل شناسی در عرصه بین المللی می باشد.

روش بررسی: این تحقیق از نوع مطالعات علم سنجی است. جامعه پژوهش را تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی تشکیل داده اند که از طریق جستجوی تولیدات علمی رشته انگل شناسی در نمایه نامه های استنادی آی.اس.آی در محدوده زمانی ۱۹۸۰ تا ۲۰۰۹ و محدوده مکانی کشور ایران صورت گرفته است.

یافته ها: نتایج نشان داد که تولید علمی ایران در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی در فاصله زمانی ۲۰۰۹-۱۹۸۰ تعداد ۷۲۲۲۹ مدرک می باشد که از این میان تعداد ۳۹۲ مدرک (۰/۵۴ درصد) مربوط به رشته انگل شناسی است. پژوهشگران ایرانی رشته انگل شناسی بیشترین میزان همکاری علمی را با همتایان خود در کشور انگلستان داشته اند. محبعلی با تولید ۲۶ مدرک پرکارترین نویسنده ایرانی در زمینه انگل شناسی بود.همچنین دانشگاه علوم پزشکی تهران با ۱۱۴مدرک، از نظر میزان تولیدات علمی در حوزه انگل شناسی رتبه اول قرار داشت.

نتیجه گیری : یافته های مربوط به روند تولیدات علمی حوزه انگل شناسی نشان داد که در سال ۲۰۰۸ میلادی نگارش و پژوهش پیرامون انگل شناسی از رشد چشمگیری برخوردار بوده و مجله Parasitology Research با چاپ ۶۵ مدرک بیشترین سهم را در انتشار مقالات حوزه انگل شناسی ایرانی داشته است.

کلید واژه ها: انگل شناسی، علم سنجی، تولیدات علمی، پایگاه‌های استنادی آی.اس.آی ، ایران

مقدمه

از مباحث مهمی که در دهه کنونی بدان توجّه وافری شده است مسئله تولید علم می باشد. بی گمان دانشگاه ها به عنوان خاستگاه علم و دانش نقش مهمی در تولید علم و تسریع پله های ترقّی در هر کشوری ایفاء می نمایند.

در سالیان اخیر علاقه زیادی به استفاده از اطلاعات کتابشناختی برای ارزیابی فعالیت های پژوهشی به وجود آمده است. ارزیابی فعالیت های پژوهشی به منزله یکی از مهم ترین ابزارهای نیل به استانداردهای عملکرد پژوهشی در مراکز علمی به شمار می رود (۱). در ایران نیز توجهات به طور جدی به سمت تولیدات علمی در سطح ملی و بین المللی سوق یافته است؛ به طوری که کمیت و کیفیت برونداد پژوهشی به عنوان یکی از شاخص های اصلی عملکرد دانشگاه ها می باشد و از این شاخصه به عنوان یکی از معیارهای رتبه بندی دانشگاه ها در عرصه های ملی و بین المللی استفاده می شود. در نتیجه پژوهشگران شاغل در مراکز علمی و پژوهشی از جانب سیاستگذاران علمی ترغیب به انجام پژوهش و انتشار آن در مجلات معتبر می شوند.

در ارزیابی تولیدات پژوهشی مربوط به هر رشته اتکاء به نتایج نظرسنجی ها چندان معتبر نبوده و ملاک اصلی ارائه آمارهای دقیق و مستند نمایه شده در پایگاه های اطلاعاتی ملی و بین المللی است. از جانب دیگر، سنجش و ارزیابی تولیدات علمی یک یا چند حوزه علمی بدون استفاده از شاخص های کمی، تقریباً غیرممکن شده است. به همین جهت دانشمندان بمنظور سنجش وارزیابی متون علمی به روش های کمی روی آورده اند (۲).

روش های مختلفی برای ارزیابی تولیدات و فعالیت های علمی وجود دارد که علم سنجی[1] یکی از این موارد است. "از شاخص های علم سنجی برای ارزیابی وضعیت یک رشته یا موضوع معین استفاده می شود" (۳). تعاریف متعددی از اصطلاح علم سنجی ارائه شده است؛ واژه نامه تامپسون علم سنجی را مطالعه کمی رشته های علمی بر اساس آثار منتشر شده و روابط علمی تعریف می کند. این نوع مطالعات می توانند شامل شناسایی افراد و سازمان های تاثیرگذار رشته های مختلف، شناسایی نواحی نوظهور پژوهشی، بررسی روند توسعه رشته ها با گذشت زمان، یا توزیع جغرافیایی و سازمانی تولیدات علمی شوند (۴)

در سالیان اخیر، حیطهٔ علم سنجی توجه زیادی را به خود منعطف کرده است و به کرات برای توصیف مطالعه علم (رشد علمی، ساختار علمی، روابط علمی، و تولیدات علمی) مورد استفاده قرار می گیرد (۵). پژوهشگران زیادی از تحلیل های علم سنجی برای انجام تحقیقات خود استفاده نموده اند که جامعه آماری اکثر این پژوهش ها تولیدات علمی نمایه شده در نمایه نامه های پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی می باشند. اگرچه بهره گیری از شاخص هایی همچون کمیت انتشار همواره مورد نقده بود است اما این شاخص ها همچنان به عنوان محک و معیاری برای سنجش اعتبار علمی محققان، سازمان ها، کشورها و ... در سطح بین المللی و همچنین به عنوان شاخص هایی در نقشه جامع علمی کشور مورد بهره برداری قرار می گیرد (۶).

از این رو، این پژوهش بر آن است تا تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی را در یک دوره سی ساله (از سال ۱۹۸۰ تا ۲۰۰۹) مورد بررسی و ارزیابی قرار داده و تصویر مناسبی از وضعیت کنونی حاکم بر تولیدات علمی این رشته در عرصه بین المللی ارائه نماید.

آموزش پزشکی جدید در ایران قدمت زیادی دارد. با گشایش مدرسه دارالفنون درسال ۱۲۷۰ خورشیدی توسط میرزا تقی خان امیر کبیر آموزش پزشکی نوین آغاز گردید. در سال ۱۲۹۷ رشته پزشکی از مدرسه دارالفنون جدا شد و به صورت مدرسه مستقلی درآمد و در سال ۱۳۱۳ به هنگام تاسیس دانشگاه تهران باعنوان دانشکده پزشکی به این مرکز علمی پیوست .

آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی تهران در سال ۱۳۱۷ تحت نظر آقای دکتر اسداله شیبانی دایر شد. در سال ۱۳۱۹باتأسیس "کرسی انگل شناسی وبخش تجسس" فعالیت های آزمایشگاه انگل شناسی شامل دو قسمت : کارهای عملی آموزشی و تجسس در زمینه بیماریهای انگلی و اپیدمیولوژی آنها شروع شد.

بر اساس مقاوله نامه ای که باوزارت بهداری منعقد گردیده بود در جلسه ۱۳۳۱/۳/۱۴ شورای دانشگاه ، تاسیس انستیتو مالاریالوژی وابسته به کرسی انگل شناسی وبخش تجسس دانشکده پزشکی بتصویب رسید و بنام انستیتو پارازیتولوژی ومالاریولوژی در سال ۱۳۳۵ و با ادغام کرسی بهداشت گرمسیری دانشکده پزشکی باین موسسه درسال ۱۳۴۲ تحت نام انستیتو انگل شناسی و بهداشت گرمسیری و در سال ۱۳۴۴ بنام انستیتو تحقیقات بهداشتی بفعالیت های آموزشی وپژوهشی خود در دانشکده پزشکی ادامه میداد. با فعالیت های آموزشی ، و پژوهشی و خدماتی اعضاء هیئت علمی و کارکنان انستیتو تحقیقات بهداشتی و با مدیریت و هدایت علمی دکتر شمس الدین مفیدی ریاست انستیتو این موسسه استحقاق لازم برای توسعه بصورت یک دانشکده را پیدا کرد. در سال ۱۳۴۵ در یکصد و پانزدهمین جلسه شورای مرکزی دانشگاههای ایران اساسنامه دانشکده بهداشت به تصویب رسید. هم اکنون در بسیاری از دانشگاههای علوم پزشکی ایران از جمله تهران، شهید بهشتی، ایران، مازندران، تبریز، اصفهان، کاشان، مشهد، شهرکرد، شیراز، ارومیه، کرمان، زنجان، همدان، اهواز، در دوره های کارشناسی ارشد یا دکتری رشته انگل شناسی پزشکی دانشجو می پذیرد.

---

1 - scientometrics

روش بررسی:

این تحقیق از نوع مطالعات علم سنجی است. جامعه پژوهش عبارت را تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی تشکیل داده اند. استراتژی جست‌وجو بدین ترتیب بود که در قسمت جستجوی پیشرفتهٔ (Advanced Search) نمایه نامه های استنادی آی.اس.آی[2] عبارت CU=Iran وارد شد تا نتایج مربوط به کشور ایران آورده شود، سپس محدودهٔ زمانی ۱۹۸۰-۲۰۰۹ انتخاب گردید، و در قسمت Subject Areas نیز موارد مربوط به رشتهٔ انگل شناسی[3] اِعمال شد. سپس با توجه به اهداف پژوهش، یافته ها پس از استخراج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و بر اساس دانشگاه یا موسسه، سال انتشار، نویسندگان، قالب مدارک، مجلات، و تاثیرگذارترین مقاله ها در این حوزه مورد بررسی قرار گرفت.

لازم به ذکر است که اطلاعات این پژوهش در ۲۴ دی ۱۳۸۸، برابر با ۱۴ ژانویه ۲۰۱۰ میلادی استخراج شده است. بنابراین، داده های مربوط به سال ۲۰۰۹ ممکن است کامل نباشد، زیرا گاهی داده ها ممکن است دیرتر وارد پایگاه های استنادی آی.اس.آی شوند.

یافته ها:

نتایج بررسی نشان داد که تولید علمی ایران در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی در فاصله زمانی ۲۰۰۹-۱۹۸۰ تعداد ۷۲۲۲۹ مدرک می باشد که از این میان تعداد ۳۹۲ مدرک (۰/۵۴ درصد) مربوط به رشته انگل شناسی می باشد. همچنین همه مقالات رشته انگل شناسی به زبان انگلیسی منتشر شده بودند. در ادامه سعی شده است به ترتیب به سوالات پژوهش پاسخ داده شود.

دانشگاه ها و سازمان های برتر:

در جدول شماره ۱ هشت دانشگاه یا موسسه برتر در زمینه تولید مدارک رشته انگل شناسی مشخص شده اند. این هشت دانشگاه یا موسسه جمعاً ۳۶۰ مدرک (۹۱/۸۳ درصد) تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی را بر عهده داشته اند؛ که در این میان دانشگاه علوم پزشکی تهران با تولید ۱۱۴ مدرک، دانشگاه تهران با ۷۳ تولید علمی، و انستیتو پاستور ایران با ۵۴ تولید علمی، نسبت به سایر دانشگاهها و موسسات به ترتیب در رتبه های اول تا سوم قرار دارند. به عبارت دیگر، بیشتر مولفان ایرانی تولیدات علمی رشته انگل شناسی در این دانشگاه ها اشتغال داشته اند. اطلاعات کامل مربوط به دانشگاهها یا موسسات برتر در زمینه انگل شناسی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

لازم به ذکر است که به دلیل اینکه در اکثر موارد، یک تحقیق توسط دو یا چند پژوهشگر (که ممکن است در سازمان های مختلف اشتغال داشته باشند) انجام می شود، مجموع تولیدات علمی هر رشته به تفکیک دانشگاه، همواره بیش از تعداد کل تولیدات علمی آن رشته می شود. همچنین این نکته را نیز باید مد نظر قرار داد که به دلیل برخی ناهماهنگی ها در نحوه نوشتن نام دانشگاه به زبان انگلیسی، گاهی ممکن است نام یک دانشگاه توسط مولفات مختلف به روش های گوناگونی نوشته شود. به عنوان مثال، نام دانشگاه تربیت مدرس به سه صورت TARBIAT MODARES UNIV، TARBIAT MODARRES UNIV، و UNIV TARBIAT MODARRESنوشته شده بود که اولی ۱۴ مقاله، دومی ۷ مقاله، و سومی ۱مقاله در زمینه انگل شناسی تولید کرده بود؛ در نتیجه محققین حاصل جمع را به عنوان یک دانشگاه به شمار آوردند. همین مسئله درباره برخی دانشگاه های دیگر از قبیل دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، انستیتو پاستور ایران، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و برخی موارد دیگر نیز صدق می کرد.

مولفان برتر:

یکی از کاربردهای علم سنجی شناسایی نویسندگان پرتالیف رشته ها و کشورهای مختلف است. با مشخص نمودن این نویسندگان می توان دانشمندان پیشگام و تاثیرگذار هر رشته علمی را شناسایی نمود. ده مولف که نام آنها در جدول شماره ۲ آمده است بیشترین تولیدات علمی در حوزه انگل شناسی را بین سالهای مورد پژوهش در ایران داشته اند. براین اساس، این افراد در تالیف ۱۵۸ عنوان مدرک نقش داشته اند. که این کار را یا به صورت انفرادی، یا به طور اشتراکی با سایر مولفان که نام آنها در این لیست آمده است و یا با سایر مولفان که نام آنها در این لیست ذکر نشده است به انجام رسانده اند. همان طور که جدول شماره ۲ نشان می دهد، «مهدی محبعلی» بیشترین تولید علمی را در حوزه انگل شناسی در عرصه بین المللی انجام داه است. این پژوهشگر با تولید ۲۶ مدرک معادل ۶/۶۳ درصد از کل تولیدات انگل شناسی ایران در رتبه اول قرار دارد. «حسن وطن دوست» نیز در تالیف ۲۱ مدرک علمی نقش داشته است و دومین نویسنده پرتالیف ایران در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی به شمار می رود. اسامی سایر مولفان پرتالیف در جدول شماره ۲ آمده است. به طور کلی، ۴۰/۳۰ درصد تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی توسط ده نفر برتر صورت پذیرفته است.

همکاری با سایر کشورها:

یکی از مهم ترین گرایش هایی که امروزه در بین اکثر پژوهشگران وجود دارد گرایش به همکاری با سایر محققین می باشد. این نوع مشارکت می تواند هم از نوع داخلی و یا خارجی باشد که در نوع دوم، محققین دو یا چند کشور اقدام به انجام یک کار تحقیقاتی و

2- این نمایه نامه ها که با نام آی.اس.آی شهرت دارند عبارتند از نمایه نامه استنادی علوم، نمایه نامه استنادی علوم اجتماعی، و نمایه نامه استنادی هنر و علوم انسانی . امروزه نمایه نامه های مذکور توسط شرکت تامسون رویتر منتشر می شوند.

3 - Parasitology

احتمالاً انتشار نتایج آن می نمایند. "دنیای امروز، برخلاف شرایط گذشته، بیش از پیش نیازمند همکاری و همفکری است. در زمینه پژوهش و تولید علم نیز بیش از هر زمان دیگری به کار گروهی وابسته هستیم. به بیان دیگر، رابطه نزدیکی میان همکاری و تولید علم وجود دارد. اهمیت و مزایای همکاری در تالیف یا آثار چند مولفی از آنجا نمایان می شود که اخیراً مجلات معتبر ترجیح می دهند مقالاتی را چاپ کنند که حاصل تلاش مشترک دو یا چند نویسنده باشد" (۷). بررسی مقالات مندرج در مجلات معتبر دلیلی بر این مدعاست.

در این قسمت بر آنیم میزان همکاری محققین رشته انگل شناسی ایران با سایر کشورها را مورد بررسی قرار دهیم. نتایج نشان داد که پژوهشگران ایران در حوزه انگل شناسی با کشورهای مختلفی از جمله انگلستان، ایالات متحده، آلمان، اسپانیا، استرالیا، اسکاتلند، کانادا، فرانسه، سوئیس، ولز، ژاپن، سوئد، ایتالیا، روسیه، دانمارک، مجارستان، نیوزیلند، ترکیه، هند، ایرلند، پاکستان، چین، آرژانتین، بنگلادش، جمهوری چک، عراق، اردن، کنیا، لیبی، آفریقای جنوبی، امارات، و ... همکاری علمی داشته اند. همان طور که از نمودار شماره ۱ بر می آید، پژوهشگران ایران در رشته انگل شناسی بیشترین میزان همکاری علمی را با همتایان خود در کشور انگلستان داشته اند. به طوری که آنان در ۳۰ مقاله (۷/۶۵ درصد) با محققین انگلیسی اقدام به انتشار آثار مشترک نموده اند. جالب آنکه کشورهای ایالات متحده و آلمان با ۱۱ تولید علمی مشترک با محققان ایران فاصله نسبتاً زیادی با انگلستان دارند. محققین کشور اسپانیا نیز در ۱۰ مورد (۲/۵۵ درصد) با همتایان خود در ایران اقدام به انتشار آثار علمی در مجلات معتبر نموده اند.

روند تولیدات علمی:

تجزیه و تحلیل داده های پژوهش روشن ساخت که تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی در دهه های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ بسیار اندک بوده است؛ به طوری که در دهه ۱۹۸۰ تنها ۱۴ مدرک از ایران به ثبت رسیده است و در آخرین دهه از قرن بیستم تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی به ۲۴ مدرک رسیده است. همان طور که در نمودار شماره ۲ نیز مشاهده می شود، با ورود به قرن ۲۱، تولیدات ایران در رشته انگل شناسی رشد چشمگیری را شاهد بوده است. براین اساس داده های پایگاه های اطلاعاتی آی. اس. آی نشان می دهد در دهه اول قرن ۲۱ تا کنون تعداد ۳۵۴ مدرک علمی (۹۰/۳۰ درصد) توسط محققین ایرانی به تالیف رسیده است. همچنین در سال ۲۰۰۸ میلادی نگارش و پژوهش پیرامون انگل شناسی رشد چشمگیری داشته است. به عبارت دیگر، تولیدات رشته انگل شناسی در سال ۲۰۰۸ میلادی با تعداد ۹۵ مدرک بیشترین بسامد را داشته است. البته از این نکته هم نباید غافل ماند که مدارک مربوط به سال ۲۰۰۹ هنوز به طور کامل در پایگاه آی.اس.آی وارد نشده است و ممکن است در سال ۲۰۱۰ مدارک مربوط به سال ۲۰۰۹ بیشتر از ۹۰ مدرک شود. به طور کلی و با توجه به نمودار شماره ۲ می توان چنین بیان نمود که هر چند تولیدات علمی انگل شناسی ایران در طول سه دهه گذشته دارای فراز و نشیب بوده، لکن از سال ۲۰۰۶ نوعی رشد صعودی مشهود داشته است.

مجلات برتر:

هدف از این بخش شناسایی مجلاتی است که بیشترین سهم را در انتشار مقالات ایران در حوزه انگل شناسی بر عهده داشته اند. یافته های نشان داد که مقالات حوزه انگل شناسی تا کنون در ۲۸ مجله به چاپ رسیده اند. ده مجله که نام آنها در جدول شماره ۳ آورده شده است ۳۳۹ مدرک معادل ۸۶/۴۷ درصد از کل تولیدات علمی ایران در زمینه انگل شناسی را به چاپ سانده اند. در این میان مجله PARASITOLOGY RESEARCH با چاپ ۶۵ مدرک در رتبه اول از این حیث قرار دارد. این مجله به تنهایی ۱۶/۵۸ درصد از کل تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی در عرصه بین المللی را منتشر نموده است.

قالب مدارک:

طبق جدول شماره ۴ مدارک حوزه انگل شناسی بین سال های مورد پژوهش در ۷ قالب می باشد که قالب ۳۷۲ مدرک معادل ۹۴/۸۹ درصد از کل تولیدات علمی این حوزه را آیتم «*مقاله*» تشکیل می دهد. «*یادداشت*» نیز قالب ۷ مدرک معادل ۱/۷۸ درصد از کل تولیدات علمی این حوزه می باشد. سایر انواع مدارک عبارتند از نامه به ویراستار، نقد و بررسی، مقاله کنفرانس، تصحیح، و منابع ویراستاری.

پر استنادترین تولیدات علمی ایران در پایگاه دبلیو.اُ. اس.:

استنادها در آثار علمی جایگاه ویژه ای دارند و در واقع یک مقاله علمی زمانی معتبر است که به آثار و متون آن موضوع استناد نماید (۸). بنابراین، هر چه میزان استنادات وارد شده به یک مقاله بیشتر باشد، ارزش و اهمیت آن مقاله فزون تر خواهد بود. با آگاهی از تعداد استناداتی که هر اثر دریافت کرده است می توان میزان تاثیرگذاری آن اثر در جامعه علمی مربوط به آن حوزه را سنجید؛ به عبارت دیگر، آثاری که بیشترین استناد را داشته اند موثرترین آثار به شمار می روند.

اطلاعات مربوط به پراستنادترین تولیدات علمی ایران، بر اساس گزارش حاصل از پایگاه دبلیو.اُ.اس به دست آمد. یافته ها نشان داد که در مجموع ۱۳۶۵ بار به ۳۹۲ تولید علمی ایران در حوزه انگل شناسی استناد داده شده است. در این میان برخی مقالات تا کنون مورد استناد قرار نگرفته اند و برخی دیگر نیز بیشتر مورد استناد قرار گرفته اند. اطلاعات مربوط به میزان استنادات دریافتی ۱۰ مقاله برتر در حوزه انگل شناسی به همراه نام نویسندگان آن ها در جدول شماره ۵ آمده است. همان طور که در جدول مذکور مشاهده می شود مقاله "The phylogeny of the Schistosomatidae

based on three genes with emphasis on the interrelationship of Schistosoma Weinland, 1858" که درسال ۲۰۰۳ چاپ شده است، با دارا بودن ۵۲ استناد در بالاترین رتبه قرار دارد و به عبارت دیگر اثرگذارترین مقاله ایران در حوزه انگل شناسی می باشد. البته نکته جالب اینکه مقاله مذکور اثری است که با همکاری پژوهشگران در سطح بین المللی نوشته شده است؛ به طوری که تعداد ۱۵ نفر از هشت کشور مختلف به عنوان مولف در تالیف این مقاله مشارکت داشته اند که ثریا نائم از دانشگاه ارومیه نیز از کشور ایران در نگارش این مقاله مشارکت داشته است.

مقاله ای که حائز رتبه دوم شده است "Control of theileria-annulata in Iran" نام دارد که تعداد ۳۸ استناد دریافت نموده است، با توجه به اینکه در سال ۱۹۸۸ منتشر شده است. همچنین، به هر مقاله ایران در حوزه انگل شناسی به طور میانگین ۳/۴۸ بار استناد شده است.

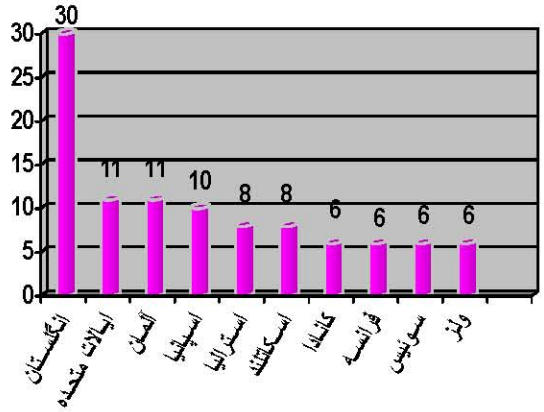
جدول شماره ۱. هشت دانشگاه و سازمان برتر ایران در تولیدات علمی انگل شناسی

رتبه	دانشگاهها و موسسات	تعداد	درصد
۱	دانشگاه علوم پزشکی تهران	۱۱۴	۲۹/۰۸
۲	دانشگاه تهران	۷۳	۱۸/۶۲
۳	انستیتو پاستور ایران	۵۴	۱۳/۷۷
۴	دانشگاه علوم پزشکی شیراز	۳۱	۷/۹۰
۵	موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی	۲۳	۵/۸۶
۶	دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی	۲۲	۵/۶۱
۷	دانشگاه تربیت مدرس	۲۲	۵/۶۱
۸	دانشگاه شیراز	۲۱	۵/۳۵
	جمع	**۳۶۰**	**۹۱/۸۳**

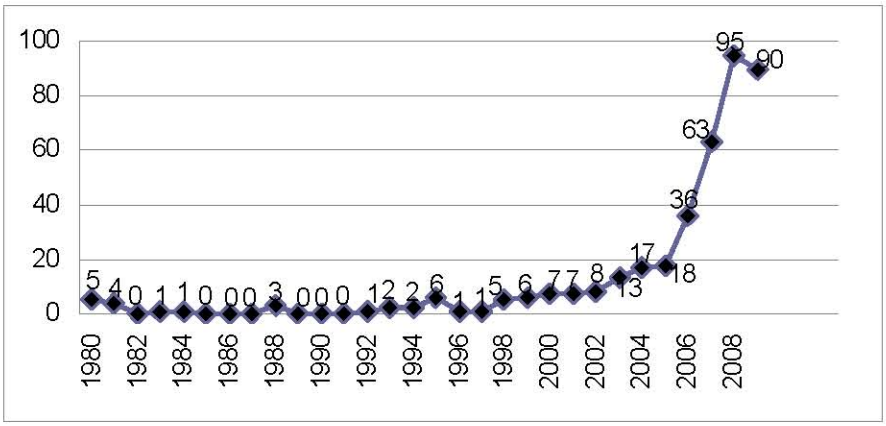
جدول شماره ۲. ده مولف برتر ایران در زمینه انگل شناسی

رتبه	نویسندگان	تعداد	درصد
۱	محبعلی، مهدی	۲۶	۶/۶۳
۲	وطن دوست، حسن	۲۱	۵/۳۵
۳	رهبری، صادق	۱۷	۴/۳۳
۴	کیا، عشرت بیگم	۱۶	۴/۰۸
۵	موبدی، ایرج	۱۵	۳/۸۲
۶	شایان، پرویز	۱۵	۳/۸۲
۷	کاظمی، بهرام	۱۳	۳/۳۱
۸	عریان، احمد	۱۲	۳/۰۶
۹	عشاقی، محمد علی	۱۲	۳/۰۶
۱۰	دین پرست، نوید	۱۱	۲/۸۰

	جمع	۱۵۸	۴۰/۳۰



نمودار شماره ۱. میزان همکاری محققین انگل شناسی با سایر کشورها



نمودار شماره ۲. روند تولیدات علمی در زمینه انگل شناسی

جدول شماره ۳. ده مجله برتر در زمینه چاپ مدارک انگل شناسی ایران

رتبه	نام مجلات	تعداد	درصد
۱	PARASITOLOGY RESEARCH	۶۵	۱۶/۵۸
۲	IRANIAN JOURNAL OF PARASITOLOGY	۵۹	۱۵/۰۵
۳	VETERINARY PARASITOLOGY	۴۰	۱۰/۲۰
۴	IRANIAN JOURNAL OF ARTHROPOD-BORNE DISEASES	۳۹	۹/۹۴
۵	ANNALS OF TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY	۳۷	۹/۴۳
۶	ACTA TROPICA	۳۱	۷/۹۰
۷	EXPERIMENTAL PARASITOLOGY	۲۲	۵/۶۱
۸	JOURNAL OF HELMINTHOLOGY	۱۷	۴/۳۳

۹	KOREAN JOURNAL OF PARASITOLOGY	۱۶	۴/۰۸
۱۰	PARASITOLOGY	۱۳	۳/۳۱
	جمع	**۳۳۹**	**۸۶/۴۷**

جدول شماره ۴. قالب مدارک حوزه انگل شناسی

رتبه	قالب مدارک	تعداد	درصد
۱	مقاله	۳۷۲	۹۴/۸۹
۲	یادداشت	۷	۱/۷۸
۳	نامه به ویراستار	۴	۱/۰۲
۴	نقد و بررسی	۴	۱/۰۲
۵	مقاله کنفرانس	۳	۰/۷۶
۶	تصحیح	۱	۰/۲۵
۷	منابع ویراستاری	۱	۰/۲۵
	جمع	**۳۹۲**	**۱۰۰**

جدول شماره ۵. پراستنادترین تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی

رتبه	نام مقاله	نویسندگان	تعداد استناد
۱	The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationship of Schistosoma Weinland, 1858	Lockyer AE, Olson PD, Ostergaard P, Naem S, et al.	۵۲
۲	Control of theileria-annulata in Iran	Hashemifesharki R	۳۸
۳	Echinococcosis/hydatidosis in western Iran	Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, et al.	۳۶
۴	Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of Theileria lestoquardi and …	Schnittger L, Yin H, Jianxun L, Shayan P, et al.	۳۲
۵	Epodemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran	Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, et al.	۳۰
۶	Identification of Leishamania major cysteine proteinases as targets of the immune …	Rafati S, Salminian AH, Hashemi K, et al.	۲۸
۷	Molecular and morphological characterization of Echimococcus granulosus of huaman …	Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, et al.	۲۷
۸	DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained …	Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, et al.	۲۶
۹	Prevalence of Echinococcus granulosus infection in stray dogs and herbivores in …	Mehrabani D, Oryan A, Sadjjadi SM	۲۶
۱۰	Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective …	Davies CR, Gavgani ASM.	۲۵

بحث:

نتایج بررسی حاظر نشان داد که از کل تولیدات علمی ایران در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی در فاصله زمانی ۲۰۰۹-۱۹۸۰، تعداد ۳۹۲ مدرک (۰/۵۴ درصد) مربوط به رشته انگل شناسی می باشد. بنابراین، می توان چنین اظهار داشت که پژوهشگران حوزه انگل شناسی نسبت به همتایان خود در سایر رشته ها از قبیل فارماکولوژی، ایمنی شناسی، جراحی، نوروساینس، نورولوژی بالینی، آنکولوژی، خون شناسی، و برخی رشته های دیگر از تولیدات نسبتاً کمتری در پایگاه های اطلاعاتی آی.اس.آی برخوردارند.

از روش های علم سنجی می توان به منظور انجام مطالعات کمّی در رابطه با توسعه تولیدات علمی یک رشته خاص در عرصه بین المللی استفاده کرد (۹). از سوی دیگر، استفاده از شاخص های علم سنجی بهنگام تصمیم گیری، به طور مستمر در حال افزایش است و منجر به رشد مطالعات علم سنجی شده است (۱۰). هدف از این تحقیق انجام یک تحلیل کمّی با استفاده از تکنیک علم سنجی و به منظور بررسی وضعیت تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی در عرصه بین المللی در طول یک دوره سی ساله بود.

گارسیا و همکارانش (۱۱)در پژوهشی به ارزیابی تولیدات علمی کشور اسپانیا در رشته های مامایی و پزشکی زنان در مجلات بین المللی بین سالهای ۱۹۸۶-۲۰۰۲ اقدام نموده اند. در این پژوهش ۷۷۹ مدرک در این دو رشته مورد بررسی قرار گرفته اند. یافته ها نشان داد که مجله تولید مثل انسانی با ۲۱۷ مقاله دارای بیشترین مقالات تخصصی و تألیفات در زمینه یائسگی و بیشترین همکاری علمی (۴/۰۷) بوده است. کل مقالات ۱۸۲۹ و تعداد نویسندگان ۳۹۹۸ نفر بوده است.

زورزتو و همکارانش (۱۲) تولیدات علمی ۲۰ دانشگاه برزیل در رشته های بهداشت و علوم زیستی را بین سالهای ۲۰۰۲-۱۹۹۸ مورد مطالعه قرار داده اند. یافته های پژوهش آنان نشان داد که رشته داروشناسی با رشد ۴/۵ ٪ و روانپزشکی با رشد ۱۹۱٪ به ترتیب کمترین و بیشترین درصد رشد تولیدات را دارا بوده اند. آن ها در پایان اعلام می دارند که رشد تولیدات علمی در این کشور به خاطر سرمایه گذاری در فعالیتهای پژوهشی و افزایش بودجه تحقیقاتی و تغییر نگرش نسبت به امر پژوهش رشدی ۴ برابری را نشان می دهد..

ون و همکاران (۱۳) در پژوهشی تحت عنوان «تولیدات علمی تحقیقات پزشکی الکترونیکی در دوره ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۵» به این نتیجه رسیدند که تعداد مقالات منتشرشده در مقایسه با دوره پنج ساله قبلی افزایش چشمگیری داشته اند. اکثر مقالات (۹۸ درصد) به زبان انگلیسی منتشر شده اند و مربوط به آمریکا (۵۷ درصد) بوده اند. تعداد ده مجله از کل ۳۷۴ مجله ۴۱ درصد مقالات را منتشر کرده اند. تحلیل تعداد مقالات مورد بررسی آشکار ساخت که کشورهای نسبتاً کوچکی نظیر سوئیس، هلند، و نروژ سهم زیادی در تولید مقالات داشته اند.

تحقیقات چندی نیز توسط ایرانیان با استفاده از روش علم سنجی بر روی تولیدات علمی انجام شده است. عصاره و ویلسون (۱۴) در پژوهشی تحت عنوان انتشارات علمی ایران، رشد و توسعه از ۱۹۸۵- ۱۹۹۹ مشارکت علمی دانشمندان ایران در سه دوره پنج ساله ۱۹۸۵-۱۹۸۹، ۱۹۹۰-۱۹۹۴ و ۱۹۹۵-۱۹۹۹ در نمایه استنادی علوم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج یافته های نشان داد که رشد انتشارات علمی ایران در پنج ساله دوم نسبت به پنج ساله اول دو برابر و در پنج ساله سوم نسبت به پنج ساله دوم ۲/۸ برابر بوده است که این افزایش به دلیل فاکتورهای زیر بیان گردیده است از جمله خاتمه جنگ تحمیلی عراق علیه ایران، موقعیت اقتصادی بهتر، تغییرات اخیر در سیاستگذاری دولت مانند افزایش بودجه های تحقیق، تغییرات اساسی در جو سیاسی مانند افزایش مجلات علمی در سطح ملی، و بازگشت تعداد زیادی از دانشجویان بورسیه خارج از کشور پس از پایان تحصیلات به کشور.

معین، محمودی، و رضایی (۱۵) تولیدات علمی ایران را در سال های ۱۹۶۷ تا ۲۰۰۳ ارزیابی نمودند و آن را با برخی کشورهای انتخابی مقایسه نمودند. آن ها دریافتند که بعد از جنگ تحمیلی میزان تولیدات علمی ایرانیان در پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی رشد فزاینده ای داشته است.

لعلی در سال۱۳۸۳ (۱۶) وضعیت تولید علمی ایران در زمینه فناوری اطلاعات را در پایگاه های استنادی آی.اس.آی مورد بررسی قرار داد و دریافت که میزان تولید علمی ایران در سال ۲۰۰۰ مجموعاً ۱۳۹۰ رکورد بوده است که اکثراً به زبان انگلیسی بوده و از این بین تنها ۲۳ رکورد (۱/۶۵ درصد) مربوط به فناوری اطلاعات می باشد.

نوروزی چاکلی و همکاران در سال ۱۳۸۶(۱۷) با استفاده از شاخص های پایگاه اطلاعاتی آی.اس.آی تولید علم ایران در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ را مورد کنکاش قرار دادند و به این نتیجه رهنمون شدند که تولیدات علمی ایران در سال ۲۰۰۶ در مقایسه با سال قبل حدود ۲۱ درصد رشد داشته است. پرکارترین نویسنده سال ۲۰۰۶ م.م.هروی بوده استکه با ۵۷ عنوان تولید علمی حدود ۱/۵۵درصد از کل تولیدات علمی نمایه شده ایران در آی.اس.آی را منتشر کرده است. نشریه Applied Mathematics and Computation با انتشار ۱۶۱ عنوان مقاله، بیشترین سهم را در انتشار تولیدات علمی ایران در سال ۲۰۰۶ به عهده داشته است.

به طور کلی، بررسی پیشینه های موجود نشان داد که تا کنون پژوهشی با دامنه موضوعی و جامعه پژوهش این پژوهش انجام نشده است. بنابراین انجام پژوهشی به منظور تحلیل روند تولیدات علمی ایران در رشته انگل شناسی ضروری به نظر می رسد.

یافته های مربوط به روند تولیدات علمی حوزه انگل شناسی نشان داد که اکثر آثار این رشته در عرصه بین المللی در دهه اول قرن بیست و یک به چاپ رسیده اند. همچنین سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۰۸ پرتولیدترین سنوات رشته انگل شناسی به شمار می رود. به نظر می رسد عواملی همچون گسترش و شناخته تر شدن رشته انگل شناسی که قبلاً منحصر به دو دانشگاه بود، افزایش پذیرش دانشجو در مقاطع تحصیلات تکمیلی، افزایش بودجه های تحقیقاتی دانشگاه، افزایش تعداد اعضای هیئت علمی دانشگاه، و همچنین افزایش پاداش چاپ مقالات در مجلات معتبر، موارد هستند که باعث ارتقای انگیزه پژوهشگران رشته انگل شناسی در انتشار تولیدات علمی خود در مجلات معتبر در سالیان اخیر شده اند. به طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان چنین اظهار داشت که هر چند تولیدات علمی انگل شناسی ایران در طول سه دهه گذشته شاهد دارای فراز و نشیب بوده، لکن از سال ۲۰۰۸ نوعی رشد صعودی چشمگیر داشته است.

. هر چند از سال ۲۰۰۸ شاهد جهش قابل ملاحظه ای دراین زمینه بوده ایم، لکن به نظر می رسد دلایلی چون عدم وجود مراکز تحقیقاتی مختص انگل شناسی در ایران، عدم رواج روش های نوین مولکولی در ایران، عدم انجام تحقیقات پایه ای و بنیادی، عدم وجودانگیزه کافی در محققین این حوزه در سالهای گذشته، عدم تسلط به زبان انگلیسی، عدم تسلط به فرایندهای ارسال مقالات به مجلات مذکور، دشواری دسترسی محققین این حوزه به امکانات ارتباط با مجلات معتبر ذکر شده و سایر موانع از جمله موارد کندی حرکت محققین ایرانی رشته انگل شناسی در رقابت با همتایان خارجی می باشد. یافته ها نشان داد که پژوهشگران ایرانی رشته انگل شناسی در مجموع با محققین ۳۳ کشور در انجام تولیدات علمی رشته انگل شناسی همکاری داشته اند. این محققان ایرانی بیشترین میزان همکاری علمی را با همتایان خود در کشور انگلستان داشته اند؛ که به نظر می رسد یکی از دلایل این امر وجود ژورنال ها و انتشارات انگل شناسی زیاد در انگلستان می باشد. همچنین تمایل محققان حوزه انگل شناسی به گذراندن دوره های تحصیلات تکمیلی در کشور انگلستان از یک طرف، و سپری نمودن فرصت های مطالعاتی در این کشور از طرف دیگر، باعث آشنایی با پژوهشگران انگلیسی و در نتیجه انجام تحقیقات مشترک شده است.

بررسی بیشتر نشان داد که دانشگاه علوم پزشکی تهران با تولید ۱۱۴ مدرک، دانشگاه تهران با ۷۳ تولید علمی، و انستیتو پاستور ایران با تولید ۵۴ مدرک در حوزه انگل شناسی، نسبت به سایر دانشگاهها و موسسات به ترتیب در رتبه های اول تا سوم قرار دارند. از آنجا که این دانشگاه ها و موسسات قدمت زیادی در حوزه انگل شناسی دارند و همچنین حمایت مالی بیشتری از پژوهشگران خود انجام می دهند انجام تولیدات علمی بیشتر در این دانشگاه ها و موسسات چندان غیرمنتظره نیست. البته ناگفته پیداست که این دانشگاه ها نسبت به سایر دانشگاه ها اعضای هیئت علمی بیشتری دارند و در نتیجه امکانات و آزمایشگاه های مجهزتری در اختیار دارند. همچنین سالانه دانشجوی زیادی نیز در سطوح تحصیلات تکمیلی در این دانشگاه ها ثبت نام می کنند که تولیدات علمی آنان نیز به نام این دانشگاه ها ثبت می شود

از جانب دیگر، در مجموع، تعداد ۹۶۸ نفر در تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی نقش داشته اند که بر این اساس می توان چنین اظهار داشت که میانگین مولفان هر یک از تولیدات علمی ایران ۲/۴۶ نفر می باشد. محبعلی و وطن دوست هر یک با تولید ۲۶ و ۲۱ مدرک پرکارترین نویسندگان ایران در رشته انگل شناسی به شمار می روند. این مولفان ۱۱/۹۸ درصد از تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی را تالیف کرده است. از جانب دیگر، ده مولف برتر ایران در حوزه انگل شناسی حدود ۴۰/۳۰ درصد از کل تولیدات علمی ایران در این حوزه را انجام داده اند.

نتایج پژوهش مشخص ساخت که ۶۱ درصد از کل تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی تنها در ۵ مجله منتشر می شوند. و مجله Parasitology Research با چاپ ۶۵ مدرک بیشترین سهم را در انتشار مقالات این رشته داشته است.

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که در مجموع ۱۳۶۵ بار به کل تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی استناد شده است. به طوری که میانگین استنادات داده شده به هر مقاله برابر با ۳/۴۸ استناد می باشد. در این میان برخی مقالات تا کنون مورد استناد قرار نگرفته اند و برخی دیگر نیز بسیار زیاد مورد استناد قرار گرفته اند. همچنین مقاله "The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationship of Schistosoma Weinland, 1858" با دارا بودن ۵۲ استناد تاثیرگذارترین مقاله پژوهشگران ایران در زمینه انگل شناسی به شمار می رود

نتیجه گیری:

به طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان چنین اظهار داشت که هر چند تولیدات علمی انگل شناسی ایران در طی سه دهه گذشته شاهد فراز و نشیب بوده، لکن از سال ۲۰۰۸ نوعی رشد صعودی چشمگیر داشته است . همچنین مشخص شد که ۶۱ درصد از کل تولیدات علمی ایران در حوزه انگل شناسی تنها در ۵ مجله منتشر می شوند. و مجله Parasitology Research با چاپ ۶۵ مدرک بیشترین سهم را در انتشار مقالات این رشته داشته است. در مجموع پیشنهاد می شود مطا لعات مشابهی در سایر رشته های علوم پایه پزشکی به منظور ارا ئه راهکارهایی جهت تقویت و توسعه روند تولید علم در کشور انجام شوند.

فهرست مراجع:

1- Uzun A. A scientometric profile of social sciences research in Turkey. *Intl. Inform. & Libr. Rev*, 1998; **30**:169-184.

2-Osareh F. "Bibliometrics". *Teaching science and psychology Journal*, 1997; **3**(3)63-74. (Persian)

3- Lolis S F, Sanches-Marques A .M .M, Reis S.L.A, Benedito E. Scientometric analysis of energetic ecology: primary production of aquatic macrophytes. *Maringá*, 2009; **31**(4): 363-369.

4- Glossary of Thomson scientific terminology (2008). The Thompson Corporation. Available at: http://science.thomsonreuters.com/support/patents/patinf/terms/

5- Hood W.W. and Wilson C. The literature of bibliometrics, scientometrics and informetrics. *Scientometrics*, 2001; **52** (2): 291–314.

6-Shahbodaghi A. Situation of publications and citations to knowledge management articles based on ISI citation indexes during 1985-2008". National conference of Knowledge Management and Information Science, 2009; Tehran, Iran. (Persian)

7-Rahimi M,Fatahi R Assisment and produce information : regard to concepets and common pattern in current science produce**.** Faslnemeye Ketab, 2007;71.

8-Abdolmajid, A. H."Citation analysis: definitions and applications". FaslnameYe Olum va Fanavarie Ettelaat, 2007; **22**(3): 73-88.

9- Tian Y,Wen C, Hong S.Global scientific production on GIS research by bibliometric analysis from 1997 to 2006, *Journal of Informetrics,*2008*;* 2:65–74.

10- Dutt B, Garg KC, Bali A Scientometrics of the international Journal. Scientometrics, *Scientometris*, 2003; **56**(1): 81-93.

11- Garcia P, Lopez-Munoz F, Callejo F, Martin-Agueda B,Alamo C. Evaluation of Spanish scientific production in international obstetrics and genecology journals during the period 1986-2002 *European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology*, 2005; **123**(2): 150-156.

12- Zorzetto R. The scientific production in health and biological science of the top 20 Brazilian Universitie, *Brazilizn Journal Of Medical And Biological Research*, 2006; **39** (12).

13- Wen H , Ho Y, Jian W, Li H, Hsu Y. Scientific production of electronic health record research, 1991–2005, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2007, 8(6):191–196.

14- Osareh F, Wilson CS. A comparison of Iranian scientific publications in the *Science Citation Index*: 1985–1989 and 1990–1994. *Scientometrics*. 2000; **48**(3): 427–442.

15- Moin M, Mahmoudi M, Rezaei N. Scientific output in Iran at the threshold of the 21st century, *Scientometrics*, 2005; **62** : 239–248.

16-La`li A. Scientific productions in information technology. Mahnameye Amuzeshi, Pajuheshi and Ettelaresani, 1383, **5**(51).26-32. . (Persian)

17- Chakoli A N. Evaluation of Iran scientific productions based on ISI statistics through 2005-2006. Faslnemeye Ketab, 2007; 71. (Persian)

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات۵۴-۴۸

مقایسه تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین

ابوالفضل امینی[۱]، خسرو عیسی زاده[۱]، سمیه رحیمی النگ[۱]، حمید واعظ[۲]، سپیده بخشنده نصرت[۳]، فاطمه چراغعلی[۳]، عزت الله قائمی[۲،۳] ×

۱) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
۲) گروه میکروب شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۳) مرکز تحقیقات عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
نویسنده رابط: عزت الله قائمی، مرکز تحقیقات عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
همراه: ۰۹۱۱۳۷۱۱۷۷۰ eghaemi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله : ۸۹/۳/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۶/۵

چکیده:

زمینه و اهداف: وجود ژن *mecA* در *استافیلوکوکوس اورئوس* منجر به تولید پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین جدید موسوم به PBP_{2a} می‌گردد. این تغییر ممکن است با تغییر بعضی فنوتیپ‌ها همراه باشد. این مطالعه با هدف مقایسه تخمیر قندی در ایزوله‌های MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) و MSSA (Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) انجام شده است.

روش بررسی: تعداد ۲۰۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (۵۷ ایزوله MRSA و ۱۴۹ ایزوله MSSA) که ۱۲۰ ایزوله از بیماران بستری و ۸۶ ایزوله از حاملین سالم در شهر گرگان جدا شده بود، مورد بررسی قرارگرفت. تخمیر قندها، درمحیط فنل رد براث حاوی قندهای گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، فروکتوز، گزیلوز، رامنوز، مانوز، سوکروز، ترهالوز، رافینوز یا مالتوز و بررسی تغییر رنگ بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. داده‌ها با آزمون Chi Square تجزیه و تحلیل گردید و درتمام موارد $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تخمیر قند گلوکز در ۱۰ ایزوله (۱۷/۵٪) MRSA و ۱۱ ایزوله (۷/۴٪) در ساعت چهارم قابل مشاهده بود که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است ($P=0/03$). توانائی تخمیر قندهای رامنوز و گزیلوز در ایزوله‌های MRSA به ترتیب ۱۹/۳٪ و ۱۰/۵٪ و در ایزوله های MSSA به ترتیب ۲٪ و ۲/۷٪ برآورد گردید که تفاوت در دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). بالاترین تفاوت در دو گروه بیمار و حامل سالم، در تخمیر قندهای فروکتوز (۱۰۰٪ در مقابل ۹۳٪)، رافینوز (۳۸/۳٪ در برابر ۲/۳٪) و رامنوز (۱۱/۷٪ در برابر ۰٪) مشاهده شد ($P<0/005$). میزان تخمیر قند رافینوز در ایزوله‌های جدا شده از عفونت ادراری بیش از سایر عفونت‌ها می‌باشد .

نتیجه‌گیری: مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با افزایش توانایی تخمیر قندها همراه می‌باشد. این پدیده ممکن است نشانگر تأثیر استقرار پروتئین PBP_{2a} در دیواره باکتری بر توانایی تخمیر قندها باشد؛ از طرفی مشخص گردید که توانایی تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیشتر از حاملین می‌باشد که این پدیده ممکن است از دلایل افزایش بیماریزایی در ایزوله‌های MRSA و انواع جدا شده از بیماران باشد.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت به متی‌سیلین، تخمیر قند

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های کسب شده از اجتماع است که می‌تواند عامل عفونت‌های مهمی همچون باکتریمی، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندرم شوک توکسیک و عفونت‌های پوستی باشد (۱). این باکتری بطور معمول در قسمت قدامی بینی افراد زندگی می‌کند. حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد افراد سالم می‌توانند در هر زمانی حامل سالم *استافیلوکوک* طلائی باشند. در برخی شرایط نیز احتمال حامل بودن بالا می‌رود مانند کادر شاغل در بیمارستان‌ها که معمولاً این افراد می‌توانند موجب انتقال آلودگی به اطرافیان و خصوصاً در محل بیمارستان به بیمارانی که با آنها سروکار دارند، بشوند که این عامل یکی از مهمترین خطرات انتقال عفونت به بیماران بشمار می‌آید (۲). این ارگانیسم سر دسته عوامل به وجود آورنده باکتریمی، عفونت‌های زخم جراحی، یکی از عوامل اصلی عفونت‌های پوست و بافت‌های نرم و از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی و گاهاً در برخی موارد مرگ ومیر می‌باشد (۳). توانائی وسیع این باکتری در ایجاد بیماری، تولید سموم و آنزیم‌های مختلف و نیز توانائی کسب سریع مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از خصوصیات مهم این باکتری می‌باشد (۴).

پیدایش ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین در دهه ۶۰ میلادی اهمیت این باکتری را بطور روزافزون افزایش داد (۵). مکانیسم عمده مقاومت به متی‌سیلین تولید یک (Penicillin PBP (Binding Protein تغییر یافته به نام PBP_{2a} می‌باشد که تمایل کمی را برای اتصال به داروهای بتالاکتام داشته و توسط این داروها مهار نمی‌گردد (۶). مقاومت به متی‌سیلین توسط ژن *mecA* کد می‌شود که روی عنصر ژنتیکی متحرک *SCCmec* قرار دارد و خود دارای ۵ نوع مجزا می‌باشد. *SCCmec*توانایی تبادل بین گونه‌های مختلف استافیلوکوکی را دارا هست (۷).

تغییر در PBP ممکن است منجر به تغییر در ساختمان دیواره باکتری شده که خود ممکن است با تغییر در بعضی فنوتیپ‌ها همراه باشد. در مطالعات گذشته شواهدی از این تغییرات مورد تأکید قرار گرفته است مثلاً ثابت شده است که میزان انتروتوکسین B تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت به متی‌سیلین در ارتباط می‌باشد (۲)، بررسی‌ها روی حضور ژن‌های لوکوسیدین پنتون ولنتین نشان داد که سویه‌های MRSA و MSSA با هم اختلاف دارند (۴ و ۱۱). سلول‌های MRSA مقادیر بالاتری از لیپیدها از همه نوع را نسبت به سلول‌های MSSA در اختیار دارند. آزمایشات نشان داده‌اند که سویه‌های MSSA دارای زمان نسل کوتاه‌تری نسبت به MRSA بوده و در نتیجه تعداد سلول‌های بیشتری در یک ساعت نسبت به MRSA بوجود می‌آورند. بدین معنی که فاز لگاریتمی رشد در شرایط یکسان در سویه‌های MRSA طولانی‌تر از سویه‌های MSSA می‌باشد و احتمالاً جداسازی سلول‌های مقاوم به متی‌سیلین طولانی‌تر خواهد بود. مطالعات بالینی متعدد نشان داده‌اند که هزینه، طول مدت درمان، بیماری‌زایی و میزان مرگ و میر سویه‌های MRSA بیشتر از MSSA است (۷). ولی با این همه تفاوت‌های احتمالی در پاتوژنیسیته و ویرولانس بین سویه‌های MRSA و MSSA هنوز به عنوان یک مشکل باقی مانده است.

بررسی توانای‌ی تخمیر قندها از خواص فنوتیپی مهمی می‌باشد که در رشد و نیز درک اکولوژیک زیستگاه باکتری‌ها اهمیت دارد، در این مطالعه مقایسه‌ای توانایی تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین بررسی شده است. همچنین در *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است تفاوت‌های‌ی بین ایزوله‌های بیماری‌زا و ایزوله‌های‌ی که از افراد حامل سالم جدا می‌شود وجود داشته باشد که در این مطالعه تخمیر قندی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیماران و حاملین نیز با هم مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

روش بررسی:

تعداد ۲۰۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (۵۷ ایزوله MRSA و ۱۴۹ ایزوله MSSA) جدا شده از بیماران بستری (۱۲۰ مورد) و پرسنل درمانی به عنوان حاملین سالم (۸۶ مورد) بیمارستان‌های شهر گرگان که طی سال های ۸۸-۱۳۸۷ جدا شده بودند بررسی شدند. برای تعیین هویت *S. aureus* از روش‌های استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، DNase و کواگولاز به روش‌های لام و لوله استفاده شد (۱۱ و ۱۲). همچنین برای بررسی مقاومت به متی‌سیلین، روش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای 5´-AAA TCA GAT GGT AAA GGT TGG C-3´ و 5´-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3´ انجام گردید (۱۳)، (نتایج ارائه نشده است). برای هر ایزوله

بعد از احیاء و اطمینان از خالص‌سازی تست تخمیر قندها انجام شد، بطورخلاصه محلول ۱٪ از قندهای گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، فروکتوز، گزیلوز، رامنوز، مانوز، سوکروز، ترهالوز، رافینوز یا مالتوز به محیط حاوی ۵ سی‌سی فنل رد براث اضافه گردید. اندیکاتور PH در این محیط فنل رد می‌باشد. قندهای منوساکارید همچون گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، فروکتوز، گزیلوز، رامنوز یا مانوز قبل از اتوکلاو به محیط‌ها اضافه شدند. در مورد سوکروز، ترهالوز، رافینوز یا مالتوز محیط‌های کشت ابتدا اتوکلاو شده و قندها پس از فیلتراسیون در کنار شعله به آنها اضافه شدند. تنظیم pH محیط کشت روی ۷/۴ ضروری است (۱۴).

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند، از کشت ۲۴ ساعته، را در محیط فنل رد براث حاوی هر یک از قندها تلقیح کردیم. محیط‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری کرده و تغییر رنگ را بعد از این مدت بررسی کردیم. تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد نشان تخمیر قند در نظر گرفته شد. در مورد قند گلوکز تغییر رنگ در سه مرحله زمانی (۴ ، ۸ و ۲۴ ساعت) بررسی و ثبت گردید.

توانائی تخمیر قندها در ایزوله‌های MRSA و MSSA و همچنین در ایزوله‌های جدا شده از بیماران و حاملین ثبت و با تست X^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در تجزیه و تحلیل داده‌ها $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

قند گلوکز در ۲۴ ساعت توسط تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* تخمیر شد. در ۱۰ ایزوله MRSA (۱۷/۵٪) تخمیر قند گلوکز از ساعت چهارم قابل مشاهده بود در حالیکه در ایزوله‌های MSSA این میزان ۷/۴٪ برآورد گردید (P=۰/۰۳). بیش از ۹۶٪ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* قندهای مانوز، سوکروز، ترهالوز و فروکتوز، و ۸۶/۳٪ آنها قند گالاکتوز را تخمیر کردند. تفاوت میزان تخمیر در ایزوله‌های MRSA و MSSA برای قندهای رامنوز (P<۰/۰۰۱) و گزیلوز (P=۰/۰۲) از نظر آماری معنی‌دار بود و برای قند گالاکتوز تخمیر در ایزوله‌های MRSA بیش از MSSA بود (P=۰/۰۵۲) (جدول ۱).

میزان تخمیر قند گلوکز در ساعت هشتم در ایزوله‌های جدا شده از بیماران بیش از ایزوله‌های جدا شده از افراد حامل بود به طوریکه ۶۲ ایزوله (۵۱/۷٪) جدا شده از بیماران و ۳۳ مورد (۳۸/۴٪) از حاملین قادر به تخمیر این قند در ساعت هشتم بودند (P=۰/۰۴). ۱۵ نمونه از ایزوله‌های جدا شده از بیماران (۱۲/۵٪) توانایی تخمیر آرابینوز را داشتند در حالیکه در ایزوله‌های جدا شده از حاملین ۵ مورد (۵/۸٪) این توانائی را نشان دادند، این تفاوت با P=۰/۰۸ معنی‌دار نیست اما قابل توجه می‌باشد. توانائی تخمیر قند ترهالوز نیز در ایزوله‌های جدا شده از بیماران بیش از حاملین بوده است (P=۰/۰۵۸). توانائی تخمیر قندهای رافینوز (۳۸/۳٪ در مقابل ۲/۳٪)، رامنوز (۱۱/۷٪ در مقابل ۰٪) و فروکتوز (۱۰۰٪ در مقابل ۹۳٪) در ایزوله‌های جدا شده از بیماران بطور معنی‌داری بیش از ایزوله‌های جدا شده از حاملین بود (P<۰/۰۰۵) (جدول ۲).جدول ۳ مقایسه توانائی تخمیر قندها توسط ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بر مبنای محل ایزولاسیون را نشان می‌دهد و مشخص می‌گردد که در بعضی از موارد تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد، بویژه در تخمیر قند رافینوز و تخمیر سریع (۸ ساعته) قند گلوکز. در سایر موارد اگرچه تفاوت‌هائی مشاهده می‌گردد ولی عمدتاً این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند.

جدول ۱- مقایسه توانایی تخمیر قندها در ایزوله های MRSA و MSSA جدا شده در استان گلستان، ایران

نوع قند	توانایی تخمیر MRSA		MSSA		کل تخمیر		P_{Value}
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	

گلوکز (۴ ساعت)	۱۰	۱۷/۵	۱۱	۷/۴	۲۱	۱۰/۲	۰/۰۳
گلوکز (۸ ساعت)	۲۷	۴۷/۴	۶۸	۴۵/۶	۹۵	۴۶/۱	۰/۴۷
گلوکز (۲۴ ساعت)	۵۷	۱۰۰	۱۴۹	۱۰۰	۲۰۶	۱۰۰	۱
گالاکتوز	۵۳	۹۳	۱۲۴	۸۳/۲	۱۷۷	۸۵/۹	۰/۰۵۲
فروکتوز	۵۷	۱۰۰	۱۴۳	۹۶	۲۰۰	۹۷/۱	۰/۱۳
مانوز	۵۵	۹۶/۵	۱۴۶	۹۸	۲۰۱	۹۷/۶	۰/۴۲
ترهالوز	۵۳	۹۳	۱۴۵	۹۷/۳	۱۹۸	۹۶/۱	۰/۱۵
مالتوز	۵۶	۹۸/۲	۱۳۹	۹۳/۳	۱۹۵	۹۴/۷	۰/۱۴
سوکروز	۵۶	۹۸/۲	۱۴۶	۹۸	۲۰۲	۹۸/۱	۰/۶۹
گزیلوز	۶	۱۰/۵	۴	۲/۷	۱۰	۴/۹	۰/۰۲
آرابینوز	۶	۱۰/۵	۱۴	۹/۴	۲۰	۹/۷	۰/۴۹
رافینوز	۱۷	۲۹/۸	۳۱	۲۰/۸	۴۸	۲۳/۳	۰/۱۱
رامنوز	۱۱	۱۹/۳	۳	۲	۱۴	۹/۷	<۰/۰۰۱

جدول ۲- مقایسه توانایی تخمیر قندها در *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس ایزوله‌های جدا شده از بیماران و افراد حامل جدا شده در استان گلستان، ایران

نوع قند	توانایی تخمیر						P_{Value}
	افراد بیمار		افراد حامل		کل تخمیر		
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
گلوکز (۴ ساعت)	۱۲	۱۰	۹	۱۰/۵	۲۱	۱۰/۲	۰/۵۴
گلوکز (۸ ساعت)	۶۲	۵۱/۷	۳۳	۳۸/۴	۹۵	۴۶/۱	۰/۰۴
گلوکز (۲۴ ساعت)	۱۲۰	۱۰۰	۸۶	۱۰۰	۲۰۶	۱۰۰	۱
گالاکتوز	۱۰۵	۸۷/۵	۷۲	۸۳/۷	۱۷۷	۸۵/۹	۰/۲۸
فروکتوز	۱۲۰	۱۰۰	۸۰	۹۳	۲۰۰	۹۷/۱	۰/۰۰۵
مانوز	۱۱۹	۹۹/۲	۸۲	۹۵/۳	۲۰۱	۹۷/۶	۰/۰۹
ترهالوز	۱۱۸	۹۸/۳	۸۰	۹۳	۱۹۸	۹۶/۱	۰/۰۵۸
مالتوز	۱۱۲	۹۳/۳	۸۳	۹۶/۵	۱۹۵	۹۴/۷	۰/۲۵
سوکروز	۱۱۸	۹۸/۳	۸۴	۹۷/۷	۲۰۲	۹۸/۱	۰/۵۵
گزیلوز	۸	۶/۷	۲	۲/۳	۱۰	۴/۹	۰/۱۳
آرابینوز	۱۵	۱۲/۵	۵	۵/۸	۲۰	۹/۷	۰/۰۸
رافینوز	۴۶	۳۸/۳	۲	۲/۳	۴۸	۲۳/۳	<۰/۰۰۱
رامنوز	۱۴	۱۱/۷	۰	۰	۱۴	۶/۸	<۰/۰۰۱

جدول ۳- مقایسه توانایی تخمیر قندها در *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس محل جداسازی

نوع قند	ادرار		خون		زخم		سایر نمونه‌ها		P_{Value}
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
گلوکز (۴ ساعت)	۵	۱۲/۲	۴	۱۶	۲	۷/۱	۰	۰	>۰/۰۵
گلوکز (۸ ساعت)	۲۹	۷۰/۷	۱۳	۵۲	۹	۳۲/۱	۶	۳۷/۵	۰/۰۰۹
گلوکز (۲۴ ساعت)	۴۱	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۲۸	۱۰۰	۱۶	۱۰۰	>۰/۰۵
گالاکتوز	۳۶	۸۷/۸	۲۴	۹۶	۲۵	۸۹/۳	۱۲	۷۵	>۰/۰۵
فروکتوز	۴۱	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۲۸	۱۰۰	۱۶	۱۰۰	>۰/۰۵
مانوز	۴۰	۹۷/۶	۲۵	۱۰۰	۲۸	۱۰۰	۱۶	۱۰۰	>۰/۰۵
ترهالوز	۴۰	۹۷/۶	۲۴	۹۶	۲۸	۱۰۰	۱۶	۱۰۰	>۰/۰۵
مالتوز	۳۸	۹۲/۷	۲۵	۱۰۰	۲۶	۹۲/۹	۱۳	۸۱/۳	>۰/۰۵
سوکروز	۴۱	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۲۷	۹۶/۴	۱۶	۱۰۰	>۰/۰۵
گزیلوز	۲	۴/۹	۲	۸	۲	۷/۱	۱	۶/۳	>۰/۰۵
آرابینوز	۶	۱۴/۶	۳	۱۲	۵	۱۷/۹	۰	۰	>۰/۰۵
رافینوز	۲۳	۵۶/۱	۷	۲۸	۸	۲۸/۶	۴	۲۵	۰/۰۳
رامنوز	۵	۱۲/۲	۴	۱۶	۲	۷/۱	۱	۶/۳	>۰/۰۵

بحث:

طیف وسیعی از قندها توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار می‌گیرند. دو مدل از انتقال کربوهیدرات در *استافیلوکوک اورئوس* شناخته و مطالعه شده است: (۱) سیستم فسفوترانسفراز قند (PTS)، که مسئول اتصال، انتقال ترانس‌ممبران و فسفریله کردن سوبستراهای قندی بیشماری می‌باشد. (۲) انتقال کربوهیدراتی مستقل از PTS که قند توسط یک پرمئاز منتقل شده و سپس بوسیله یک کیناز وابسته به ATP فسفریله می‌شود. برای بیشتر قندها، به عنوان مثال گلوکز، هر دو مدل سیستم‌های انتقال در یک گونه وجود دارد تا انتقال مؤثر را تضمین کند، همچنین قندهای مانیتول، گالاکتوز، مانوز تنها توسط PTS منتقل می‌شوند (۱۵).

توانائی تخمیر قندها بعنوان یکی از منابع اصلی غذائی در *استافیلوکوک*‌ها ضروری به نظر می‌رسد.اکثریت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توانائی تولید اسید از قندهای مختلفی مثل گلوکز، مانیتول، مانوز، ترهالوز، مالتوز و ساکاروز را دارند (۱۵)، این پدیده در ایزوله‌های جدا شده از منطقه ما نیز مشاهده شده است. در مطالعه حاضر همه ایزوله‌ها قند گلوکز را تخمیر کرده‌اند و در حدود ۱۰٪ از آنها، این فرایند در همان ۴ ساعت اولیه آغاز شده است، این رقم در ۸ ساعت به ۴۶٪ رسید که نشانگر نیاز شدید باکتری به مصرف سریع این قند برای رشد می‌باشد. مطالعه ما نشان

داد که کمتر از ۱۰٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تخمیر قندهای آرابینوز و گزیلوز را دارند در حالیکه در منابع علمی مثل کتاب " Bergey's manual of determinative bacteriology" (۱۶) و " The Prokaryotes" (۱۵) در جداول تشخیصی به عدم توانایی تخمیر این قندها توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* اشاره شده است، همچنین توانایی تخمیر قند رافینوز در ایزوله‌های جدا شده در این منطقه ۲۳٪ می‌باشد که بیش از حد مورد انتظار (<۱۰٪) می‌باشد (۱۵). از طرفی مطالعه Adegoke در سال ۱۹۸۲ (۱۷) و نیز Ajuwape در سال ۲۰۰۱ (۱۸) نشان داد که به ترتیب ۸۱/۷٪ و ۴۶/۳٪ ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تخمیر قند گزیلوز می‌باشند. این تفاوت ممکن است نشانگر تفاوت در ویژگی‌های ایزوله‌های بومی در این منطقه به نسبت نقاط دیگر باشد، بررسی کامل‌تر این پدیده در سایر نقاط ایران می‌تواند در شناسایی ویژگی‌های ایزوله‌های بومی ایران مؤثر باشد. از طرفی مشخص گردید که در مورد هر سه قند فوق و نیز قند رامنوز توانایی تخمیر در ایزوله های MRSA بیش از MSSA می‌باشد به همین دلیل پیشنهاد می‌گردد مطالعات وسیع‌تری در مورد نقش PBP_{2a} در کسب این توانایی انجام شود.

بررسی Adegoke در سال ۱۹۸۲ روی ۸۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بز نشان داد که ۱۰۰٪ ایزوله‌ها قند گلوکز را در ۲۴ ساعت تخمیر کرده‌اند. همچنین ۹۸/۸٪ از سویه‌ها قند مالتوز، ۹۸/۷٪ از سویه‌ها قند سوکروز را همراه با تولید اسید تخمیر کردند (۱۷). همچنین در مطالعه Ajuwape تمامی ۱۰۸ ایزوله جدا شده قندهای گلوکز، مانیتول و سوکروز را تخمیر کردند، همچنین ۹۸/۱٪ از ایزوله‌های جدا شده قند مالتوز و ۸۹/۱٪ از ایزوله‌های جدا شده قند ترهالوز را تخمیر کردند (۱۸). این یافته‌ها مشابه نتایج در ایزوله‌های منطقه ما می‌باشد.

گلوکز، گالاکتوز، مانوز و گزیلوز، بخشی از هشت قند ضروری برای بدن می‌باشند که از آنها به عنوان گلیکونوترینت نام برده می‌شود. وجود این مواد برای فعالیت‌های حیاتی بافت‌ها ضروری است و بسیاری از آنها می‌تواند در سطح سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن مستقر گردند، مثلاً وجود گالاکتوز در روی سلول‌های خونی، وجود مانوز در سلول‌های دستگاه ادراری و ... می‌تواند بر اهمیت این قندها بعنوان رسپتور *استافیلوکوکوس* تأکید نماید.

همچنین در مواردی که باکتری به فرم مهاجم تبدیل می‌شود یا قدرت بیماریزائی آن افزایش می‌یابد انتظار می‌رود که توانائی تخمیر قندها نیز افزایش یابد.

نتایج ما نشان داد که مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با افزایش توانائی تخمیر قندها همراه می‌باشد، بویژه در تخمیر قندهای رامنوز، گزیلوز و گالاکتوز این توانائی مشخص‌تر می‌شود، سرعت تخمیر قند گلوکز نیز در ایزوله‌های MRSA بیش از ایزوله‌های MSSA می‌باشد. بر این اساس این فرض که تولید PBP2a ممکن است منجر به افزایش نفوذپذیری قندها به داخل باکتری‌ها گردد مطرح می‌شود که اثبات آن نیاز به تحقیقات گسترده‌تر دارد. همچنین توانایی تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران عموماً بیشتر از حاملین می‌باشد و بیشترین تفاوت در تخمیر قندهای فروکتوز، رافینوز، رامنوز و ترهالوز دیده می‌شود که این پدیده ممکن است از دلایل افزایش بیماریزائی در ایزوله‌های جدا شده از بیماران باشد.

در بررسی توانائی تخمیر قندها بر حسب محل ایزولاسیون باکتری مشخص گردید که ایزوله‌های جدا شده از نمونه ادراری توانائی بیشتری در تخمیر قندهای گلوکز (در ساعت هشتم) و رافینوز دارند و این تفاوت با سایر ایزوله‌ها کاملاً معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۳ و P=۰/۰۰۹). توانائی تخمیر قندهای گالاکتوز و مالتوز در ایزوله‌های جدا شده از خون و تخمیر قند آرابینوز در ایزوله‌های جدا شده از زخم بیش از سایر ایزوله‌ها می‌باشد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. اهمیت بالینی این پدیده برای ما مشخص نمی‌باشد ، به همین دلیل مطالعات کامل‌تر در زمینه اهمیت بالینی و نیز مشخص کردن تفاوت در فراوانی این قندها در نمونه‌های ادرار، خون و زخم در مطالعات آینده می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری:

مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با افزایش توانائی تخمیر قندها همراه می‌باشد. همچنین توانایی تخمیر قندها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیشتر از حاملین سالم می‌باشد که این پدیده ممکن است از دلایل افزایش بیماریزائی در ایزوله‌های MRSA و انواع جدا شده از بیماران باشد.

فهرست مراجع:

1. Weichhart T, Horky M, Sollner J, Gangl S, Henics T, Nagy E, et al. Functional Selection of Vaccine Candidate Peptides from *Staphylococcus aureus* Whole-Genome Expression Libraries In Vitro. *Infect Immun* 2003; **71**(8): 4633-41.
2. Waldrogel FA. *Staphylococcus aureus*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Churchill Livingstone Press. 2000; PP: 2072-3.
3. Parsonnet J, Deresiewic RL. Staphylococcal infections. In: Branwald E, Fauci AS. *Harrison 's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. McGraw-Hill Book Press. 2001; PP: 889-901.
4. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol* 1999; **37**(11): 3556-63.
5. Shurland S, Zhan M, Bradham D, Roghmann MC. Comparison of Mortality Risk Associated With Bacteremia Due to Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**(3): 273-9.
6. Finan JE, Rosato AE, Dickinson TM, Ko D, Archer GL. Conversion of Oxacillin-Resistant *Staphylococci* from Heterotypic to Homotypic Resistance Expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**(1): 24-30.
7. Rozgonyi F, Kocsis E, Kristof K, Nagy K. Is MRSA more virulent than MSSA? *Clin Microbiol Infect* 2008; **13**(9): 843-5.
8. Coia JE, Browning L, Haines L, Birbeck TH, Platt DJ. Comparison of enterotoxins and haemolysins produced by methicillin-resistant (MRSA) and sensitive (MSSA) *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1992; 36(): 164-171.
9. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau- Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2006; 193(): 1495-503.
10. Robert J, Etienne J, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(): 585-7.
11. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey&scotts Diagnostic microbiology*. 12th ed. USA; Elsevier. 2007; PP: 172-213.
12. Vaez H, Ghazi Saeidi K, Moradi A, Tabaraei A, Khodabakhshi B, Bazouri M, et al. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009. *Iranian J Medical Microbiology* 2009; **3**(4): 31-6.
13. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modified DNA Extraction for Rapid PCR Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococci*. *Iranian Biomedical J* 2004; **8**(3): 161-5.
14. Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*. 3th ed. CRC Press; 2004: 1381-3.
15. Gotz F, Bannermant T, Schleifer K. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The Prokaryotes*, Volume 4. 3th ed. Springer Press. 2006; 61-70.
16. Holt JG, Bergey DH, Breed RS. Gram Positive Cocci. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins Press. 1993; 527-59.
17. Adegoke GO, Ojo MO. Biochemical characterization of *Staphylococci* isolated from goats. *Vet Microbiol* 1982; **7**(5): 463-70.
18. Ajuwape AT, Aregbesola EA. Biochemical Characterization of *Staphylococcus* isolated from Rabbits. *Isr J Vet Med* 2001; **56**(2): 17-21.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره۳ پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۶۰-۵۵

مقایسه نتایج تشخیص ازمایشگاهی عفونتهای باکتریال بیمارستانی با استفاده ازروشهای استاندارد

سعید عابدیان[۱] ، محترم نصرالهی[۲] ، محمد خادملو[۳]، مریم سرابی جماب [۴]، فرشیده عابدیان[۵]، عرازمحمد میرابی[۵]، محمود دودانگه [۶]

نویسنده رابط: سعید عابدیان

همراه:

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۴/۲ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۶/۲۶

چکیده:

زمینه و اهداف :استفاده از روشهای استاندارد جهت تشخیص دقیق باکتریها و انجام آزمایش حساسیت انتی بیوتیکی صحیح و به تبع ان درمان بموقع و موثر عفونتهای باکتریال نقش مهمی در توسعه سلامت جامعه و جلوگیری از مقاومتهای دارویی دارد. این تحقیق باهدف استفاده از روشهای استاندارد در تشخیص باکتریها و مقایسه ان با نتایج بدست امده در ازمایشگاه های بیمارستان های آموزشی و درمانی انجام گرفته است.

روش بررسی : در این مطالعه کشتهای مثبت پلیتهای حاوی باکتریها ی جداشده از نمونه بیماران ازمایشگاههای چند بیمارستان پس از تعیین جنس وگونه باکتری و انجام ازمایشات حساسیت انتی بیوتیکی به ازمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شده و بر اساس پروتکلهای استاندارد مورد بررسی مجدد قرار گرفته و از نظر جنس و گونه مورد مطالعه قرار گرفتند و سپس ازمایش حساسیت به انتی بیوتیکها بروش کربی بائر انجام شد.

یافته ها : از ۱۰۱ نمونه مورد بررسی بیست در صد موارد باکتریهای گزارش شده توسط ازمایشگاه بیمارستانها و ۲۲/۵در صد حساسیت های انتی بیوتیکی ناصحیح بوده است و اختلاف معنی داری بین دو گروه مورد مطالعه در تشخیص های گونه های باکتریا ل و حساسیت به برخی از داروها دیده شده است($P<0.05$) .

نتیجه گیری :عدم برقراری برنامه های کنترل کیفی داخلی در برخی از ازمایشگاهها و همچنین عدم نظارت بموقع و صحیح مراجع نظارتی دربخشهای مختلف بیمارستانی سبب شده تا 20درصد از موارد تشخیص بیمارستانی در این مطالعه درست نبوده است .عدم تطابق نتایج بین ازمایشگاهها ، انتی بیوگرام های ناصحیح وبه تبع ان گزارشات ازمایشگاهی غلط مبتنی بر ان سبب ایجا د مقاومت دارویی در برخی از بیماران میشود که لزوم اموزش مستمر در زمینه های میکروبشناسی و استفاده از پروتکلهای استاندارد در تشخیص گونه های باکتری وبکار گیری تعیین حساسیت دارویی استاندارد بسیار ضروری بنظر میرسد.

کلید واژه ها: کشت ،مقاومت دارویی ،انتی بیوگرام

مقدمه

عفونت های باکتریال از عوامل اصلی بروز بیماری های عفونی و از علل عمده مرگ و میر در جهان محسوب می شوند (۱) . تشخیص دقیق این عوامل و شناسایی درست انها سبب درمان صحیح بیماریها و جلوگیری از هدر رفتن منابع انسانی و اقتصادی میشود که دراین راستا ازمایشگاهها ی تشخیص طبی در بیمارستانها از اهمیت ویژه ای برخوردارند. از علل عمده عوامل باکتریا ل در ایجاد بیماری میتوان از باکتری **اشرشیا** کولی (E. Coli) در عفونتهای ادراری ، باکتری استافیلوکوک اورئوس در عفونت زخمها و پسودومونا س ائروژینوزا در تولید عفونتهای بیمارستانی نلم برد که در این راستا داشتن دانش کافی مبتنی بر علوم میکروبشناسی ، داشتن تجربه کافی ، استفاده از اخرین منابع علمی در علم میکروب شناسی ودرنهایت استفاده از اخرین پروتکلهای سازمان جهانی بهداشت و ازمایشگاههای رفرانس در تشخیص جنس وگونه باکتریها اهمیت بسزایی دارد. تشخیص دقیق و استاندارد باکتریها و متعاقب ان آنتی بیوگرام صحیح و به تبع آن درمان به موقع و موثر بیماری ها نقش مهمی در توسعه سلامت جامعه دارد (۲). عدم تطابق نتایج بین آزمایشگاه ها و آنتی بیو گرام های نا صحیح و گزارشات آزمایشگاهی غلط مبتنی بر آن معضلات فراوانی برای جامعه به همراه داشته است (۳).در این راستا مقاومت ها دارویی یکی از معضلات بهداشتی درمانی محسوب می شود که ناشی از مصرف بی رویه و تجویز نامناسب دارو ها می با شد.(۴) در حال حاضر مقاومتهای دارویی بعنوان یک مشکل عمومی در سلامت افراد بخصوص در عفونت های بیمارستانی بشمار می ایند(۵و۶و۷و۸و۹و۱۰). بدیهی است تشخیص درست و درمان بموقع عفونتهای باکتریایی سبب کاهش عفونتهای بیمارستانی شده و از اثرات تحمیل هزینه ها ی بیمارستانی به بیماران کاسته میشود .با توجه به مطالب فوق این مطالعه با هدف ارزیابی کشتهای باکتریال و انتی بیوگرام برخی از مایشگاههای بیمارستانها و مقایسه نتایج انها با نتایج حاصل از روشهای استاندارد سازمان جهانی بهداشت و از مایشگاههای رفرانس پایه ریزی گردید.

روش بررسی:

۱-۲.کشت

تعداد ۱۰۱نمونه از کشتهای مثبت باکتریال شامل پلیتهای اگار خوندار ،مولر هینتون، شکلات اگار و کشتهای خون ازازمایشگاههای بیمارستانها به بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شد وسپس نمونه ها در محیطهای اختصاصی و غیر اختصاصی پاساژداده شدند. پس از ۲۴تا ۷۲ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷درجه و اتمسفر حاوی Co2 وبدون آن از نمونه ها لام میکروسکوپی تهیه شد و بروش گرم ، رنگ امیزی گردید. بر اساس گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتریها ازمایشهای افتراقی براساس دستورالعملهای سازمان جهانی بهداشت و ازمایشگاههای رفرانس ا نجام شد(۱۱و۱۲).

۳-۲. ازمایش تعیین حساسیت

جهت همه نمونه ها پس از تعیین جنس و گونه و مقایسه انها با نتایج حاصله ازآزمایشگاههای بیمارستانها با استفاده از روش استاندارد کربی بوئر و به روش انتشار از دیسك ازمایش تعیین حساسیت انتی بیوتیکی انجام شد . با اندازه گیری قطر هاله عدم رشدو بر اساس جداول استاندارد ، میزان حساسیت یا مقاومت باکتریهای جداشده تعیین گردیدو سپس با جداول استاندارد مقایسه شده است. جهت انجام انتی بیوگرام از همان دیسکهای انتی بیوتیکی در ازمایشگاههای بیمارستانها استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت در تشخیص گونه های باکتری و تعداد انها در ازمایشگاهها و روش های مرجع دیده میشود(جدول شماره۱). بعلاوه نتایج حاصل از ازمایش حساسیت انتی بیوتیکی تفاوت معنی داری ($P<0.05$) را در حساسیت به برخی از انتی بیوتیکها از قبیل جنتامایسین و سفتازوکسیم نشانداده است (جدول شماره ۲).

مقایسه نتایج ازمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نیز نشان دهنده تفاوت در نتایج گزارش شده از سوی آزمایشگاههای بیمارستان ها و این تحقیق می باشد. در این مطالعه میزان حساسیت هر یك از باکتریها ی جداشده نسبت به انتی بیوتیکها با یکدیگر مقایسه گردیدتا اگر تفاوتی بین نتایج ازمایش ازمایشگاههای بیمارستانها و ازمایشگاه دانشکده وجود دارد مشخص گردد. این مقایسه نشان داد که تفاوت معنی داری با $P<0.05$برای آنتی بیوتیک سفالوتین نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس ، جنتامایسین برای اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس ، آنتی بیوتیک سفتیزکسیم برای اشرشیاکولی ، نیتروفورانتئین برای اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس ،کوتری موکسازول برای آنتروباکتر آنروژنزا و در نهایت آنتی بیوتیک وانکومایسین برای استافیلوکوکوس اورئوس در بین نتایج آزمایشگاههای بیمارستانها و آزمایشگاه دانشکده پزشکی وجود دارد (جدول شماره ۳و۴).

جدول شماره۱ .مقایسه نتایج کشت نمونه ها در ازمایشگاههای بیمارستانها و ازمایشگاه دانشکده پزشکی

گروه مطالعه / گونه	بیمارستانها (تعدادموارد)	آزمایشگاه دانشکده (تعدادموارد)
اشرشیاکولی	۶۱	۵۳
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۱۲
انتروباکتر کلوآکه	۰	۷
انتروباکتر آئروژینوزا	۱	۳
سودوموناSP	۶	۵
انتروباکترSP	۷	۵
استافیلوکوکوسSP	۲	۰
استافیلوکوکوس کواگولاز منفی	۳	۳
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	۰	۱
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۳	۰
سودوموناس آئروزینوزا	۱	۱
سودوموناس سپاسیا	۰	۳
پروتئوسSP	۳	۰
پروتئوس میرابلیس	۰	۲
سیتروباکتردیورسوس	۰	۱
سیتروباکتر فروندی	۰	۱
سراشیا مارسه سنس	۰	۱
کلبسیلاSP	۱	۳
باسیل گرم منفی	۲	۰

جدول شماره ۲ . مقایسه نتایج آزمایش تعیین حساسیت ازمایشگاههای بیمارستانها و آزمایشگاه دانشکده پزشکی که تفاوت معنی داری نسبت به برخی از آنتی بیوتیکها مشاهده گردید.

گروه / آنتی بیوتیک	بیمارستانها		آزمایشگاه دانشکده		P
	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	
سفالوتین	۸ (۱۳,۳%)	۵۲ (۸۶,۷%)	۱۸ (۲۰%)	۷۲ (۸۰%)	P>0.05
جنتامایسین	۲۵ (۳۰,۹%)	۵۶ (۶۹,۱%)	۶۰ (۶۲,۵%)	۳۶ (۳۷,۵%)	P<0.05
سفتیزکسیم	۱۹ (۲۷,۱%)	۵۱ (۷۲,۹%)	۴۸ (۵۴,۵%)	۴۰ (۴۵,۵%)	P<0.05
نیتروفورانتئین	۳۹ (۴۸,۸%)	۴۱ (۵۱,۳%)	۶۰ (۶۲,۵%)	۳۶ (۳۷,۵%)	p>0.05
کوتری موکسازول	۳۰ (۳۱,۶%)	۶۵ (۶۸,۴%)	۴۳ (۴۴,۳%)	۵۴ (۵۵,۷%)	p>0.05
سیپروفلوکساسین	۳۸ (۴۳,۷%)	۴۹ (۵۶,۳%)	۴۶ (۴۷,۹%)	۵۰ (۵۲,۱%)	p>0.05
نورفلوکساسین	۵ (۶۲,۵%)	۳ (۳۷,۵%)	۱۰ (۶۲,۵%)	۶ (۳۷,۵%)	p>0.05
نالیدیکسیک اسید	۱۶ (۲۵,۸%)	۴۶ (۷۴,۲%)	۲۵ (۳۲,۱%)	۵۳ (۶۷,۹%)	p>0.05
ونکومایسن	۳ (۲۳,۱%)	۱۰ (۷۶,۹%)	۱۱ (۷۳,۳%)	۴ (۲۶,۷%)	P<0.05

جدول ۳: مقایسه حساسیت باکتریها نسبت به جنتامایسین

مکان / گونه باکتری	بیمارستانها		دانشکده		P
	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	
اشرشیاکولی	۱۲(۲۵%)	۳۶(۷۵%)	۳۵(۷۱,۴%)	۱۴(۲۸,۶%)	P<0.05
استافیلوکوکوس اورئوس	۱(۱۱,۱%)	۸(۸۸,۹%)	۷(۵۸,۳%)	۵(۴۱,۷%)	P<0.05
انتروباکترآروژنز	۱(۱۰۰%)	۰(۰%)	۱(۳۳,۳%)	۲(۶۶,۷%)	P>0.05
سودومونا سSP	۱(۲۰%)	۴(۸۰%)	۳(۶۰%)	۲(۴۰%)	P>0.05
انتروباکتر SP	۲(۳۳,۳%)	۴(۶۶,۷%)	۴(۸۰%)	۱(۲۰%)	P>0.05
استافیلوکوکوس کواگولاز منفی	۱(۱۰۰%)	۰(۰%)	۲(۶۶,۷%)	۱(۳۳,۳%)	P>0./05
سودومونا س اثروژینوزا	۱(۱۰۰%)	۰(۰%)	۰(۰%)	۱(۱۰۰%)	P>0.05
کلبسیلاSP	۰(۰%)	۱(۱۰۰%)	۱(۳۳,۳%)	۲(۶۶,۷%)	P>0.05

جدول ۴ : مقایسه حساسیت باکتریها نسبت به کوتری موکسازول

مکان / گونه باکتری	بیمارستانها		دانشکده		P
	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	حساس مورد (درصد)	مقاوم مورد (درصد)	
اشرشیاکولی	۱۸(۳۱,۶%)	۳۹(۶۸,۴%)	۲۷(۵۴%)	۲۳(۴۶%)	P<0.05
استافیلوکوکوس اورئوس	۲(۲۲,۲%)	۷(۷۷,۸%)	۵(۴۵,۵%)	۶(۵۴,۵%)	P>0.05
انتروباکترآروژنز	۱(۱۰۰%)	۰(۰%)	۰(۰%)	۳(۱۰۰%)	P<0.05
استافیلوکوک کواگولاز منفی	۲(۱۰۰%)	۰(۰%)	۲(۶۶,۷%)	۱(۳۳,۳%)	P>0.05
سودوموناس SP	-	۶(۱۰۰%)	-	۵(۱۰۰%)	P>0.05
انتروباکترSP	۲(۲۸,۶%)	۵(۷۱,۴%)	۲(۴۰%)	۳(۶۰%)	P>0.05
کلبسیلاSP	۰(۰%)	۱(۱۰۰%)	۱(۳۳,۳%)	۲(۶۶,۷%)	P>0.05

بحث و نتیجه گیری:

یکی از علل شایع مرگ و میر درجوامع انسانی عفونتهای ناشی از باکتریها می باشد لذا تشخیص به موقع عوامل این عفونتها و تعیین حساسیت عامل آنها نسبت به آنتی بیوتیکها ی موجودمی تواند گامی موثر در جهت بهبود بیماری و کاهش مرگ و میر باشد.در این راستا تحقیق حاضر ، بر اساس تشخیص باکتریها با استفاده از روشهای شناسایی استاندارد باکتریها و تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آنها بر مبنای شیوه های استاندارد پایه ریزی شده است .دراین مطالعه بطور کلی تشابه ۸۰% بین نتایج کشت و مشابهت ۷۸,۵% بین نتایج ازمایش تعیین حساسیت در بین دوگروه دیده میشود.

با توجه به برخی از گزارشات نا همگون بدست امده از ازمایشگاههای بیمارستان ها و آزمایشگاه دانشکده پزشکی ، علاوه بر تفاوت در تعداد باکتریهای به دست امده از کشتها ، در گونه باکتریها و موارد انها نیز جواب ها متفاوت بوده است به طوری که در نتایج کشت آزمایشگاه دانشکده پزشکی گونه هایی از قبیل ،پروتئوس میرابلیس ،سیتروباکتر دیورسوس،سیتروباکتر فروندی،سراشیا مارسه سنس مشاهده گردید ، در حالیکه این گونه باکتریها در نتایج از مایشگاههای بیمارستانی به چشم نمی خورد و لذا این باکتریها اشتباها تحت عنوان گونه دیگری گزارش گردیده اند

که این تفاوتها میتواند ناشی ازعدم استفاده از محیط های کشت افتراقی IMVIC و آزمایشات اختصاصی در ازمایشگاه بیمارستانها جهت شناسایی باکتریها باشد ، در حالیکه استفاده از محیط های افتراقی و سایر ازمایشهای اختصاصی در آزمایشگاه دانشکده پزشکی موجب شناسایی گونه های بیشتری و متنوع تری گردید.

تفاوت در موارد استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده از سوی بیمارستانها نسبت به دانشکده ، نشان میدهد که برای شناسایی این باکتری از آزمایشات کواگولاز ،DNase و آزمایش تخمیر قند مانیتول که در دانشکده پزشکی استفاده می گردید در بیمارستان استفاده نشده است . تفاوت در موارد گونه های کشت کلبسیلا نیز نمایانگر عدم استفاده از محیط سیمون سیترات ،وگزپروسکوئر(VP) ،محیط مانیتول آگارو سایر محیط های افتراقی جهت شناسایی این باکتری در بیمارستانها است. بعلاوه در نتایج به دست آمده از آزمایشگاه دانشکده پزشکی گزارشی از استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دیده نمی شود در حالیکه آزمایشگاه بیمارستان ۳ مورد از این گونه باکتری را گزارش نموده اند و یا در نتایج بیمارستان ،

استافیلوکوکوس اپیدرمیس دیده نمی شود در حالیکه دانشکده پزشکی یک مورد را گزارش کرده است که این عدم هماهنگی در نتایج نشان دهنده عدم استفاده ازازمایش حساسیت نسبت به تست نووبیوسین در افتراق بین استافیلوکوکوس اپیدرمیس از استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس می باشد.

از دیگر آزمایشات اختصاصی استفاده شده در آزمایشگاه دانشکده پزشکی استفاده از تست حساسیت نسبت به باسیتراسین جهت شناسایی استرپتوکوکهای بتا همولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوکها و آزمایش حساسیت به اپتوچین جهت شناسایی استرپتوکوک پنومونیه از استرپتوکوکهای آلفا همولیتیك می باشد که سبب شناسایی سویه های باکتریهای استرپتو کوکوس در ازمایشگاه دانشکده پزشکی شده است .

از نتایج دیگر حاصل از این مطالعه ،عدم هماهنگی بین نتایج ازمایش تعیین حساسیت می باشد و با توجه به این که هردو گروه از دیسکهای آنتی بیوتیکی یکسان و تهیه شده از یك شرکت سازنده برای تعین حساسیت استفاده نموده اند ،عدم انجام روش صحیح کربی بوئر سبب ایجاد تفاوت معنی داری در برخی از نتایج گردید. از میان ۹ آنتی بیوتیک مورد استفاده ، تفاوت معنی داری در حساسیت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفتیزکسیم و وانکومایسین بین دوگروه مشاهده گردید($P<0.05$).

در این مطالعه مقایسه ای بین حساسیت هر یك از باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک ها ی موجودبطور جداگانه صورت گرفت . این مقایسه نشان داد که تفاوت معنی داری بین حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سفالوتین ، حساسیت اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به جنتامایسین ، حساسیت اشرشیاکولی نسبت به سفتی زوکسیم، حساسیت اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نیتروفورانتوئین و حساسیت انتروباکتر آنروژنز نسبت به کوتریموکسازول ودر نهایت حساسیت استافیلوکوک اورئوس نسبت به وانکومایسین در بین نتایج بدست امده از آزمایشگاههای بیمارستانها و آزمایشگاه دانشکده پزشکی وجود دارد ($P<0.05$).

در مطالعه ای که آقای karlowskey و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام دادند نشان می دهد که شایع ترین باکتری های جدا شده از کشت ها به ترتیب استافیلوکوکوس کواگولاز منفی ، استافیلوکوکوس اورئوس ، انتروکوکوس فکالیس ، کلبسیلا و اشرشیاکولی بودند(۱۳) و در مطالعه آقای Hsueh و همکاران در طی سالهای ۱۹۸۱-۱۹۹۹ در تایوان نشان می دهدکه ، اولین علت عفونتهای بیمارستانی و سپتی سمی بترتیب کاندیدا ، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکولی می باشد.(۱۴) در مطالعه حاضر بیشترین موارد باکتریهای جدا شده، اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس بوده است که که با مطالعات دیگران همخوانی دارد.. در مطالعه آقای karlowskey و همکاران بیشترین میزان حساسیت به داروها در بین باکتریهای شایع جدا شده نسبت به سفتریاکسون بوده است (۱۳)در حالیکه در مطالعه ما بیشترین میزان حساسیت در بین باکتریها نسبت به نور فلوکساسین بوده است. در مطالعه آقای Hsueh و همکاران افزایش مقاومت به سفوتاکسیم را دربین خانواده انتروباکترها بویژه در کلبسیلا پنومونیه ذکر کرده اند در حالیکه مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها متعلق به کلبسیلا و سودوموناس بوده است و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک سفتیزکسیم در سودوموناس و در کلبسیلا دیده شد.

در مطالعه آقای Bilgin Arda و همکاران در سال۲۰۰۷ که بر روی ۱۰۰۰ بیماردر ترکیه انجام شده نشان می دهد که در درمان عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس ، میزان مقاومت دارویی نسبت به انتی بیوتیکهایی از قبیل جنتامایسین ، متی سیلین و پنی سیلین و همچنین در درمان عفونتهای ناشی از کلبسیلا مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۳ افزایش داشته است. (۱۵) در این راستا مطالعه حاضرنشان میدهد که استفاده مناسب از آنتی بیوتیک ها و تجویز درست آنها یکی از مهمترین و مشخص ترین راهها در جلوگیری از مقاومت دارویی و کاهش هزینه ها ی در مان است . لذا بر اساس این مطالعه پیشنهاد می شود که نمونه های کنترل کیفی همه ماهه به بیمارستانها ارسال و نتایج حاصله پس از آنالیز در آموزش کارکنان بیمارستانها مورد استفاده قرار گیرد، بعلاوه کلیه بیمارستانها مجاب به استفاده از روش های استاندارد تشخیصی بر اساس پروتکلهای سازمان جهانی بهداشت و ازمایشگاههای مرجع کشوری شوند و روش کربی بوئر جایگزین رو شهای سنتی آزمایش حساسیت انتی بیوتیکی شود.

فهرست مراجع:

1- Finland M, Jones W.F, Barens M. Occurrence of serious bacterial infections since introduction of antibacterial agents. *J Am Med Asso.* 1959; **170**:2188-97.

2-Plowman R, Graves N, Girrifin M, Roberts J, Swan B, and Taylor I. The Socio-economic burden of hospital acquired infection. *Euro Surveill.* 2000; **5**(4): 49-50

3- Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA.. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis.* 1987 Nov-Dec; 9(6):1065-78

4-Kollef M. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin.infect.dis.* 2000; **31**; 131-138

5- Cardo D.National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Infect Control.* 2004 Dec; **32**(8):470-85

6-Emori T.G, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory .*Clin microbial Rev* 1993; **6**; 428-42

7-Fridkin SK, Steward CD,Edward JR. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in united states

hospitals:project ICARE phase 2 .*Clin infect Dis*. 1999;**29**:245-52.

8-Sahm DF, Marsilino MK, Piazza G. Antimicrobial resistance in key blood steam bacterial isolates: electronic surveillance with the surveillance network database- USA.*Clin infect Dis*. 1999;**29**:259-63

9-Fraser VJ, Jones M, Dunkel J.Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology risk factors and predictors of mortality. *Clin infect Dis*.1992; **14**:414-21

10- Husni RN, Goldstein LS, Arroliga AC, Hall GS, Fatica C, Stoller JK. Risk factors for an outbreak of multi-drug–resistance acinetobacter nosocomial pneumonia among intonated patients. *Chest*. 1999; **115**:1378-82

۱۱-صارمی م.صارمی م . محیط های کشت ازمایشگاهی و روشهای استاندارد (ازمایشگاه مرجع سلامت). جلد ۱- انتشارات نوید شیراز- ۱۳۸۷

12- Baron E J, Finegold SM. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 8th ed. USA; Mosby Co. 2008

13- Karlowsky J A, Jones E, Deborah C, Dragil,C, Daniel F .Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the united states. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004 May 10;3:7.

14- Hsueh PR, Chen MI, Sun CC, Chen WH, Pan HJ, and et al .Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan1981-1999. *Emerging infectious disease*.2002, **8**(1)451-459

13- Arda B, Siphahi OR, Yamazhan T, Tasbakan M, Pullukch H, Tunger A, Buke C and et al. Short term effect of antibiotic control policy on the usage patterns and cost of antimicrobials,mortality, nosocomial infection rates and antibacterial resistance *Jornal of infection*.2007;**155**(1)41-48