بسم الله الرحمن الرحیم

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران

فصلنامه:
سال۴، شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹

ISSN: 1735 - 8612

دارای رتبه علمی- پژوهشی از
کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

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

* استفاده از مطالب این نشریه با ذکر منبع بلامانع است

صاحب امتیاز:
انجمن علمی میکرب شناسی پزشکی ایران

مدیر مسئول:
دکتر غلامرضا ایراجیان

سردبیر:
دکتر مسعود شریفی

مدیر اجرایی:
دکتر رضا رنجبر

ویراستاران انگلیسی:
دکتر نور امیر مظفری
دکتر جمشید فقری

شورای نویسندگان(به ترتیب حروف الفبا):

دکتر نور امیر مظفری،دانشگاه علوم پزشکی *ایران* - دکتر غلامرضا ایراجیان،دانشگاه علوم پزشکی *ایران*
دکتر بهمن تبرائی،انستیتو پاستور ایران- دکتر رضا رنجبر، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله
دکتر مسعود شریفی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین- دکتر مروت طاهری کلانی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
دکتر محمد نیاکان، دانشگاه شاهد

داوران این شماره (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر محمدرضا آقامیریان ، دکتر محمد آهنجان
دکتر محسن ارزنلو ، دکتر غلامرضا ایراجیان
دکتر محمدرضا حق شناس ، دکتر رشید رمضان زاده
دکتر رضا رنجبر ، دکتر محمد رهبر ، دکتر فریده زینی
دکتر مجتبی شهنازی ، دکتر شیرین صبافر
دکتر محمد مهدی فیض آبادی ، دکتر عزت الله قائمی
دکتر شهاب مدرس ، دکتر ناصر نظری
دکتر محمدرضا نهایی ، دکتر سعید ولی زاده
دکتر رسول همکار

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران در index Copernicus, IMEMR, Iran Medex, SID و Magiran نمایه می گردد.

طراح و گرافیست : خدیجه کشاورز افشار
نشانی : تهران،صندوق پستی۱۶۴۶-۱۳۱۴۵
تلفکس :۸۸۰۲۰۹۱۶
پست الکترونیک : jmicrobiology@gmail.com
آدرس سایت : www.ism.ir

چاپ : رامین
شمارگان :۱۰۰۰ نسخه
قیمت :۲۰۰۰۰ ریال

فهرست مندرجات

یادداشت سردبیر

باکتری شناسی

بررسی مولکولی PBP2b در ایزوله‌های بالینی *استرپتوکوکوس پنمونیه* ۹

مهوش اسکویی، سامان نوبری، فاطمه رحمتی قزلجه، بهاره شقاقی، نور امیر مظفری

بررسی اپیدمیولوژیک انتروکوک مقاوم به وانکومایسین در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد بستری در بیمارستان‌های حضرت علی اصغر(ع) و محک تهران در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۶ ۱۷

علیرضا ناطقیان، خدیجه ارجمندی, پروانه وثوق، عبدالله کریمی, آزیتا بهزاد, معصومه نوید نیا

ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (Bunium persicum) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۲۶

ندا سلیمانی، مرتضی ستاری، سعید سپهری سرشت، سعید دانشمندی، صفورا درخشان

شیوع تو لید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده(ESBLs)در گونه های *کلبسیلا پنمونیه* و *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه‌های ادرار در بیمارستان میلاد تهران – ۱۳۸۸ ۳۶

آوا بهروزی ، محمد رهبر ، جلیل وند یوسفی

نقش نانو ساختار لایه سطحی و تولید بتالاکتاماز در مقاومت سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در برابر پنی سیلین ۴۲

شیلا جلال پور ، روحا کسری کرمانشاهی، اشرف السادات نوحی، حمید زرکش اصفهانی

عفونت های بیمارستانی

شیوع و عوامل خطر اکتساب *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در مراکز آموزشی – درمانی شهر قزوین،۸۵-۱۳۸۳ ۴۹

تکتم کریم زاده ، فاطمه محمدی چلکاسری، مسعود شریفی، بهزاد بیژنی، محمود علیپور حیدری

فناوری PCR برای شناسایی vanA و vanB در حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در سه بیمارستان آموزشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۵۸

ابوالفضل وهابی، آلکا حسنی، محمد رضا نهائی، صفر فرج نیا

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی وشناسایی مولکولی بتالاکتامازهای وسیع الطیف TEM و SHV در ایزوله های *اشریشیا کلی* با مقاومت چندگانه جدا شده از ادرار بیماران بستری در بیمارستان های کرمان ۸۷-۱۳۸۶ ۶۶
شهلا منصوری، داوود کلانتر، مصطفی شکوهی، ثمانه عباسی

ویروس شناسی

شیوع گاستروانتریت حاد ناشی از انتریک آدنوویروس تیپ‌های Ad40 , Ad41 در کودکان زیر۵ سال، بستری در بیمارستان بهرامی تهران در سال‌های۸۸-۱۳۸۷ با روش PCR ۷۴
مریم رضائی ، رزیتا عدالت، امیر سهرابی، سید داور سیادت، مهدیه معتمدی‌راد، جلیل وندیوسفی، شهاب مدرس گیلانی

بررسی آلودگی گاوداری‌های استان ایلام به ویروس سینسیتیال تنفسی ۸۰
علی محمد بهرامی، مرتضی شمس، رضاهوشمندفر

تک یاخته شناسی

تظاهرات بالینی ژیاردیازیس در شهر همدان در سال ۱۳۸۵ ۸۷
حشمت ا... طاهرخانی، مصطفی انصاری، محمد فلاح، صادق صبا، صفورا شریعتی، غلامرضا روشندل

قارچ شناسی

شناسایی گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه خون بیماران مبتلا به کاندیدمی به روش Seminested PCR ۹۱
محمد حسن شاه حسینی، محمد نعمتیان سوته، محمد قهری، سارا سعادتمند، سید احمد حسینی

مقاله کوتاه

مطالعه فیلوژنتیکی ویروس انفلوآنزا A، ساب تایپ H5N1، در همسایگان ایران طی سال‌های ۲۰۰۶- ۲۰۰۳ ۱۰۰
علی نجفی، حمید رضا توکلی، علی مهرابی توانا، مهدی قربانعلی زادگان، رضا رنجبر

واژه گزینی در میکرب شناسی - قسمت ۳ ۱۰۴

فراخوان

یادداشت سردبیر

در حاشیه یازدهمین کنگره سراسری میکرب شناسی ایران و اولین کنگره میکرب شناسی منطقه مدیترانه شرقی

این کنگره در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ توسط دانشگاه علوم پزشکی گیلان، انجمن علمی میکرب شناسی ایران و همکاری سازمان جهانی بهداشت(WHO) برگزار شد.

کنگره سراسری میکرب شناسی ایران برای نخستین بار پا را از سطح ملی فراتر گذاشت و خود را در سطح منطقه مدیترانه شرقی (EMRO) مطرح نمود. لازم شد تا دبیر بین الملل هم تعیین شود. مهمانان خارجی از کشورهای آلمان ، هلند ، استرالیا ، ترکیه و بلاروس بودند. هر یک از ایشان که در زمینه پژوهشی خود نام‌آور می باشند به ایراد سخنرانی پرداختند و در پانل‌ها شرکت فعال داشتند.

مقالات در ۹ محور از طریق سایت کنگره پذیرش شد:

۱- میکرب شناسی تشخیصی، ۲- میکرب شناسی مولکولی، ۳- اپیدمیولوژی عفونت‌های باکتریایی (بیماری‌های نوپدید)، ٤- مقاومت دارویی (فنوتایپی و ژنوتایپی)، ٥- میکرب شناسی کاربردی، ٦- عفونت‌های بیمارستانی، ۷- بیماری‌های مشترک بین انسان و دام (زئونوز)، ۸- میکرب شناسی دارویی، مواد غذایی، بهداشتی و آرایشی ۹- میکرب شناسی آب و فاضلاب و صنعتی

بیش از ۱۲۰۰ مقاله از طریق سایت کنگره دریافت گردید. بیش از ۱۰۰ نفر از متخصصین داوری مقالات را عهده‌دار شدند. بر اساس تصمیمات شورای سیاستگزاری کنگره تعداد سخنرانی‌ها کاهش یافت و رویکرد طرح مشکلات عفونت-های باکتریایی کشور و استان در قالب پانل‌های تخصصی، با حضور اساتید بنام داخلی و خارجی، اتخاذ شد. امکان ارائه ۵۲۰ مقاله به‌صورت پوستر نیز فراهم شد.

در برنامه افتتاحیه ابتدا ریاست محترم دانشگاه ضمن خوش آمد گویی به ایراد سخنرانی پرداخت. سپس، پیام وزیر محترم بهداشت، درمان و آموزش پزشکی سرکار خانم دکتر مرضیه وحید دستجردی قرائت شد. مشارالیها در پیام خود اشاره کردند:

بی شک میکرب‌شناسی کاربری جایگاه پر اهمیتی در بیوتکنولوژی و تهیه واکسن‌ها دارد که بدون یک بنیان قوی و علمی در این رشته قادر نخواهیم بود رسالت علمی خود را به نحو احسن در نظام سلامت ایفا نماییم. مبارزه با گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی و بیماری‌های نوپدید و بازپدید که چهره تهدید کننده‌ای در جوامع ایجاد کرده است و موفقیت در کنترل آنها به جز با درک عمیق از رشته میکرب شناسی امکان پذیر نیست.

یازدهمین کنگره سراسری میکرب شناسی ایران که برای اولین بار به صورت بین المللی در دانشگاه علوم پزشکی گیلان اجرا می‌شود نشانگر تلاش و عزم علمی و پژوهشی دانشگاهیان در بخش‌های مختلف کشور است که با همکاری انجمن میکرب شناسی ایران ارائه می‌شود. امید داریم که این واقعه علمی زمینه ترقی و شکوفایی را فراهم آورد تا ره توشه-ای غنی و ارزشمند برای علاقمندان شرکت کننده در کنگره باشد.

سپس آقای دکتر قانعی، معاون محترم تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به ایراد سخن پرداخت. بعد از سخنرانی دبیران کنگره و ریاست محترم انجمن علمی میکرب شناسی، آقایان دکتر موسوی به تشریح کلکسیون میکربی ایران و دکتر بوذری به معرفی اهداف آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی (آمکا) و روش‌های مختلف برای تشخیص این پاتوژن‌ها پرداختند.

در مجموع ۷ پانل در باره سل، آموزش میکرب شناسی، پژوهش ، عفونت‌های بیمارستانی، زئونوز (لپتوسپیروز)، مقاومت دارویی و *هلیکوباکتر پیلوری* برگزار گردید.

در حاشیه برگزاری کنگره، کارگاه های سل، لپتوسپیروز، Real-Time PCR و الکتروفورز دو بعدی نیز برگزار شد.

با توجه به تشکیل گروه واژه گزینی میکرب شناسی و به منظور آشنایی اساتید میکرب شناسی با آن از مدیر محترم بخش برون سپاری، آقای دکتر رضا منصوری ، در خواست شد تا نماینده ای در کنگره حضور یابد. در پی موافقت نهائی ریاست محترم فرهنگستان زبان و ادب فارسی آقای دکتر غلامعلی حداد عادل ، آقای دکتر علاءالدین طباطبائی در نشستی با حضور جمعی از اساتید میکرب شناسی کشور شرکت نمودند. این نشست صمیمی و پربار ابتدا با گزارش نماینده انجمن علمی میکرب شناسی ایران در فرهنگستان زبان و ادب فارسی، درباره شکل گیری گروه مذکور آغاز شد. سپس آقای دکتر طباطبائی در باب شیوه واژه گزینی به طور مبسوط توضیح داد. اساتید حاضر ضمن استقبال بی نظیر از موضوع مطرح شده در بحث شرکت کردند. به سئوالات حاضرین به‌طور کامل پاسخ داده شد. در باب چرائی واژه گزینی هم صحبت شد. نماینده انجمن در فرهنگستان زبان و ادب فارسی و نیز آقای دکتر طباطبائی موشکافانه به تجزیه و تحلیل آن پرداختند. همچنین اساتید از دل مشغولی خود در این زمینه صحبت کردند که با تبادل نظر همگانی همراه بود. این نشست که تجربه موفقی محسوب شد رضایت خاطر و اطمیان قلبی حضار را فراهم آورد.

کنگره که با حضور و استقبال پر شوریکهزار و یکصد نفر از اساتید، پژوهشگران، دانش آموختگان و دانشجویان علاقه‌مند روبرو شد در روز چهارم با صدور قطعنامه پانزده ماده‌ای به کار خود پایان داد.

امید است این گردهمائی‌ها همچنان محل تبادل آراء و نظرات علمی باشد. رسالت بزرگی که برای این نوع همایش‌ها متصور است تبادل و ارتباط سازنده علمی است. به گونه‌ای که در سایه آن جوانان و به‌ویژه دانشجویان شیوه صحیح و علمی آن را بیاموزند. با تلاش هایی که انجمن علمی میکرب شناسی ایران در سال‌های اخیر به خرج داده این امیدواری وجود دارد که هر سال همگان شاهد ارتقاء کیفی آن باشیم. باشد تا گره از کار فروبسته مملکت باز کند.

دکتر مسعود شریفی

سردبیر مجله

شرایط تهیه و ارسال مقاله

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

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

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

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

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

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

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

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران از مقالات پژوهشی گروهی استقبال می کند.

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

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

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

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

مثال انگلیسی :

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

مثال فارسی :

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

۲-۵) سازمان به عنوان مؤلف; مثال:

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

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

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

۵-۵) مجله همراه با ضمیمه تکمیلی:

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

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

مثال فارسی:

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

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

مثال انگلیسی:

Kastner DL. Intermittent and periodic Arthritic Syndromes. In: Koopman W J, ed. Arthritis and allied Conditions. A Textbook of Rheumatology. 13th ed. Baltimore; Williams & Wilkins. 1997; PP: 1279-1306.

مثال فارسی:

بهرامی ف ، نوحی ع. کنترل کیفیت آزمایش لیپیدهای سرم. در کتاب: تضمین کیفیت آزمایشگاهی، مؤلفین: محمدی ح و جلیلی ح. چاپ دوم، تهران ، مرکز نشر دانشگاهی ، ۱۳۷۵ ، صص ۵۰ تا ۶۱.

۸-۵) رفرانس الکترونیک (مقاله) :

Moynagh J.The evaluations of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commisson, http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12-en.htm(Accessed May 2005).

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

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

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

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

بند ۸) مجله میکرب شناسی پزشکی ایران از بازگرداندن مقالات تأیید نشده توسط هیات تحریریه به نویسندگان آن ها معذور است. در صورت درخواست کتبی نویسنده رابط ، فقط عکس ها و تصاویر اصلی بازگردانده می شود.

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

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره‌های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۶-۹

بررسی مولکولی PBP2b در ایزوله‌های بالینی*استرپتوکوکوس پنمونیه*

مهوش اسکویی[۱*]، سامان نوبری[۱]، فاطمه رحمتی قزلجه[۱]، بهاره شقاقی[۱]، نور امیر مظفری[۲]

۱) بخش میکرب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲) گروه میکرب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
نویسنده رابط: مهوش اسکویی، بخش میکرب شناسی، انستیتو پاستور ایران
تلفن: ۰۲۱-٦٦٤٠٥٥٣٥ **oskoui1@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۹/۲٤ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱

چکیده:

زمینه و اهداف: *استرپتوکوکوس پنمونیه* از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده پنمونی، مننژیت، سینوزیت و اوتیت میانی است. مقاومت این باکتری به بتالاکتام‌ها وابسته به تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین (Penicilin binding protein; PBP) است. هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های پنموککی در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیماران در تهران و تغییرات صورت گرفته در *PBP2b* بود.

روش بررسی: ٥٤ ایزوله‌ی بالینی *استرپتوکوکوس پنمونیه*(از ۱۳۷۹ الی ۱۳۸۷) از مراکز درمانی مختلف در تهران (از جمله بیمارستان‌های امام خمینی، حضرت رسول اکرم[ص]، سینا، شهدای تجریش، حضرت علی‌اصغر[ع]، مرکز طبی کودکان و آزمایشگاه بهار) جمع‌آوری شد و با آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. تست حساسیت به سفوتاکسیم، اریترومایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین و تری-متوپریم سولفامتوکسازول به روش انتشار از دیسک انجام گرفت. MIC برای پنی سیلین به روش broth microdilution تعیین شد. ژن *pbp2b* از طریق PCR تکثیر و تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: از ٥٤ ایزوله، ٢٤ ایزوله(٤٤/٤٪) مقاومت حدواسط به پنی سیلین و ١٤ ایزوله(٢٥/٩٪) مقاوم به پنی‌سیلین بودند. ۲ ایزوله(۳/۷٪) به سفوتاکسیم، ۹ ایزوله(١٦/٦٪) به اریترومایسین، ۱۰ ایزوله(۱۸/۵۱٪) به تتراسایکلین، ۲۸ ایزوله(۵۱/۹٪) به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول مقاوم بودند. ۹ ایزوله(١٦/٦٪) مقاومت چندگانه داشتند. تمام ایزوله‌های مقاوم به پنی-سیلین واغلب ایزوله‌ها با مقاومت حد واسط دارای موتاسیون در نواحی کاتالیتیکی pbp2b بودند.

نتیجه گیری: نتایج بیانگر شیوع سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین است. سویه‌های دارای مقاومت چندگانه، نشان دهنده بحران در درمان عفونت‌های پنموککی است. تغییرات در توالی اسید آمینهPBP2b عمدتا" با کاهش حساسیت به پنی‌سیلین همخوانی نشان داد.نتایج نشان می‌دهد که حساسیت یا مقاومت *این باکتری* به پنی‌سیلین می‌تواند با تعیین تغییرات صورت گرفته در ژنpbp2b ارزیابی شود.

کلید واژه‌ها: *استرپتوکوکوس پنمونیه*، مقاومت به پنی‌سیلین، مقاومت چندگانه، PBP2b

مقدمه:

استرپتوکوکوس پنمونیه همچنان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای باکتریایی محسوب می‌شود که از علل اصلی عفونت‌ها نظیر پنمونی، مننژیت، سینوزیت و اوتیت میانی، به ویژه در میان کودکان و افراد سالخورده است(۱) از طرفی اغلب عفونت‌های پنموککی به‌ویژه پنمونی پنموککی در هنگام بروز اپیدمی‌های ویروسی، از جمله انفلوآنزا، به سرعت در میان مبتلایان به بیماری ویروسی گسترش می یابد و روند درمان را با مشکلات جدی مواجه می‌سازد. مقاومت به پنی‌سیلین در میان پنموککها اولین بار در دهه ۱۹۶۰ گزارش شد. در آن سال‌ها MIC سویه‌های مقاوم به پنی-سیلین ۰/۱ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و نگرانی عمده‌ای در مورد مقاومت به پنی‌سیلین تا زمانی که سویه‌هایی با MIC≥۱μg/ml و نیز سویه‌هایی با مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی، از آفریقای جنوبی در اواخر دهه ۱۹۷۰ و از اسپانیا در اوایل دهه ۱۹۸۰ گزارش شد، وجود نداشت(۲). در دهه ۱۹۹۰ سویه‌های مقاوم به پنی سیلین باMIC بالاتر از ۰/۱μg/ml تقریبا" در همه کشورها دیده شد. در سال‌های اخیر شیوع سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در برخی کشورهای اروپایی بیش از ۵۰٪گزارش شده‌است(۳). در کشورهای آسیایی این میزان حدود ۷۰٪ گزارش شد(٤). در آمریکا بیش از ۳۰٪ایزوله ها مقاوم به پنی‌سیلین بوده‌اند (۵). در سال ۱۳۸۳ در مطالعات صورت گرفته در ایران بیش از ۳۰٪سویه‌های پنموکک جدا شده از بیماران عدم حساسیت به پنی‌سیلین را نشان دادند(٦).

مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در *استرپتوکوکوس پنمونیه* مربوط به تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin binding) PBP protein: است. *استرپتوکوکوس پنمونیه* دارای شش PBP می باشد که از میان آنها تغییرات در PBP1a,PBP2b,PBP2x در ایجاد مقاومت به بتالاکتام‌ها موثرتر تلقی شده‌است(۷). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که تغییر در PBP2b شاخص اصلی مقاومت به پنی سیلین است. این در حالی است که از تغییرات در PBP2x به عنوان شاخص مقاومت به سفالوسپورین‌ها ذکر می‌شود(۸). تغییرات در PBP2b میل ترکیبی آن را نسبت به پنی‌سیلین به شدت کاهش می‌دهد در حالی که بر روی میل ترکیبی آن به سفالوسپورین‌ها تاثیر چندانی ندارد(۹). از این رو، بررسی تغییرات PBP2b در سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی سیلین ضروری است.

اگرچه شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ظهور PBP-های تغییر یافته ناشی از تبادلات نوترکیبی با گروه *استرپتوکوکوس* ویریدانس است، اما ردیابی رویدادهایی که رخ داده تا مقاومت به پنی‌سیلین در پنموکک گسترش یابد، بسیار پیچیده می باشد. به هر حال، واضح است که تبادلات نوترکیبی بین گونه‌ای و نیز موتاسیون‌ها در ژن‌های کدکننده PBPها هردو در ایجادPBPهایی با میل ترکیبی کم به بتالاکتام‌ها دخیل می باشد(۱۰).

در این مطالعه میزان شیوع مقاومت به پنی‌سیلین و برخی دیگر از آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های پنموککی در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیماران درتهران تعیین شد و تغییرات صورت گرفته درPBP2b به عنوان شاخص اصلی مقاومت به پنی‌سیلین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

۱- سویه های باکتریایی: از میان بیش از **۳۰۰** ایزوله بالینی مشکوک به پنموکوک، جمع آوری شده طی سال‌های **۱۳۷۹** الی **۱۳۸۷** از مراکز درمانی مختلف در تهران (از جمله بیمارستان‌های امام خمینی، حضرت رسول اکرم^{ص}، سینا، شهدای تجریش، حضرت علی اصغر^{ع}، مرکز طبی کودکان و آزمایشگاه بهار)، ٥٤ ایزوله پس از آزمایش‌های تعیین هویت به عنوان *استرپتوکوکوس پنمونیه* شناسایی شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌ها، ابتدا ایزوله‌ها بر روی محیط آگار خوندار حاوی۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و در دمای۳۷°C و۵٪CO_2 به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. کلنی‌های کوچک، براق و آلفا همولیتیک شناسایی شدند. جهت تعیین حساسیت به اپتوچین از دیسک اپتوچین(16mm, HiMedia Laboratoris Pvt. Ltd) استفاده شد. هاله عدم رشد بیش از ١٤mm در اطراف دیسک به عنوان حساس به اپتوچین منظور شد. تست حلالیت در صفرا با استفاده از نمک دزوکسی‌کولات سدیم انجام شد. سوسپانسیون حاوی *استرپتوکوکوس پنمونیه* در مجاورت آن پس از تقریبا" ۳۰ دقیقه شفاف شد. در کلیه

آزمایش‌های تشخیصی از سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* ATCC 49619 به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

۲-آنتی‌بیوگرام: آزمایش آنتی بیوگرام با روش Kirby Bauer انجام شد. برای این منظور از دیسک‌های اگزاسیلین استفاده شد (از این دیسک جهت تعیین حساسیت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی‌سیلین استفاده می‌شود.(۱۱))، اریترومایسین، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، تری‌متوپریم سولفاموکسازول، ونکومایسین و آمپی‌سیلین که همگی از شرکت MAST انگلستان تهیه شده بودند، استفاده شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولرهینتون آگار حاوی ۵٪خون گوسفند تلقیح گردید. پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷°C و در حضور ۵٪ CO_2 قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و با جداول ارائه شده توسط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مقایسه گردید (۱۲). از سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* ATCC 49619 به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

۳- تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC)

برای تمام ایزوله‌ها آزمایشMIC جهت تعیین حساسیت به پنی‌سیلینبر اساس CLSI و به روش microdilutionbroth انجام شد. از سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* ATCC 49619(MIC,۰/۱µg/ml) به عنوان شاهد استفاده شد.

٤- استخراج DNA کروموزومی

DNA باکتریایی پس از کشت خالص یک روزه، با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNAMetabion miniprep طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید.DNA استخراج شده در ۲۰۰-۵۰ میکرولیتر محلول Tris-EDTA حاوی RNase و در ۲۰°C- نگهداری شد.

۵- آزمایش PCR

DNA تخلیص شده به‌عنوان الگو درواکنش PCR استفاده شد. کلیه مواد مورد استفاده درآزمایش PCR از شرکت GenetBio تهیه گردید و جهت PCR از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf استفاده شد. برای تکثیر ژن pbp2b*استرپتوکوکوس پنمونیه* از جفت پرایمر pbp2b- F: 5´-GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGGG- 3´ و pbp2b-R:5´-CAATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG - 3´ استفاده شد. ترکیبات مخلوط واکنش (25µl) عبارتند بود از: PCR Buffer (10x) 2.5µl، $MgCl_2$ (50mM) 1 µl، dNTPs(1.2mM)0.4µl، Forward primer (100pm/µl) 0.5µl، Reverse primer (100pm/µl) 0.5µl، Taq DNA polymerase (5U/µl) 0.1µl، Template DNA 0.8µl، Dd water 19.2µl. بعد از انکوباسیون ابتدایی در 94° C به مدت 7 دقیقه مخلوط واکنش در 35دور در 94° C به مدت 2 دقیقه، 50°C به مدت1 دقیقه، 72°C به مدت 2 دقیقه و در نهایت در 72°C به مدت 7 دقیقه تکثیر گردید. جهت الکتروفورز محصول PCR ، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. جهت تعیین سایز محصول از مارکر ۳۰۰۰bp تهیه شده از شرکت Fermentas استفاده شد. سایز محصول PCR ژن pbp2b ، ۱۵۰۰bp بود(۱۳).

٦- تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)

پس از تکثیر ژن 2b از طریق PCR، محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Macrogene Research در کشورکره فرستاده شد. عملیات Sequencing با استفاده از ABI Capillary System انجام گرفت. محصولات PCR در هر دو جهت تعیین توالی شدند.

۷- آنالیز توالی‌هایpbp2b

توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای pbp2b به‌دست آمده با استفاده از نرم افزارهای MEGA4, Chromas آنالیز شدند و با یکدیگرو با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ایpbp2b سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* استاندارد حساس به پنی سیلینR6 (Gene Bank Accession Number X1622) مقایسه شدند (١٤).

یافته‌ها:

از مجموع بیش از ۳۰۰ ایزوله جمع آوری شده، پس از آزمایش‌های تعیین هویت، ٥٤ ایزوله به‌عنوان *استرپتوکوکوس پنمونیه شناسایی شدند.* ٤٦ ایزوله (۸۵/۲٪) با هاله عدم رشد بزرگتر از ١٤ میلی متر حساس به اپتوچین بودند. هاله عدم رشد در ۸ ایزوله(۱٤/۸٪) کمتر از ١٤ میلی متر بود. این ایزوله‌های مشکوک پس از آزمایش حلالیت در صفرا و اثبات محلول بودن در صفرا هویت‌شان به‌عنوان پنموکک اثبات گردید. تمام ٥٤ایزوله(۱۰۰٪) پس از انجام آزمایش حلالیت در صفرا، محلول در صفرا بودند. در آزمایش آنتی-بیوگرام با دیسک اگزاسیلین، هاله عدم رشد ۱۲ ایزوله(۲۲/۲٪) بزرگتر از ۲۰میلی‌متر بود که به‌عنوان حساس به پنی‌سیلین شناسایی شدند. ٤۲ایزوله (۷۷/۸٪) با هاله عدم

رشد کمتر از ۲۰میلی‌متر غیر حساس به پنی‌سیلین شناخته شدند. در آزمایش تعیینMIC، ۱۶ایزوله(۲۹/۶٪) باMIC ≤۰/۰۶µg/ml، حساس به پنی‌سیلین (Penicillin (Susceptible *Streptococcus pneumoniae*:PSSP شناسایی شد. ۲٤ ایزوله (٤٤/٤٪) با ۰/۱≤MIC≤۱µg/ml مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین داشتند (Penicillin Intermediate Resistant *Streptococcus pneumoniae*:PISP)، و ۱٤ ایزوله (۲۵/۹٪) با MIC≥۲µg/ml مقاوم به پنی سیلین (Penicillin (Resistant *Streptococcus pneumoniae*:PRSP بودند. مقایسه آزمایش‌های آنتی بیوگرام و MIC پنی‌سیلین نشان داد که تعداد ۸ (۱٤/۲٪) ایزوله که در آزمایش آنتی بیوگرام مقاوم محسوب شدند با آزمایش MIC در واقع حساس به پنی سیلین بودند. با این حال تمام ایزوله‌هایی که به دیسک اگزاسیلین حساس بودند پس از آزمایش تعیینMIC نیز در محدوده حساس به پنی‌سیلین قرار داشتند.

هاله عدم رشد ۲ایزوله(۳/۷٪) با دیسک سفوتاکسیم کمتر از ۲۵ میلی‌متر بود که مقاوم به سفوتاکسیم شناخته شدند.

۵۲ (۹٦/۳٪) ایزوله دیگر حساسبه سفوتاکسیم بودند. یک ایزوله (۱/۸٪) دارای مقاومت کامل به هر دو آنتی بیوتیک پنی‌سیلین و سفوتاکسیم بود. ۹ ایزوله(۱٦/٦٪) مقاوم به اریترومایسین و ٤۵ایزوله(۸۳/٤٪) به آن حساس بودند. ۳ (۵/۵٪) ایزوله مقاوم به اریترومایسین، به پنی‌سیلین هم مقاوم بود. ۱۰ ایزوله (۱۸/۵۱٪) مقاوم به تتراسایکلین و ٤٤ ایزوله(۸۱/٤۹٪) به آن حساس بودند. ۳ ایزوله(۳۰٪) مقاوم به تتراسایکلین به پنی‌سیلین نیز مقاوم بودند. ۲۸ ایزوله(۵۱/۹٪) مقاوم به تری‌متوپریم سولفامتوکسازولو ۲٦ ایزوله (٤۸/۱٪) به آن حساس بودند. ۹ ایزوله(۳۲/۲٪) مقاوم به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول دارای مقاومت به پنی‌سیلین نیز بودند. ۱ ایزوله (۱/۸٪) به دیسک آمپی‌سیلین مقاومت نشان داد. MIC_{pn} این سویه ۰/۸µg/ml بود. تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪) به دیسک ونکومایسین حساس بودند.

با توجه به استانداردهای CLSI و تعریف مقاومت چندگانه، ۹ایزوله(۱٦/٦٪) دارای مقاومت چندگانه بودند. ٤ ایزوله(٤٤/٤٪) از ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه، باMIC≥ ۲µg/ml مقاومت کامل به پنی‌سیلین را نشان دادند.

پس از الکتروفورز محصول PCR ژن pbp2b، در تمام ایزوله‌ها باند 1.5 Kb شناسایی گردید. پس از تعیین توالی محصولات PCR ژن pbp2b، توالی اسید آمینه‌ای ناحیه PBD از pbp2b ایزوله‌ها با استفاده ازنرم افزارهای Chromas و Mega 4 با سویه استاندارد حساس به پنی سیلین R6 مقاِسه شد. به طور کلی ۵۱ تغِیر اسیدآمیه‌ای در توالی اسید آمینه ای PBP2b مشاهده شد. توالی نوکلئوتیدی pbp2b با مشخصات Gene Bank Accession Number HM371130 ثبت گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای PBP2b در ایزوله-های غیر حساس به پنی‌سیلِن به ترتیب نشان دهنده حداکثر ۱۱/۸٪ و ۹/۲٪ عدم تشابه به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سویِه استاندارد R6 بودند. از ٤۵٤ اسید آمینه ناحیه ترانس پپتیدازی PBP2b آنالیز شده به طور متوسط ۲ جایگاه در ایزوله‌های PSSP، ۱٦ جایگاه در ایزوله‌های PISP و ۳۰ جایگاه در ایزوله‌های PRSP نسبت به سویه استاندارد R6 تغییر یافته بود (جدول۱).

اغلب موتاسیون‌های یافت شده در ایزوله‌های مورد بررسی بین دو موتیف اسید آمینه‌ایKTG (در موقعیت ۱۷٤– ۱۷۲) و SSN(در موقعیت ۲۵۱–۲٤۹) قرار داشتند (جدول۲). هیچ موتاسیونی در مجاورت موتیف اسید آمینه‌ایSVVK در PBP2b مشاهده نشد. در توالی اسید آمینه‌ای PBP2b ایزوله‌ها به طور کلی ٤ موتاسیون جدید مشاهده گردید:

Ala 335 Gly , Ser 446 Phe , Met 332 Val, Asn 439Lsy.

جدول۱: ارتباط بین حساسیت به پنی‌سیلین با میانگین تغییرات مشاهده شده در توالی ٤۵٤ اسید آمینه‌ای *pbp 2b* در مقایسه با سویه استاندارد حساس R6.

درصد تغییرات مشاهده شده	تعداد موتاسیون مشاهده شده	حساسیت به پنی سیلین
۰/٤	۲	حساس
۳/۵	۱٦	حدواسط
٦/٦	۳۰	مقاوم

جدول۲: ارتباط حساسیت به پنی‌سیلین و موتاسیون‌های رخ داده در مجاورت نواحی کاتالیتیکی *pbp 2b* بر حسب درصد.

حساسیت به پنیسیلین	Thr252Ala/Ser	Thr295Ala/Ser	Glu282Gly	AFSRPM (233-238)
حساس	٪٦/٢	٪٠	٪٠	٪٠
حد واسط	٪٩١/٦	٪١٠٠	٪١٠٠	٪٢٠/٨
مقاوم	٪١٠٠	٪١٠٠	٪١٠٠	٪١٠٠

بحث:

تغییرات قابل ملاحظه‌ای درباره حساسیت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به عوامل ضد میکروبی و اهمیت درمان صحیح عفونت‌های حاد آن، در جهان گزارش شده‌است(۱). در این مطالعه ۷۰/۳ درصد ایزوله‌ها به پنی‌سیلین عدم حساسیت نشان دادند (مقاوم به پنی‌سیلین و مقاومت حدواسط به آن). این میزان، شیوع بالای مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی سیلین را در تهران نشان می دهد. تحقیقات در کره جنوبی(۱۵) نشان می‌دهد که به‌طور متوسط ۸۰ درصد از سویه‌های جدا شده به پنی‌سیلین عدم حساسیت دارند. در آمریکای لاتین این میزان بیش از ٦۰ درصد گزارش شده‌است(۱۵). در اواخر دهه ۱۹۸۰شیوع *استرپتوکوکوس پنمونیه* غیر حساس به پنی‌سیلین در آمریکا حدود ٤ درصد بود. اما، طی یک دهه به بیش از ۲۵ درصد افزایش پیدا کرد که در سال‌های ابتدایی قرن ۲۱ این میزان به۳۰ تا ۵۰ درصد رسید(١٦). در سال‌های اخیر در برخی کشورهای پیشرفته MIC پنی‌سیلین بسیار زیاد گزارش شده‌است. اما، در کشورهای در حال توسعه مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین همچنان غالب می‌باشد. در اسپانیا میزان مقاومت زیاد و حد واسط به پنی‌سیلین تقریبا مشابه است (به ترتیب ۲۰ درصد و ٢٦ درصد) (۱۰). در کانادا، مطالعات ملی نشان می‌دهد شیوع و گسترش سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* با مقاومت افزایش یافته به پنی سیلین، طی یک دوره پنج ساله (۱۹۹۷-۲۰۰۲)، تغییر چشمگیری نداشته و از ۲۱/۲ درصد به ٢٤ درصد افزایش یافته است. با این حال سویه‌هایی با مقاومت بالا به پنی-سیلین (MIC≥ ۲µg/ml) به طور شگفت آوراز ۲/٤ درصد در سال ۱۹۹۹ به ۱۳/۸ درصد در ۲۰۰۲ افزایش یافته است. میزان پنموکک مقاوم به چند دارو هم طی این دوره پنج ساله از۲/۷ درصد تا ۸/۸ درصد افزایش یافته است(۱۷). در یک مطالعه بین المللی در کشورهای آسیایی شیوع مقاومت به پنی‌سیلین از٤٤/٥ درصد تا ۷۱/٦ درصد متغیر گزارش شده است(٤).

سفوتاکسیم به‌ویژه در درمان بیماران مبتلا به مننژیت پنموککی کاربرد دارد و در کنار سفتریاکسون همچنان به - عنوان داروی انتخابی باقی مانده است. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به سفوتاکسیم۳/۷ درصد بود. در این میان تنها ۱ ایزوله دارای مقاومت کامل به هر دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و پنی سیلین بود. تمام ایزوله‌های حساس به پنی‌سیلین به سفوتاکسیم نیز حساس بودند. در حالی که هر دو ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، کاهش حساسیت به پنی-سیلین را نشان دادند. مطالعه اسکویی و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان می‌دهد که با افزایش MIC پنی‌سیلین، مقاومت به سفوتاکسیم نیز مشاهده می شود(٦). همسو با مطالعه حاضر، در بررسی‌های صورت گرفته در آمریکا، هیچ مورد مقاوم به سفوتاکسیم و حساس به پنی‌سیلین مشاهده نشده است(۱۸). در کانادا نشان داده شد که بیشترین موارد مقاومت به اریترومایسین در سویه‌هایی با مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین مشاهده می شود(۱۹).یافته های ما نیز با این نتایج مطابقت دارد.

در سال‌های اخیر، مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی که در درمان عفونت‌های پنموککی به مشکل جدی تبدیل شده-است، اولین بار در آفریقای جنوبی گزارش شد(۲۰). در مطالعه حاضر١٦/٦ درصد ایزوله‌ها مقاومت چندگانه داشتند که می‌تواند درصدی قابل توجه و هشدار دهنده در درمان عفونت‌های پنموککی محسوب گردد. این در حالی است که شیوع مقاومت به چند دارو در اسپانیا بسیار زیاد و بیش از ٦٥ درصد گزارش شده‌است(۲۰). مقاومت چندداروی درآفریقای جنوبی۱۵ درصد است و در آمریکا بین۲۰ درصدتا۳۰ درصد متغیر می‌باشد(۱۹). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که ٤۲/۸ درصد از ایزوله‌هایی که مقاومت بالا به پنی‌سیلین دارند، دارای ویژگی مقاومت چندگانه هم هستند. در میان ایزوله‌هایی هم که مقاومت حدواسط به پنی سیلین دارند، ١٦/٦ درصد مقاومت چندگانه نشان دادند. تحقیقات نشان داده است که مقاومت به داروهای غیر بتالاکتام در میان سویه‌های غیر حساس به پنی‌سیلین نسبت به سویه‌های حساس به پنی‌سیلین بیشتر

است (۱۵). نتایج ما نیر چنین امری را تایید می کند. خوشبختانه، کلیه ایزوله‌های بررسی شده به ونکومایسین حساس بودند. این در حالی است که در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر تحمل ونکومایسین در سویه های *استرپتوکوکوس پنمونیه* منتشر شده است(۲۱).

مطالعات مولکولی سویه‌های*استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین نشان داده‌است که مقاومت پنی‌سیلین و دیگر بتالاکتام‌ها با تغییرات در ژن‌های کد کننده PBP ها به‌ویژه PBP1a، PBP2b، PBP2x مرتبط می باشد. در این میان از تغییرات در PBP2b به عنوان شاخص مهم مقاومت به پنی‌سیلین نام برده شده است(۷). توالی اسید آمینه‌ای در ناحیه متصل شونده PBP2b به پنی‌سیلین، در سویه‌های غیر حساس به پنی‌سیلین تفاوت زیادی باسویه-های حساس به پنی‌سیلین دارد(۲۲). در مطالعه حاضر بر روی توالی اسید آمینه‌ای ناحیه PBD از PBP2b، به طور متوسط ۲۳ جایگاه در ایزوله‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* غیر حساس به پنی‌سیلین نسبت به سویه استاندارد حساس به پنی‌سیلین R6 تغییر یافته بود. توالی‌های PBP2b در ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین، نسبت به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سویه R6، حداکثر ۱۱/۸ درصد و ۹/۲ درصد عدم تشابه نشان دادند. در حالی که توالی اسید آمینه‌ای و نوکئوتیدی اغلب ایزوله‌های حساس به پنی‌سیلین مشابه توالی pbp2b در سویه R6 بود. تغییرات اسید آمینه‌ای Thr 252→ Ala، Glu 282→ Gly , Thr 295→Ala در همه ایزوله‌های PRSP و اغلب ایزوله‌های PISP دیده شد. تغییر Thr 252→ Ser وThr 295→ Ser نیر در برخی ایزوله‌های غیر حساس دیده شد.

در سال 1993توالی موزائیک مشخصی در توالی اسید آمینه‌ای *pbp2b* شناسایی شد که نتیجه جانشینی ٦ باز متوالی می‌باشد: AFSRPM یا AFSVPM. این توالی در بین کدون‌های ۲۳۳ تا ۲۳۸ قابل شناسایی است. این جانشینی‌ها که در جایگاه فعال PBP2b قرار دارد موجب کاهش میل ترکیبی پنی‌سیلین با PBP2b می‌گردد. موتاژنزیس در این ناحیه این پدیده را اثبات کرده-است(۲۳). ۱۲ ایزوله غیر حساس (۳۱/۵ درصد) دارای این جانشینی‌ها بودند.

در بررسی Beak و همکاران در کره یک Blockدر توالی اسید آمینه‌ای *pbp 2b*(Block B، در موقعیت ٤٨٢ تا ٣٦٧) شناسایی شده است(۲۳). توالی Block B بسیار مرتبط با توالی مشابه در سویه‌های *استرپتوکوکوس اورالیس* مقاوم به پنی‌سیلین (MIC= ٤µg/ml) می-باشد(٢٤). این Block در ۲ ایزوله مطالعه حاضر نیز دیده شد.

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تغییرات در ژن‌های PBP2b *استرپتوکوکوس پنمونیه* از طریق نوترکیبی بین گونه‌ای با *استرپتوکوکوس اورالیس* و *استرپتوکوکوس میتیس* ایجاد می شود(۸).

در سال ۲۰۰٦ ، Granger و همکاران سویه‌هایی که دارای موتاسیون‌های Leu261→ Ile , Gly273→ Leu ,Ser275 →Asn ,Gly289→ Ala , Thr295→ AlaAla296→Ser بودند را شناسایی کردند(٢٤). تعداد ۱۱ ایزوله مطالعه حاضر و سویه استاندارد حد واسط ATCC49619 می توانند در این گروه طبقه بندی شوند.

تجزیه و تحلیل موتیف‌های متصل شونده PBP2b در ایزوله‌های ما نشان دهنده عدم وجود موتاسیون در، یا در نزدیکی، جایگاه فعال سرین از موتیف SVVK می باشد. مشابه نتایج ما در سایر مطالعات نیر منتشر گردیده است.جانشینی Thr 252→ Ala/Ser در مجاورت موتیف SSN در PBP2b که در همه ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین یافت شد، تائیدی بر اهمیت آن در مقاومت به بتالاکتام‌ها به‌ویژه به پنی‌سیلین است. تحقیقات نشان می دهد که این جانشینی میل ترکیبی به پنی‌سیلین را تا ٦٠ درصد کاهش می دهد. نقش این جانشینی بارها در سایر تحقیقات مورد تاکید قرار گرفته است(٢٤-٢٢).

آسپاراژین (Asn) در موتیف SSN با گروه کربونیل زنجیره جانبی R1 پنی سیلین پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد، جانشینی Thr 252→ Ala/Ser احتمالا" این پیوند هیدروژنی را تخریب می‌کند و منجر به کاهش میل ترکیبی PBP2b می گردد(۲۲). شگفت آور است که این موتاسیون، که نقش آن در ایجاد مقاومت به پنی سیلین بارها تائید شده است، در۱ ایزوله حساس به پنی سیلین در مطالعه حاضر و چند ایزوله حساس از کره (۲۳)، آمریکا (۲۵)و کانادا (٢٤) نیز دیده شده است.

جانشینی Ala 232 Gly در مجاورت موتیف KTG در PBP2b در هیچ یک از ایزوله‌های مقاوم مطالعه حاضر دیده نشد. در حالی که این موتاسیون در برخی مطالعات در سویه‌هایی با مقاومت زیاد به پنی سیلین با MICهای

بین ۲-۸µg/ml از دیگر کشورها گزارش شده است(۱۰). دو موتاسیون Glu 282 Gly و Thr 252 Ala/Ser که در همه ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین در مطالعه حاضر مشاهده شدند، قبلا نیر به عنوان شاخص‌های مهم مقاومت پنموکک به پنی‌سیلین معرفی شده‌اند (۲۴-۲۲و ۲۶).

مطالعات نشان می دهد که ظهور و گسترش مقاومت به بتالاکتام‌ها در *استرپتوکوکوس پنمونیه* فرایندی پیچیده است و شامل پخش کلونال، انتقال افقی DNA و موتاسیون‌های نقطه ای در PBPها به ویژه PBP2b می‌باشد(۱۷). توالی‌های DNA مشابه یا مرتبط با هم ژن‌هایPBP در مقاومت به پنی‌سیلین در *استرپتوکوکوس پنمونیه*، *استرپتوکوکوس میتیس* ، *استرپتوکوکوس اورالیس* و *استرپتوکوکوس سنگوئیس* دخیل می‌باشد. ترانسفورماسیون ژن‌های تغییر یافته PBP ها از یک سویه استرپتوکوک به سویه استرپتوکوک دیگر در تحقیقات مختلف گزارش گردیده است(۸).در تحقیقات انجام گرفته در سال ۱۹۹۳ از *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس اورالیس* به عنوان منابع اولیه ژنی برای PBP2b و PBP2x، که شاخص-های اصلی مقاومتی در *استرپتوکوکوس پنمونیه* می باشند، نام برده شده است (۲۴).

با توجه به اهمیت تغییرات صورت گرفته در PBP ها در ایجاد مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به بتالاکتام‌ها لازم است که بررسی‌های مشابهی بر روی ژن‌های کد کننده PBP2b و PBP2x و PBP1a نیر در ایران صورت گیرد. در سال‌های اخیر نشان داده شد که علاوه بر PBP2b وPBP2x و PBP1a احتمالا" دو PBPدیگر (PBP2a و PBP1b)نیر ممکن است در مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به بتالاکتام‌ها دخیل باشد. نقش PBP2a در مقاومت به سفوتاکسیم در موتان‌های آزمایشگاهی اثبات شده است(۲۴).

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر بیانگر افزایش تعداد ایزوله‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین است. در عین حال افزایش تعداد ایزوله‌هایی با مقاومت چندگانه، می تواند نشان دهندهبحران در درمان عفونت‌های پنموککی باشد. خوشبختانه هیچ موردی از مقاومتونکومایسین مشاهده نشد و این دارو همچنان می‌تواند در درمان *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به آنتی بیوتیک گزینه جایگزین محسوب شود. در مطالعه حاضر تغییرات در توالی اسید آمینه‌ایPBP2b عمدتا" با کاهش حساسیت به پنی‌سیلین همخوانی نشان داد. به این ترتیب نقش تغییرات در ژن ***pbp2b***به عنوان شاخصی مهم ایجاد مقاومت به پنی سیلین آشکار می‌گردد. نتایج نشان می‌دهد که حساسیت یا مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی‌سیلین می‌تواند با تعیین تغییرات صورت گرفته در ژن ***pbp2b*** ارزیابی شود..

فهرست منابع:

1. Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:1613–1620
2. Harwell JI, Brown RB. The Drug- Resistant *Pneumococcus* Clinical Relevance, Therapy, and Prevention. *Chest.* 2000; 117:530-541.
3. Perez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente C, Garcia-Rey C. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1965–1972.
4. Song JH, Lee NY, Ichiyama S. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis.* 1999; 28: 1206–1211.
5. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A. *et al*. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1917–1924.
6. Oskoui M, Feizabadi MM, Amirkhani A. Drug susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in TEHRAN, IRAN. *Arch Iranian Med.* 2003; 6(3): 192-195.
7. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30:673-691.
8. Chi F, Nolte O, Bergmann C, Ip M, Hakenbeck R. Crossing the barrier: Evolution and spread of a major class of mosaic pbp2x in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and

S.oralis. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297:503–512.
9. Pagliero E, Chesnel L, Hopkins J, Croize J, Dideberg O, Vernet T. *et al*. Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2b and Its Implication in β-Lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1845–1855.
10. Soriano F, Cafini F, Aguilar L, Tarrago D, Alou L, Gimenez MJ. *et al*. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 1234-1240
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard M7-A6. CLSI 2005, Wayne, PA, USA & Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12. CLSI 2005, Wayne, PA, USA
12. Garcia Leona EM, Cercenado AM. Susceptibility of *Streptococcus Pneumoniae* to penicillin*Clin Infect Dis*. 1992;14 427-435.
13. Sogstad MKR, Hoiby EA, Cagant DA, Molecular characterization of non-penicilin-susceptible *Streptococcus pneumonia* in Norway. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3225-323.
14. Izdebski R, Rutschmann J, Fiett J, Sadowy E, Gniadkowski M, Hryniewicz W. et al. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b,and PBP 1a in isolates of two *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland23F-16 and Poland6B-20. *Antimicrob Agents Chemother.*2008; 52:1021-1027.
15. Adam D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.*2002; 50:1-5.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Geographic variation in penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: selected sites, United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*1999; 48:656–661.
17. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Genetic analysis of *pbp2x* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. *J Antimicrob Chemother.*2005; 55: 832–839.
18. Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggemann AB. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, Including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrob Agents Chemother.*2001; 45: 1721–1729.
19. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM. The prevalence of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta.*N Engl J Med.* 2008; 333: 481–486.
20. Oteo J, Alos JI, Gomez-Garces JL. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: a multicentre surveillance study. *J Antimicrob Chemother.*2001; 47: 215–218.
21. Normark BH, Novak R, Ortqvist A, Kallenius G, Tuomanen E, Normark S. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 552-558.
22. Nichol KA, Zhanel GG, Hoban DJ. Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*2002; 46:3261–3264.
23. Beak JY, Ko SK, Oh WS, Jung SI, Kim YS, Chang HH. *et al*. Unique variations of pbp2b sequences in Penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from Korea. *J Clin Microbiol.*2004; 42:1746-1750.
24. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Molecular characteristics of *pbp1a* and *pbp2b* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. *J Antimicrob Chemother.*2006; 57:61-70.
25. Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5): 1273–80.
26. Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, Osaki Y, Katoka H, Suzuki T. *et al*. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6): 2244–50.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲ ، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۲۵-۱۷

بررسی اپیدمیولوژیک انتروکوک مقاوم به وانکومایسین در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد بستری در بیمارستان‌های حضرت علی اصغر (ع) و محک تهران در سال ۸۷-۱۳۸۶

علیرضا ناطقیان[۱ *]، خدیجه ارجمندی[۲]، پروانه وثوق [۳]،عبدالله کریمی[٤] ، آزیتا بهزاد[٥]، معصومه نوید نیا [٦]

۱) گروه عفونی کودکان، بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
۲) گروه خون و انکولوژی کودکان، بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
۳) گروه خون و انکولوژی کودکان، بیمارستان محک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
٤) گروه عفونی کودکان، مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
٥) متخصص کودکان، بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
٦) گروه میکرب شناسی، مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
نویسنده رابط: علیرضا ناطقیان، گروه عفونی کودکان، بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
تلفن:۲۲۲۲۲۰۴۱ nateghian@hotmail.com

تاریخ دریافت:۸۸/۸/۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۱/۱٤

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین (vancomycin resistant enterococci=VRE)، در بیماران مبتلا به نقص ایمنی عامل عمده افزایش ابتلاء و مرگ ومیر هستند. هدف این مطالعه تعیین فراوانی حاملین انتروکوک مقاوم به وانکومایسین در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، تعیین اپیدمیولوژی مولکولی آن و عوامل خطر ساز موثر در شیوع آن در سال‌های ۸۷-۱۳۸٦ بود.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی _مقطعی نمونه مدفوع ۱۳۰ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد مراجعه کننده به ۲ بیمارستان تهران (علی اصغر(ع) و محک)، بر روی محیط‌های انتروکوک آگار و آگار خوندار کشت داده شد. ارگانیسم‌های جدا شده به روش باکتریولوژی تعیین هویت شدند. حداقل غلظت بازدارنده وانکومایسین به روش macrodilution تعیین شد. سرانجام PCR با پرایمرهای Van A و VanB انجام گردید. سایر اطلاعات از طریق پرسشنامه و با رجوع به پرونده بیماران تکمیل شد. برای تجزیه وتحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری STT ، Mann whithney new، Chi-sqare ، Fisher exact ، Anova و Kruskal-Wallis استفاده شد.

یافته‌ها: از کشت نمونه مدفوع ۱۳۰ کودک (با متوسط سنی ٦/٥ سال) در ۹٥ نمونه (۷۳٪) انتروکوک جدا شد. از ۳۳سویه (۳٤/۷٪) انتروکوک مقاوم به وانکومایسین، ۲٦ سویه (۷۸/۸٪) واجد فتوتیپvanA و ۷ سویه (۲۱/۲٪) دارای فتوتیپ vanB بودند. سابقه بستری در ICU با اکتساب انتروکوک ارتباط معنی داری داشت (P=0.03)، و با اکتساب VRE هم روندی به سمت معنی دار شدن نشان داد (P=0.07). بین وجود vanA و vanB در سویه‌های VRE و متغیر سن تفاوت معنی دار مشاهده شد (P=0.007). بین متغیرهای جنس، مدت زمان بیماری، تعداد بستری‌های قبلی، وجود بیماری همزمان دیگر، سابقهٔ نوتروپنی شدید در یک ماه قبل از جمع‌آوری نمونه، سابقه مصرف آنتی بیوتیک در ۳ ماه قبل و اکتساب VRE ارتباط معنی دار مشاهده نشد (P>0.05).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که شیوع VRE در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد زیاد است. اجرای برنامه‌های مداخله‌ای جهت کنترل آن بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: انتروکوک مقاوم به وانکومایسین, عوامل خطر ساز, لوسمی لنفوبلاستیک حاد, کودکان

مقدمه:

انتروکوکسی فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوانات است. دو گونه *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* بیشترین گونه‌های بیماریزا در انسان هستند. اهمیت این ارگانیسم، در مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک‌ها (به خصوص سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها) است. با مقاومت روز افزون به گلیکوپپتیدها (وانکومایسین) و ابتلاء و مرگ‌ومیر بالای آن، کنترل انتروکوک مشکل‌تر شده و تعیین اپیدمیولوژی و عوامل خطر ساز موثر در گسترش آن حیاتی به نظر می‌رسد(۱). مقاومت شدید انتروکوک به گلیکوپتیدها اولین بار در سال ۱۹۸٦ در اروپا و یک سال بعد در آمریکا گزارش گردید. از آن زمان، این ارگانیسم به‌طور شایع در آسیا، استرالیا، آمریکای جنوبی و آفریقا افزایش یافته است. در ایران نیز انتروکوک یک خطر مهم و بالقوه برای بخش-های پذیرش دهنده به بیماران مزمن بشمار می آید. در آمریکا در سال های۹۳-۱۹۸۹ میزان مقاومت گزارش شده به این ارگانیسم بر اساس تیم ملی نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی از ۰/۳٪ به ۸٪ افزایش یافت. این افزایش به خصوص در بخش‌های مراقبت ویژه چشمگیرتر بود (۲). تلاش‌های گسترده در بخش‌های هماتولوژی با انجام اقدامات بهداشتی و مراقبتی دقیق جهت کنترل طغیان‌های کلونیزاسیون با VRE (vancomycin resistant enterococci)، نشان از اهمیت موضوع در این بخش‌ها دارد (۳). در عین حال اهمیت VREدر ایجاد عفونت‌های خطرناک در افراد دچار انواع نقص ایمنی را نیز نمی‌توان نادیده گرفت (٤). متاسفانه این عوامل در مطالعات نواحی مختلف جغرافیایی و در گروه‌های مختلف بیماران، بر حسب سن یا نوع بیماری زمینه ای و بسیاری از عوامل دیگر، متفاوت و گاهی متناقض ذکر شده است. این امرانجام مطالعات بومی را با در نظر گرفتن شرایط اپیدمیولوژیک و لحاظ کردن عوامل پیشنهاد شده یا مورد ظن جهت تعیین دقیق نقش آنها ضروری می نماید. برای مثال، بسیاری از مطالعات؛ مصرف نابجای وانکومایسین، فشار آنتی بیوتیکی بیش از حد توسط آنتی بیوتیک‌های دیگر (سفالوسپورین‌های نسل سوم، آمینوگلیکوزیدها، ایمیپنم)، بستری طولانی مدت در بیمارستان، وجود نقص-های زمینه‌ای به‌خصوص سرطان، و دریافت شیمی درمانی را از جمله عوامل خطرساز برشمرده‌اند (۲و ۷-۵). اما، در برخی مطالعات فقط طول اقامت در بخش‌های پرخطر مانند ICU از عوامل خطر ساز به حساب آمده است (۸). به هر حال، هر چه عوامل خطر ساز بیشتر مشخص و کنترل شوند، احتمال مواجهه این بیماران دچار نقص‌های ایمنی یا بیماران نیازمند بستری طولانی با عفونت‌های مقاوم و خطرناک بیمارستانی کمتر خواهد بود(۲).

تعیین فتوتیپ مولکولی مقاومت انتروکوک نیز اهمیت فراوان دارد. اصولا این مقاومت در گونه *E.faecium* شایع‌تر است (۲، ۹،۵) و با فتوتیپ Van A بیشتر مشاهده می شود (۱۰). تا مشخص شدن این عوامل در هر مرکز خاص بیمارستانی، اهمیت برنامه‌های غربالگری یا ارزیابی روزمره (چک روتین) بیماران از مسایلی است که باید در مورد آن تصمیم‌گیری شود. با توجه به میزان کلونیزاسیون آن در مطالعات جدید در بیماران دچار سرطان، لزوم بررسی میزان حاملین و مقاومت به وانکومایسین در آنها بیشتر مطرح می‌شود. بنابراین، تعیین فراوانی حاملین VRE در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia:ALL) بستری شده در بیمارستان‌های حضرت علی اصغر (ع) و محک, تعیین اپیدمیولوژی مولکولی و عوامل خطر ساز آن به عنوان اولین مطالعه اختصاصی در یک مرکز فوق تخصصی ارجاعی خون و بیماری‌های عفونی کودکان در کشور الزامی به نظر می‌رسید. به‌طوری که با تعیین فراوانی حاملین VRE و عوامل خطرساز مؤثر بر شیوع آن و با حذف عوامل خطرساز ممکن است بتوان شیوع VRE و عوارض ناشی از آن را کاهش داد .

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی است که در بیمارستان ۱٤۰ تختخوابی فوق تخصصی و آموزشی حضرت علی اصغر (ع)، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران، و همچنین در بیمارستان غیر آموزشی محک انجام شد. جمعیت مورد مطالعه کلیه کودکانی بودند که تشخیص سرطان ALL در آنها داده شده بود. این افراد در زمان انجام طرح در بخش‌های هماتولوژی ، انکولوژی و عفونی بیمارستان‌های حضرت علی اصغر و محک بستری شده بودند و یا به درمانگاه خون این مراکز مراجعه کرده بودند. معیارهای خروج شامل الف- ابتلاء به سرطان غیر از ALL و ب - عدم رضایت والدین بود.

حجم نمونه بر اساس فرمول $z^2*p*(1-p)/d^2$ = میزان بروز در تحقیقات مشابه که حدود ۵٪ بود (۳) ، با در نظر گرفتن فاصله اطمینان ۹۵٪ و دقت برآورد ۵٪، حدود ۷۵ نفر محاسبه شد، ولی جهت افزایش دقت مطالعه، تعداد به ۱۳۰ نفر افزایش داده شد.

نمونه‌های مدفوع جهت بررسی از نظر وجود انتروکوک، تعیین اپیدمیولوژی مولکولی (نوع مقاومت موجود از نظر VanA یا VanB) به روش‌های کشت و PCR به صورت ذیل به مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی اطفال در بیمارستان مفید فرستاده شد : ابتدا نمونه تازه مدفوع بر روی محیط Enterococcosal agar و Blood agar کشت داده شد. بعد از ۲٤ ساعت کلنی‌های مشکوک جهت تست کاتالاز بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت بر روی کلنی‌های مشکوک آزمایش‌های افتراقی صفرا-اسکولین، تحمل نمک (NaCl 6.5%)، سولفید-ایندول موتیلیتی (SIM) و محیط شیر حاوی آبی‌متیلن، آزمایش‌های قندی و اسید آمینه (مانیتول, سوکروز/رافینوز,آرژینین‌دی هیدرولاز ,آرابینوز) و آزمایش PYR انجام شد(۵). حداقل غلظت بازدارنده (MIC) وانکومایسین به روش macrodilution و با استفاده از پودر وانکومایسین, (sigma، آلمان) تعیین شد (۵).

سویه‌ها در دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد در محیط تریپتیکاز سوی براث با ۱۵٪ گلیسرول نگهداری شدند. در زمان مناسب سویه‌ها به دمای اتاق رسانده شد و DNA طبق روش boiling استخراج گردید(۹). PCR با پرایمرهای Van A وVanB انجام شد .توالی پرایمرها برای,van AF(forward) , vanAR(reverse) vanBF و vanBR به‌ترتیب به‌صورت ذیل بود:

5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A-3'
5'-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA-3'
5'-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA-3'
5'-CCG CCA TCC TCC TGC AAA AAA-3'

همزمان با جمع آوری نمونه، اطلاعات مورد نیاز با کمک پرسشنامه (حاوی متغیرهای؛ مشخصات دموگرافیک، مدت بیماری کنونی، دفعات بستری، بستری در ICU ، سابقه نوتروپنی شدید، بیماری‌های همزمان و مصرف آنتی-بیوتیک‌ها) ثبت شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های مناسب آماری STT برای متغیرهای کمی پیوسته و Mann whithney new برای متغیرهای کمی گسسته Chi-sqare و در صورت لزوم Fisher exact برای متغیرهای کیفی به صورت univariate analysis استفاده شد. سپس برای متغیرهای کمی پیوسته از آزمون Anova و متغیرهای کمی گسسته از Kruskal-Wallis-test جهت تعیین عوامل خطر ساز واقعی کلونیزاسیون VRE و فتوتیپ Van A استفاده شد.

با توجه به پرسشنامه، میزان درصد حاملین VRE به صورت درصد فراوانی و توزیع ژنتیکی آنها نیز به صورت توصیفی تعیین شد. با توجه به اینکه اطلاعات بیمار فاش نمی شد و جمع‌آوری نمونه درد و ناراحتی برای بیمار ایجاد نمی کرد، بنابراین مطالعه مشکل اخلاقی نداشت.

یافته‌ها:

میانگین سن ۱۳۰ کودک مورد مطالعه ٦/٥ سال بود (محدوده سنی بیماران از ٦ ماه تا ١٦/٥سالگی با انحراف معیار ۳/۸) . ٤٧ نفر (٣٦٪) مؤنث و ۸۳ نفر (٦٤٪) مذکر بودند. انتروکوک از ۹۵ نمونه (۷۳٪) جدا شد. از ۹۵ سویه انتروکوک جدا شده ۳۳ سویه(۳٤/۷٪) مقاوم به وانکومایسین بود. متوسط دوره بیماری در بیماران مورد بررسی ۲۲/۷ ± ١٦/٥ ماه بود. ٦٠ نفر (٤٦٪) کمتر از ۱۰ بار سابقه بستری و ۷۰ نفر (٥٤٪) بیشتر از ۱۰ بار سابقهٔ بستری داشتند. ۱۳ نفر (۱۰٪) مشکل دیگری به جز ALL داشتند .در مجموع ۷۵ نفر (۵۸٪) در طول ماه پیش از نمونه گیری حداقل ۱ اپیزود از نوتروپنی شدید را گذرانده بودند، و ۱۲ نفر(۹٪) سابقهٔ بستری قبلی در ICU را داشتند. ۸۵ نفر (٦٧٪) در ۳ ماه پیش از بررسی، آنتی-بیوتیک دریافت کرده بودند که در ۳۵٪ موارد به صورت وریدی بود. شایع‌ترین آنتی بیوتیک مورد استفاده در بیماران مورد مطالعه سفتریاکسون، سفتازیدیم – آمیکاسین، سفکسیم و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول بود. سابقهٔ انجام دیالیز در ۲ نفر (۱/۵ درصد) از بیماران وجود داشت، اما سابقهٔ کشت خون مثبت با اسافیلوکک و سابقهٔ مصرف لوله گاستروستومی در هیچکدام از موارد وجود نداشت. سابقهٔ اسهال ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در ۱نفر (۰/۷۷٪) یافت شد. انجام بررسی آماری روی این عوامل بالقوه خطرساز امکان پذیر نشد. در مورد بررسی سایر عوامل خطر ساز از نظر خطر حامل بودن انتروکوک (جدول۱)، انتروکوک مقاوم به وانکومایسین(جدول ۲) و فتوتیپ Van A (جدول ۳) آنالیز آماری انجام گردید..

جدول ۱: اکتساب روده‌ای انتروکوک در کودکان مبتلا به ALL به تفکیک عوامل خطرساز

عوامل خطر ساز	گروه واجد انتروکوک (۹۵ نفر)	گروه فاقد انتروکوک (۳۵ نفر)	سطح معنی داری (P value)
متوسط سن(سال)	۶/۴۶	۶/۵۴	./۹
تعداد جنس مذکر	۵۹	۲۴	./۴۰
مدت بیماری(ماه)	۱۴/۸	۲۱	./۱۶
تعداد دفعات بستری در هر گروه	۶۶/۳۴	۶۳/۲۱	./۶۶
تعداد موارد با سابقه نوتروپنی شدید در یکماه اخیر (تعداد مطلق نوتروفیل کمتر از ۵۰۰ در هر میلیمتر مکعب)	۵۶	۱۹	./۶۳
تعداد بیماری همزمان	۸	۵	./۳۳
مصرف آنتی بیوتیک در ۳ ماه اخیر	۶۳	۲۲	./۷
سابقه بستری در ICU	۱۲	۰	./.۳*

*** معنی دار**

جدول ۲: اکتساب روده‌ای انتروکوک مقاوم به وانکومایسین به تفکیک عوامل خطرساز در کودکان مبتلا به ALL

عوامل خطر ساز	گروه واجد انتروکوک مقاوم(۳۳ نفر)	گروه فاقد انتروکوک (۹۷ نفر)	سطح معنی داری (P value)
متوسط سن(سال)	۶/۴۳	۶/۵۲	./۹۹
تعداد جنس مذکر	۲۴	۵۹	./۲۳
مدت بیماری(ماه)	۱۲/۹	۱۷/۷	./۳
تعداد دفعات بستری	۶۶/۳۴	۶۲/۷۷	./۶۲
تعداد موارد با سابقه نوتروپنی شدید	۲۱	۵۴	./۵۴
تعداد بیماری همزمان	۳	۱۰	۱/۰۰
مصرف آنتی بیوتیک در ۳ ماه اخیر	۲۳	۶۲	./۶۷
سابقه بستری در ICU	۶	۶	./.۷*

*** روند به سمت معنی داری**

جدول۳: اکتساب روده‌ای فتوتیپ‌های Van A و Van B به تفکیک عوامل خطرساز در کودکان مبتلا به ALL

عوامل خطر ساز	گروه واجد فتوتیپ Van A (۲۶ نفر)	گروه واجد فتوتیپ Van B (۷ نفر)	سطح معنی داری (P value)
متوسط سن(سال)	۷	۴/۱	./ . .۷*
تعداد جنس مذکر	۱۷	۷	./۱۴
مدت بیماری(ماه)	۱۳/۴	۱۰/۹	./۸
تعداد دفعات بستری در هر گروه	۱۶/۹۶	۱۷/۴	./۹۶
تعداد موارد با سابقه نوتروپنی شدید	۱۷	۴	./۶۸
تعداد دارای بیماری همزمان	۲	۱	./۵۲
مصرف آنتی بیوتیک در ۳ ماه اخیر	۱۹	۴	./۶۴
سابقه بستری در ICU	۴	۲	./۵۸

*** معنی دار**

بحث:

از ۱۳۰ کودک مبتلا به ALL، ۷۳ در صد واجد انتروکوک هستند، که از میان آنها ۲۵/۳ درصد حامل انتروکوک مقاوم به وانکومایسین می‌باشند. بنابراین، حدود یک سوم (۳٤/۷ درصد) سویه‌ها VRE هستند. شایع‌ترین فتوتیپ جدا شده ، VanA (۷۸/۸ درصد) و سپس VanB (**۲۱/۲** درصد) است.

گرچه متاسفانه مطالعه مشابه در ایران یافت نشد تا بتوان نتایج را با آن مقایسه نمود ولی مطالعه حاضر نشان می‌دهد در ایران نیز انتروکوک یک خطر مهم و بالقوه برای بخش-های پذیرش دهنده بیماران مزمن به‌شمار می آید. بررسی-های انجام شده در ایران در سال‌های اخیر ، توسط بهرام فتح الله زاده در ۳ بیمارستان تهران (**۱۱**) و اوژان اسدیان در بیماران دیالیزی بیمارستان نمازی شیراز (۱۲) و مقایسه آن با نتایج مطالعه اخیر حاکی از افزایش روزافزون خطر VRE است. بیماران مبتلا به بدخیمی به‌دلیل مواجهه زیاد با محیط بیمارستان و دریافت مکرر داروهای شیمی-درمانی و آنتی بیوتیک‌ها از نظر ابتلا به VRE با خطر زیاد مواجه‌اند. خطر انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین اولین بار در سال ۱۹۸٦ در اروپا و سپس یک سال بعد در امریکا مورد توجه قرار گرفت. فتوتیپ VanA به‌خصوص درگونه *انتروکوکوس فاسیوم* شاخص ایجاد مقاومت شناخته شد(۲و۱۵-۱۳). سپس تعداد در حال افزایش از بیماران با VRE به‌طور مرتب گزارش شده‌اند که در فرانسه، هلند و کره به ترتیب از ۲ درصد به ۲۰ درصد رسید که به خصوص در بخش های مراقبت ویژه بیشتر بوده است(**۱٦**). در مطالعه Qian zhou ذکر شده که بعد از اولین مورد VRE گزارش شده در ONTARIO درسال۱۹۹۳، تعداد افراد آلوده به‌طور مرتب افزایش یافته است. با توجه به محدودیت درمان و قابلیت انتقال ژن مقاومت وانکومایسین به دیگر باکتری‌ها ، VRE به یک مشکل بهداشتی در سطح جهان تبدیل شده است. با توجه به محدودیت در جداسازی بیماران، کنترل آن مشکل است (**۱۷**) .

بررسی‌های انجام شده در کودکان از نظر VRE بسیار محدود است. لذا، مطالعات اندکی در این مورد یافت شد. به‌عنوان مثال، خطر VRE در اطفال در بیمارستان دانشگاهی Akdeniz ترکیه بررسی شده است که شیوع آن ۱/۵ در صد و همه واجد vanA گزارش شد(۱٤).در مطالعه Harry و همکاران مصرف وانکومایسین قبلی عاملی جهت گسترش VRE ذکر شده است. با توجه به این مطالعه مصرف وانکومایسین در بخش‌های هماتولوژی – انکولوژی و بیماران اطفال پیوند شده حدود ۲۰ برابر است. لذا، میزان و خطر VRE و مرگ و میر ناشی از آن با توجه به محدودیت‌های درمان در این بخش‌ها بیشتر است (۱۸) . خطر بیشترVRE در بیماران این بخش‌ها در مطالعه Iva vangnerova در چک اسلواکی نیز تایید شده است (**۱۹**).

در مطالعه Nalini singh-Naz (۱۹۹٤) در بخش‌های هماتولوژی – انکولوژی اطفال در واشنگتن میزان VRE ، ۲٤ درصد گزارش شده است که از ۱۲٤ بیمار بررسی شده ٤٦ نفر بدخیمی داشته‌اند. البته ذکر نشده که چه میزان از افراد واجد VRE در این گروه قرارگرفته بودند. در مقام مقایسه، میزان کلی VRE مشابه مطالعه ما می‌باشد، اما مسلما این میزان در بیماران مبتلا به بدخیمی کمتر بوده است که البته مطالعه مذکور مربوط به حدود ۱۵ سال قبل است (۱۹). در مطالعه Alexander A.padiglione (۱۹۹۸) ۱/۹۱ درصد از بیماران مبتلا به VRE گزارش شده‌اند. این مطالعه نیز در بخش‌های هماتولوژی، پیوند، کلیه و ICU انجام گرفته و از این میان *E.faecium* با فتوتیپVanB بیشترین گونه جدا شده بوده است. این میزان کم ابتلا به VRE ، مطابق آنچه در این مطالعه بیان شده به علت اجرای مناسب روش‌های کنترل عفونت بوده است. همچنین با توجه به اینکه نمونه به‌صورت سواب رکتال گرفته شده، احتمال منفی شدن نمونه‌ها به‌طور کاذب افزایش یافته است (۲۰) .در مطالعه M.Knoll در فاصله سال‌های ۲۰۰۱-۱۹۹۹، میزان شیوع VREبخش‌های هماتولوژی انکولوژی بیمارستان دانشگاهی، ٦-۳ درصد گزارش شده است و بیشترین فتوتیپ از نوع Van A بوده است (**۳**). در مقایسه با مطالعه حاضر، این میزان بسیار کمتر است اما از نظر فتوتیپ هماهنگی دارد.

در مطالعات سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ ، در ایالت میشیگان آمریکا، VRE حدود ٤۰ درصد گزارش شد، که VanB٨٩.٤ درصد وVanA ۱۰/٦ درصد بود (۲۱)، که در مقایسه میزان آن تقریبا ۲ برابر است و فتوتیپ کم خطرتری دارد . در همان سال مطالعه‌ای به منظور تعیین فتوتیپ VRE توسط Kedziorska بر روی بیماران مبتلا به سرطان و با نقص ایمنی انجام شد. نتایج نشان داد همه

سویه‌های VRE واجد فتوتیپ VanB بودند(۲۲) .علت این تفاوت می‌تواند مربوط به تفاوت نژادی، رژیم شیمی درمانی و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. در همان زمان در ترکیه مطالعه‌ای انجام شد که در آن VRE یافت نشد. البته، انتروکوک با حساسیت متوسط به وانکومایسین یافت شد که ٤٥ درصد آن را *E.faecalis* و ۲۹ درصد را *E.faecium* تشکیل می‌داد. نتیجه این مطالعه مقاومت انتروکوک‌ها به آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، سیپروفاکسین و نورفلوکساسین را نشان داد، اما عدم وجود VRE بسیار جالب توجه بود(۲۳). این مسئله نشان می‌دهد که حتی در کشورهای همسایه نیز شرایط مختلف است و بستگی به نحوه درمان و وجود عوامل خطر ساز دیگر دارد.

در مورد عوامل خطر ساز، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سابقه بستری در ICU یک عامل جهت اکتساب انتروکوک (P=0.02) است و همچنین با اکتساب VRE نیز روند ارتباطی قوی وجود دارد (P=0.07). در مقایسه بین دو گروه واجد VanA و VanB از نظر سنی، تفاوت معنی دار مشاهده شد. به طوری که میانگین سنی افراد واجد VanA بیشتر بود. این امر می‌تواند به دلیل بستری‌های بیشتر، مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک و در نتیجه مواجهه بیشتر با فتوتیپ خطرناک‌تر باشد. فقط در مطالعه Nalini (۱۹۹٤) از سن پایین به عنوان عامل خطر ساز شناخته شده جهت ابتلا به VRE، یاد شده است که البته در مطالعه ما و سایر مطالعات مطرح نیست. همچنین همانند مطالعه ما در هیچکدام از مطالعات ارجحیت سنی مشاهده نشد. مدت زمان تشخیص بیماری نیز در این مطالعه، رابطه معنی دار نداشت. هر چند انتظار می‌رفت با افزایش مدت زمان بیماری و تماس بیشتر با محیط بیمارستان، این امر افزایش یابد. البته در هیچ یک از مطالعاتی که در بیماران خاص انجام گرفته است، مدت ابتلا به بیماری زمینه‌ای، به‌عنوان عامل خطر ساز ثابت نشده است. در مطالعه ما طول مدت بستری مورد ارزیابی قرار نگرفته است. البته به این دلیل است که اکثر نمونه‌های ما از بیماران سرپایی واجد ALL مراجعه کننده به درمانگاه خون گرفته شده است. این عامل در تعدادی از مطالعات به‌عنوان عامل خطر ساز مطرح شده است (۲، ٤، ۸، ۱۷،۲۰و۲۱).

در مطالعه حاضر تعداد بستری‌های قبلی به‌عنوان عامل خطر ساز جهت اکتساب VRE مطرح نشد. در بررسی سایر مطالعات (۱۷) نیز این عامل، مطرح نبوده است. در مورد وجود بیماری همزمان دیگر، با توجه به تعداد کم بیمارانی که غیر از ALL بیماری دیگری نیز داشتند، رابطه معنی داری به دست نیامد. در مطالعات دیگر وجود بیماری زمینه ای به‌عنوان عامل خطر ساز مطرح شده است. به‌عنوان مثال، در مطالعه Nalini-Singh ، وجود بدخیمی و کم خونی داسی شکل در اطفال (۱۹) و وجود بیماری زمینه‌ای در مطالعه Askarian ، عامل خطر ساز جهت اکتساب VRE بوده اند (٢٤) . در مطالعه Christidou و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در یونان ، وجود سرطان و CRF و همچنین بستری در بخش‌های کلیه و جراحی به‌عنوان عامل خطر ساز مطرح شده‌اند (۲۵). در مقابل در مطالعه Qian zhou، وجود سرطان و دیابت شیرین ، ارتباط معنی داری با اکتساب VRE نداشته است . همچنین این عدم ارتباط در مطالعه Alexendraنیز دیده شده است (**۲۰**). نوتروپنی شدید در پاره ای از مطالعات به عنوان عامل خطر ساز مطرح شده است (**۲٦**). اما، در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین سابقه نوتروپنی شدید در یک ماه قبل از نمونه گیری و عامل خطر ساز VRE بدست نیامد. سابقه مصرف لوله گاستروستومی هم در مطالعه ما هیچ موردی نداشت و لذا قابل بررسی نبود. در عین حال که این سابقه در برخی مطالعات انجام شده به عنوان یک عامل خطر ساز مطرح است (٦، ۷) بین بستری در ICU و اکتساب انتروکوک ،هم از نوع حساس وهم از نوع مقاوم به وانکومایسین، ارتباط معنی دار یافت شد. دلیل آن می تواند ، وجود ICU به‌عنوان یک بخش پر خطرباشد که در آن؛ بیماران در معرض عفونت‌های مهاجم تری قرار می گیرند، استفاده از وسایل و دستگاه‌های مختلف که احتمال آلودگی بیشتری با انتروکوک دارند، ازدحام ICU ، عدم باور صحیح پزشکان و پرسنل جهت شستشوی صحیح و اصولی دست، و عدم رعایت درست اصول جداسازی باشد. در مطالعات دیگر نیز ، بستری در ICU به‌عنوان یک عامل خطر ساز مطرح بوده است (٤، ۸، ۱۸، ۲۰)، اما در مطالعه Christidou ، ارتباطی در این باره به‌دست نیامده است (۲۵). .البته در بعضی مطالعات همانند مطالعات انجام شده در برزیل (۸) ، تمام مطالعه در ICU انجام گرفته است.

گرچه مصرف آنتی‌بیوتیک در بسیاری از مطالعات به‌عنوان عامل خطر ساز جهت اکتساب VRE مطرح شده است (**۵**، ۸، ۱۷-۱۲، ۱۹و ۲۹-۲۷)، اما در مطالعات مختلف نوع آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت بوده است. بیشترین اتهام متوجه سفالوسپورین‌های نسل سوم (۱۸، ۱۹، ۲۲، ٢٤و ۲۸) و سپس آنتی بیوتیک‌های ضد بی‌هوازی‌ها، وانکومایسین،

ایمیپنم، مونوباکتام و کارباپنم‌ها بوده است (۷، ۲۰ و۲۵). در مطالعه حاضر عدم ارتباط مصرف آنتی بیوتیک در **۳** ماه گذشته و اکتساب VRE می‌تواند به دلیل تفاوت وضعیت رعایت بهداشت در بیماران ما در مقایسه با مطالعات دیگر باشد. این امر موجب تنوع ارگانیسم‌های روده‌ای بیماران شده و همچنین به سرعت با ارگانیسم‌های مختلف کلونیزه می شود . همچنین می‌توان به تفاوت نژادی در این مطالعات اشاره کرد .از آنجا که به هر حال میزان حامل بودن انتروکوک‌های مقاوم در این مطالعه به نسبت دیگر مطالعات زیاد است (مثلا ۹/٦ درصد در مطالعه Matar و همکاران(۲٦))، افزایش تعداد نمونه می‌تواند به یافتن این ارتباط کمک کنند.

نتیجه گیری:

در این مطالعه ثابت شد که VRE به خصوص از نوع پلاسمیدی در حال گسترش است و میزان حاملین آن در بیماران لوسمیک بسیار زیاد ست. پس عامل زمینه‌ای آن می‌تواند هر عامل خطر سازی باشد که از اهمیت موضوع کم نمی‌کند. پیشنهادات ذیل را می‌توان مطرح نمود:

گرچه هنوز انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین جزو ارگانیسم‌های شایع موجد باکتریمی یا عوارض جدی در بیماران این دو مرکز نیست، اما این احتمال بالقوه وجود دارد که به تدریج به یک پاتوژن جدی تبدیل گردد، که درمان آن بسیار سخت و عوارضی مانند اندوکاردیت نیز ممکن است در پی داشته باشد(۲٦).

بهبود شرایط ICU ضروری به‌نظر می رسد که توصیه می‌شود تعداد تخت‌های ICU متناسب با تعداد پرسنل باشد. روش صحیح بهداشت دست به پزشکان، پرسنل، بیماران و همراهان آموزش داده شود و بر اجرای صحیح آن نظارت شود. از آنجا که شستن به تنهایی با آب و صابون کافی نیست ، بهتر است از صابون آنتی‌سپتیک و نیز ترکیبات بدون آب با پایه الکل استفاده شود. اصول ضد عفونی صحیح دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده رعایت شود. جداسازی بیماران مبتلا و کلونیزه باید رعایت شود و از آنها در اتاق جداگانه ای پرستاری شوند. پرسنل در زمان مراقبت حتماً از وسایل محافظت فردی نظیر گان و دستکش استفاده کند. .بررسی بیماران به‌خصوص در بخش‌های پر خطر باید طبق یک برنامه منظم به طور روزمره انجام گیرد. کشت نمونه مدفوع ، سواب رکتال, اطراف رکتوم و ناحیه کشاله ران به صورت پیوسته به فاصله یک هفته انجام شود. در مواردی که سابقه کشت مثبت از هر ناحیه‌ای از بدن وجود دارد ، مجددا کشت تکرار شود و منفی شدن آن اثبات شود .افراد واجد VRE درمان نشده باید مشخص شوند، در پرونده آنها این نکته به‌صورت متفاوتی ثبت شود و در بستری‌های بعدی به آن توجه شود(۲۹). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، باید به‌طور مناسب باشد. یعنی فقط زمانی که مورد نیاز هستند و حتی الامکان از آنتی بیوتیک طیف محدود استفاده شود. باید دستورالعملی برای استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در هر مرکز بیمارستانی و اختصاصی آن مرکز تدوین شود. استفاده از وانکومایسین محدود شود و با داروهای مناسب مانند تیکوپلانین جایگزین شود .

تقدیر و تشکر:

این مطالعه در قالب پروژه تحقیقاتی با بودجه و همیاری مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در بیمارستان مفید صورت گرفت. لذا، از ریاست مرکز آقای دکتر کریمی و تمام پرسنل این مرکز به‌خصوص پرسنل آزمایشگاه و سرکار خانم‌ها دکتر طباطبایی و گل نبی تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست مراجع:

1. Haslam DB.*Entrococcus* In : Kliegman ,Behrman,Jenson and Stanton 'Nelson Textbook of Pediatrics,18th ed. Philadelphia : WB Saunders, 2007 ;PP: 1151-53.
2. Sylvain D,Trish M. Vancomycin-resistant enterococci- a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance . *CHEST J* 2003.,123:504-518
3. M. Knoll ,G. Daeschlein , J. Okpara-Hofmann , Okpara-Hofmann, I. Klare, D. Wilhelms, *et al*. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in a hematological oncology ward and hygienic preventive measures. A long-term study . *Onkologie* 2005;28:187-192 .
4. McNeil SA,Malani PN,Chenoweth CE, Fontana RJ; Magee JC; Punch JD, *et al* .Vancomycin-resistant enterococcal colonization and infection in liver transplant candidates and recipients: A prospective surveillance study . *Clin Infect Dis* 2006 ; 42(2):195–203 .
5. Simona F. O, Najam Z, Susan M.D, Mamtha Balasubramaniam, Ellie Hershberger, Marcus J, *et al*. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* ,2004 ; 53 : 626-30 .

٦. ناجیان ی . بررسی عوامل خطر عفونت با انتروکوک مقاوم به وانکومایسین در بیمارستان حضرت رسول اکرم تهران در سال ۸۱- ۱۳۸۰، دانشگاه علوم پزشکی ایران . پایان نامه برای در یافت درجهٔ دکترای پزشکی به راهنمایی دکتر علیرضا ناطقیان . ش ث : ۳۳۱۲ .

7. Nateghian AR, Robinson JL, Samadi B ,Abdi N .Appropriate use of Vancomycin in an educational tertiary care hospital in Tehran,Iran . *Med J of the Islamic Republic of Iran* 2007 ; 21(1) : 43-49.
8. Furtado GHC , Martins ST, Coutinho AP, Coutinho AP, Soares GMM, Wey SB, *et al* . Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil . *Braz J Infect Dis* 2005 ; 9(1) PP:64-69.
9. Ghidán A, Jeney C, Csaba L, Csiszár K, Rozgonyi F . PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary . *J Antimicrob Chemother* ,2000 ; 46: 325-327 .

۱۰. فیض آبادی م، اسدی س، خطیبی س، اصغر زاده، مبشری ف، اعتمادی گ و همکاران . بررسی الگوی مقاومت دارویی سویه های فکالیس و فاسیوم انتروکوک در بیمارستان لبافی نژاد و شهید چمران سال های ۸۲-۷۹ . *مجله دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی* ۱۳۸۳ ، سال نهم. شماره ٤٢ ، صص ۳۳۹-۳۳۳

11. Fatholahzadeh B, Hashemi F, Emaneini M , Aligholi M, Kazemi B, Sadeghi *, et al*. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran . *DARU* 2006 ; 14(3):141-5.
12. Assadian O, Askarian M, Stadler M, Shaghaghian S. Prevalence of Vancomycin-resistant enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz, Iran. BMC Infect Dis 2007; 52(7) .online journal.
13. Alexandra E, Gebhard F,Gregor G, Franz D, Herald H,Kessler A,*et al*. High prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci in Austrian poultry . *Appl Environ Microbiol*, 2005 ; 71(10): 6407-09.
14. Ayla E, Thierry N, Betil OB ,Dilara O, Dilara I,Dilek C,*et a*l. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital . *J Antimicrob Chemother* 2008 ; 61(5) :1033-1039 .
15. Iva V, Pavel S, Milan K, Sabina S,Jaromir H,Edgar F,*et al* **.** Sources and Pathways of spread of vancomycin-resistant enteroccocci in hematology-oncological patients . *Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006 ;150(1):117–120.
16. Antonia T. T, Luis Gustavo O.C, Giane V.C , Sonia R,Angela Von N,Periera R,*et al* **.** Low prevalence of vancomycin resistant enterococci colonization in intensive care patients in a Brazilian teaching hospital . *Braz J Infect Dis* l 2006 ;.**10** (4) ,:250-9.
17. Qian Z, Christine M, Sarah E,Noble WC,Virani Z,Cree RGA*, et al* . Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital . *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**:398-403

18. Harry L.K, Ronda L.S, James M.H,Gil L,Jane DS,Beth HS, *et al*. Vancomycin use in hospitalized pediatric patients . *AAP* 2003; 112(2) :104-111.
19. Nalini SN, Ambreen S, Andreas P, Rantilal M,Campos J. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in children . *JCM* 1999 ; 37(2) : 413-16 .
20. Alexander A. P, Rory W,Elizabeth A.G ,Di O,Pearson S,Franklin C**, *et al* .** Risk factors for new detection of vancomycin-resistant enterococci in acute-care hospitals that employ strict infection control procedures . *Antimicrob Agent Chemother*, 2003 ;47(8**) :** 2492-98 .
21. Preeti N. M, LeeAnn T, Susan M.D **,**Robinson D,Kauffman C,Cow J, *et al* . Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period . *J Antimicrob Chemother*, 2002 ;**49**(5) : 841-843.
22. Kedzierska J, Wegrzyn J, Skotnicki AB,MNaser S,Gajda A,Skotnicki AB,*et al*. *Infections with Van B phenotype* Enterococcus faecium *and* E. faecalis *in patients with immune deficiency during the course of hematologic neoplasms .Med Dosw Mikrobiol* 2003; **55**(1):11-24 .
23. SR Moaddab, A Rafi . Prevalence of vancomycin and high level aminoglycoside resistant enterococci among high-risk patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003 Dec; 34(4) ,849-54.
24. M. Askarian, R. Afkhamzadeh, A. Monabbati, Daxboeck F,Assadian O. Risk factors for rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. Int J Infect Dis 2009 ; **12**(2) :171-5
25. Christidou A., Nikolaidis P., Skoutelis A., Kartali S,Maltezos E,Levidiotou S,*et al*. Vancomycin-resistant enterococci in Greece: a multicentre prevalence study on intestinal colonisation. 15th Europian Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen / Danmark , April 2-5 , 2005 .
26. Matar MJ**,** Tarrand J**,** Raad I**,** Rolston KV. Colonization and infection with vancomycin-resistant *Enterococcus* among patients with cancer. *Am J Infect Control* 2006 ;34(8):534-6.
27. Sheila M.N, Jeffrey S.G, Theoklis Z,Priya P,Rettig S,Gross K, *et al*. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization among pediatric oncology patients. Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30:338–345
28. Lesens O, Mihaila L, Robin F,Baud O,Romuszko JP,Tourniac O,*et al* . Outbreak of colonization and infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a French university hospital **.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006 Sep**;** 27(9):984-6 .
29. Lesens O, Robin F, Corbin V, Vidal M,Sanchio AM,Julien F,*et al*. *Vancomycin-resistant* Enterococcus *in an epidemic situation: screening at admission for patients at risk of carriage. Presse Med* 2006 Aug; **35**(7-8):1167-73.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۳۴-۲۶

ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی

ندا سلیمانی[۱]، مرتضی ستاری*[۱]، سعید سپهری سرشت[۲]، سعید دانشمندی[۳]، صفورا درخشان[۱]

۱) گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲) گروه پاتولوژی ، مرکز قلب تهران
۳) گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
نویسنده رابط: مرتضی ستاری، گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۵۶۳ *sattarim@modares.ac.ir*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٤/۲٤

چکیده:

زمینه و اهداف: مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها علیه عفونت ناشی از باکتری‌ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردید تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضد میکربی جدید با اثر بخشی بیشتر به‌خصوص گیاهان داروئی صورت گیرد. هدف این تحقیق، ارزیابی اثرات متقابل داروئی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر ضد تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود.

روش بررسی: اسانس زیره سیاه از دانه آن تخلیص شد و با روش کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی (GC/MS) تجزیه (آنالیز) شد. برای بررسی عملکرد ضد باکتریایی اسانس از روش انتشار از دیسک و تعیین حداقل غلظت‌های مهارکننده (MIC) و کشنده (MBC) بر روی ۸ سویه استاندارد باکتریایی استفاده شد. در بررسی اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) و کاهندگی (آنتاگونیستی) ، سویه‌های استاندارد باکتریایی بر روی محیط حاوی اسانس کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی آن قرار گرفت.

یافته‌ها: در اسانس زیره سیاه ۱۳ ترکیب شناسایی شد. بر اساس آزمایش انتشار از دیسک در آگار بیشترین میزان هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ٤٥ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج MIC و MBC نشان داد که اسانس بیشترین میزان مهار کنندگی و کشندگی را بر روی *اشریشیا کلی* دارد. نتایج مربوط به اثرات هم‌افزایی و کاهندگی در مورد *اشریشیا کلی* نشان داد که اسانس موجب افزایش اثر جنتامیسین می شود، اما در مورد سایر باکتری‌ها نتایج متغیر بود.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که اسانس زیره سیاه می‌تواند به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضد میکربی برای درمان عفونت‌های باکتریایی موثر باشد. همچنین این اسانس می‌تواند عملکرد برخی از آنتی-بیوتیک‌ها را تقویت نماید که امکان استفاده از آن را به‌ویژه در موارد مقاومت داروئی مطرح می‌نماید.

کلید واژه‌ها: زیره سیاه، فعالیت ضد باکتریایی، اثرات هم‌افزایی و کاهندگی، اسانس، آنتی‌بیوتیک

مقدمه:

آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک در دهه‌های گذشته توانسته‌اند نقش مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایفا نمایند (۳-۱). اما، پیدایش مقاومت دارویی در برابر اغلب آنتی-بیوتیک‌ها و بروز عوارض جانبی جدی به‌دنبال مصرف برخی از آنها، انگیزه زیادی را برای جستجو و ارائه ترکیبات ضد میکربی جدید به‌ویژه با منشاء گیاهی فراهم آورده است. در بسیاری از نقاط دنیا ترکیبات گیاهی به شکل سنتی و به منظور درمان برخی بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های عفونی، اسهال، تب، سرماخوردگی، کنترل زاد و ولد و بهداشت دهان و دندان استفاده می‌شوند. خواص ضد میکربی گیاهان از دیر باز مورد توجه بوده‌است.

گذشتگان بدون اطلاع از وجود میکرب‌ها و تنها از طریق تجربه‌های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌کردند. با این حال امروزه مطالعه بر روی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی با هدف رسیدن به ترکیبات جدید در اولویت قرار گرفته است(۹-٤).

گیاه زیره سیاه یا زیره کوهی*(Bunium persicum)* با نام علمی *persicum* Boiss از خانواده .Apiaceae (Umbelliferae) است. زیره سیاه گیاه دارویی است ، با ساقه‌های صاف و میان تهی که تا ارتفاع ٦۰ سانتی‌متر می‌رسد. برگ‌ها با تقسیم شانه‌ای و دارای زاویه بدون دمبرگ می‌باشند. گل‌ها به رنگ سفید و به صورت مجتمع در گل آذین چتری در خرداد ماه ظاهر می‌شوند. گل‌ها خودبارور هستند و با حشرات گرده افشانی می‌شوند (۱۰). این گیاه بومی خاورمیانه، به ویژه جنوب شرق ایران است و به‌صورت وحشی در مناطق مختلف استان کرمان می-روید. از زیره سیاه در طب سنتی در موارد گرفتگی عضلات، به‌عنوان باد شکن، اشتها آور، خلط آور، افزایش دهنده ترشح شیر، طعم دهنده در صنایع غذایی و تقویت کننده معده استفاده می شود. همچنین این گیاه دارای اثرات ضد سرطانی، کاهش دهنده قند خون و قابض می‌باشد (۱۲). از ترکیبات مهم و عمده گیاه زیره سیاه می‌توان به لیمونن(Limonene)، سابینن (Sabinene)، فلاونوئیدها (Flavonoids)، پلی‌ساکاریدها، کومارین (Cumarin)، کـومین آلدئید (Cuminaldehyde)، دی-هیدروکاروئول (Dihydrocarveol) ، پینن (Pinene) و ترپینن (Terpinene) اشاره نمود (۱۳).

مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها علیه عفونت ناشی از باکتری‌ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردیده تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضدمیکربی جدید با اثر بخشی بیشتر صورت گیرد. با توجه به کاربردهای ذکر شده و امکان استفاده مفید آن به‌صورت بالینی و برای درک مناسب از اثرات این گیاه داروئی در این مطالعه ارزیابی اثرات متقابل داروئی(اثر سینرژیسمی/هم‌افزایی و آنتاگونیسمی/ کاهندگی) و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه علیه تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام شد.

مواد و روش‌ها:

۱- نمونه گیاهی و استخراج اسانس

دانه‌های گیاه زیره سیاه از گیاهان کشت شده در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی (وابسته به جهاد کشاورزی استان تهران) در ۲۵ کیلومتری شمال تهران تهیه شد. دانه‌های گیاهی جمع‌آوری شده توسط مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران تایید شدند. سپس این دانه‌ها شسته و با استفاده از آسیاب پودر گردید. ۵۰ گرم از پودر با یک لیتر آب مخلوط شد و به مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation)در دستگاه کلونجر ((Clevenger) (شرکت شیمی فن، تهران، ایران) اسانس گیری شد (١٤). سپس اسانس جداسازی و تا زمان استفاده برای آزمایش ضدباکتریایی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲- تجزیه (آنالیز) اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی (GC/MS)

برای تجزیه (آنالیز) کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی اسانس استخراج شده از دستگاه GC/MS (PerkinElmer, California, USA) با مشخصات زیر استفاده شد:

گازکروماتوگراف واریان ۳٤۰۰ کوپل شده با دستگاه طیف سنج جرمی (ساترن II) تحت شرایط ذیل: ستون DB-1 به طول ٦۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵میکرومتر، گاز حامل هلیوم، فشار گاز سر ستون ۳۵ میلی لیتر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت و دامنه جرمی ٤۰-۳۵۰amu.

برنامه‌ریزی حرارتی گاز کروماتوگراف به این ترتیب انجام

شد: درجه حرارت ۲۳۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و درجه حرارت محفظه تزریق ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد. شناسایی اجزای اسانس با مقایسه طیف جرمی و شاخص‌های نگهداری (بازداری) آنها با نمونه‌های تایید شده صورت گرفت.

۳- سویه‌های آزمایش

جهت اررزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه از سویه‌های استاندارد استفاده شد. این سویه‌ها که از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد، عبارتند از: *اشریشیا کلی* **ATCC ۲۵۹۲۲**، *پسودوموناس آئروژینوزا* **ATCC ۲۷۸۵۳**، *استافیلوکوکوس اورئوس* **ATCC۲۵۹۲۳**، *شیگلا فلکسنری* **M90T**، *باسیلوس سرئوس* **ATCC ۹٦۳٤**، *باسیلوس سوبتیلیس* **PY-79**، *سالمونلا تیفی موریوم* **ATCC ۱٤۰۲۸** و *انتروکوکوس فکالیس* **ATCC ۳۳۱۹٦** . سویه‌های مورد مطالعه با استفاده از محیط‌های افتراقی، انتخابی، اختصاصی و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند.

٤- تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس

الف: آزمایش حساسیت به اسانس به روش انتشار از دیسک فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره با دو روش انتشار از دیسک (١٤) با اندازه‌گیری هاله مهاری و روش رقت سازی در محیط مایع (broth dilution) با اندازه‌گیری حداقل غلظت مهار کننده (MIC)(۱۵) تعیین شد.

در روش انتشار از دیسک، دیسک‌های بلانک استریل (MAST Co. UK) روی سطح ظروف پتری تلقیح شده با باکتری‌ها قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر از اسانس روی دیسک‌ها تزریق شد. سپس ظروف پتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله‌های مهار رشد در اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. یک دیسک تزریق شده با ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و یک دیسک تزریق شده با ۵۰ میکرولیتر بافر تایرود(۲۸) به عنوان دیسک شاهد منفی در نظر گرفته شد. از دیسک‌های جنتامیسین و اگزاسیلین (MAST Co. UK) به‌عنوان شاهد مثبت دارویی استفاده شد. همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار تایید شدند.

ب: تعیین حداقل غلظت مهارکننده Minimum Inhibitory Concentration برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده اسانس بر روی سویه‌های آزمایش از روش microbroth dilution استفاده شد (۱۵). ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (Merck) به هر چاهک میکروپلیت الیزا اضافه شد. اسانس در بافر Tyrode (NaCl ۰/۸ گرم، CaCl2 ۰/۰۲ گرم، KCl ۰/۰۲ گرم، NaHCO3 ۰/۱ گرم، D-Glucose ۰/۱ گرم، MgCL2 ۰/۱ گرم، NaH2PO4 ۰/۰۰۵ گرم **در**۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر در pH = ۷/٤) به نسبت ۱:۲ رقیق شد. در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲ اسانس اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. به‌همین ترتیب سریال رقت در چاهک‌ها ایجاد گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (۱۰۸ باکتری در میلی‌لیتر) به صورت جداگانه به چاهک‌ها اضافه شد. به چاهک شاهد منفی بافر Tyrode بدون اسانس اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. کم‌ترین غلظتی که جهت توقف رشد باکتری‌ها در پایان ۱۸ ساعت گرمخانه-گذاری مورد نیاز است به عنوان MIC (حداقل غلظت مهار کننده) تعریف شد.

ج: تعیین حداقل غلظت کشنده Minimum Bactericidal Concentration

برای تعیین حداقل غلظت کشنده ۱۰ میکرولیتر از محتوای چاهک‌ها در پایان ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، روی محیط مولر هینتون آگار (Merck) کشت داده شد. ظروف پتری به‌منظور بررسی رشد باکتری‌ها به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کم‌ترین غلظت اسانس که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۵). تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

۵- بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

برای تعیین اثر ترکیبی میان اسانس زیره سیاه و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از روش انتشار از دیسک استفاده شد. بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس بر آنتی‌بیوتیک معمولا با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) صورت می‌گیرد که برابر با رقت ۱:۲ تا ۱:٤ MIC است. در این مطالعه غلظت تحت مهاری اسانس زیره با رقت ۱:۲ MIC به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد و به‌عنوان ظروف پتری آزمایش (تست) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت CFU $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ (معادل نیم مک فارلند) روی محیط کشت آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس

توسط سواب به‌صورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح آگار قرار داده شدند. سپس قطر هاله‌های مهار رشد دیسک‌ها، پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ثبت شد. برای بررسی اثر متقابل اسانس بر آنتیبیوتیک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، پیپراسیلین- تازوباکتام (۱۱۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، جنتامیسین (۱۰µg)، اریترومایسین (۱۵µg)و اگزاسیلین (۱µg) استفاده گردید (Mast Co., Merseyside, UK).

یافته‌ها:

۱- ترکیب شیمیایی اسانس توسط GC/MS

اجزای شناسایی شده توسط تجزیه‌های GC/MS در جدول **۱** فهرست شده‌اند. در اسانس زیره سیاه در مجموع ۱۳ ترکیب شناسایی شد. از میان آنها کومین آلدهید (۲۴/۲٪)، پارا منتا ۱و۳- دی ان ۷ آل (۱۱/٤٪)، پارا منتا ۱و٤-دی ان ۷ آل (۱۸/۲٪) و گاما ترپینن (۲۰/٦٪) اجزای عمده آن را تشکیل می دادند (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب شیمیایی اسانس تعیین شده توسط GC/MS

شماره	نام ترکیب شیمیایی	اندیس کواتس*	درصد
۱	α-Thujene	۹۳۰	۰/۵
۲	α-Pinene	۹۳۹	۰/۸
۳	Sabinene	۹۷۹	۱/۲
٤	β-Pinene	۹۸۲	۱٤/۱
۵	Myrcene	۹۹۳	۱
٦	ρ-Cymene	۱۰۲۳	۵/۷
۷	β-Phellandrene	۱۰۳۱	۰/۳
۸	γ-Terpinene	۱۰۵۸	۲۰/٦
۹	ρ-Menth-3-en-7-al	۱۱۵۲	۲/٦
۱۰	Cumin aldehyde	۱۱۷۹	۲٤/۲
۱۱	ρ-Mentha-1,3-dien-7-al	۱۲۰٦	۱۱/٤
۱۲	ρ-Mentha-1,4-dien -7-al	۱۲۰۹	۱۸/۲
۱۳	Cuminyl alcohol	۱۲٦۷	۲/۳

*شاخص بازداری

۲- فعالیت ضد باکتریایی اسانس (نتایج آزمون‌های انتشار از دیسک، MIC و MBC)

نتایج آزمایش‌های ضد باکتریایی در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس آزمایش انتشار از دیسک بزرگ‌ترین هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ٤۵ میلی‌متر و بعد از آن بیشترین قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کلی* بود. در *انتروکوکوس فکالیس*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی موریوم* کمترین قطر هاله عدم رشد مشاهده گردید. بررسی نتایج MIC و MBC نشان داد که اسانس زیره سیاه بیشترین اثر مهار کننده و کشنده را بر روی *اشریشیا کلی* دارد (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج آزمون انتشار از دیسک، در سویه‌های استاندارد برای اسانس زیره سیاه

باکتری	قطر هاله مهاری رشد انتشار دیسک در آگار†							
	اسانس زیره سیاه*	جنتامیسین	اگزا سیلین	آمپی سیلین	اریترومایسین	وانکومایسین	سفالوتین	پیراسیلین تازوباکتام
شیگلا فلکسنری	۱۸ ± ۰/ ۵	۱٤ ± ۰/٤	۱۱ ± ۰/٦	۲۵ ± ۰/۸	۲۳ ± ۰/۵	۲۰ ± ۰/٦	۳۰ ± ۰/۸	۳۰ ± ۰/۵
انتروکوکوس فکالیس	۷ ± ۰/۳	۰	۰	۱۲ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۸	۱۲ ± ۰/۹	۰	۱۸ ± ۰/٦
باسیلوس سرئوس	٤۵ ±۰/ ۷	۲۱ ± ۰/۸	۱۷ ± ۰/۸	۲۰ ± ۰/٤	۲۲ ± ۰/۵	۲٤ ± ۰/۸	۵۳ ± ۰/۵	۲۹ ± ۰/۸
سالمونلا تیفی موریوم	۸ ± ۰/۵	۱۵ ± ۰/۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱۸ ± ۰/۵
باسیلوس سوبتیلیس	۲۱ ± ۰/۸	۲٤ ± ۰/۸	۱۷ ± ۰/۵	۲۱ ± ۰/۵	۳۰ ± ۰/۵	۱۹ ± ۰/۷	٤۰ ± ۰/٦	۲۷ ± ۰/۹
اشریشیا کلی	۱٦ ± ۰/۳	۲۱ ± ۰/۳	۱٤	۱۲ ± ۰/٦	۱۲ ± ۰/٦	۰	۲۳ ± ۰/ ٤	۲۵ ± ۰/۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰ ± ۰/ ۹	۱۲ ± ۰/۸	۲۲ ± ۰/۹	۲۷ ± ۰/٤	۲٤ ± ۰/۵	۱٤ ± ۰/۸	۳۰ ± ۰/۳	۳۰ ± ۰/۹
پسودوموناس آئروژینوزا	۸ ± ۰/۸	۱۵ ± ۰/٦	۰	۱۱ ± ۰/۷	۱۰ ± ۰/٤	۰	۹ ± ۰/۵	۱۰ ± ۰/٤

* برحسب رقت از ذخیره (استوک) (وزن حجمی ذخیره = ۷۵mg/ml میلی گرم در میلی لیتر)؛ † قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر؛ جنتامیسین (۱۰µg)؛ اگزاسیلین (۱µg)، وانکومایسین(۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، پیراسیلین-تازوباکتام (۱۱۰µg)، آمپی سیلین (۱۰µg) و اریترومایسین (۱۵µg).

جدول ۳. MIC و MBC در سویه‌های استاندارد برای اسانس زیره سیاه

باکتری	اثر مهارکننده و کشنده در محیط مایع برحسب mg/ml		
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	شاهد (Tyrode)
شیگلا فلکسنری	۰/۰۲۵	۰/۰۵	–
انتروکوکوس فکالیس	–	–	–
باسیلوس سرئوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	–
سالمونلا تیفی موریوم	–	–	–
باسیلوس سوبتیلیس	۰/۰۵	۰/۱	–
اشریشیا کلی	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۳۱	–
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	–
پسودوموناس آئروژینوزا	–	–	–

(وزن حجمی ذخیره = ۷۵mg/ml میلی گرم در میلی لیتر)

۳-۳- اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

نتایج مربوط به اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) و کاهندگی (آنتاگونیستی) اسانس زیره سیاه بر روی سه آنتی‌بیوتیک معمول و برای پنج سویه باکتری استاندارد در جدول‌های ٤ و ٥ آورده شده است. در مورد *اشریشیا کلی* اسانس باعث افزایش اثر جنتامیسین و آمپی سیلین شد و بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی این باکتری تاثیری نداشت. در مورد *شیگلا فلکسنری* موجب افزایش اثر هر سه آنتی-بیوتیک بکار رفته شد. در مورد *باسیلوس سوبتیلیس* اثری نداشت. نتایج اثرات متقابل دارویی و اسانس بر *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* متغیر بود (جدول‌های ٤ و ٥).

جدول ٤. اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

باکتری	اگزاسیلین A/AE(%)	جنتامیسین A/AE (%)	آمپی‌سیلین A/AE (%)
شیگلا فلکسنری	۱۱/۱۳ (۱۸/۱۸)	۱٤/۱۷ (۲۱/٤۲)	۲٥/۲٦ (٤)
باسیلوس سرئوس	۱۷/۱۷ (۰)	/۲۷ ۲۱ (۲۸/٥۷)	۲۰/۲۰ (۰)
اشریشیا کلی	۱٤/۱٤ (۰)	۲۱/۱۹ (۹/٥۲)	۱۲/۱٤ (۱٦/٦٦)
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۲/۲۲ (۰)	۱۲/۱٤ (۱٦/٦٦)	۲۷/۲۷ (۰)
باسیلوس سویتیلیس	۱۷/۱۷ (۰)	۲٤/۲٤ (۰)	۱۸/۱۸ (۰)

A: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک مورد نظر؛ AE: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک به همراه اسانس زیره سیاه؛ ٪: درصد افزایش و یا کاهش قطر هاله عدم رشد باکتری.

جدول ٥. اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها

باکتری	اثرات برهمکنش اسانس زیره سیاه بر آنتی‌بیوتیک‌ها		
	اگزاسیلین	جنتامیسین	آمپی‌سیلین
شیگلا فلکسنری	S	S	S
باسیلوس سرئوس	IN	S	IN
اشریشیا کلی	IN	S	S
استافیلوکوکوس اورئوس	IN	S	IN
باسیلوس سویتیلیس	IN	IN	IN

S: سینرژیستی (هم‌افزایی)؛ IN: حد وسط (فاقد اثر).

بحث:

گیاهان داروئی در طب سنتی و مصارف صنعتی و خوراکی کاربردهای گسترده دارند و از آنها به‌عنوان چاشنی، طعم دهنده و حتی نگهدارنده استفاده می‌شود. امروزه توجه خاصی به این گیاهان و مشتقات آنها به‌منظور استفاده‌های درمانی و مکمل‌های درمانی در بیماری‌های مختلف شده است (۱۷،۱٦). جستجو برای کشف عوامل ضد میکربی سالم و موثر ادامه دارد که می‌تواند هم از لحاظ درمانی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از عفونت‌های باکتریایی استفاده شود. این نیاز در سال‌های اخیر با ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو نمایان تر شده است (۱۸). بنابراین، شرکت‌های داروسازی در حال حاضر به‌دنبال داروهای جایگزین از سایر منابع از جمله گیاهان هستند. زیرا، مشخص شده گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکربی تولید می‌کنند. در مورد اثر ضد میکربی اسانس گیاه زیره سیاه گزارش-هایی انتشار یافته است. نتایج مطالعه حاضر در اسانس زیره سیاه ، سیزده جزء را شناسایی کرد. کومین آلدهید، گاما ترپینن، پارا- منتا ۱و٤ دی ان ۷ ال، بتا پینن و پارا- منتا ۱و۳ دی ان ۷ ال اجزای عمده بودند. حضور میزان بالای کومین آلدهید (حدود ۲۵ درصد) در اسانس زیره سیاه می-تواند فعالیت ضد باکتریایی آنها را توضیح دهد. همچنین اجزای فرعی اسانس یعنی آلفا پینن(α-Pinene) و سابینن (Sabinene) هم دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند (۱۹). طی مطالعه‌ای نشان داده شد که اسانس زیره اثر ضد میکربی قابل قبولی روی سویه‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۲۰). در پژوهشی دیگر، اثر ضد میکربی زیره روی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* بررسی و اثبات شده است (۲۱). رنجبریان و همکاران در سال ۱۳۸۳ طی مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی چهار عصاره گیاهی از جمله زیره سیاه را بر *هلیکوباکتر پیلوری* به روش انتشار از دیسک بررسی کردند. آنها نشان دادند عصاره زیره رشد این باکتری را مهار می‌کند (۲۲). درمطالعه دیگری، اثر ضد میکربی اسانس زیره سیاه بر روی سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی* و *شیگلا دیسانتریه* بررسی و به اثبات رسید (۲۳). اثرات ضد باکتریایی ترکیبات تیموکینون (Thymoquinone) و تیموهیدروکینون (Thymohydroquinone) سیاه دانه هم بررسی شد. ثابت شد که این ترکیبات خاصیت ضد باکتریایی و اثرات مختلف هم‌افزایی، کاهندگی یا بی‌اثر را بر روی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمپی‌سیلین و جنتامیسین از خود نشان می‌دهند (۲٤). در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه بر ضد سویه‌های استاندارد ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی خوب این اسانس بر ضد سویه‌های مورد آزمایش است. سویه-های استاندارد *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سویتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کلی* بیشترین حساسیت را به ترکیبات اسانس نشان دادند، اما در مورد سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *پسودوموناس آئروژینوزا* میزان حساسیت چندان قابل توجه نبود. آزمایش‌های MIC و MBC نیز حاکی از آن بود که اسانس زیره در مورد *اشریشیا کلی* حتی تا رقت۱/٤۸۰ (۰/۰۰۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) هم اثر مهاری دارد. در مورد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا فلکسنری* نیز تا چند رقت اثر مهار کننده قابل توجهی مشاهده شد. لیکن در مورد سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *باسیلوس سویتیلیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در رقت‌های بیشتر ممانعت از رشد باکتری مشاهده نشد. در آزمایش انتشار از دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد در *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سویتیلیس* و سپس *اشریشیا کلی* دیده شد. در حالی که در بررسی MIC بیشترین تاثیر اسانس بر روی *اشریشیا کلی* بود. با توجه به اینکه *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سویتیلیس* توانایی اسپور زایی دارد لذا در روش انتشار از دیسک قطر هاله عدم رشد بیانگر تاخیر در رشد (اسپور زایی) یا کشندگی می باشد. در حالی که در روش تعیین حساسیت در محیط مایع در مقابل شرایط نامساعد حاصل از اسانس گیاه، با سرعت بیشتری اسپور تولید می‌کنند و در مقابل اسانس مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. چون از آخرین لوله‌ای که رشدی در آن دیده نمی‌شود مجددا محیط فاقد اسانس کشت داده می‌شود. بنابراین، اگر اسپورها زنده باشند بر روی محیط شاهد رشد می کنند. بنابراین، همواره در مورد این باکتری‌ها MIC به روش لوله با چاهک تفاوت دارد، مگر آنکه بحث اسپورکشی مورد توجه قرار گرفته باشد.

از جمله مسائل قابل توجه، برهم‌کنش برخی ترکیبات گیاهی با عده‌ای از داروها است. این تعامل می‌تواند به-

صورت هم‌افزایی(سینرژیستی) و یا به‌صورت کاهندگی (آنتاگونیستی) باشد. در این مطالعه اثرات اسانس گیاه زیره سیاه بر روی عملکرد چند آنتی‌بیوتیک متداول که بر روی سویه‌های استاندارد اثر داده شده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس زیره سیاه موجب افزایش حساسیت *شیگلا فلکسنری* به اگزاسیلین، جنتامیسین و آمپی‌سیلین می‌شود. این اسانس بر روی عملکرد اگزاسیلین، جنتامیسین و آمپی‌سیلین بر ضد *باسیلوس سوبتیلیس* اثری نداشت. اسانس زیره سیاه بر عملکرد جنتامیسین و آمپی‌سیلین بر ضد سویه‌های استاندارد *اشریشیا کلی* و نیز تنها بر عملکرد جنتامیسین بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر سینرژیستی داشت. ولی بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو سویه اثری نداشت. در مورد *باسیلوس سرئوس*، اسانس زیره سیاه موجب افزایش حساسیت باکتری به جنتامیسین شد. در مجموع اسانس زیره سیاه موجب افزایش اثر جنتامیسین بر ضد هر چهار باکتری مورد آزمایش شد. اهمیت این موضوع از آنجا مشخص می‌گردد که این ترکیبات گیاهی به‌طور گسترده به عنوان چاشنی و نگهدارنده در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از سوی دیگر شناخت مناسب و دقیق‌تر این بر همکنش‌ها می‌تواند به عنوان یک راهکار مفید درمانی به‌ویژه در مورد عفونت‌های میکربی مورد بهره برداری قرار گیرد(۲۵).

نتیجه گیری:

این احتمال وجود دارد که بتوان اسانس زیره سیاه را همچون دیگر مشتقات گیاهان داروئی با خواص ضد-باکتریایی به‌عنوان ترکیب جایگزین و یا مکمل در درمان عفونت‌های باکتریایی بکار برد. البته این موضوع نیاز به پژوهش گسترده بالینی دارد. در حال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت‌ها و استفاده از آنتی‌بیوتیک-ها مطرح می‌باشد ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که توجه خاصی را برای حل این مشکل می‌طلبد (۲۶). از سوی دیگر مواد غذایی و مکمل‌هایی که افراد مختلف و بیماران مصرف می‌کنند می‌توانند بر عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات تقویتی یا بازدارنده داشته باشند (۲۷). مواد تشکیل دهنده گیاهان دارویی می‌تواند در بازگشت حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در شرایط فعلی به‌دلیل مقاومت دارویی قابلیت‌های درمانی خود را از دست داده-اند، موثر باشند. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که اسانس گیاه زیره سیاه می‌تواند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکربی برای درمان عفونت‌های باکتریایی مفید باشد. با این حال برای ارزیابی سمیت احتمالی اسانس، بررسی خواص و اثر آن و به‌دست آوردن غلظت‌های مناسب آن برای استفاده در بدن موجود زنده آزمایش‌های تکمیلی و in vivo لازم است.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان از گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری داشته‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

فهرست مراجع :

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):564-582.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223-253.
3. Ayfer D, Turgay O. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk J Biol* 2003; 27:157-162.
4. Kudi AC, Umoh JU, Eduvie LO, Gefu J. Screening of Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, *J Ethnopharmacol* 1999; 67(2):225-228.
5. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2):213-220.
6. Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Gurdyal SB, Wright CW. The evaluation of forty-three plant species for in vitro anti-mycobacterial activities: isolation of active constituents from Psoralea corylifolia and Sangivinaria canadiensis. J Ethnopharmalol 2002; 79(1):57-67.
7. Palombo EA and Semple SJ. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2001; **77**(2):151- 157.
8. Khafagi IK and Dewedar A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive Compounds. *J Ethnopharmacol* 2000; **71**(3):365-376.
9. Essawi T and Srour M. Screening of Some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; **70**(3):343-349.
۱۰- قهرمان ا، *فلور رنگی ایران*، جلد دوم.تهران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ۱۳۷۲،.ص ۱٤۰۵
۱۱- زرگری ع، *گیاهان دارویی*، جلد ۵، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳٦۸، ص ۹٤۰
12. Narayan VK and Giridhar KR. The in vitro efficacy of essential oils of some umbellifera Plants. *Ind Drugs* 1980; 17(12):394-396.
13. Thappa R, Ghoshs K, Agarwal SG, Raina, AK , Jamwal PS. Comparative studies on the major volatiles of Kalazira (*Bunium persicum* seed) of wild and cultivated sources. *Food Chem* 1991; 41(2):129-134.
14. Baydar H, Sagdic O, Ozcan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Cont* 2004; 15:169-72.
15. Demirci F, Guven K, Demirci B, Dadandi MY, Baser KHC. Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. *Food Cont* 2008; 19(12):1159-1164.
16. Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:335-339.
17. Han SY, Li PP. Progress of research in antitumor mechanisms with Chinese medicine. *Chin J Integr Med* 2009; 15(4):316-20.
18. Preuss HG, Echard B, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem* 2005; 272(1-2):29-34.
19. Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum L.* and *Carum carvi L.* essential oils. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(1): 57–61
20. Bonyadian M, Karim G. Study of the effects of some volatile oil of herbs Pennyroyal, Peppermint, Tarragon, Caraway seed and Thyme against *E. coli* and *S. aureus* in broth media. *J Vet Med Tehran Uni* 2003; **57**(4):81-83.
21. Mekawey AAI, Mokhtar MM, Farrag RM. antitumor and antibacterial activities of [1-(2-Ethyl, 6-Heptyl) Phenol] from *Cuminum Cyminum* seeds. *J App Scienc Res* 2009; **5**(11):1881-1888.
22. Ranjbaran P, Sadeghian S, Shirazi MH, Sarraf-Nejad A, Fazeli MR, Amin GH, *et al.* Antibacterial effects of *Cinnamon verum*, *Bunium persicum*, *Foeniculum vulgare* and *Anethum graveolens* extracts on *Helicobacter pylori* via disk diffusion and flow cytometry. *J Hamedan Univ Medl Science* 2005; **33**(3):42-47.
23. Syed. M and Hanif M. Antimicrobial activity of the essential oil of the umbelliferae family part 1. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgar* and *Bunium persicum* oils. *Pak J Scient Indust Res* 1985; **55**:116-120.
24. Halawani E. Antibacterial acativity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advan Biol Res* 2009; **3**(6):148-152.
25. Deborah A, Kennedy1 MBA, SickKids ND. Research Fellow & Dugald Seely Clinically based evidence of drug–herb interactions: a systematic review. *Expert Opin Drug Saf* 2010; (9-1):79-124.
26. Spratt BG, Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science* 1994; (264):388-393.
27. Song W, Studies on traditional Chinese medicines against bacterial infections, *J Beijing Tradit Chin Med* 2002; (21):249-251.
28. Ebtekar M, Hassan ZM. Effect of immunomodulators pyrimethamine and cimetidine on immunosuppression induced by sulfur mustard in mice. Int J Immunopharmacol 1993;**15**:533– 41.

یادی از همکار فرزانه مرحوم دکتر مرتضی ستاری

مرحوم دکتر مرتضی ستاری، عضو هیئت علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بود. ایشان روز ۹ مرداد ۱۳۸۹ بر اثر عاضه ایست قلبی در صحن مرقد مطهرامام علی ابن موسی الرضا (ع) جان را به جان آفرین تسلیم کرد. او که در ۱۳۳۹ در تهران متولد شد در گروه باکتری شناسی فعالیت آموزشی – پژوهشی داشت. حاصل این خدمت ارائه بیش از ۵۳ عنوان مقاله داخلی و خارجی، راهنمایی و مشاوره بیش از ۵۰ عنوان پایان نامه و تربیت صدها دانشجو در مقاطع تحصیلات تکمیلی بود.

در افتخار همراهی و هم‌نشینی با آن مرحوم به ویژه در گردهمایی‌های علمی آموختم که چگونه و تا چه اندازه می توان با قرآن مانوس بود و تا چه حد می‌توان آن را در فعالیت‌های روزمره گنجاند. نحوه و محل درگذشت آن مرحوم ارتباط تنگاتنگی با اعتقادات و انس وی با کتاب الهی و خاندان عصمت و طهارت دارد.

مقاله حاضر را در واپسین ماه‌های زندگی پر برکت تکمیل نمود. به پاس بزرگداشت روح پر فتوح آن مرحوم شورای نویسندگان تعداد جدول‌ها را بدون کم وکاست پذیرفت. روحش شاد

سردبیر مجله

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۴۱-۳۶

شیوع تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBLs) در گونه‌های *کلبسیلا پنمونیه* و *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه‌های ادرار در بیمارستان میلاد تهران – ۱۳۸۸

آوا بهروزی [۱] ، محمد رهبر [۲*] ،جلیل وند یوسفی [۱]

۱) گروه میکرب شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد آسلامی، واحد کرج
۲) بخش میکرب شناسی،آزمایشگاه مرجع سلامت
نویسنده رابط: محمد رهبر، بخش میکروب شناسی، آزمایشگاه مرجع سلامت . تهران
تلفن:۰۲۱ -٦٦٧٢٨١١٢ rahbar_reflab@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: آنزیم‌های بتا لاکتاماز طیف گسترده (ESBLs) باعث مقاومت گسترده به پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و منوباکتام‌ها می شوند. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع مقاومت ناشی از ESBLs بر روی پاتوژن‌های ادراری جدا شده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان میلاد تهران در سال ۱۳۸۸ ا نجام شد.

روش بررسی: بیماران مورد مطالعه افراد بستری و سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان میلاد بودند (اسفند ماه ۱۳۸۷ لغایت خرداد ماه ۱۳۸۸). سویه های جدا شده با آزمایش‌های بیوشیمیائی تعیین هویت شدند. برای آزمایش‌های حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها و تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده به-ترتیب از روش انتشار از دیسک و دیسک ترکیبی، طبق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ، استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز (سن، جنس، سابقه مصرف آنتی-بیوتیک) از طریق مصاحبه و یا مراجعه به پرونده بیماران بستری جمع‌آوری شد.

یافته‌ها : از ۱۱۳۰۸ نمونه ادرار بیماران سرپایی و بستری ، کشت ۱۰۲۰ نمونه(۹٪) مثبت شد. ۷۳۵ سویه باسیل گرم منفی، شامل ۶۲۰ (۸۴/۳٪) سویه *اشریشیا کلی* و ۱۱۵ (۱۵/۷٪) سویه *کلبسیلا پنمونیه* جدا شد. ۱۳۲ (۲۱٪)سویه *اشریشیا کلی* و ۱۸ (۱۵٪) سویه *کلبسیلا پنمونیه* مولد آنزیم بتا لاکتاماز طیف گسترده بودند. بالاترین میزان مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنمونیه* به کاربنی سیلین (۱۷ سویه، ۹۹/۹۵٪)، آمپی سیلین (۱۸ سویه، ۱۰۰٪) و آمیکاسین (۱۴ سویه، ۷۸٪) ، و کمترین میزان مقاومت به افلوکساسین(۵ سویه، ۲۸٪) بود. در مورد *اشریشیا کلی* بالاترین میزان مقاومت به آمپی سیلین در ۵۲۷ سویه (۸۵٪), تتراسیکلین در ۳۸۵ سویه (۶۲٪)و تری متو پریم سولفامتوکسازول در ۳۳۵ سویه (۵۴٪) بود. این سویه‌ها کمترین مقاومت را به نیتروفورانتوئین در ۳ سویه (۰/۵٪)، به آمیکاسین در ۱۲۴ سویه (۲۰٪)و به جنتامایسین در ۱۲۴ سویه (۲۰٪) نشان دادند.

نتیجه گیری : قریب یک پنجم سویه‌های *اشریشیا کلی* ویک ششم سویه‌های *کلبسیلا پنمونیه* جدا شده ازنمونه‌های ادرار مولد آنزیم بتا لاکتاماز طیف گسترده هستند که به اغلب آنتی بیوتیک‌های متداول نیز مقاوم می باشند.

کلمات کلیدی:ESBLs، *اشریشیا کلی* ، *کلبسیلا پنمونیه*، ادرار، بیمارستان میلاد

مقدمه:

با شناسایی باکتری‌ها بشر همواره در تلاش جهت به‌دست آوردن دارویی مؤثر بر علیه عفونت‌های ناشی از آنها بوده است. در این راستا نیز باکتری‌ها با کسب مکانیسم‌های مقاومت دارویی باعث بروز مشکلاتی در این زمینه شده‌اند. انتروباکتریاسه، معمول‌ترین پاتوژن‌های گرم منفی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های دستگاه ادراری هستند (۱و۲) بتا لاکتام‌ها برای درمان این عفونت‌ها از عوامل ضد میکروبی انتخابی موثر می‌باشند (۳-۱). انواعی از آنزیم‌های بتالاکتاماز در گونه‌های خاصی از باکتری‌های گرم منفی و به‌خصوص در *کلبسیلا پنمونیه و اشریشیاکلی* وجود دارند. این آنزیم‌ها تحت عنوان بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده (ESBLs) خوانده می‌شوند. علت این نام‌گذاری توانایی باکتری در هیدرولیز حلقه بتالاکتام است. بدین معنی که کلیه آنتی‌بیوتیک‌هائی را که حلقه بتا لاکتام دارند، تجزیه می‌کنند. آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام مکرراً تجویز می‌گردد و ظهور مقاومت در میان باسیل‌های گرم منفی باعث محدودیت اثر آنها می‌شود. بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده باعث مقاومت گسترده به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام می‌گردد (۳) ژن‌های این آنزیم‌ها اغلب به‌صورت پلاسمیدی و گاهی به‌صورت کروموزومی هستند. SHV-1 , TEM-2, TEM – 1 خانواده‌ای از این آنزیم‌ها هستند که به واسطه انتروباکتریاسه و بیشتر توسط *اشریشیا کلی* و *کلبسیلاپنمونیه* تولید می‌شوند. اگرچه این آنزیم‌ها در دیگر باکتری‌های گرم منفی نظیر گونه‌های سالمونلا، پروتئوس، پسودوموناس *آئروژ ینوزا* و سایر انتروباکتریاسه هم جدا شده‌اند(۳-۱). در سال ۱۹۸۳ اولین سویه تولید کننده آنزیم‌های بتا لاکتاماز طیف گسترده در آلمان جداسازی شد. به‌دنبال آن گسترش سویه‌های مقاوم در دیگر نقاط جهان دیده شد. در سال‌های اخیر افزایش میزان جداسازی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها از نقاط مختلف جهان گزارش شده است (٤و ٥).

با توجه به شیوع بالای سویه‌های مولد این نوع آنزیم در *اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه* (٤) به‌نظر رسید که انجام مطالعه‌ای در خصوص فراوانی تولید آنزیم‌های بتا لاکتاماز طیف گسترده در سویه‌های *اشریشیا کلی* و کلبسیلا پنمونیه جدا شده از نمونه‌های ادرار در بیمارستان میلاد تهران ضرورت دارد.

مواد و روش کار:

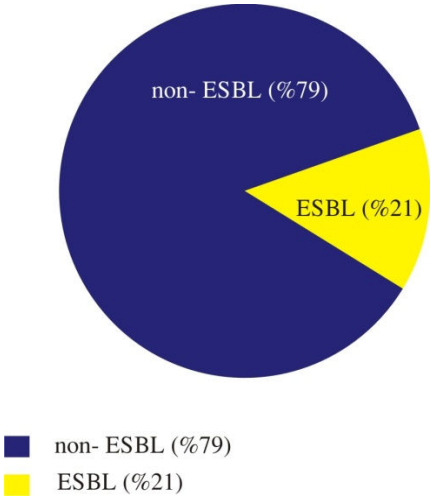
بیماران مورد مطالعه افراد بستری و سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان میلاد بودند(اسفند ۱۳۸۷ لغایت خرداد ۱۳۸۸). نمونه ادرار با احتمال ابتلاء به عفونت ادراری جمع‌آوری شد. اطلاعات مورد نیاز شامل سن، جنس، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک از طریق مصاحبه و یا مراجعه به پرونده بیماران بستری جمع آوری شد.

نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت متداول شامل مکانکی آگار و آگار خوندار کشت داده شد و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. ابتدا کلونی‌ها شمارش شد، در صورت با ارزش بودن تعداد آنها رنگ آمیزی گرم بعمل آمد و سپس با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیائی تعیین هویت گردید (5). سنجش حساسیت به روش انتشار از دیسک و طبق توصیه Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)انجام گرفت (٦). دیسک‌های آنتی بیوتیکی شرکت MAST (انگلستان) استفاده شد. قطر هاله‌های ممانعت از رشد اندازه گیری وبا مراجعه به جداول CLSI نتایج تفسیر گردیند (۷).

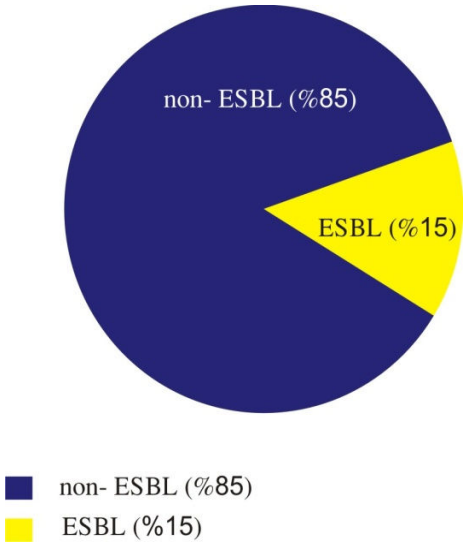
در مواردی که قطر هاله دیسک‌های سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپودوکسیم به ترتیب برابر یا کوچکتر از ۲۷، ۲۲ ، ۱۷ میلی‌متر بود، سویه مشکوک به تولید ESBL در نظر گرفته می‌شد. در مواردی که هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانیک اسید(Clavulanic acid) حداقل ٥ میلی‌متر از هاله عدم رشد دیسک فاقد کلاوولانیک اسید بزرگتر بود آن سویه مولد ESBLs تلقی می‌شد. از دو سویه *کلبسیلا پنمونیه*ATCC 603 700 (سویه مولد ESBL) و اشریشیا کلی ATCC 25922 (سویه غیر مولد ESBL)به عنوان شاهد استفاده شد (۷, ۸).

یافته ها:

از مجموع **۱۱۳۰۸** نمونه ادرار بیماران سرپایی و بستری که در زمان این مطالعه به بخش میکرب شناسی آزمایشگاه بیمارستان میلاد ارسال شد، کشت **۱۰۲۰** نمونه(**۹**٪) مثبت گردید. از **٦۲۹** نمونه (**٦۱/۷**٪) *اشریشیاکلی* و از **۱۱٥** نمونه(**۱۱/۳**٪) *کلبسیلا پنمونیه* جدا شد. شیوع آنزیم‌های بتالاکتامتاز در سویه‌های مذکور به ترتیب **۱۳۲ (۲۱**٪) و **۱۸ (۱٥**٪) سویه بود(نمودارهای ۱و۲).



نمودار ۱: توزیع فراوانی تولید بتالاکتاماز طیف گسترده در سویه های *اشریشیاکلی*



نمودار ۲: توزیع فراوانی تولید بتالاکتاماز طیف گسترده در سویه های *کلبسیلا پنمونیه*

از مجموع ۱۵۰ بیمار که از نمونه آنها سویه‌های مولد ESBLs جدا شد ٤٥ نفر (٪۳۰) مرد و ۱۰۵ نفر (٪۷۰) زن بودند. ۵ نفر(٪۳/۳) هم باردار بودند. بیشترین فراوانی سویه‌های مولد ESBLs در زنان در گروه‌های سنی ۲۹-۲۰ سال و بالای ٦۰ سال و در مردان نیز در گروه سنی بالای ٦۰ سال بود.از میان ۷٤٤ نمونه کشت مثبت ۱۳ (٪۱۲) نمونه مربوط به بیماران بستری و ٦۰٤ (٪۵۹) نمونه مربوط به بیماران سرپایی بود. از میان ۱۵۰ سویه مولد ESBLs، ٤٦ (٪۳۱) سویه از نمونه بیماران بستری و ۱۰٤(٪٦۹) سویه از نمونه بیماران سرپایی جدا شد. میزان شیوع سویه‌های مولد ESBLs در بیماران سرپایی (۱۰٤ از ٦۰٤ سویه) ٪۱۷ و در بیماران بستری (٤٦ از ۱۳۵ سویه) ٪۳٤ بود.

بیشترین میزان مقاومت در سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد ESBLs به کاربنی سیلین (۱۳۰ سویه ٪۹۸/۹۹)، آمپی سیلین (۱۳۱ سویه ٪۹۹/۹۹) و تری متو پریم-سولفاماتکسازول (۱۰٦ سویه ٪۸۰) و کمترین میزان به نیتروفورانتوئین (۲٦ سویه ٪۲۰) بود. همچنین بیشترین میزان مقاومت درسویه‌های *کلبسیلا پنمونیه* نیز به کاربنی سیلین (۱۷ سویه ٪۹۵/۹۹)، آمپی سیلین (۱۸ سویه ٪۱۰۰) و آمیکاسین (۱٤ سویه ٪۷۸) و کمترین میزان مقاومت به افلوکساسین (۵ سویه ٪۲۸) بود. درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های دیگر در جدول ۱ بیان شده‌است. میزان مقاومت دارویی در افراد بستری نسبت به افراد سرپایی بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنمونیه* جدا شده از نمونه ادرار

	E. coli	*K. pneumoniae*
Tetracycline	79%	50%
Amikacin	54%	78%
Nalidixic acid	85%	45%
Gentamycin	50%	84%
Nitrofurantoin	20%	67%
Trimethoprime-Sulfamethoxazole	80%	45%
Ofloxacin	70%	28%
Ceflizoxime	99.91%	99.95%
Cefazolin	99.99%	100%
Cefalotine	99.99%	100%
Ceftizoxime	99.98%	99.95%
Ceftazidime	88%	100%
Carbenicillin	99.98%	99.95%
Ampicillin	99.99%	100%

جدول ۲: مقایسه درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از نمونه ادرار بیماران سرپایی و بستری

	درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سویه-های جدا شده از نمونه بیماران بستری(۳۰۶ سویه)	درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سویه-های جدا شده از نمونه بیماران سرپایی(۷۱٤سویه)
Tetracycline	70%	75%
Amikacin	55%	55%
Nalidixic acid	90%	83%
Gentamicine	53%	53%
Nitrofurantion	33%	31%
Trimethoprime- Sulfamethoxazole	83%	73%
Ofloxacin	72%	69%
Ceflizoxime	99.98%	99.92%
Cefazolin	100%	99.99%
Cefalotine	100%	99.99%
Ceftizoxime	100%	99.97%
Ceftazidime	99.98%	99.97%
Carbenicillin	100%	99.96%
Ampicillin	100%	99.97%

بحث:

در این مطالعه میزان فراوانی سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده بتا لاکتاماز طیف گسترده **۲۱**٪ بود. مطالعه Hawkey و همکارانش برای تعیین شیوع باکتری‌های تولید کننده ESBLs در کشورهای آسیائی، نشان داد میزان شیوع آن در کشورهای مختلف متفاوت است(**۹**) در مطالعه نامبرده گان گزارشی از ایران نیامده است. تعداد مطالعات انجام شده در باره شیوع سویه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* تولید کننده ESBLs در کشور ما نسبتا محدود است و مطالعات در این خصوص پیشینه زیادی ندارد. در مطالعه فاضلی و همکاران از **۲۷۸** نمونه *اشریشیاکلی* **۵۳/۹**٪ قادر به تولید ESBLs بودند. در مطالعه مهرگان و همکاران هم شیوع سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز **۱۶**٪ گزارش گردید(۳). این میزان تقریبا شبیه به مطالعه حاضر است. در مطالعه نور امیر مظفری و همکاران میزان شیوع ESBL در *اشریشیا* کلی تولید کننده بتالاکتاماز **۱۶**٪ گزارش گردید(۳). این میزان تقریبا شبیه به مطالعه حاضر است. در مطالعه نور امیر مظفری وهمکاران میزان شیوع ESBL در *اشریشیا کلی* جدا شده ٤١/٥٪ اعلام شده است(١٠).

میزان حساسیت سویه‌های مولد ESBLs در این مطالعه نسبت به نیتروفورانتوئین ۸۰٪ برای *اشریشیا کلی* و ۳۳٪ برای *کلبسیلا پنمونیه* است. در مطالعه مهرگان و همکاران میزان حساسیت *اشریشیاکلی* به نیتروفورانتوئین ٩٤٪ گزارش شده است که اندکی از نتیجه مطالعه حاضر بالاتر است (۳). همچنین در مطالعه امین زاده و همکاران این میزان ۷۸٪ گزارش گردید(٤) که اندکی کمتر از نتیجه ما می‌باشد. در همان مطالعه این میزان برای *کلبسیلا پنمونیه* نیز ۱۹٪ گزارش شده است (٤). این تفاوت‌ها می‌تواند به علت نوع آنتی بیوتیک تجویز شده در بیمارستان‌ها باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان حساسیت سویه *اشرشیاکلی* مولد بتا لاکتاماز طیف گسترده به آمیکاسین ٤٦٪، به جنتامایسین ٥٠٪ و به تری متو پریم-سولفامتاکسازول ۲۰٪ است. در مطالعه فاضلی و همکاران بر روی ۲۷۸ سویه *اشرشیاکلی* حساسیت به آمیکاسین، جنتامایسین و به تری متو پریم-سولفامتاکسازول به‌ترتیب ٧٦٪، ٤٣/٣٪ و ٢٩/٣٪ بود(١٠). همچنین در مطالعه حاضر میزان حساسیت *اشرشیاکلی* مولد بتا لاکتاماز طیف گسترده به افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۳۰٪ و ۱۵٪ بود که در مطالعه فاضلی و همکاران به ترتیب ٢٤٪ و ٢٠٪ اعلام شده است (١٠). در این مطالعه حساسیت سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتا لاکتاماز طیف گسترده به تتراسیکلین ۲۱٪ بود. طی مطالعه‌ای در اسپانیا این میزان ۰٪ گزراش گردید (١٢).

در مطالعه Malzer و همکاران شیوع *اشریشیا کلی* مولد بتا لاکتاماز طیف گسترده در نمونه‌های بالینی ٥٣/٩٪ بود(١٣). همچنین درصد تولید بتا لاکتاماز طیف گسترده در *اشریشیا کلی* در بعضی از کشورهای آسیا از جمله کره ٤/٨٪، تایوان ٨/٥٪ و در هنگ کنگ ١٢٪ گزارش گردید (١٣). در حالیکه در مطالعه حاضر میزان شیوع آن٢١٪ می-باشد. همچنین در این مطالعه میزان فراوانی سویه‌های *کلبسیلا پنمونیه* مولد بتا لاکتاماز طیف گسترده ١٥٪ گزارش گردید. در مطالعات صورت گرفته در فرانسه شیوع آن ١٥-٥٪ و در ایتالیا و اسپانیا ١٠٪ گزارش شده است(١٥).

تفاوت‌های منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا، پاسخ‌های آنتی بیوتیکی متفاوتی را ایجاد می‌نماید وحتی ممکن است الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از بیمارستانی تا بیمارستان دیگر دریک کشور متفاوت باشد. منشا این تفاوت‌ها در نقاط مختلف عبارتند از: تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت-های ژنتیکی سویه‌ها، تفاوت در زمینه‌های فرهنگی و اقتصادی. بنابراین، الگوهای درمانی مورد استفاده در مناطق مختلف متفاوت و بر اساس ویژگی‌های خاص یک منطقه می‌باشد. لذا، تحقیقات و مطالعات منظم و دنباله دار در مناطق مختلف جهان ضروری به‌نظر می‌رسد.

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که به دلیل تجویز مکرر غیر بیمارستانی و حتی گاهی بدون نسخه آمینوگلیکوزیدها از یک سو و جهش‌های آنزیمی و سلولی مانند تولید آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها یا پمپ‌های برون ریز و همچنین انتقال مقاومت از طریق پلاسمیدها از سوی دیگر حساسیت به این آنتی بیوتیک‌ها کاهش یافته است (١٥, ١٦). مطالعات نشان می‌دهد شیوع بتالاکتاماز در بیماران بستری بیشتر از بیماران سرپایی است. ژن آنزیم‌های بتا لاکتاماز طیف گسترده به‌طور شایع بر روی عناصر خارج کروموزمی (پلاسمیدی) و به طور نادر بر روی کروموزوم قرار دارد. همانطور که گفته شد این مقاومت‌ها توسط مکانیسم‌های مختلف به باکتری‌ها منتقل می شود. شیوع این مقاومت‌ها ابتدا از آلمان گزارش شد و سپس از سراسر اروپا گزارش شد. در حال حاضر در تمام نقاط دنیا به‌طور گسترده شایع می‌باشد. انتروباکتریاسه و به‌ویژه *کلبسیلاپنمونیه* و *اشریشیاکلی* سهم مهمی در اپیدمی‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (١٨ , ١٩).

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان دهنده بالا بودن میزان شیوع مقاومت در سویه‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* مولد ESBLs در بین بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران است. میزان شیوع این مقاومت‌ها

در افراد بستری در مقایسه با بیماران سرپائی بالا است. لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه و ضرورت کنترل بیشتر و همچنین کاهش مصرف آنتی بیوتیک برای کاهش میزان ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتامار امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

فهرست مراجع:

۱۱)امیر مظفری.ن، فروهش تهرانی ،هـ ،طراف لنگرودی،ز. بررسی مقاومت دارویی ناشی از بتالاکتاماز وسیع الطیف در *اشرشیا کولی* با مقاومت چند گانه دارویی در بیماران بستری- *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران* ۱۳۸۷ ، شماره ۵۹،صص ۳۹ تا ٤٥.

12)Sorlozano A,Gutierrez J,Romero JM,Dios Luna J,Damas M,Piedrolo G .Activity in vitro of twelve antibiotics against clinical isolates of extended-spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli.J Basic Microbiol* 2007;47:413-416.

13)Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta – lactamase (ESBL) Producing E. coli compared to non - ESBL producing E. coli. *J Infect*. 2007; 55: 254-9.

14)Tzouvelekis LS, Bonoma RA SHV –type beta –lactamases Curr PharmDes.1999;**5**(11)847-64.

15) Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, *et al* , Epidemiology and SuccessfulControl of a large Outbreak Due to *Klebsiella Pneumoniae* Producing Extended – Spectrum Beta Lactamases. *Antimicrob . Agents Chemother* 1998; **42** : 52 – 58.

16) Kausar J, Afia Z, Rumina H. Frequency and sensitivity pattern of extended – spectrum beta – lactamases – producing isolates in a tertiary care hospital laboratory of Pakistan. *Pak Med Assoe*. 2005; **55** : 436-439.

17) Poole K. Resistanco to β - lactam antibiotic. *Cell Mol lifeSei* 2004; **61** :2200 – 2223.

18) Gniadkowski M, Schnider I , Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Seftazidime – restitant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: dent6ification of there novel TEM and ShV – 5- type extended spectrum beta- lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 520 – 20

19)Li WC, Huang FY , Liu CP , Weng LC, Wnag NY , Chiu NC , *et al* Ceftriaxone resistance of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in northern Taiwan attributable to production of CTX – M – 14 and CMY-2 β - lactamases . *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 3237 – 43.

1) Astal ZE, Increasing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in the Gaza Strip. *Singapor Med J*. 2005; **46**:457-59

2)Kader AA, Kumar AK. Extended – Spectrum beta – lactamase in urinary isolates of *Eschrrichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and other gram – negative bacteria in a hospital in Eastern Province, Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2005; **26** : 956 – 959.

3) Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended – spectrum beta – lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran. *Iran J Antimicrob Agents*. 2008; **31**: 147 – 51.

4) Aminzadeh Z, Sadat Kashi M , Sha'bani M. Bacteriuria by Extended spectrum Beta–lactamase – producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran. *Iran j Kidney Dis*. 2008 ; **2**: 197 – 200.

5) Khanfar HS, Bindaryna Km , Senok AC, Botta GA. Extended spectrum beta – lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries*. 2009; **3**: 295 -9.

6)Mahon C.R , Manuselis G. *Textbook of diagnostic mrcrobiology* . 1st ed. Philadelpia; W. B. Sanders . 1995;PP: 58-7

7) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100 – S14. Wayne, PA: NCCLS; 2004.

8)Bush K, Flamm PK, Ohringer S, Singer SB, Summerill R, Bonner DP. Effect of clavulanic acid. On activity of B- lactam antibiotics in *Serratia marcescens* isolates producing both a TEM – B – lactamase and a chromosomal cephalosporinase. *Atimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2203- 2208.

9)Hawkey PM. Prevalence and locality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia *Clin Microbiol Infect.* 2008 ;**14** (Suppl)1:159-65.

۱۰) فاضلی. ح ، حسینی. م، محمدی قلایی، پ. فراوانی و الگوی مقاومت دارویی *اشرشیاکلی*های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه‌ای کلینکی بیمارستانی الزهرا (س) اصفهان – ۱۳۸٦، *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد*، ۱۳۸۷، صص ۵۸ تا ٦٤.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۴۸-۴۲

نقش نانو ساختارلایه سطحی و تولید بتا لاکتاماز در مقاومت سویه های *باسیلوس سرئوس* در برابر پنی سیلین

شیلا جلال پور[۱*] ، روحا کسری کرمانشاهی[۲]، اشرف السادات نوحی[۳] ، حمید زرکش اصفهانی[٤]

۱) گروه صنایع غذایی، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا
۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا ،تهران
۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران
٤) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
نویسنده رابط: شیلا جلال پور، گروه صنایع غذایی، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا
تلفن : ۰۳۲۱- ۳۲٤۳۰۰٥ **shilla.jalalpoor@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۹/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۹/٦/۲۸

چکیده:

زمینه و اهداف: لایه سطحی در اغلب باکتری‌ها خارجی ترین پروتئین است که با مهار ورود آنتی بیوتیک‌ها بیماریزایی باکتری را افزایش می‌دهد. نظر به نقش دست پرسنل و سطوح بیمارستان در انتقال عفونت‌های بیمارستانی، آلودگی منابع مزبور با سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد لایه سطحی و β-لاکتاماز، منجر به گسترش عفونت‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می گردد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی لایه سطحی و تولید β-لاکتاماز، هم چنین نقش لایه سطحی در مهار ورود پنی سیلین در سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از دست پرسنل و سطوح بیمارستان بود.

روش بررسی: این مطالعه آزمایشگاهی در سال‌های ۱۳۸٦-۱۳۸٤ در بیمارستان فوق تخصصی الزهرا و دانشگاه اصفهان انجام شد. ۲۷٤ نمونه از دست پرسنل و سطوح بیمارستان جمع‌آوری شد و *باسیلوس سرئوس* جداسازی و شناسایی گردید. برای آماده سازی سویه‌ها از کشت ۱٦ ساعته در محیط TSA (Tryptone Soy Agar) استفاده شد. پس از جداسازی پروتئین‌های سطحی، نمونه‌ها توسط 10X SDS-PAGE الکتروفورز شدند. آزمایش حساسیت میکربی به روش کربی- بائر و توان تولید β-لاکتاماز به روش اسیدومتریک انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۲۶ نمونه(۹/۴۹٪) *باسیلوس سرئوس* جدا شد. از ۱۳ سویه جدا شده از دست پرسنل ۱۱ سویه (۸۴/۶٪) و از ۱۳ سویه جدا شده از سطوح بیمارستانی ۱ سویه (۷/۷٪) مولد نانوساختار لایه سطحی بودند. ۱۱ سویه (۹۲/۳٪) از سویه‌های فاقد لایه سطحی و تمام (۱۰۰٪) سویه‌های واجد لایه سطحی، به پنی سیلین مقاوم بودند. تمام (۱۰۰٪)سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد لایه سطحی، مولد β-لاکتاماز بودند.

نتیجه گیری : نتایج بیانگر شیوع بیشتر سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد لایه سطحی در دست پرسنل بیمارستان و مقاومت بیشتر سویه‌های واجد لایه سطحی، به پنی‌سیلین است.

کلید واژه‌ها: لایه سطحی ، *باسیلوس سرئوس*، مقاومت آنتی بیوتیکی، β-لاکتاماز، عفونت بیمارستانی

مقدمه:

*باسیلوس*ها به واسطه تولید اسپور انتشار گسترده‌ای در محیط دارند. *باسیلوس سرئوس* امروزه به عنوان یک باکتری بیماریزای انسانی و از جمله عوامل موثر در عفونت‌های بیمارستانی ،به خصوص در افراد مبتلا به نقص در سیستم ایمنی، محسوب می‌شو د. عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *باسیلوس سرئوس* در دو گروه طبقه-بندی می‌شوند: گاستروانتریت و عفونت‌های غیر گاستروانتریت. عفونت‌های غیر گاستروانتریت عبارتند از عفونت‌هایی که در نتیجه انتقال وانتشار *باسیلوس سرئوس* توسط وسایل آلوده پزشکی (وسایل آلوده جراحی، دستکش، باند و...)یا توسط پرسنل بیمارستان در بیماران بستری به وقوع می‌پیوندد (۱). باکتریمی و اندوکاردیت، عفونت‌های چشمی، عفونت عضلات اسکلتی در میزبان حساس از جمله عفونت‌های غیرگاستروانتریت هستند (۳،۲). پنی‌سیلین آنتی بیوتیک انتخابی درمان عفونت‌های ناشی از باسیلوس است.افزایش مقاومت سویه‌های باسیلوس سرئوس در برابر آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام منجر به کندی روند درمان بیماران می گردد (٤،٥).

هر عاملی که باعث مهار ورود یا غیر فعال سازی آنتی بیوتیک‌های وارد شده به باکتری گردد، در نهایت باعث مقاومت آنتی بیوتیکی و شکست درمان می‌شود. لایه سطحی و تولید β-لاکتاماز به ترتیب با مهار ورود برخی از آنتی بیوتیک‌ها و غیر فعال کردن آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام، منجر به افزایش مقاومت در باکتری‌ها می‌شوند. چون آنتی بیوتیک‌های خانواده β-لاکتام طیف اثر گسترده دارند از جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری‌های عفونی برخوردار می‌باشند، و مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنها تبعات گسترده دارد (٦).

متداول‌ترین و مهم‌ترین روش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک ها، تولید آنزیم‌های غیر فعال‌کننده است. β-لاکتاماز از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها است (٦). پنی سیلیناز اولین β-لاکتامازی است که شناسایی شد. این آنزیم اولین بار توسط Chain وAbraham در سال ۱۹٤۰ از اشریشیاکلی جداسازی شد. در آن زمان پنی‌سیلین هنوز به صورت متداول وارد مصارف بالینی نشده بود(۷، ۸).

لایه سطحی جدیدترین ساختار سطحی شناسایی شده در پروکاریوت‌ها است. با بیش از سه دهه تحقیق امروزه مشخص شده است که یکی از متداول‌ترین ساختارهای سطحی موجود در اکثر آرشی‌ها و باکتری‌ها ساختار کریستالی منظم و تک لایه‌ای است که از زیر واحدهای مشابه پروتئینی یا گلیکوپروتئینی بوجود آمده‌است(۹، ۱۰). در طول این سه دهه اسامی مختلفی برای آن پیشنهاد شده است از جمله: ساختار کریستالی منظم(Crystalline Arrays، لایه کریستالی سطحی (Crystalline Surface Layer)، لایه سطحی (Surface Layer)و لایه–S(S-Layers)(۱۱-۹).لایه سطحی خارجی ترین پروتئین دیوارهٔ سلولی محسوب می‌شود و زیرواحدهای سازنده آن، توان بازیابی و ایجاد شبکه متقارن کریستالی تحت شرایط آزمایشگاهی را دارا می‌باشند (۹).

ویژگی‌ها و خواص منحصر بفرد این بیو پلیمر آن را به ابزار مناسبی برای بکارگیری در علوم بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی مبدل کرده است (۱۲-۹).لایه سطحی سبب پایداری و استحکام دیوارهٔ سلولی، شکل‌دهی به سلول (به-ویژه در آرشی‌ها)، حفاظت باکتری در برابر عوامل محیطی (حرارت‌های زیاد، تغییرات pH، پروتئازهای خارج سلولی، استرس‌های مکانیکی ناشی از فشارهای اسمزی و تغییرات فشاری و فشار ناشی از محلول‌های یونی) می‌گردد(۹).

لایه سطحی عملکردهای گوناگونی دارد. از جمله مهم-ترین آنها می توان به بیماری‌زا بودن آن اشاره کرد. لایه سطحی؛ خاصیت اتصال و چسبندگی دارد و لذا می‌تواند به سلول‌های میزبان و سطوح محیطی متصل شود، با مهار فاگوسیتوز و دفاع غیر اختصاصی منجر به پایداری عفونت در میزبان گردد، تهاجم برخی از باکتری‌های انگل از جمله *بدلو ویبریو* (*Bdellovibrio*) و برخی از فاژها را به باکتری می‌گیرد، و با خاصیت غربالگری و نفوذپذیری انتخابی از ورود برخی مولکول‌ها ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های مضر به داخل باکتری ممانعت به‌عمل آورد (۹و ۱۵-۱۳). فقدان لایه سطحی در باکتری‌های بیماری‌زا منجر به کاهش یا فقدان توان بیماری زایی باکتری می‌گردد (۹).از جمله باکتری‌های بیماری‌زای واجد نانوساختار لایه سطحی می‌توان به جنس‌های *ریکتزیا*، *تره‌پونما*، *باکتروئیدس*، *کلامیدیا*، *آئروموناس*، *کلستریدیوم*، *کمپیلوباکتر* و *باسیلوس* اشاره کرد (۹).گونه‌های *باسیلوس آنتراسیس*، باسیلوس تورنژینسیس و *باسیلوس سرئوس*،واجد توانایی تولید لایه سطحی می باشند (۹ ، ۱٦ و ۱۷) .

میکروارگانیسم‌ها در اغلب محیط‌های زنده و غیر زنده به تعداد زیاد یافت می‌شوند. اما حضور آنها در دست پرسنل و سطوح بیمارستان از اهمیت ویژه برخوردار است. سطوح بیمارستانی و دست پرسنل در حفظ و نگهداری ، انتقال و انتشار باکتری‌ها در بیمارستان منابع بالقوه‌هستند. به عبارت دیگر، کنترل باکتری‌ها در سطوح بیمارستانی و دست پرسنل باعث کنترل و حتی توقف عفونت‌های بیمارستانی می‌گردد (۱۸).

در محیط بیمارستان انواع متعددی از باکتری‌های بیماریزا حضور دارند اما گونه‌های *باسیلوس* به‌واسطه تولید اسپور انتشار گسترده دارند. انتشار سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد لایه سطحی و β-لاکتاماز در سطوح بیمارستان و دست پرسنل در نهایت منجر به گسترش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد. مطالعه حاضر به تعیین فراوانی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در سطوح بیمارستانی و دست پرسنل و تولید لایه سطحی و β-لاکتاماز در سویه‌های جداسازی شده و هم چنین تعیین نقش لایه سطحی در ممانعت از ورود پنی سیلین در سویه‌های *باسیلوس سرئوس* پرداخته است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در سال‌های ۱۳۸٦- ۱۳۸٤ در بیمارستان فوق تخصصی الزهرا اصفهان و دانشکده علوم دانشگاه اصفهان انجام گرفت. با محاسبه حجم نمونه، به حداقل ۱۹۲ نمونه نیاز بود. اما، با توجه به گستردگی نمونه‌های محیطی، وجود سطوح پرتماس و کم تماس (دسته‌بندی مزبور از اهداف این پژوهش بود)و.. ۱۹٤ نمونهٔ محیطی و ۸۰ نمونه از دست پرسنل بیمارستان جمع آوری شد.

نمونه‌های محیطی از سطوح کم تماس و پرتماس بیمارستان از جمله صندلی، میز کنار تخت، کف اتاق، تشک پلاستیکی و لبه کنار پنجره اتاق بیماران جمع آوری شد. برای تهیه نمونه از سطوح بیمارستان از سوآب و محیط TSB (Tryptone Soya Broth) (Merck) استفاده شد (۲۰-۱۸). پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، هر نمونه روی محیط Blood agar (Merck) به روش خطی کشت داده شد (۱۸، ۱۹).برای تهیه نمونه از دست پرسنل از روش Fingerprint Technique استفاده شد(۲۱-۱۹). برای این منظور نمونه‌ها مستقیماً با تماس سرانگشتان دست پرسنل، روی محیط های Blood agar جمع‌آوری گردید (۲۱-۱۹). ظروف پتری به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و کلنی‌ها جداسازی و خالص سازی گردید. جنس یا گونه باکتری‌های خالص سازی شده با انجام روش‌های میکروبیولوژیک از جمله: رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز و β-لاکتاماز (Merck)،استفاده از محیط‌های پایه و اختصاصی از جمله بلادآگار، نوترینت براث (Merck) و محیط اختصاصی *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* Selective Agar) (Q-UELAB) انجام گرفت است ۱۹ ، ۲۰ و ۲۲).

برای شناسایی نانوساختار لایه سطحی، سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در محیط TSA (Tryptone Soya Agar) (غنی شده با gr ٪۰/٦ عصارهٔ مخمر) (Merck) به مدت ۱٦ ساعت در شرایط هوازی کشت داده شدند. پروتئین‌های سطحی سویه‌ها جداسازی و با SDS-PAGE آنالیز شد (۱٦ ، ۱۷ و ۱۹) جداسازی پروتئین‌های سطحی با افزودن PBS (Phosphate buffered saline) (Merck) PH =۷/٤ روی ظرف پتری و با میله شیشه‌ای سرکج انجام گرفت (۱٦ ، ۱۷ و ۱۹). سوسپانسیون حاصل شده ٦ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب آن در PBS سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون در PBS به ۰/٦: OD (λ:450^{nm}) (Optical Density) رسانده شد و مجدداً سوسپانسیون سانتریفوژ و رسوب حاصله در ۵۰۰ میکرولیتر SDS-Tris-HCL ۱% (pH:۸) (ساخت شرکت Merck) سوسپانسیون شد. سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه تکان داده شد. رنگ‌آمیزی پروتئین‌های سطحی با استفاده ازSample Buffer (Merck) انجام گرفت. برای این منظور ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون به همراه ۵ میکرولیتر Sample Buffer به مدت ۵ دقیقه در دمای۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شد (۱٦ ، ۱۷ و ۱۹).

نمونه‌های آماده سازی شده توسط 10X SDS-PAGE به مدت ۱۰۰ دقیقه تحت ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از محلول کماسی بلو (Merck) به مدت ۱ ساعت در شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه انجام گردید. خارج کردن رنگ‌های اضافه از ژل، با استفاده

از محلول متانول (Merck) به مدت ۵ تا۱۵ دقیقه روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه انجام گرفت (۱۹، ۲۳).

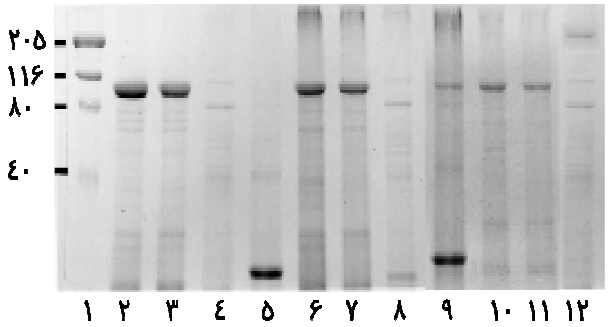
الگوی حساسیت سویه‌های *باسیلوس سرئوس* با روش کربی بائر و با دیسک پنی سیلین (شرکت پادتن طب) بررسی شد (۱۹، ۲٤). بررسی وجود β-لاکتاماز در سویه-های *باسیلوس سرئوس* با روش اسیدومتریک انجام گرفت. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر محلول قرمز فنل ۰/۵٪ به ٤/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و سوسپانسیون به ویال پنی سیلین جی ۵ میلیون واحدی افزوده شد. پس از حل کردن پنی سیلین به آرامی و قطره قطره، محلول سود ۱ مولار به ویال اضافه شد. این عمل تا تولید رنگ بنفش در محلول ادامه پیدا کرد. در این حالت pH محلول ۸/۵ بود. سپس یک لوله موئینه به قطر ۰/۲ تا ۱ میلی متر در ویال وارد شد و بلافاصله لوله موئینه روی سطح کلنی باکتری کشیده می‌شد تا ته لوله توسط باکتری کاملاً مسدود گردد. نتیجه پس از ۱۵-۵ دقیقه خوانده می‌شد (۲۷-۲۵).

یافته‌ها:

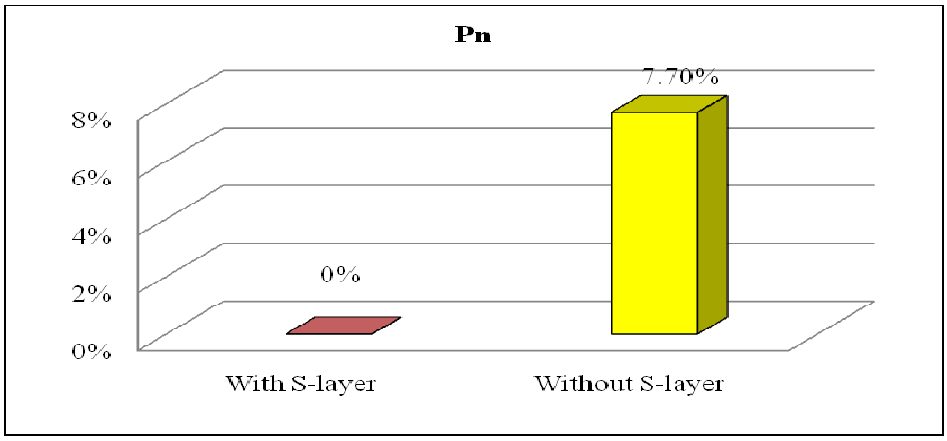
از ۲۷٤ نمونه مورد بررسی، *باسیلوس سرئوس* از ۲٦ (۹/٤۹٪) نمونه جدا شد. فراوانی آن در سطوح بیمارستانی و دست پرسنل به ترتیب ۱۳ (٦/۷٪) و ۱۳ (۱٦/۲۵٪) سویه بود. بر اساس نتایج SDS-PAGE، ۱۲ سویه (٤٦/۲۰٪) واجد لایه سطحی و ۱٤ سویه (۵۳/۸٪) فاقد آن بودند (تصویر ۱). به این ترتیب که ۱۱ سویه (۸٤/٦٪) جدا شده از دست پرسنل و ۱ سویه (۷/۷٪) جداسازی شده از سطوح بیمارستان واجد لایه سطحی بود.

۱۱ سویه (۹۲/۳٪) فاقد لایه سطحی و تمام (۱۰۰٪)سویه‌های واجد لایه سطحی به پنی سیلین مقاوم بودند (نمودار ۱).

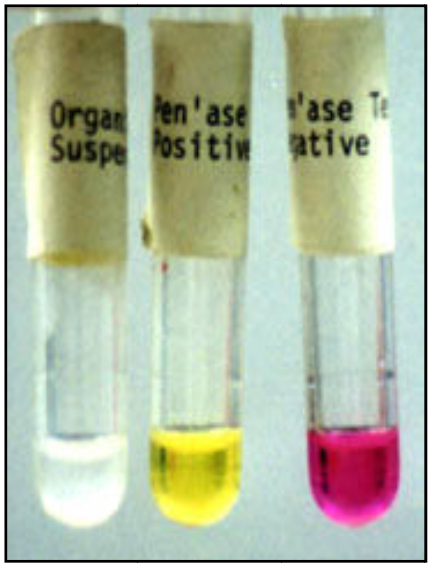
۱۲ سویه (۱۰۰٪) واجد نانوساختار لایه سطحی، توانایی تولید β-لاکتاماز را نیز داشتند(تصویر ۲). هم‌چنین ۱۳ سویه(۹۲/۸٪)از سویه‌های فاقد نانوساختار لایه سطحی، واجد توانایی تولید β-لاکتاماز بودند. ۱ سویه(۷/۲٪)از سویه‌های فاقد نانوساختار لایه سطحی، فاقد β-لاکتاماز بودند.



تصویر ۱: الکتروفورز پروتئین‌های سطحی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* با روش 10X SDS-PAGE
(ستون ۱:مارکر وزن مولکولی، ستون‌های ۱۲-۲ : سویه‌های *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی)



نمودار۱: درصد حساسیت سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد و فاقد لایه سطحی به پنی سیلین جی



تصویر ۲: تست β-لاکتاماز با روش اسیدومتریک (چپ به راست: شاهد، مثبت، منفی)

بحث:

در مطالعه حاضر فراوانی *باسیلوس سرئوس* در سطوح و دست پرسنل بیمارستان به‌ترتیب ٦/٧ درصد و ١٦/٢٥ درصد است. مطالعات مشابه در ایران نشان می‌دهد که گونه‌های *باسیلوس* بیشترین باکتری‌های جداسازی شده از محیط بیمارستان را به خود اختصاص می‌دهند(٣٠-٢٨). نتایج مطالعات مشابه در خصوص اپیدمیولوژی گونه‌های *باسیلوس* و سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در دست پرسنل بیمارستان، در سایر کشورها نشان می‌دهد دست ٣٧ درصد از پرسنل آلوده به گونه‌های *باسیلوس* است و فراوانی *باسیلوس سرئوس* در دست پرسنل مراکز درمانی ١٥ درصد گزارش شده است (١ ،٢ و٣١). نتایج مطالعات انجام گرفته در خصوص انتشار گونه های *باسیلوس* در مراکز بهداشتی-درمانی، مبین انتشار گسترده گونه‌های *باسیلوس* در سطوح بیمارستان و سویه های *باسیلوس سرئوس* در دست پرسنل بیمارستان می‌باشد (٣٢-٢٨).

در ارتباط با لایه سطحی در *باسیلوس سرئوس*، Kotiranta و همکارانش در سال‌های ١٩٩٨-١٩٩٩،به بررسی چهار سویه *باسیلوس سرئوس* (٢ سویهٔ استاندارد و ٢ سویه بالینی) پرداختند. مطالعات آنها مشخص کرد سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های بالینی واجد لایه سطحی بودند در صورتی که سویه‌های استاندارد فاقد توانایی تولید لایه سطحی بودند(١٦).

بر اساس نتایج این مطالعه ٨٤/٦٠ درصد از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از دست پرسنل بیمارستان واجد لایه سطحی بود. این در حالی است که تنها ٧/٧٠ درصد از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از سطوح بیمارستان واجد لایه سطحی بودند. نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات گویای فراوانی بیشتر لایه سطحی در سویه‌های جدا شده از شرایط زیستی، در مقایسه با شرایط غیر زیستی می‌باشد(٣٣ ، ٣٤).

باسیلوس سرئوس یک باکتری بیماریزای انسانی است و لایه سطحی هم یک ساختار بیماریزایی محسوب می‌شود. لذا، شاید بتوان اینگونه تفسیر کرد که باکتری‌ها ترجیحاً در صورتی که تحت شرایط زیستی قرار گیرند، لایه سطحی تولید می‌کنند تا بواسطه این ساختار، خود را از نفوذ آنتی بیوتیک و آنزیم‌های موجود در بدن انسان محافظت کنند.

نتایج نشان داد سویه‌های *باسیلوس سرئوس* فاقد لایه سطحی در مقایسه با سویه‌های *باسیلوس سرئوس* واجد لایه سطحی از حساسیت بیشتری به پنی سیلین برخوردار هستند. قابل توجه است که تمام سویه‌های مولد لایه سطحی و ٩٢/٣ درصد سویه‌های فاقد لایه سطحی در برابر پنی سیلین مقاوم بودند. نتایج حاصله از این مطالعه و دیگر مطالعات ، گویای نقش لایه سطحی در مهار ورود آنتی بیوتیک‌ها به باکتری است (٣٤،٣٣).

نتایج تست اسیدومتریک نشان داد که تمام سویه‌های *باسیلوس سرئوس* مولد لایه سطحی، توانایی تولید β-لاکتاماز را نیز دارند. فراوانی لایه سطحی و تولید β-لاکتاماز در سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، مبین شیوع

گسترده و قابل ملاحظه عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در *سویه های باسیلوس سرئوس* است. به این ترتیب که تنها ۷/۱۰ درصد از سویه‌های باسیلوس سرئوس فاقد لایه سطحی و β-لاکتاماز هستند. اما، تمام سویه‌های مولد لایه سطحی، واجد آنزیم β-لاکتاماز نیز می باشند. از طرف دیگر ۹۲/۲ درصد از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* فاقد لایه سطحی، واجد توانایی تولید آنزیم β-لاکتاماز هستند. این امر نشانگر شیوع گسترده‌تر β-لاکتاماز، در مقایسه با لایه سطحی، در سویه‌های *باسیلوس سرئوس* می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه بیانگر فراوانی قابل ملاحظه لایه سطحی در سویه‌های باسیلوس سرئوس جدا شده از دست پرسنل بیمارستان است. این جدا سازی می‌تواند موئد اهمیت شرایط زیستی در بیان ژن‌های مولد لایه سطحی باشد. در مقابل فراوانی لایه سطحی در سویه‌های جدا شده از سطوح بیمارستان، که در آنجا شریط غیرزیستی حاکم است، بسیار اندک است. سویه‌های واجد لایه سطحی در مقایسه با سویه‌های فاقد این لایه از حساسیت بیشتری به پنی سیلین برخورداراند. این امر بیانگر نقش لایه سطحی در مهار ورود برخی از ترکیبات آلی به داخل باکتری است.

از جمله دلایل فراوانی و انتشار قابل ملاحظه ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فراوانی نانوساختار لایه سطحی و β-لاکتاماز در سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، عدم کنترل تراکم باکتری‌ها در محیط بیمارستان و در نتیجه تسهیل انتشار ژن‌های مقاومت در میان آنها است. ارتقاء بهداشت محیط بیمارستان و دست پرسنل ، در کنترل ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها نقش به سزایی ایفا می کند.

تقدیر و تشکر:

تشکر و قدردانی خود را از مدیریت بیمارستان فوق تخصصی الزهرا، مدیریت آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، مدیریت بخش مجلات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، کمیته کنترل عفونت بیمارستان الزهرا؛ آقایان دکتر اردشیر طالبی، دکتر مهرداد معمارزاده، دکتر کامیار مصطفوی زاده، سینا مباشری زاده، فریبرز کیانپور، محسن حسینی بالام، خانم کبری مقصودی، مهندس علی مهرابی و تمامی عزیزانی که در به ثمر رسیدن این مطالعه یارای ما بودند اعلام می‌نماییم.

فهرست مراجع:

1.Van der Zwet WC, Parlevliet GA, Savelkoul PH, Stoof J,Kaiser AM. Outbreak of Bacillus cereus infection in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J Clin Microbiol* ,2000;**38**:4131-4136.

2. Amaout M.K, Tamburro RF, Bodner S.M. Bacillus cereus causing fulminanl sepsis and hemolysis in two patients with acule leukemia.*Pediatr Hematol Oncol* ,1999;**21**:431-435.

3.Hilliard N J, Schelonka RL, Waites KB. Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate. *J Clin Microbiol*, 2003; **41**: 3441- 4.

4. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology.* 24th ed, USA; McGraw-Hill , 2004;PP: 203-212.

5.Tadjbakhsh H. *General Bacteriology*- 6th ed, Tehran; Tehran University Press, 1383;PP 544.

6.Paterson D.L, Bonomo Ra. Extended spectrum β-lactamases: A Clinical Update. *Cli Microbiol Rev*, 2005; **18**: 657- 86.

7.Parul A , Ghosh A.N, komar S, Bas B, Kapila K. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Isolates in a tertiary care hospital. *Indian J Path Microbiol*, 2008; **51**(1): 137- 42.

8.*Abraham EP, Chain E . An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.* Nature, *1940; **46**: 837.*

9.Sara .M ,Uwe B. Sleytr. S-Layer Proteins. *J Bacteriol*, 2000; **182** (4): 859- 68.

10.Eichler J. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco) proteins. *Microbiology*, 2003; **149**: 3347- 51.

11.Schaffer Ch, Paul M. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiol*, 2005; **15**: 643- 51.

12.Mesnagem S, Couture E.T ,Mock M, Gounon P, Fouet A. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *J Mol Micro* , 1997; **23** (6): 1147- 55.

13.Masahiro Y, Hirofuji T,Motooka N, Nozoe K, Shigenaga K, Anan H ,*et al*. Humoral Immune Responses to S-Layer-Like Proteins of Bacteroides forsythus. *Clin Diagnost Laborate Immune*, 2003; 10 (3): 383- 7

14.Sara M. Conserved anchoring mechanisms between crystalline cell surface S-layer proteins and secondary cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol*, 2001; 9:47- 49.

15.Messner P, Steiner K, Zarschler K, Schaffer C .S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydr Rese*, 2008; 343 (12) 1934- 51.

16.Kotiranta A, Haapasalo M ,Kari K. Surface Structure, Hydrophobicity, Phagocytosis ,and Adherence to Matrix Proteins of *Bacillus cereus* Cells with and without the Crystalline Surface Protein Layer. *Infect and Immun*, 1998; 66(10): 4895- 902.

17.Kotiranta A. K, Hitoshi I, Markus P. Haapasalo P, Kari L. Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiol Lett*, 1999; 179: 275- 80.

18.Sehulster L, Raymond Y.W. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). 2003 , Atlanta GA 30333.

19.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R, Noohi A, Zarkesh H. Study of β-lactamase and S-layer Production in some of Isolated Pathogen Bacteria From Clinical and Environmental Hospital Samples. MSc thesis, Iran, Tehran, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, 1386; PP: 98-115.

20.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Esfahani H. The comparative frequency the β-lactamase Production and antibiotic susceptibility pattern of Bacterial stains isolated from Staff Hands and Hospital Surfaces in Azzahra Hospital–Isfahan. *Iran J Med Microbiol* .2009;3(4): 37-45.

21.Estes R. Food, Hands and Bacteria. 2000. Available at http://pubs.caes.uga.edu/ caespubs/ pubcd/B693. htm#Wash. Accessed july 8, 2006.

22.Washington C, Stephen A, Janda W , Koneman E, Procop G,Schreckenberger P Woods G. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Sixth edition. USA; Lippincott wiiliams and wilkins, 2006;pp: 775- 779.

23.Sambrook J, Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.3 rd ed. NY; Cold Spring Harbor, 2001;PP: 15-80.

24.Wikler M. A, Cockerill F. R, Craig W.A, Dudley M. N Eliopoulos G.M, Hecht D.W, *et al.* Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; 26 (3): 32- 44.

25.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Esfahani. Comparison of the frequency β-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. *J Rafsanjan UMS*. 1388; 8(3): 203-214.

26.β-lacatamase. testing for beta lactamase production. 2006 .Available at www.aecom .yu.edu/home/id/idmicro/betalactamase.htm.2 006.Accessed 9.5.2006.

27.Wikler M A, Cockerill F R, Craig W A, Dudley M N, Eliopoulos G M, Hecht D W, Hindler J F, *et al*. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; *Approved Standard*. Ninth Edition. 2009; PP:8-50.

28.Hakiemi Najafabadi Sh. Overview of Bacterial contamination of Inhalation equipments. The 8th National Congress of Microbiology. Iran-Isfahan; 2006: 10.

29.AliAkbary F. Aslany Y, Saadat M, Etemadifar sh. Overview contamination Non Medical equipments Hospitals in Shahrekord Health-Education. The National Student Congress on The Role of Health Service Staff in Prevention of Hospital Infections; 2007, Iran-Isfahan, 2007: 26.

30.Mansuri F, Banitabay Hematyar Sh. Overview of Bacterial Culture in Operations room in selective Hospital in Isfahan Medical Science university (2005-2006). The National Student Congress on The Role of Health Service Staff in Prevention of Hospital Infections; 2007, Iran-Isfahan, 2007: 128.

31.Kampf G, Kramer A . Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs. *Clinl Microbiol Rev*, 2004;17(4):863-893.

32.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani, Sina Mobasherizadeh. Survey Prevalence and Resistance to Some Beta lactame Antibiotics in *Bacillus cereus* strains Isolated of AZZAHRA Hospital (Iafahan/1384-86). *Iran J Biology*, 1389:23(4).In Press.

33.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Isfahani H. Survey effect of in-vivo and in-vitro condition on expression of surface layer genes in bacteria. *J Iran Chemical Soc*, 2009; 6 (suppl): S11.

34.Jalalpoor Sh, Kasra Kermanshahi R , Nouhi A.S , Zarkesh Esfahani. Survey characterization nano structure surface layer in some of pathogen bacteria. *Zahedan J Resea Medi Science* .1389; 12 (5).In press.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۵۷-۴۹

شیوع و عوامل خطر اکتساب *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مراکز آموزشی – درمانی شهر قزوین،۸۵-۱۳۸۳

تکتم کریم زاده [*۱]، فاطمه محمدی چلکاسری [۲]، مسعود شریفی [۳]، بهزاد بیژنی [٤]، محمود علیپور حیدری [٥]

۱) مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲) مرکز بهداشت شهید بلندیان، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳)گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
٤)گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
٥)گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
نویسنده رابط: تکتم کریم زاده، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک،مرکز آموزشی درمانی بوعلی سینا، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
همراه: ۰۹۱۲۷۸۰۰۳٤۳ **TK111479@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۹/۲ تاریخ پذیرش مقاله :۸۹/۵/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف : کنترل و درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (methicilin resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) به علت مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها یک معضل جهانی است. هدف این مطالعه تعیین شیوع و عوامل خطرساز اکتساب *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مراکز آموزشی – درمانی شهر قزوین بود.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی (۸۵-۱۳۸۳) در ۳ مرکز آموزشی – درمانی شهر قزوین (شهید رجایی، بوعلی سینا و کوثر) انجام شد. نمونه سواب بینی بیماران به هنگام پذیرش و ترخیص در محیط‌های اختصاصی کشت شد. بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، برای تعیین مقاومت به متی سیلین از روش Oxacillin screening plates مطابق با دستورالعمل *Clinical and laboratory standards institute*(CLSI) استفاده شد. سایر اطلاعات از طریق پرسشنامه با مصاحبه حضوری و مراجعه به پرونده بیماران جمع آوری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای تحلیل شد.

یافته‌ها: از ۱۰۸۳ بیمار به هنگام پذیرش ۵۶ نفر (۵/۲٪) حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) بودند. از این تعداد ۵۱ نفر (۴/۷٪) حامل سویه حساس به متی‌سیلین ((methicilin sensitive *S. aureus:* MSSA)) و ۵ نفر(۰/۵٪) حامل سویه MRSA بودند. از ۷۹۳ بیمار باقیمانده به هنگام ترخیص به ترتیب ۷۹ نفر (۱۰٪) و ۱۵ نفر (۱/۹٪) با سویه‌های مذکور کلینزه شدند. عوامل خطرساز کلونیزاسیون با MRSA، طول مدت اقامت در بیمارستان، بخش بستری، آنتی بیوتیک تجویز شده (به‌ویژه سیپروفلوکساسین) و استفاده از ابزار تهاجمی (آنژیوکت) بود (P< 0/05). میان سایر متغیرها با کلونیزاسیون MRSA ارتباط معنی‌دار یافت نشد(P> 0/05).

نتیجه گیری : یافته‌ها مؤید حضور سویه MRSA در جمعیت شهر قزوین است. در پی بستری بروز کلنیزاسیون با سویه‌های MSSA و MRSA در مقایسه با حالت حامل در بدو پذیرش با همین ارگانیسم‌ها به‌ترتیب ۲/۱ و ۳/۸ برابر است. این میزان برای MRSA افزون تر است که با طول مدت اقامت در بیمارستان، بستری در بخش‌های جراحی و داخلی ، مصرف سیپروفلوکساسین و تعبیه آنژیوکت همسو می باشد.

کلمات کلیدی: *S.aureus*، MRSA، کلنیزاسیون، آنتی بیوتیک ، عوامل خطر ساز

مقدمه:

Staphylococcus aureus (S. aureus) به علل متعدد از جمله چشمگیر بودن میزان ابتلاء و مرگ و میر ناشی از عفونت آن و مقاومت به بسیاری از عوامل ضد میکربی مورد توجه قرار گرفته است (۱). توانائی سازش این باکتری با آنتی بیوتیک‌ها، منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین (methicilin resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA) شد. عامل مقاومت به متی سیلین و دیگر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام ، ژن mecA است. این ژن بر روی عامل ژنتیکی متحرکی موسوم به Staphylococcal cassette chromosome mecA (SCCmec) قرار دارد. کلون‌های اولیه *MRSA* مرتبط با مراکز بیمارستانی بودند (hospital-associated-MRSA (HA-MRSA)). کلون‌های اکتسابی از جامعه (community-associated MRSA (CA-MRSA)) هم در دنیا ظهور کردند (۲). MRSA به عنوان عامل اصلی عفونت-های مرتبط با مراکز بهداشتی- درمانی یک مساله شناخته شده است (۱، ۳).

میزان عفونت در پی کلنیزاسیون با MRSA بیشتر از عفونت در پی کلنیزاسیون با *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین (methicilin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)) است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که هزینه درمان بیمار مبتلا به عفونت MRSA به طور معنی دار بیشتر از عفونت MSSA است. طبق آمار سیستم ملی نظارت بر عفونت-های بیمارستانی، میزان MRSA از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۱، ۱۳ درصد افزایش یافته است. در کشورهای اروپایی، این میزان بسیار متغیر و از کمتر از یک درصد در کشورهای شمال اروپا (از قبیل دانمارک، هلند) تا بیش از ٤٠ درصد در کشورهایی از قبیل انگلستان، یونان و ایتالیا گزارش شده است. ژاپن در این میان قابل ذکر است، زیرا بالاترین شیوع تعریف شده MRSA را در جهان دارد. (۱)

کنترل MRSA یک موضوع حل نشده در بیمارستان و جامعه است. ظهور چنین مقاومت‌هایی در ارتباط با استفاده از عوامل ضد میکربی است (٤، ۵). عوامل متعددی از قبیل کنترل عفونت، خصوصیات بیمار و انتقال بیمار بین مراکز هم در این امر دخیل هستند. به‌نظر می‌رسد پیشگیری از ظهور و کنترل مقاومت ضد میکربی در بیمارستان‌ها بر اصلاح تجویز عوامل ضد میکربی و عملکرد کنترل عفونت استوار است (٤).

سایر عوامل خطرساز که در اکتساب این ارگانیسم مطرح هستند، عبارتند از: مدت اقامت در بیمارستان، جراحی، سابقه بستری، تغذیه روده‌ای، ازدحام بیمارستانی و شدت بیماری(۱، ٦).

کلنیزاسیون با MRSA ، مرحله مهمی در پاتوژنز عفونت محسوب می‌شود و منبع آن انتقال متقاطع بین انسان‌ها است. کلنیزاسیون با این ارگانیسم ممکن است ماه-ها و حتی سال‌ها باقی بماند. به هر حال اطلاعات در مورد تاریخچه طبیعی کلنیزاسیون MRSA و تعیین آن ناکافی است (۷).

بیماران کلنیزه با MRSA به هنگام پذیرش در بخش-های بیمارستانی مهم‌ترین منبع انتقال به کارکنان و سایر بیماران هستند (۸). مطالعه بیماران در بدو پذیرش و هنگام ترخیص از بیمارستان اطلاعات ذی قیمتی از نظر موقعیت سویه‌های اکتسابی از جامعه و میزان خطر کلنیزاسیون با سویه‌های بیمارستانی را در اختیار ما قرار می‌دهد. شناسایی عوامل خطر مرتبط با کلنیزاسیون MRSA ، تشخیص زود هنگام بیماران کلنیزه و جدا سازی حاملین MRSA در طول اقامت در مراکز درمانی، مداخلات بالقوه کنترل MRSA محسوب می شوند(۸، ۹).

این مطالعه با هدف تعیین میزان کلنیزاسیون MRSA در طول بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین و عوامل خطرساز مرتبط با آن انجام شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه مقطعی در فاصله دی ماه ۱۳۸۳ تا شهریور ماه ۱۳۸۵ بر روی بیماران بستری در مراکز آموزشی – درمانی شهید رجایی (مرکز جراحی و تروما)، بوعلی سینا (مرکز بیماری‌های داخلی) و کوثر (مرکز بیماری‌های زنان و زایمان) شهر قزوین انجام شد. بیماران بستری در بخش-های مراقبت ویژه (ICU)، دیالیز و سوختگی وارد مطالعه نشدند. حجم جمعیت مورد مطالعه بنابر , **a=0/05** **d=0/03**، ٥٦٧ نفر محاسبه شد. به منظور افزایش دقت مطالعه و با احتساب احتمال ریزش نمونه‌ها، از جمعیتی حدود دو برابر حجم نمونه محاسبه شده نمونه جمع‌آوری شد. نمونه گیری به صورت سرشماری و به نسبت میانگین

بیماران بستری در طول ماه (تعداد روزهای بستری بیماران/ تعداد تخت‌های هر بخش) انجام شد. این میانگین نمایانگر ازدحام (turn over) بیماران در هر بخش و تخت‌های موجود در آن است. اطلاعات دموگرافیک و اطلاعات اختصاصی (سن، جنس، محل سکونت، بعد خانوار، سابقه بستری، مصرف آنتی بیوتیک طی ۲ ماه پیش از پذیرش، بیماری زمینه‌ای، ارجاع از بخش یا بیمارستان دیگر، مصرف آنتی بیوتیک در طول مدت بستری) از طریق پرسشنامه، با مصاحبه حضوری و با رجوع به پرونده بیماران جمع‌آوری شد.

نمونه سواب بینی هر بیمار در طول ۲٤ ساعت اول پذیرش در بخش و نیز به هنگام ترخیص جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در محیط‌های آگار خوندار و مانیتول – سالت آگار کشت شد و به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. برای تعیین هویت ارگانیسم-های جدا شده از رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، آزمایش کواگولاز لوله‌ای و آزمایش DNase. استفاده شد (۱۰). برای تعیین مقاومت به متی سیلین از روش Oxacillin screening plate و مطابق با دستور العمل CLSI (Clinical and laboratory standards institute)(۱۱)استفاده شد. در این روش به محیط مولر – هینتون آگار مقدار ٤ درصد کلرور سدیم و 6mg/ml پودر اکساسیلین (sigma، آلمان) اضافه شد. رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی این محیط بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مؤید مقاومت به متی‌سیلین است. از سویه *S.aureus* ATCC 33591 به عنوان سویه مقاوم به متی سیلین واز سویه *S.aureus* ATCC 25923 به‌عنوان سویه حساس به متی‌سیلین استفاده شد.

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS پردازش و با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها:

محدوده سنی ۱۰۸۳ بیمار بستری در طول مدت مطالعه ۳ تا ۹٤ سال با میانگین ۲۰/۸۹±٤۲/۲٤ سال بود. اکثر بیماران (۲۵۱ نفر ۲۳/۲٪) در گروه سنی ۲۰ تا ۲۹ سال قرار داشتند. ٦۱۵ نفر (۵٦/۸٪) زن، ۸۹۹ نفر (۸۳٪) متاهل و ٦۱۳ نفر (۵٦/٦٪) ساکن شهر بودند. بعد خانوار بیماران از ۱ تا ۱۷ نفر متغیر بود.

بیشتر بیماران (۵٦۲ نفر ۵۱/۹٪) را زنان خانه‌دار تشکیل می دادند. مشاغل دیگر عبارت بودند از: شغل آزاد (۹۳ نفر، ۹٪)، کارگر (۹٤ نفر،۸/۷٪)، کشاورز (۸۷ نفر، ۸٪)، محصل یا دانشجو (۷٦ نفر، ۷٪) و کارمند یا معلم (۲۸ نفر،۲/٦٪). ۱۳۳ نفر (۱۲/۳٪) بیکار یا بازنشسته بودند.

٤۱۸ نفر (۳۸/٦٪) در بیمارستان شهید رجایی، ٤۲۱ نفر (۳۸/۹٪) در بیمارستان بوعلی سینا و ۲٤٤ نفر (۲۲/۵٪) در بیمارستان کوثر بستری بودند. درصد بیماران هر بخش که نمونه آنها جمع‌آوری شده به‌طور مجزا در جدول ۱ آمده است.

جدول۱: توزیع فراوانی بیماران به تفکیک بخش‌های بستری، بر اساس محاسبه میانگین بستری در طول ماه

بخش بستری	فراوانی	درصدفراوانی
جراحی عمومی مردان	۱۱۷	۱۰/۸
ارتوپدی مردان	۱۲۵	۱۱/۵
جراحی عمومی زنان	۱۲۸	۱۱/۸
ارتوپدی زنان	٤۸	٤/٤
داخلی مردان	۹۹	۹/۱
داخلی زنان	۸۰	۷/٤
عفونی	٦۹	٦/٤
قلب مردان	۵۵	۵/۱
قلب زنان	٦۰	۵/۵
اعصاب	۵۸	۵/٤
جراحی زنان	۱۲۲	۱۱/۳
الکتیو بیمارستان کوثر پس از زایمان	۸۳	۳/٦
	۳۹	۷/۷
جمع	۱۰۸۳	۱۰۰

هنگام پذیرش ، ۵۶ نفر حامل *S. aureus* بودند: ۵۱ نفر (۴/۷٪) حامل سویه MSSA و ۵ نفر (۰/۵٪) حامل سویه MRSA. ۲۹۰ نفر به علل متفاوت (نمونه مثبت هنگام پذیرش، فوت، ترخیص با رضایت شخصی، انتقال به بیمارستان یا بخش دیگر و ...) از نمونه‌گیری به هنگام ترخیص حذف شدند. هنگام ترخیص، نمونه ۷۹۳ نفر (۷۳/۲٪) جمع‌آوری شد. ۷۹ نفر (۱۰٪) با سویه MSSA و ۱۵ نفر (۱/۹٪) با سویه MRSA کلنیزه شده بودند.

۱۰ نفر (۶۷٪) در بیمارستان شهید رجایی و ۵ نفر (۳۳٪) در بیمارستان بوعلی سینا (**p < 0/001**) در مجموع ۱۵ نفر (۱/۹٪) با MRSA کلنیزه شده بودند.

مدت بستری بیماران از ۱ تا ۳۱ روز متغیر بود. بیش ترین میزان کلنیزاسیون با MRSA (۴۰٪) در بیمارانی بود که به مدت ۴ تا ۵ روز در بیمارستان بستری بودند (**p = 0/006**).

طیف آنتی بیوتیک‌های تجویز شده بسیار وسیع و شامل سفالوسپورین ها، آمینوگلیکوزیدها، پنی سیلین‌ها، فلوئوروکینولون‌ها و غیره بود. از میان ۷۴۳ بیمار که وضعیت تجویز آنتی بیوتیک برای آنها مشخص بود، برای ۲۵۷ نفر (۳۴/۱٪) هیچ گونه آنتی بیوتیکی تجویز نشده بود. بین نوع آنتی بیوتیک تجویز شده در بیمارستان و کلنیزاسیون با MRSA ارتباط معنی دار وجود داشت (**p=0/007**). شایع ترین آنتی بیوتیک دخیل در این رابطه سیپروفلوکساسین و سپس سفتریاکسون بود(جدول ۲).

جدول۲: توزیع فراوانی آنتی‌بیوتیک تجویز شده برای بیماران بستری

آنتی بیوتیک	فراوانی	درصدفراوانی
عدم تجویز	۲۵۷	۲۳/۷
سفازولین	۱۴۹	۱۳/۸
سفالکسین	۲۹	۲/۷
سفتریاکسون	۳۷	۳/۴
سیپروفلوکساسین	۲۳	۲/۱
سفازولین + جنتامایسین	۵۰	۴/۶
سفازولین + سفالکسین	۶۹	۶/۴
سفتریاکسون + مترونیدازول	۱۲	۱/۱
سایر موارد	۱۲۸	۱۱/۸
نا مشخص	۳۲۹	۳۰/۴
جمع	۱۰۸۳	۱۰۰

مدت مصرف آنتی بیوتیک برای ۲۳۷ بیمار (۳۱/۵٪) یک روز، برای ۱۹۶ بیمار (۲۶/۱٪) ۲ تا ۵ روز، برای ۴۸ بیمار (۶/۴٪) ۶ تا ۱۰ روز و برای ۱۴ نفر (۱/۹٪) بیش از ۱۰ روز بود.

۱۰۴۱ نفر (۹۶/۱٪) به طور مستقیم در بخش مورد نظر (بخشی که به هنگام نمونه گیری در آن بستری بودند) بستری شده بودند و یا از بخش دیگری از همان بیمارستان ارجاع شده بودند. ۴۲ نفر (۳/۹٪) از بیمارستان دیگری منتقل شده بودند. ۵۴۷ نفر (۵۰/۵٪)، سابقه ارجاع از بخش دیگر (به ویژه اورژانس) به بخش مورد نمونه گیری را داشتند. ۳۷۲ نفر (۴۳/۳٪) سابقه بستری قبلی نداشتند. ۱۴۸ نفر (۱۳/۷٪) در طول ۲ ماه قبل، ۶۳ نفر (۵/۸٪) در طول ۶ ماه قبل از پذیرش فعلی در بیمارستان بستری بودند . ۳۲۱ نفر (۲۹/۶٪) سابقه مصرف آنتی بیوتیک در طول مدت ۲ ماه قبل از پذیرش فعلی در بیمارستان را ذکر کردند. آموکسی سیلین، سفالکسین، آمپی سیلین و پنی سیلین تزریقی شایع‌ترین آنتی بیوتیک‌های مصرفی قبل از پذیرش بودند. ۵۱۹ بیمار (۴۷/۹٪) هیچ بیماری زمینه‌ای نداشتند. (جدول ۳).

جدول۳: فراوانی آنتی‌بیوتیک تجویز شده برای بیماران بستری

بیماری زمینه‌ای	فراوانی	درصدفراوانی
فاقد بیماری زمینه‌ای	۵۱۹	٤٧/٩
هماتولوژیک	۱۵	۱/٤
سابقه جراحی	۳۹	۳/٦
اعصاب و روان	۳۱	۲/۹
گوارشی	۲۷	۲/۵
عفونی	۲٦	۲/٤
دیابت	۲۲	۲
قلبی – عروقی	٦۲	۵/۷
ریوی	۲۰	۱/۸
کلیوی	۱۱	۱
تیروئیدی	۱۸	۱/۷
ژنیکولوژیک	۱۳	۱/۲
قلبی–ریوی	۱۷	۱/٦
ترکیبی از بیماری‌ها	۲۳۷	۲۱/۹
نامشخص	۲٦	۲/٤
جمع	۱۰۸۳	۱۰۰

روش‌های تهاجمی شامل تعبیه آنژیوکت، کاتتر ادراری، لوله نازوگاستریک (NGT)، لوله تراشه، Chest Tube، درن، اکسیژن نازال و ماسک اکسیژن بودند. بیشترین تعداد مصرف متعلق به آنژیوکت با **٧٦٤** مورد (**۷۰/۵**٪) بود. البته برای **۲۱۳** بیمار دیگر نیز آنژیوکت در ترکیب با دیگر فراگردهای تهاجمی استفاده شده بود. در **۱۰٤** مورد (**۹/٦**٪) هیچ گونه ابزار تهاجمی به کار نرفته بود (جدول٤). بین استفاده از فراگردهای تهاجمی (آنژیوکت) و کلنیزاسیون با سویه MRSA ارتباط معنی دار وجود داشت (**p = 0/018**).

میان سن، جنس، محل سکونت، بعد خانوار، سابقه بستری در بیمارستان، ارجاع از بیمارستان یا بخش دیگر، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و بیماری زمینه‌ای با کلنیزاسیون MRSA ارتباط یافت نشد(**P> 0/05**).

جدول٤:فراوانی فراگردهای تهاجمی تعبیه شده برای بیماران بستری

فراگرد تهاجمی	فراوانی	درصدفراوانی
آنژیوکت	۱۰٤	۹/٦
کاتترادراری	٧٦٤	۷۰/۵
آنژیوکت و کاتترادراری	۱۳۵	۱۲/۵
آنژیوکت و NGT	۲۹	۲/۷
آنژیوکت ، کاتترادراری وNGT	۱۳	۱/۲
سایر موارد	۳۸	۳/۵
جمع	۱۰۸۳	۱۰۰

بحث:

در مطالعه حاضر ۱۰ درصد بیماران به هنگام ترخیص از بیمارستان با سویه MSSA و ۱/۹ درصد با سویه MRSA کلنیزه بودند. میزان بروز کلنیزاسیون با سویه MRSA، نسبت به حاملین با همین سویه (CA-MRSA) ۲/٤ برابر است. در مطالعه روی کودکان بزرگتر از ۲ سال که در سال ۱۳۸۲ در بیمارستان کودکان شهر قزوین صورت گرفت کلنیزاسیون با سویه MRSA به هنگام ترخیص، ۲ درصد بود(۲)، که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. باکتری هایی که مقاومت چند دارویی دارند از جمله MRSA در مراکز بهداشتی ایالات متحده و بسیاری از کشورهای دیگر اندمیک هستند(۱۲). میزان کلنیزاسیون HA-MRSA در بینی بیماران بستری در سریلانکا (۲۰۰۳) در بخش جراحی ٦ درصد (۸)، در عربستان سعودی (۱۹۹۸) ۲ درصد (۱)، در آلمان (۲۰۰۵) ۲ درصد (۱۳) و در بیمارستان دیگری در عربستان سعودی ۸ مورد از هر ۱۰۰۰ پذیرش (۱) برآورد شد.

مطالعات تائید کرده‌اند که حامل بودن طولانی مدت با MRSA می تواند پس از ترخیص از بیمارستان مداومت داشته باشد. بر روی ۷۸ بیمار یک مطالعه اینده نگر انجام گرفت. ٤۰ درصد بیماران پس از متوسط ۸/۵ ماه عدم کلنیزاسیون با MRSA، بعد از بستری مجدد در بیمارستان به حاملین دایم آن مبدل شدند (١٤). این مطلب نشانگر نقش سویه‌های بیمارستانی در کلنیزاسیون افراد در جامعه می باشد.

در مطالعه حاضر، حاملین MRSA به هنگام پذیرش در جنس مذکر ٤۰ درصد و در جنس مونث ٦۰ درصد بود. میزان کلنیزاسیون به هنگام ترخیص به ترتیب به ۳۳/۳ و ٦٦/۷ درصد رسید (کلنیزاسیون با سویه MRSA ، در جنس مذکر و مؤنث به نسبت ۱ به ۲ می باشد). به نظر می رسد کلنیزاسیون در زنان در طول بستری در بیمارستان بیش تر رخ داده است.

کلنیزاسیون با سویه MRSA از روز چهارم بستری آغاز می‌شود و به ۱۰ روز اول از زمان بستری محدود می‌گردد. بین کلنیزاسیون با سویه MRSA و مدت زمان اقامت در بیمارستان ارتباط معنی دار وجود داشت. چنین ارتباطی در مطالعه کودکان بستری در بیمارستان کودکان قزوین در سال ۱۳۸۲ نیز به دست آمد. بنابر داده‌های آن مطالعه کلنیزاسیون از روز سوم بستری آغاز و تا روز هفتم ادامه داشت (۲). ارتباط میان مدت زمان اقامت و کلنیزاسیون با MRSA در برخی مطالعات (۸، ۱۵، ١٦)، نیز تائید شده است. در مطالعه Scriven و همکارانش (۲۰۰۳) بر روی ۱۰۰ بیمار تحت جراحی شریانی ، میزان کلنیزاسیون MRSA از ٤ درصد به هنگام پذیرش به ۱۷ درصد به هنگام ترخیص رسید. مدت بستری (١٦ روز) مهم ترین عامل تعیین کننده کسب MRSA شناخته شد (۱۷).

میزان بروز کلنیزاسیون با سویه MRSA در مراکز آموزشی- درمانی جراحی، داخلی و بیماری‌های زنان و زایمان به ترتیب به نسبت ۲، ۱ و صفر بود. بین بروز کلنیزاسیون با سویه MRSA و بخش بستری ارتباط معنی دار یافت شد. به نظر می رسد ازدحام (turn over) دربخش‌های داخلی و جراحی عامل مؤثر بر کلنیزاسیون باشد. اکثر موارد کلنیزاسیون در مطالعه Balkhy و همکاران در عربستان سعودی نیز در بخش‌های جراحی و داخلی (۱)و در مطالعهAsensio و همکاران در بخش-های جراحی، داخلی و ICU (١٦)اتفاق افتاده بود. در مطالعه Cunningham و همکاران (۲۰۰٦) نیز ارتباط درصد اشغال تخت‌های بیمارستانی با میزان کلنیزاسیون بیماران با MRSA، ٤۹ درصد برآورد شده است. در بسیاری از مراکز، میزان اشغال تخت برای بیماران جراحی عمومی و داخلی بیش از دستورالعمل‌های ملی است (بیش از ۸۵ درصد تخت‌ها اشغال شده‌اند) (۱۸). برخلاف شیوعی که در مطالعه حاضر در بخش‌های عادی به‌دست آمده است، شیوع کلنیزاسیون با MRSA در مراکز مراقبت‌های ویژه (ICU) بالاست. در برزیل (۱۹۹۷) این شیوع به هنگام پذیرش و ترخیص از ICU به ترتیب ٤٦ و ۵۲ درصد (۱۹)و در ICU بیمارستان‌های هنگ کنگ نیز ۱۲/۱ درصد است (۲۰). در بخش‌های مراقبت ویژه مراکز آموزشی درمانی قزوین (۱۳۸٤) میزان کلنیزاسیون به هنگام ترخیص با سویه MRSA، ۲۳ درصد گزارش شد (۲۱). با توجه به یافته‌های این دو مطالعه که هر دو در قزوین انجام شده کلنیزاسیون در بخش‌های مراقبت ویژه ۱۲ برابر بیشتر از میزانی است که در بخش‌های عادی روی می‌دهد. لذا، کاهش مدت زمان بستری، کاهش ازدحام بخش‌ها و درصد اشغال تخت‌های بیمارستانی می تواند

خطر کلنیزاسیون MRSA را کاهش دهد. مطالعه دراز مدت درباره کلنیزاسیون با MRSA در مرکز آموزشی- درمانی شهید رجایی نیز به نظر ضروری می‌رسد.

بین تجویز آنتی‌بیوتیک (سیپروفلوکساسین) در بیمارستان و کلنیزاسیون با سویه MRSA ارتباط معنی دار یافت شد. مطالعات مصرف فلوئوروکینولون (**۲۲،۱۳**)و سفالوسپورین (۱٦) را به‌عنوان عامل خطر ساز عمده در اکتساب MRSA تایید کرده‌اند. در انگلستان (**۲۰۰۲**)، بین درمان با آنتی بیوتیک (آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین) و کلنیزاسیون MRSA ارتباط معنی دار به دست آمد(۲۳). در مطالعه Crowcroft و همکاران در بلژیک نیز بروز MRSA با افزایش مصرف سفتازیدیم، سفسولودین، آموکسی سیلین با اسید کلاوولانیک و فلوئوروکینولون افزایش یافت. ولی بین مصرف سفالوسپورین‌های نسل اول و دوم و تعداد موارد جدید MRSA ارتباط منفی وجود داشت(٤). در یک مطالعه مورد- شاهدی نیز تجویز سیپروفلوکساسین یا سفالوسپورین به‌طور معنی دار با اکتساب MRSA همراه بود. در حالی که کسب MRSA ارتباطی با تجویز فلوکلوگزاسیلین و کوآموکسی کلاو نداشت. شاید کسب سویه‌های مقاوم تحت تاثیر مصرف آنتی بیوتیک‌هایی است که در بزاق ترشح می شوند. ولی هنوز مشخص نیست که چرا برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، که MRSA به آنها مقاوم است، بیش از برخی دیگر در کلنیزاسیون آن نقش دارند (۵). به هر حال، تغییر الگوی مصرف آنتی بیوتیک ممکن است هم علت و هم معلول اکتساب MRSA باشد. دراین مطالعه تنها ارتباط کلنیزاسیون با MRSA در بیمارستان با مصرف سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون نشان داده شد. زیرا، در یک مطالعه مقطعی تعیین ارتباط، و نه علیت، قابل حصول است.

به دلیل وجود ارتباط قوی بین کلنیزاسیون MRSA و مصرف سیپروفلوکساسین، پیشنهاد شده است در مراکزی که MRSA اندمیک است توجه بیشتری به مصرف فلوروکینولون‌ها مبذول گردد (۲۳). در هر حال، مداخلات شامل ارتقاء الگوی منطقی تجویز آنتی بیوتیک باید با شواهد تجربی و اپیدمیولوژیک حمایت شود (٤). در مطالعه بر روی کودکان بستری در بیمارستان کودکان قدس قزوین (**۱۳۸۲**) نیز بین کلنیزاسیون MRSA و تجویز سفتریاکسون ارتباط مستقیم یافت شد (۲). ولی در معدود مطالعات، نظیر مطالعه Schlesinger و همکاران بر روی **۹٤۹** کودک شک به تاثیر آنتی بیوتیک خاص در کسب MRSA از جامعه یا در بیمارستان مشاهده نشد(۲٤).

بین استفاده از روش‌های تهاجمی (آنژیوکت) و کلنیزاسیون با سویه MRSA ارتباط معنی‌دار یافت شد. در برخی مطالعات نیز ابزارهای تهاجمی (از قبیل آنژیوکت و کاتتر ادراری) در کنار دیگر عوامل، یکی از عوامل تعیین کننده کلنیزاسیون با MRSA شناخته شده است (۵، ۱۵). بنابراین، می توان آنژیوکت را به‌عنوان فراگرد موثر در جهت آماده سازی برای کلنیزاسیون با MRSA در نظر گرفت. دقت در تعویض به‌موقع آنژیوکت و رعایت نکات آسپتیک از سوی پرسنل تعبیه کننده آن حائز اهمیت است. مطالعات مختلف نیز بر نقش پرسنل بیمارستانی در انتقال سویه‌های مقاوم به متی سیلین صحه گذاشته‌اند (۲۵).

در مقاله مروری بر روی عفونت‌های ناشی از MRSA (**۱۹۸۲** تا **۲۰۰۲**)، علی‌رغم استفاده از جداسازی‌های مختلف و سیاست‌های محافظتی بهداشتی، این عفونت‌ها همچنان افزایش یافتند. بی اثر بودن واضح اقدامات کنترلی به عوامل متعددی از جمله شکست در شناسایی بیماران کلنیزه شده با MRSA نسبت داده شد. ضعف در قبول توصیه‌هایی همچون؛ استفاده از وسایل محافظتی، شستشوی دست از سوی کارکنان مراقبت‌های بهداشتی- درمانی (HCWs)، شکست در شناسایی و درمان آندسته از کارکنانی که مسئول انتقال MRSA هستند، ورود MRSA توسط بیمارانی که از دیگر مراکز بهداشتی پذیرش می شوند، همگی از دیگر عواملی هستند که در مظان اتهام قرار دارند. برنامه‌های کنترل که شامل نظارت دقیق و فعال بر کشت نمونه بیماران پرخطر است و استفاده از وسایل محافظتی، میزان شیوع MRSA را کاهش داده است و اثر بخشی- هزینه خوبی را در پی داشته است (۲٦). کاهش شیوع MRSA در کشور استونی از **۲۱** درصد (**۲۰۰۰**) به **۱۲** درصد (**۲۰۰٤**) و در فرانسه از **۳۳** درصد (**۲۰۰۱**)به **۲۸** درصد(**۲۰۰٤**) با تکیه بر سیاست گذاری‌های بهداشتی امکان پذیر شده‌است (۲۷).

بنابراین، آموزش و افزایش آگاهی کارکنان مراقبت‌های بهداشتی- درمانی جهت رعایت نکات ایمنی ساده از قبیل؛ استفاده صحیح از دستکش، شستشوی صحیح دست‌ها در تماس با هر بیمار، و اتخاذ راهکارهای مناسب جهت افزایش پذیرش شستن دست می تواند از احتمال انتشار

MRSA بکاهد. همچنین نمونه گیری از کارکنان مراقبت‌های بهداشتی- درمانی می تواند امکان درمان حاملین MRSA و جلوگیری از انتقال این ارگانیسم به بیماران را فراهم نماید.

نتیجه گیری:

یافته‌ها مؤید حضور سویه MRSA در جمعیت شهر قزوین است. در پی بستری بروز کلنیزاسیون با سویه‌های MSSA و MRSA در مقایسه با حالت حامل در بدو پذیرش با همین ارگانیسم‌ها به ترتیب **۲/۱** و **۳/۸** برابر است. این میزان برای MRSA افزون‌تر است که با طول مدت اقامت در بیمارستان، بستری در بخش‌های جراحی و داخلی، مصرف سیپروفلوکساسین و تعبیه آنژیوکت همسو می باشد. بستری شدن در مراکز درمانی آموزشی به افزایش حاملین MRSA به میزان ۱/۸ برابر بیش از حاملین MSSA در جامعه منجر می شود. این امر توجه جدی عملی به رعایت موازین کنترل عفونت را طلب می-نماید.

در نهایت انجام مطالعه گسترده‌تر جهت تعیین هر چه شفاف‌تر روابط متغیرهایی چون بیماری زمینه‌ای، سابقه بستری و مصرف آنتی‌بیوتیک با کلنیزاسیون MRSA پیشنهاد می‌شود.

فهرست مراجع:

1. Balkhy HH, Memish ZA, Almuneef MA. Methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*: A 5- year review of surveillance data in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**(8): 976-82.

۲. شریفی م، سررشته‌داری م، حسنی ف، رئیسی ب، علیپود حیدری م. شیوع کلنیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین دربینی کودکان بستری و برخی عوامل خطر موثر بر آن. *مجله میکرب شناسی پزشکی ایران* **۱۳۸۷**،سال۲، شماره های ۳ و ٤ ، صص ۷۹ تا ۸۵.

3. Trividic M**,** Gauthier ML**,** Sparsa A**,** Ploy MC**,** Mounier M**,** Boulinguez S**, *et al.*** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatological practice: origin, risk factors and outcome**.** *Ann Dermatol Venereol*. 2002; 129(1 Pt 1): 27-9.

4. Crowcroft NS, Ronveaux O, Monnet DL, Mertens R. Methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* and antimicrobial use in Belgian hospitals. Infect *Control Hosp Epidemiol* 1999 ; **20**(1): 31-6.

5. Hill DA, Herford T, Parratt D. Antibiotic usage and methicillin– resistant *Staphylococcus aureus:* an analysis of causality. *J Antimicrob Chemother* 1998; **42**: 676-7.

6. Cook PP, Catrou P, Gooch M, Holbert D. Effect of reduction in ciprofloxacin use on prevalence of methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* rates within individual units of tertiary care hospital. *J Hosp Infect* 2006; **64**: 348-51.

7. Marschall J, Muhlemann K. Duration of methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* carriage, according to risk factors acquisition. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006 Nov; **27**(11): 1206-12.

8. Corea E, de Silva T, Perera J. Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*, prevalence, incidence and risk factors associated with colonization in Sri Lanka. *Hosp Infect* 2003 ; **55**(2): 145–8.

9. Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, Christenson J, Gervaz P, Bandiera- Clerc C, *et al*. Universal screening for methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. *JAMA* 2008; **299**(10): 1149-57.

۱۰. شریفی م. *کاربرد، تفسیر و اصول آزمایش‌های بیوشیمیایی در باکتری شناسی پزشکی*. چاپ اول، تبریز، انتشارات احرار، ۱۳۷۹.

11. NCCLS. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for that grow aerobically; approved standard. 5th ed. NCCLS document M7– A5. NCCLS, Wayne Pennsylvania; 2000.

12. Henderson DK. Managing methicillin–resistant staphylococci: a paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms.*Am J Infect Contro* 2006;**34** [5Suppl 1] : S45-S54

13. Chaberny IF, Sohr BD, Gastmeier P. A point- prevalence of MRSA in a German university hospital to identify patients at risk and to evaluate an established admission screening procedure. *Infection* 2008; **36**(6): 526-32.

14. Scanvic A, Denic L, Gaillon S, Giry P, Andremont A, Lucet JO. Duration of colonization by methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge

۲۱. شریفی م، آصف زاده م، جوادی الف، کارگر آ. شیوع کلنیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه مراکز آموزشی درمانی قزوین- ۱۳۸٤. *مجله میکرب شناسی پزشکی ایران*۱۳۸۸،سال۳، شماره های ۲ و ۳ ، صص ٤۰ تا ٤٦.

22. Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y. Fluoroquinolones and the risk for methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect Dis* 2003 ; **9**(11): 1415-22.

23. Hari S, Sunley R, Tami A, Gundmann H. The Nottinghom *Staphylococcus aureus* population study: prevalence of MRSA among the elderly in a university hospital. *J Hosp Infect* 2002 ; **50**(1): 25–9.

24. Schlesinger Y, Yahalom S, Raveh D, Yinnon AM, Segel R, Erlichman M, *et al.* Methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in children in Jerusalem: community vs. chronic care institutions. *Isr Med Assoc J* 2003 ; **5**(12): 847–51.

25. Blok HF, Troelstra A, Kamp– Hopmans TE, Gigengack– Baars AC, Vandenbroucke– Grauls CM, Weersink AJ, *et al*. Role of healthcare workers in outbreaks of methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*: a 10 years evaluation Dutch university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003 ; **24**(9): 679–85.

26. Woyce JM, Havill NL, Kohan C, Duirgan DG, Ligi CE. Do infection control measures work for methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Hosp Epidemiol* 2004 ; **25**(5): 395–401.

27. EARSS Annual Report 2004. (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), Bilthoven, The Netherland, 2005 Sep.

and risk factors for prolonged carriage. *Clin Infect Dis* 2001; **32**(10): 1393–8.

15. Austin TW, Austin MA, McAlear DE, Coleman BT, Osoba AO, Thaqafi AO, *et al*. MRSA prevalence in a teaching hospital in western Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2003 ; 24(12): 1313–6.

16**.** Asensio A**,** Guerrero A**,** Quereda C**,** Lizán M**,** Martinez-Ferrer M**.** Colonization and infection with methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*: associated factors and eradication. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996 ; **17**(1): 20-8.

17. Scriven JM, Silva P, Swann RA, Thompson MM, Naylor AR, Bell PR, *et al*. The acquisition of methicilli– resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vascular patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003 ; **25**(2): 147-51.

18. Cunningham JB, Kernoham WG, Rush T. Bed occupancy, turn over interval and MRSA rates in northern Ireland. *Br J Nurs* 2006; **15**(6): 324-8.

19. Korn GP, Martino MD, Mimica IM, Mimica LJ, Chiavone PA, Musolino LR. High frequency of colonization and absence of identification risk factors for methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2001; **5**(1): 1–7.

20. Ho PL. For the Hong Kong intensive care unit antimicrobial resistance study (HK–ICARE) Group. Carriage of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*, ceftazidime– resistant Gram– negative bacilli and vancomycin– resistant enterococci before and after intensive care unit admission. *Crit Care Med* 2003; **31** (4): 1175–82.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۱ بهار ۱۳۸۹، صفحات۶۵-۵۸

فناوری PCR برای شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB* در حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در سه بیمارستان آموزشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

ابوالفضل وهابی*[۱]، آلکا حسنی[۲]، محمد رضا نهائی[۱]، صفر فرج نیا[۳]

۱)گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲)گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، مرکز بیماری‌های عفونی و طب گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳)مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
نویسنده رابط: ابوالفضل وهابی، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
همراه : ۰۹۱٤۱۲۸٤۷٤۹ a.vahhabi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۸/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۹/۲/۵

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک به‌صورت فزاینده عامل عفونت‌های شدید بیمارستانی است. مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، به‌ویژه ونکومایسین، آمپی سیلین و غلظت‌های زیاد آمینوگلیکوزیدها در آن شایع است. شناسائی سریع و درست انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistant enterococci : VRE) ، در مدیریت و درمان بیماران کلنیزه شده یا دچار عفونت انتروکوکی، بسیار حیاتی است و اجرای برنامه‌های درمانی مناسب برای پیشگیری از انتشارآن را فراهم می‌کند. هدف این مطالعه بکارگیری فناوری PCR ، جهت شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB* در حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین بود .

روش بررسی: ٤۳۲ نمونه مدفوع یا رکتال سوآب از بیمارانی که حداقل ۷۲ ساعت در بخش‌های پرخطر (ICU ، هماتولوژی/انکولوژی، عفونی و سوختگی) در سه بیمارستان آموزشی درمانی تبریز (سینا، کودکان و شهید قاضی طباطبائی) بستری بودند و همچنین بیماران سرپائی (مراجعه کننده به درمانگاه انکولوژی، درمانگاه عفونی و بخش همودیالیز) جمع آوری شد (۸۷-۱۳۸٦). نمونه‌ها در محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و سویه‌های انتروکوک جداسازی گردید. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) ونکومایسین ، با روش Agar dilution انجام شد و سویه‌های مقاوم با E-test تایید گردید. فناوری PCR جهت شناسائی ژن‌های *vanB*/*vanA* ، اجراء شد.

یافته‌ها: از ٤۳۲ نمونه ۲۹۱ (٦۷/۳٪) سویه انتروکوک ایزوله شد. ۱۸۹ سویه (٦٤/۹٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۸٦ سویه (۲۹/۵٪) *انتروکوکوس فسیوم* تعیین هویت شدند. تعیین MIC ، مقاومت کامل به ونکومایسین را در ۱۵ (۵/۱٪) سویه اثبات کرد که همگی *انتروکوکوس فسیوم* بودند. فناوری PCR ، حضور ژن‌های *vanA* یا *vanB* با مقاومت حد واسط (MICs, 8-16 µg/ml) یا مقاومت سطح بالا (MICs, ≥ 256 µg/ml) به ونکومایسین را در ٥٤ (۱۸/۵٪) سویه نشان داد. در مجموع ٤۲ (٦٦/٦٪) سویه مقاوم، *انتروکوکوس فسیوم* و ۱۵ (۲۳/۸٪) سویه *انتروکوکوس فکالیس* بودند. ٥٤ (۸۵/۷٪) سویه مقاوم به ونکومایسین از بیماران بستری و ۹ (۱٤/۲٪) سویه ازبیماران سرپائی بدست آمد.

نتیجه گیری: مقاومت کامل به ونکومایسین در *انتروکوکوس فسیوم* و در بیماران بستری یافت شد. مقاومت متوسط یا سطح بالای انتروکوک به ونکومایسین در بیماران بستری و سرپائی وجود دارد. فراوانی ژن *vanB* بیشتر از *vanA* است.

کلید واژه ها: انتروکوک، ونکومایسین، کلنیزاسیون، *vanA*، *vanB*

مقدمه:

در سال‌های اخیر انتروکوک به‌عنوان یک پاتوژن بیمارستانی پراهمیت جایگاه بسیار مهمی پیدا کرده است. مقاومت این باکتری در مقابل بسیاری ازآنتی بیوتیک ها، به‌ویژه گلیکوپیتیدها به یک معضل اساسی در پزشکی امروز مبدل شده است(۱). این ویژگی مقاومت می‌تواند به‌صورت ذاتی (مقاومت سطح پائین به پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها)و یااکتسابی (مقاومت به گلیکوپیتیدها وغلظت‌های زیاد آمینوگلیکوزیدها) بروز نماید. از زمان جداسازی اولیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistant enterococci : VRE) درانگلستان و فرانسه، عفونت‌های ناشی از این باکتری به‌صورت روزافزون در نقاط مختلف دنیا افزایش یافته است (۲). در حال حاضر انتروکوک مقاوم به ونکومایسین به‌عنوان دومین پاتوژن رایج در عفونت‌های کسب شده از بیمارستان معرفی می‌شود. از آنجائیکه ژن‌های عامل مقاومت به ونکومایسین، قابل انتقال به باکتری‌های دیگر هستند، ویژگی مقاومت به گلیکوپیتیدها می‌تواند به باکتری‌های دیگر همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant *Staphylococcous aureus* (MRSA)) منتقل گردد. درنتیجه یک پاتوژن فوق‌العاده خطرناک ایجاد می‌شود که از بین بردن آن با آنتی بیوتیک های موجود بسیار مشکل خواهد بود(۳،۱).

ونکومایسین یکی از اعضای خانواده گلیکوپیتید می‌باشد. این آنتی بیوتیک‌ها با اتصال به واحدهای پیش ساز پپتیدوگلیکان،از سنتز دیواره سلولی باکتری ممانعت می‌کنند(٤). ژنوتیپ‌های مختلفی از مقاومت به گلیکوپیتیدها درانتروکوک شناسایی شده است که شامل ژنوتیپ‌های *vanA, vanB, vanC1/C2/C3, vanD, vanE, vanG* می‌باشد(۳). *vanA* و *vanB* ژنوتیپ‌های بسیار رایج مقاومت به گلیکوپیتید محسوب می‌شوند. *vanA* مقاومت سطح بالا به ونکومایسین و تیکوپلانین را القاء می کند و بیان آن به‌وسیله ونکومایسین یا تیکوپلانین تحریک می‌شود. ژنوتیپ *vanB* مقاومت به غلظت‌های مختلف ونکومایسین را القاء می‌کند، اما این سویه‌ها در برابر تیکوپلانین حساس می‌باشند و بیان این ژنوتیپ فقط به‌وسیله ونکومایسین تحریک می‌شود(۵).

روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، جهت شناسایی مقاومت به گلیکوپیتید، اولین بار در سال ۱۹۹۵ ارائه و اجراء گردید. امروزه بسیاری از آزمایشگاه‌های میکرب شناسی از PCR برای اثبات مقاومت به ونکومایسین استفاده می کنند. بکارگیری مستقیم این روش بر روی نمونه‌های بالینی و یا بر روی کشت می تواند زمان شناسایی سویه‌های انتروکوک مقاوم را کاهش دهد(٦).

کمیته‌های کنترل عفونت بیمارستانی، بررسی نمونه‌های مدفوع و یا رکتال سوآب بیماران بستری در بخش‌های پرخطر بیمارستانی را برای شناسائی اولیه بیماران کلونیزه شده با انتروکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، و پیشگیری ازانتقال شخص به شخص، همچنین شیوع اپیدمی‌های بیمارستانی با این باکتری‌ها ضروری می‌دانند(۷). تاکنون، گزارش مستندی از اپیدمیولوژی و فراوانی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در داخل و یا خارج محیط‌های بیمارستانی در شهر تبریز و منطقه شمال غرب کشور در دسترس نیست. از این‌رو، این مطالعه با هدف ارزیابی میزان کلونیزاسیون روده‌ای سویه‌های VRE در بیماران بستری و همچنین گروهی از بیماران سرپائی در دانشگاه علوم پزشکی تبریز طراحی و اجراء گردید.

مواد و روش‌ها:

بررسی میزان شیوع: در یک دوره ۹ ماهه(۱۳۸۷-۱۳۸٦)، از بیمارانی که حداقل ۷۲ ساعت در بخش‌های پرخطر همچون ICU ، هماتولوژی/انکولوژی، عفونی و سوختگی در سه بیمارستان آموزشی درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (سینا، کودکان و شهید قاضی طباطبائی) بستری شده بودند نمونه مدفوع یا رکتال سوآب (با توجه به شرایط بیمار) جمع‌آوری شد.از بیماران مراجعه‌کننده به بخش همودیالیز، درمانگاه‌های هماتولوژی/انکولوژی و عفونی به‌عنوان بیمار سرپائی نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها جهت جداسازی انتخابی سویه‌های VRE به آزمایشگاه میکرب - شناسی انتقال داده شدند.

کشت انتخابی و تعیین هویت بیوشیمیایی انتروکوک: نمونه‌ها در دو محیط انتخابی بایل اسکولین آزاید آگار و بایل اسکولین آزاید براث (Hi-media) تلقیح شدند (۸،۱). در این مرحله، کلنی‌های دارای هاله سیاه رنگ (مشکوک به انتروکوک)، با بکارگیری تست‌هایی همچون رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط حاوی ٦/۵٪ NaCl و واکنش بایل اسکولین به‌طور اولیه به‌عنوان انتروکوک شناسائی شد. با بررسی ویژگی‌های فیزیولوژی و

میکربیولوژی، انتروکوک‌ها تا حد گونه تعیین هویت شدند(۱۰،۹).

غربالگری: جهت ارزیابی اولیه میزان حساسیت سویه‌های جدا شده به ونکومایسین، کلنی‌های جوان انتروکوک بر روی محیط کشت حاوی ونکومایسین با غلظت‌های مختلف ٤، ٦ و ٨ میکروگرم در میلی‌ایتر تلقیح گردید. کلنی‌های رشدکرده بر روی ظروف حاوی آنتی‌بیوتیک، به‌عنوان سویه‌هائی با حساسیت پائین به ونکومایسین در نظر گرفته شدند(۸).

ارزیابی حساسیت به ونکومایسین: حداقل غلظت مهاری (MIC) و نکومایسین برای سویه‌های جدا شده، با روش استاندارد Agar dilution تعیین گردید. سویه‌های مقاوم به ونکومایسین، با روش E-test نیز مورد آزمایش و تائید قرار گرفت (۱۲،۱۱).

تکثیر ژن‌های vanA , vanB : جهت انجام روش PCR و تکثیر ژن‌های اختصاصی مورد نظر، از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی بکار رفته در مطالعه kariyema و همکاران استفاده شد(۱۳). استخراج DNA با جوشاندن سوسپانسیون باکتریای در تراس بافر استریل به مدت ۱۵ دقیقه و سپس سانتریفوژ در 1500 g انجام شد(۱). ترکیب کمپلکس PCR شامل PCR buffer (سیتاژن-ایران)، 0.2 mM dATP , dCTP , dGTP , dTTP , (سیتاژن-ایران) 0.5 µM از هر پرایمر (بیونر)، 2.5 , 1.5 mM MgC12 U Taq DNA Polymerase (سیتاژن-ایران)و ۵۰ نانو گرم DNA استخراج شده از سویه انتروکوک به عنوان الگو بود. پس از انجام فرایند آمپلیفیکاسیون DNA بر روی دستگاه ترموسیکلر (ASTEC) محصول بدست آمده، در کنار سایز مارکر(1Kd DNA Ladder) وDNA متعلق به سویه‌های کنترل (*انتروکوکوس فسیوم* با ژنوتیپvanA ATCC 51559) و (*انتروکوکوس فکالیس* فاقد ژنوتیپ‌های ATCC 29212vanA/vanB) بر روی ژل آگارز ۱٪ در 0.5X TBE الکتروفورز شد و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید(۱ ،۱۳).

یافته‌ها:

در مجموع ٤۳۲ بیمار شامل ۳۰۰(٦۹/٤٪) بیمار بستری و ۱۳۲ (۳۰/۵٪) بیمار سرپایی در این مطالعه شرکت داشتند. از میان آنها ۲۹۱ (٦۷/۳٪)سویه انتروکوک شناسائی شد. تمام ۲۹۱ سویه انتروکوک در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد و محیط حاوی ٦/۵٪ NaCl رشد کردند و واکنش های PYR و آرژینین دهیدرولاز مثبت داشتند. هیچ یک از سویه‌ها پیگمان زرد تولید نکردند. در نهایت، ۱۸۹ (٦٤/۹٪) سویه به‌عنوان *انتروکوکوس فکالیس* و۸٦ (۲۹/۵٪) سویه به‌عنوان *انتروکوکوس فسیوم* تعیین هویت شدند.

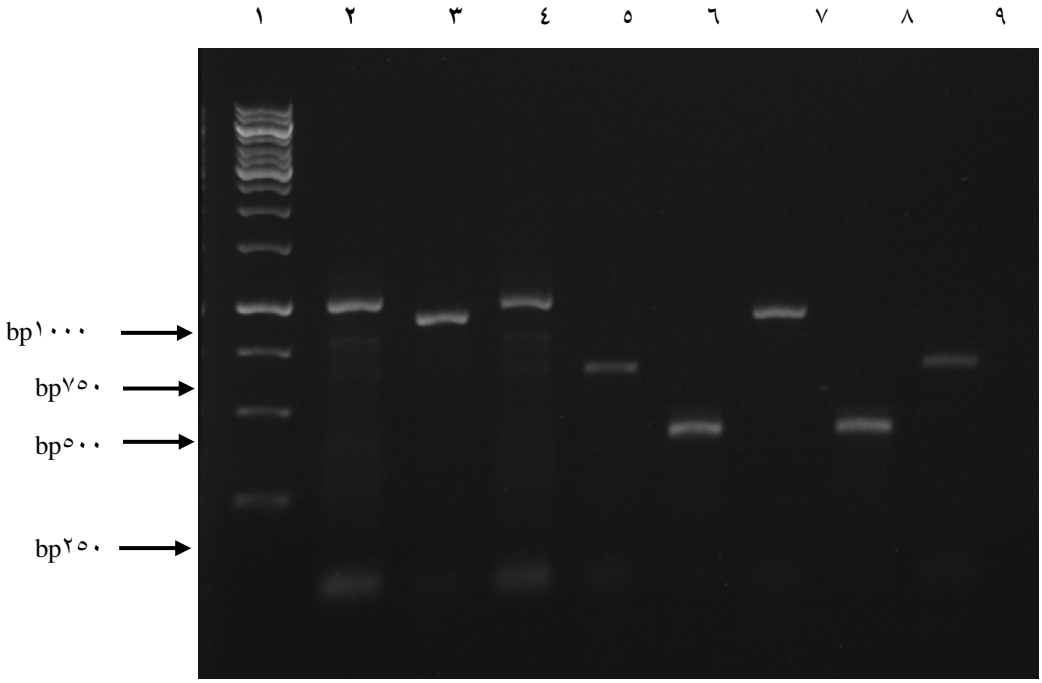
تعیین MIC، مقاومت به ونکومایسین را برای ٦۳ (۲۱/٦٪)سویه نشان داد. از این تعداد، ۱۵ (۲۳/۸٪)سویه *انتروکوکوس فسیوم* بود که مقاومت کامل به ونکومایسین داشتند (MICs, ≥32 µg/ml). ٤۸ (۷٦/۱٪)سویه دیگر، *انتروکوکوس فکالیس* یا *انتروکوکوس فسیوم* و دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین بودند (MICs, 8-16 µg/ml).

اجرای روش PCR، مقاومت به ونکومایسین را برای ۱۵(۵/۱٪)سویه انتروکوک اثبات کرد. این سویه‌ها همگی، *انتروکوکوس فسیوم* بودند و ژنوتیپ مقاومت در آنها *vanA* (n=12) و *vanB* (n=3) بود. ٤۸ سویه دیگر که با روش‌های فنوتیپی، مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند دارای ژنوتیپ‌های *vanA* (n=12) و *vanB* (n=27) بودند. ۹ سویه انتروکوک که با روش‌های فنوتیپی، مقاومت حد واسط به ونکومایسین نشان دادند، ژن‌های *vanA* یا *vanB* در آنها شناسائی نشد. احتمال می‌رود این سویه‌ها متعلق به ژنوتیپ‌های دیگر غیراز *vanB/vanA* باشند که در این مطالعه بررسی نشدند. در مجموع، روش PCR وجود ژنوتیپ *vanA* را در ٢٤ سویه مقاوم ۳۸٪ و *vanB* را در ۳۰ سویه مقاوم ٤۷/٦٪ انتروکوک اثبات کرد. (جدول ۱، شکل ۱).

بیشترین سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین به ترتیب از بیماران بستری شده در بخش‌های هماتولوژی/انکولوژی وICU ایزوله گردید. مقاومت کامل به ونکومایسین (MICs, ≥32 µg/ml) در بخش‌های عفونی، سوختگی و بیماران سرپایی مشاهده نشد اما، سویه‌هایی با مقاومت حد واسط به ونکومایسین (MICs, 8-16 µg/ml) از این بیماران جدا گردید. در مجموع، مقاومت به ونکومایسین در بیماران بستری، با ٥٤(۸۵/۷٪) سویه دارای مقاومت کامل یا حد واسط به ونکومایسین به‌ویژه در بخش‌های (هماتولوژی/انکولوژی و ICU)در مقایسه با بیماران غیر بستری با ۹(۱٤/۲٪)سویه دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین، بیشتر بود. به‌علاوه، از بیماران سرپایی، انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین جدا نشد.

جدول۱ : آزمایش PCR برای سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین

سویه انتروکوک تعداد (درصد)	ونکومایسین MIC (µg/ml)	ژنوتیپ (تعداد سویه)
انتروکوکوس فسیوم ۴۲ (٪۶۶/۶)	۲۵۶	*van A* (۱۲) *van B* (۳)
	۸ –۱۶	*van A* (۶) *van B* (۱۸) Negative (۳)
انتروکوکوس فکالیس ۱۵ (٪۲۳/۸)	۸ –۱۶	*van A* (۶) *van B* (۹)
انتروکوک غیر از گونه های *فکالیس/فسیوم* ۶ (٪۹/۵)	۸ –۱۶	Negative (۶)



شکل ۱ : الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

ستون یک سایز مارکر (1 Kbp)، ستون‌های ۲و۴ *vanA* (1,030 bp)، ستون‌های ۳و۷ *انتروکوکوس فکالیس* (941 bp)،ستون‌های ۵و۹ *انتروکوکس فسیوم* (658 bp)، ستون‌های ۶و۸ *vanB* (433 bp).

بحث:

در این مطالعه میزان کلنیزاسیون روده‌ای سویه‌های VRE در میان بیماران بستری در بخش‌های بیمارستانی پرخطر و همچنین گروهی از بیماران سرپائی بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان حساسیت به ونکومایسین در سویه-های انتروکوک از بیماران بستری در مقایسه با بیماران سرپایی کاهش قابل توجهی دارد. بدین ترتیب که از مجموع سویه‌های مقاوم جداشده تنها ۱٤/۲درصد با مقاومت حد واسط از بیماران سرپایی جدا شد و انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین فقط از بیماران بستری جدا شد. به عبارت دیگر ۱٤/۲ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین از بیماران سرپائی جدا شد در حالیکه ۸۵/۷ درصد از این سویه‌ها متعلق به بیماران بستری است. شیوع زیاد مقاومت به ونکومایسین در بیماران بستری در مقایسه با افراد غیر بستری، در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است. از جمله Taylor و همکاران در مطالعه خود شیوع سویه‌های مقاوم به ونکومایسین را در بیماران بستری ۳۲ درصد و در بیماران غیر بستری ۲/۳ درصد گزارش کرده-اند(۱٤). در مطالعه مشابهی که Kolar و همکاران بر روی نمونه‌های رکتال سوآب افراد غیر بستری انجام دادند مقاومت به ونکومایسین، ۱/٦ درصد گزارش شد(۱۵). با این وجود، برخی مطالعات نیز مقادیر زیادتری از مقاومت را در بیماران غیر بستری گزارش می‌کنند. از جمله Gambarotto و همکاران مقاومت به ونکومایسین را در بیماران بستری ۳۷ درصد و در افراد غیر بستری ۱۱/۸ درصد گزارش می کنند(۱).

بررسی ژن‌های *vanA* و *vanB* با اجرای فناوری PCR، وجود مقاومت کامل به ونکومایسین را در ۵/۱ درصد از سویه‌های انتروکوک ثابت کرد. این سویه‌ها همگی *انتروکوکوس فسیوم* بود که ۸۰ درصد ژنوتیپ *vanA* و ۲۰ درصد ژنوتیپ *vanB* دارند. ۱۳/٤ درصد سویه‌های انتروکوک دارای مقاومت متوسط به ونکومایسین هستند، ژنوتیپ‌های *vanA* یا *vanB* دارند که شامل ۳۸/٤ درصد *انتروکوکوس فکالیس* و ٦۱/۵ درصد *انتروکوکوس فسیوم* هستند. نکته جالب توجه آنکه جداسازی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* (٦٤/۵ درصد) نسبت به *انتروکوکوس فسیوم* (۲۹/۵ درصد) بیشتر بود، اما مقاومت حد واسط یا مقاومت کامل به ونکومایسین، در ٦٦/٦ درصد از سویه‌های *انتروکوکوس فسیوم*وجود دارد. تنها ۲۳/۸ درصد از سویه‌ها با مقاومت حد واسط به ونکومایسین متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* هستند. این مورد می تواند تایید کننده فراوانی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و همچنین شیوع زیادتر مقاومت به ونکومایسین در میان سویه‌های *انتروکوکوس فسیوم* باشد. همچنانکه IVEN و همکاران در مطالعه سویه‌های انتروکوک جدا شده از مدفوع، شیوع مقاومت به ونکومایسین را در *انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب ۳۰/۲ درصد و ۱۳/۹ درصد گزارش کرده‌اند(۸). در مطالعه Kuriyama و همکاران، این مقاومت به ترتیب ٦٦/٤ درصد و ۳۳/۵ درصد گزارش شده‌است (۱٦).

با اینکه تعداد سویه‌های دارای مقاومت کامل به ونکومایسین در این مطالعه، نسبتا" کم است اما، این نتیجه از دو دیدگاه حائز اهمیت می‌باشد: اول اینکه سویه‌های انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین، مقاومت سطح بالا به ونکومایسین دارند (MICs, ≥ 256 µg/ml). دوم اینکه علی‌رغم تعداد نسبتا" کم مقاومت کامل به ونکومایسین، گروه بزرگتری از سویه‌ها مقاومت حد واسط به ونکومایسین دارند. این امر گویای پیشرفت مقاومت به این آنتی بیوتیک در میان سویه‌های انتروکوک در جمعیت بیماران مورد بررسی است. Bell و همکاران در مطالعه خود، مقاومت حد واسط را در ۲۰ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش کردند(۱۷). Gordts و همکاران مقاومت حد واسط را فقط در ۱۸/۱ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش کردند (۲). در صورتی که در مطالعه kolar و همکاران مقاومت حد واسط در ۷۷/۷ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش شده است (۱۵). در مطالعه حاضر مقاومت حد واسط در ۷٦/۱ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین مشاهده گردید. لذا، نسبت سویه‌های انتروکوک دارای مقاومت کامل یا حد واسط به ونکومایسین در مطالعات مختلف متفاوت است و با گونه‌های انتروکوک جدا شده و ژنوتیپ‌های مختلف عامل مقاومت متناسب می باشد.

با وجود اینکه بررسی نمونه‌های مدفوع یا رکتال سوآب در بیماران بخش‌های پرخطر جهت شناسائی اولیه انتروکوک‌های مقاوم به آنتی بیوتیک به‌ویژه سویه‌های VRE، توسط سازمان‌های بهداشتی و در مقالات متعدد بین المللی مورد تاکید قرار گرفته اما هنوز روش قابل قبول و مورد توافقی برای این کار معرفی نشده است. مطالعات متعدد در نقاط مختلف دنیا، استفاده از روش‌های

مختلف با بکارگیری محیط‌های کشت متفاوت، بدون آنتی بیوتیک یا همراه با غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک، را تجربه کرده‌اند(۲، ۵ ، ۸ ، ۱۳ ، ۱٤ ، ۱۷ ، ۱۸). بنابراین چون نتایج ارائه شده در مقالات مختلف ممکن است از نظر روش بکار رفته جهت جداسازی باکتری، محیط‌های کشت مورد استفاده، بیماران مورد نظر و حجم جامعه آماری متفاوت باشد، مقایسه نتایج را می‌تواند با مشکل مواجه کند. با این حال، میزان حاملین روده‌ای VRE را در نقاط مختلف دنیا متفاوت و اکثرا" رو به افزایش گزارش می کنند. Gordts و همکاران در بلژیک در سال ۱۹۹۵، حاملین روده‌ای VRE را ۳/۵ درصد گزارش کرده‌اند که ۸۲ درصد این سویه‌ها مقاومت سطح بالا و ۱۸ درصد مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند(۲). Iven و همکاران در بلژیک در سال ۱۹۹۹، حاملین روده‌ای VRE را ۱۲/۸ درصد گزارش کرده‌اند(۸). Taylor و همکاران در انگلستان در همان سال این میزان را ۱۲/۲ درصد گزارش کرده‌اند که شامل ۵۹ درصد ژنوتیپ *vanA* و ٤۱ درصد ژنوتیپ *vanB* می‌باشد. در این مطالعه فراوانی سویه‌های مقاوم در بیماران بستری ۳۲ درصد و در بیماران سرپائی ۲/۳ درصد گزارش شده‌است(١٤). Gikas و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۵، حاملین روده‌ای VRE را ۲۰/۵ درصد گزارش کرده‌اند(۱۸). در مطالعه حاضر میزان حاملین روده‌ای VRE در بیماران بخش‌های پر خطر بیمارستانی براساس شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB*، ۱۸/۵ درصد بود. در این مطالعه مقاومت کامل به ونکومایسین در سویه‌های جدا شده از بیماران سرپائی مشاهده نشد.اما، برخی مطالعات مشابه درصدهای بالائی از مقاومت را در این بیماران گزارش کرده‌اند(۱، ۱۹).

در مجموع، اجرای PCR ، وجود مقاومت با ژنوتیپ *vanA* را در ۸/۲ درصد و مقاومت با ژنوتیپ *vanB* را در ۱۰/۳ درصد از سویه‌های جدا شده اثبات کرد. با توجه به اینکه ژنوتیپ *vanB* در انتروکوک عمدتا" عامل ایجاد مقاومت متوسط تا سطح بالا به ونکومایسین می باشد(۳) شیوع سویه‌های دارای ژنوتیپ *vanB* در کنار شیوع سویه‌های انتروکوک با مقاومت حد واسط به ونکومایسین در این مطالعه می تواند تا حدی توجیه کننده این فراوانی باشد. هر چند که در برخی مطالعات نیز شیوع ژنوتیپ *vanA* گزارش شده‌است(١٤).

امروزه انتروکوک مقاوم به گلیکوپپتید برای بیماران بستری در بیمارستان به یک معضل بزرگ درمانی مبدل شده‌است. VRE، نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA)، به‌عنوان یک عامل بسیار مهم در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، موجب افزایش میزان عفونت و مرگ و میر در بیماران بستری می‌شود(۲). با وجودی که به‌نظر می‌رسد در ایران، میزان شیوع سویه‌های VRE در نمونه‌های بالینی در حد نسبتا" کمی باشد، اما بروز مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از موارد عفونت، در برخی از مطالعات می تواند زنگ خطری برای پیدایش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم توسط این سویه‌ها باشد. از جمله می توان به مطالعه‌ای در بیمارستان لبافی نژاد تهران (در سال ۲۰۰۵) اشاره کرد. در این مطالعه تمام سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه-های ادرار بیماران بستری، حساس به ونکومایسین بود، در حالیکه، ۷۰ درصد سویه‌های *انتروکوکوس فیسیوم* مقاوم به ونکومایسین بودند(۲۰). با این وجود اطلاعات در مورد اپیدمیولوژی، میزان شیوع کلنیزاسیون روده‌ای و نسبت حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در داخل و خارج محیط‌های بیمارستانی در ایران بسیار اندک می باشد. مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که VRE می‌تواند به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی در روده بیماران، در محیط-های داخل و خارج بیمارستان مستقر شود و کلنیزاسیون روده‌ای مهم‌ترین و معمول‌ترین مسیر انتشار این باکتری‌ها محسوب می‌گردد(۲۲،۲۱). با وجود اینکه مطالعات بسیاری در مورد اپیدمیولوژی این باکتری‌ها در نمونه‌های مدفوع در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، اما اطلاعات مستند در مورد فراوانی این سویه‌ها در ایران بسیار اندک است و تجربیات موجود عمدتا" بر روی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی است.

همانطور که پیشتر اشاره شد اکثر مطالعات داخلی به بررسی مقاومت سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و موارد عفونت پرداخته‌اند. لذا، مطالعه بر روی حاملین روده‌ای انتروکوک محدوداست. در تجربه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در بیمارستان نمازی شیراز و بر روی نمونه مدفوع بیماران همودیالیزی انجام شد حاملین روده‌ای VRE، ٦/۲ درصد (۹ بیمار از مجموع ١٤٦ بیمار) گزارش گردید(۲۳). در مطالعه مشابه در بیمارستان امیر علم تهران، میزان مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه مدفوع بیماران بستری ۱/٤۲ درصد و در بیماران دارای نارسائی کلیه و تحت همودیالیز، ۷/۵۲ درصد (۷ بیمار از مجموع ۹۳ بیمار همودیالیزی) گزارش شده

است(۲٤). میزان زیادتر مقاومت در بیماران همودیالیزی در مطالعه اخیر، با شرایط ویژه این بیماران، که جزو گروه‌های پر خطر برای کلنیزاسیون و عفونت انتروکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک محسوب می‌شوند سازگار است. در مطالعه حاضر از مجموع ۲٤ بیمار همودیالیزی، مقاومت به ونکومایسین در ۱۲/۵ درصد مشاهده شد. مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز جهت بررسی کلنیزاسیون روده‌ای VRE در بیماران بستری در بخش‌های مختلف، با روش Agar Dilution انجام شد نشان داد که ۱٤/۱ درصد از بیماران، حامل روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین هستند(۲۵).

نتایج مطالعه حاضر، در مقایسه با مطالعات مشابه نسبتا" بالا است که لزوم توجه جدی به این موضوع راگوشزد می‌کند. همانطورکه پیشتر اشاره شد انتروکوک، فلور طبیعی روده انسان است و اکثر عفونت‌های آن منشاء اندوژن دارند. لذا، کلنیزاسیون روده‌ای مهم‌ترین و معمول‌ترین مسیر برای انتشار این باکتری است(۱٦،۱۵). از سوی دیگر درمان عفونت‌های انتروکوکی به‌ویژه در بیماران بستری در بخش‌های خاص همیشه با مشکل مواجه است و تدابیر درمانی ویژه‌ای را طلب می‌کند.

نتیجه‌گیری:

برای عفونت‌های انتروکوکی مقاوم به بتالاکتام وآمینوگلیکوزید، ونکومایسین درمان جایگزین محسوب می‌شود. لذا، مقاومت به این آنتی بیوتیک درمان عفونت-های انتروکوکی را با مشکل جدی مواجه خواهد کرد. از سوی دیگر افزایش میزان حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان‌ها به‌عنوان یک منبع بالقوه عفونت بیمارستانی می‌تواند هشداری بسیار جدی برای انتشار این سویه‌ها باشد. لذا، کمیته‌های کنترل عفونت بیمارستانی جهت آگاهی از میزان کلنیزاسیون روده‌ای انتروکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک باید برنامه کشت‌های نظارتی از نمونه‌های مدفوع یا رکتال سوآب بیماران بستری شده در بیمارستان به‌ویژه بیماران دارای شرایط خاص را به‌صورت دوره‌های متناوب و منظم انجام دهند. با توجه به تجربه انجام شده در مطالعه حاضر، جداسازی سویه‌های انتروکوک از نمونه مدفوع و ارزیابی مقاومت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک با روش‌های فنوتیپی همچون انتشار از دیسک ، تعیین MIC و انجام E-test کاری دشوار، پر هزینه و وقت گیر است و نتایج آن ممکن است صحت و دقت روش‌های مولکولی همچون PCR را نداشته باشد. در صورتیکه استفاده از پرایمرهای اختصاصی و بکارگیری مستقیم روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR جهت شناسایی مقاومت به گلیکوپپتید بر روی نمونه‌های بالینی و یا بر روی کشت می‌تواند علاوه بر تسریع شناسایی انتروکوک-های مقاوم، امکان شناسائی ژن‌های عامل مقاومت و تعیین گونه مقاوم را نیز فراهم آورد.

فهرست مراجع:

1. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, *et al*. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol*, 2000; **38**(2): 620-624.
2. Gordst B, VanLanduyt H, Ieven M, VanDamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 1995; **33**(11): 2842-2846.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Glen Mayhall C. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbial Rev*, 2000; **13**(4): 686-707.
4. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptides resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; **37** (8): 1563-1571.
5. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; **33**(1): 24-27.
6. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AMG, Lambert EJ, *et al*. Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003; **41**(6): 2483-2486.
7. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997; **35**(9): 2325-2330.

8. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, VanLaer F, Goossens H. Comparision of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptides-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 1999; **37** (5): 1436-1440.
9. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbial*, 1989; **27**(12): 731-734.
10. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Envirom Microbio,*1999; **65**(10): 4425-4430.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 6th edition. CISI document, 2006; M7-A7. Wayne, Pa.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests: 16th informational supplement. CLSI document M100-S16, 2006; Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne, Pa.
13. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 2000; **38**(8): 3093-2-3095.
14. Taylor ME, Oppenheim BA, Chadwick PR, Weston D, Palepout MFI, Woodford N, *et al*. Detection of Glycopeptides-resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. *J Hosp Infect*, 1999; **43**: 25-32.
15. Kolar M, Cekanova L, Vagnerova I, Kesselova M, Sauer P, Koukalova D, *et al.* Molecular-Biological analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from a community in the Czech republic. *Biomed Papers*, 2004; **148**(2): 167-169.
16. Kuriyama T, Williams DW, Patel M, Lewis MAO, Jenkins LE, Hill DW, *et al.* Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. *J Med Microbial,* 2003; **52**(10): 821-827.
17. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vacomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbial*, 1998; **36**(8): 2187-2190.
18. Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikoladis P, Skoutelis A, levidiotou S, *et al*. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant Enterococci in Greek hospitals. *J Clin Microbial*, 2005; **43**(11): 5796-5799.
19. Heier KIH, Claus H, Bohme G, Marin S, Seltmann G, Hakenbeck R, *et al*. *E. faecium* strains with *vanA* mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animals foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist*, 1995; **1**:265-272.
20. Feizabadi MM, Sayadi S, Shokrzadeh L, Parvin M, Yadegaryian D. Increase in prevalence of vancomycin resistant isolates of *Enterococcous faecium* at Labbafinejad hospital. *Iran J Clin Infect Dis,* 2008; **3**(2): 73-77.
21. Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J Antim Microb Chemother*,1994; **34**: 515-528.
22. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, Perez-Diaz C, Baquero F. *Van-A* mediated vancomycin resistant *Enterococcus* spp. In sewage. *J Anntimicrob,* 1994; **33**: 553-561.
23. Assadian O, Askarian M, Stadler M, Shaghaghian S. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz, Iran. *BMC Infect Dis,* 2007; **7**(52): 1-5.
24. Hasibi M, Rezaii J, Mohajer Iravani B, Moslemi SB, Rahimi H, *et al*. Hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci: A report of 2-year experience. *Acta Medica Iranica,* 2009;**47**(6):469-472.
25. Askarian M, Afkhamzadeh R, Monabbati A, Daxboek F, Assadian O. Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. *Inter J Infect Dis*, 2008; **12**: 171-175.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات۷۳-۶۶

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی مولکولی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف TEM و SHV در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* با مقاومت چندگانه جدا شده از ادرار بیماران بستری در بیمارستان‌های کرمان، ۸۷-۱۳۸۶

شهلا منصوری[۱]،داوود کلانتر*[۱] ، مصطفی شکوهی[۲]، ثمانه عباسی[۱]

۱) گروه میکرب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
نویسنده رابط: داوود کلانتر، گروه میکرب‌شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان.
همراه: ۰۹۱۹۳۹۱۶۶۱۰ Davoud1362@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۱۷

چکیده:

زمینه و اهداف: *اشریشیاکلی* از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت‌های ادراری است. وجود مکانیسم-های مختلف ایجاد مقاومت به ویژه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف($ESBL_S$) درمان عفونت‌های حاصل از آن را مشکل کرده است. شناسایی الگوی مقاومت و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند TEMو SHV که شایع می‌باشند برای درمان مناسب عفونت‌های این باکتری ضروری است. هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از ادرار بیماران بستری و شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف TEMو SHV در آنها بود.

روش بررسی : این بررسی بر روی ۱۱۵ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری در سه بیمارستان شهر کرمان انجام شد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد برای آنتی-بیوتیک‌های مختلف با روش رقت در آگار تعیین شد. از روش دیسک ترکیبی برای تعیین $ESBL_S$ استفاده شد. از DNA پلاسمیدی و کروموزومی جهت شناسایی ژن بتالاکتامازهای TEM وSHV با روش PCR استفاده شد.

یافته ها : ۸۶ ایزوله (۷۴/۷٪)حداقل به سه آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف مقاوم بودند که به‌عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چندگانه در نظر گرفته شدند. کمترین میزان مقاومت به سفتیزوکسیم در ۷ (۱۴/۷٪) ایزوله و بیشترین مقاومت به آموکسی‌سیلین و تری متوپریم/ سولفامتوکسازول به ترتیب در ۱۰۸ (۹۴٪) و ۱۱۰ (۹۵٪) ایزوله بود. جمعاً ۷۶ ایزوله (۶۶٪) تولید کننده $ESBL_S$ بودند. در آزمایش PCR بر روی DNA پلاسمیدی و کروموزومی در مجموع ۴۸ ایزوله (۴۱/۷٪) دارای ژن TEM و ۳۹ ایزوله (۳۳/۹٪) دارای ژن SHV و ۲۰ ایزوله (۱۷/۳٪) دارای هر دو ژن بودند.

نتیجه گیری: مقاومت چندگانه در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* در عفونت‌های ادراری زیاد است. به علت مقاومت بالا، تری متوپریم/ سولفامتوکسازول و آموکسی‌سیلین جهت درمان عفونت‌های ادراری ناشی از این باکتری توصیه نمی‌شوند. در مجموع فراوانی ژن TEM بیشتر از SHV است.

واژه های کلیدی :عفونت بیمارستانی، عفونت ادراری، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ، مقاومت چندگانه، *اشریشیاکلی*

مقدمه:

عفونت مجاری ادراری(UTI) یکی از شایع ترین عفونت-های بیمارستانی می باشد، که ممکن است با علامت یا بدون علامت باشد. اگرچه چندین نوع میکروارگانیسم از جمله قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها می‌توانند باعث عفونت‌های ادراری شوند ولی باکتری‌ها از مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل هستند(۱). این عفونت‌ها از مخازن و منابع مهم گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌ها به شمار می روند، که سبب افزایش هزینه‌های درمانی عفونت‌های حاصل از این نوع باکتری‌ها می شوند(۲). امروزه درمان بیماران مبتلا به عفونت با باکتری‌ها به‌علت افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در دنیا با مشکل مواجه شده است(۳). در این رابطه ایزوله‌های دارای فنوتیپ مقاومت به چند دارو (Multiple Drug Resistance)از اهمیت خاصی برخوردارند. استفاده وسیع و نادرست از عوامل ضدمیکربی، در بین دیگر عوامل خطر منجر به ایجاد باکتری‌های مقاوم به چند دارو می گردد. *اشریشیاکلی* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های ادراری است. بیش از ۸۵ ٪ عفونت‌های دستگاه ادراری به‌خصوص در زنان جوان و حامله به وسیله این ارگانیسم ایجاد می‌شود. این عفونت‌ها به‌صورت سیستیت، پیلونفریت، سالپژیت و باکتریوری مشاهده می-شوند (٤).

یکی از عوامل اصلی مقاومت در این باکتری پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز به‌ویژه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) است. در اکثر موارد مقاومت اکتسابی بتالاکتامازها سبب مقاوم شدن باکتری به طیف وسیعی از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر فلوئوروکئینولون‌ها، آمینو گلیکوزیدها و غیره می گردد که درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با مشکلات جدی روبرو می‌سازد (۵). این آنزیم‌ها که بسیاری از آنها بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) نامیده می‌شوند، به چهار گروه اصلی A تا D تقسیم می شوند. گروه A که سبب هیدرولیز پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌های با طیف اثر کم و وسیع می‌شود، شامل TEM.1,TEM.2 وSHV.1 است. این گروه تا کنون در باکتری‌هایی مانند *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنمونیه* شناسایی شده‌اند. گروه B ، شامل متالوبتا لاکتامازهای وابسته به روی(Zn) می‌باشند که قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها هستند. این گروه در باکتری‌هایی مانند *پسودوموناس آئروژینوزا* و *سراشیامارسنس* گزارش شده‌است. گروهC ،که از آنها می-توان AmpCها را نام برد ، قادر به تجزیه سفومایسین‌ها می‌باشند. گروه D، بتالاکتاماز با قدرت هیدرولیز زیاد مانند OXA بر علیه اکساسیلین و کلوکساسین هستند که اسید کلاولانیک به‌طور ضعیف از فعالیت آنها جلوگیری می-کند(٦). در این تقسیم‌بندی آنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف TEMوSHV که در گروه A قرار دارند به طور وسیعی در *اشریشیاکلی* گزارش شده‌اند، این آنزیم‌ها سبب هیدرولیز آمپی‌سیلین، کاربنی‌سیلین، اکساسیلین، سفالوتین و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌گردند و معمولا توسط ژن‌های پلاسمیدی رمز دهی می شوند(۷). مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها به‌ویژه سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و حتی سفالوسپورین های نسل چهارم مانند سفپیم و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کینولون‌ها و نیز تری‌متوپریم/ سولفامتوکسازول که زمانی درمان انتخابی برای بسیاری از عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری بود مشکلات جدی را در درمان به‌وجود آورده است(۳). بسیاری از ژن-های رمز دهی کننده عوامل مقاومت مانند TEM و SHV بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال قرار دارند. بنابراین، بررسی الگوی مقاومت دارویی و شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای شایع، که امروزه یکی از دلایل اصلی مقاومت این باکتری می باشند، ضروری است. این مطالعه با هدف تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از ادرار بیماران بستری در بیمارستان‌های کرمان و شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف TEM وSHV در سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸٦انجام شد.

مواد و روش ها :

این مطالعه توصیفی درسال ۸۷-۱۳۸٦ بر روی ۱۱۵ ایزوله *اشریشیاکلی* انجام پذیرفت. ایزوله‌ها از نمونه ادرار بیماران بستری در دو بیمارستان دانشگاهی و یک بیمارستان تامین اجتماعی (بیمارستان های افضلی پور، شهید باهنر و آیت‌ا.. کاشانی) جدا شدند. نمونه‌هامربوط به بیماران مبتلا به عفونت ادراری بود که شمارش کلنی آنها معادل یا بیشتر از 10^5 باکتری در هر میلی لیتر بود. ایزوله‌ها بعد از تعیین هویت در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (Trypticase Soy broth: TSB) (شرکت Merck) حاوی ٤۰٪ گلیسرول و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقاومت ایزوله‌ها به ایمیپنم، سفوتاکسیم، سفالکسین، نالیدیکسیک اسید، سفتازیدیم، آموکسی‌سیلین، سفالوتین،

سفتی زوکسیم، تتراسایکلین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول ،جنتامایسین و سیپروفلوکساسین (تهیه شده از شرکت MAST)با روش رقت در آگار به‌وسیله دستگاه Hand inculator(MAST) تعیین شد. برای مقاومت به سفپیم از روش انتشار از دیسک استفاده شد(۸). ایزوله-ای که در روش رقت در آگار به یک یا چند سفالوسپورین وسیع الطیف مقاوم بود از نظر آنزیم‌های ESBLs بررسی می‌شد. برای شناسایی آنزیم‌های ESBLs از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودکسیم با غلظت ۳۰µg به تنهایی و همراه با کلاوولانیک اسید (۱۰µg) (تهیه شده از شرکت MAST) به فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر بروی محیط تلقیح شده قرار داده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ایزوله‌هایی ESBL مثبت منظور می‌شدند که در آنها نسبت قطر هاله عدم رشد دیسک حاوی کلاوولانیک اسید همراه با سفالوسپورین به دیسک حاوی سفالوسپورین به تنهایی مساوی یا بیشتر از ۱/۵ سانتی‌متر بود(۹).از سویه‌های استاندارد *E.coli ATCC 25922*، *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* و *Klebsiella pneumoniae ATCC* 700603 به ترتیب به‌عنوان شاهدهای آنتی بیوگرام و تولید ESBLs استفاده شد(۱۰)

استخراج DNA: ایزوله‌های تولید کننده ESBLs برای شناسایی بتالاکتامازهای TEM و SHV به روش PCR بررسی شدند. از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer جهت بررسی پلاسمیدی استفاده شد و DNA کروموزومی به روش فنل کلروفرم استخراج شد(۱۱)

برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای bla_{SHV} و bla_{TEM} آزمایش PCR با دستگاه ترموسایکلر MWG(Primus) و در شرایط زمانی و دمایی زیر انجام شد. مرحله اول (Initial Denaturation) یک سیکل در °C ۹۵ به مدت یک دقیقه برای DNA پلاسمیدی و سه دقیقه برای DNA کروموزومی، مرحله دوم(Denaturation)، ۲۵ سیکل در °C ۹۵ به مدت یک دقیقه، مرحله سوم (Annealing)، ۲۵ سیکل به مدت یک دقیقه در °C ۶۰ برای ژن SHV و °C ۴۸ برای ژن TEM، مرحله چهارم (Extension) ۲۵ سیکل به مدت یک دقیقه در °C ۷۲ و مرحله نهایی(Final Extension) یک سیکل به مدت ۱۰ دقیقه در °C ۷۲.

پرایمرهای F با توالی 5′-AAGATCCACTATCGCCAGCAG-3′ و R با توالی 5′-ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG-3′، برای آمپلیفیکاسیون ژن bla_{SHV} به طول 200bp، F با توالی 5′-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC-3′ و R با توالی 5′-TAATCAGAGGCACCTATCTC-3′ برای آمپلیفیکاسیون ژن bla_{TEM} به طول 800bp انتخاب شدند و از شرکت سینا ژن تهیه شدند(۱۲).

مخلوط واکنش PCR شامل ۱۲/۵µl از PCR Master Mix تهیه شده از شرکت سیناژن، ۹/۵µl آب دیونیزه استریل و ۱µl از هر یک از پرایمرها برای هر ژن بعلاوه ۱µl از DNA الگو بود. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز(سیناژن) ۱/۵٪ با بافر Tris- borate EDTA(TBE) الکتروفورز شد. ژل با محلول اتیدیوم بروماید(Merck) ۰/۵ µg/ml رنگ شد. برای مشاهده ژن‌های TEM و SHV از دستگاه UV gel documentation استفاده شد. در کلیه مراحل PCR از *Klebsiella pneumoniae ATCC* 700603 به عنوان شاهد مثبت برای ژن TEMوSHV استفاده شد(۱۳). جهت تعیین اندازه محصول PCR از DNA مارکر (100bp DNA Ladder) شرکت Fermentas استفاده شد.

یافته ها:

حداقل غلظت مهار رشد (MIC): میزان MIC ایمیپنم در تمام (۱۰۰٪) ایزوله‌ها مساوی یا کمتر از ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نشان دهنده حساسیت کامل به این آنتی‌بیوتیک بود. تمام (۱۰۰٪) ایزوله‌ها حداقل به دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند. ۸۶ ایزوله (۷۴/۷٪) حداقل به سه آنتی بیوتیک از کلاس‌های مختلف مقاوم بودند که به-عنوان مقاومت چندگانه (Multiple drug resistance : MDR) در نظر گرفته شدند. بیشترین مقاومت به‌طور همزمان مربوط به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، آموکسی-سیلین و تتراسایکلین بود. در ۶۳ ایزوله (۵۵٪) مقاومت به چهار کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت دیده شد. کمترین مقاومت دارویی ایزوله‌ها مربوط به سفتیزوکسیم و بیشترین مقاومت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول بود(جدول ۱).

تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) : ۷۶ ایزوله(۶۶٪) به روش دیسک ترکیبی تولید کننده ESBL بودند(شکل ۱).

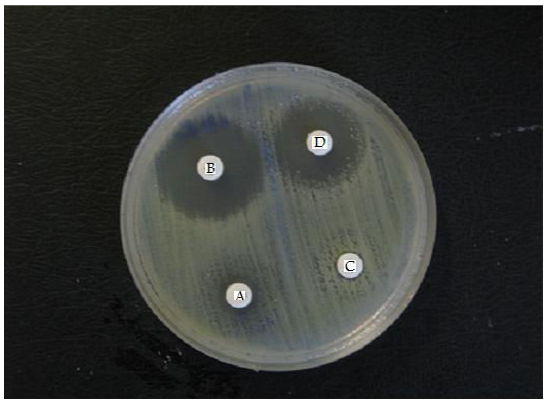
جدول ۱: مقاومت دارویی ایزوله‌های *اشریشیاکلی*

داروی ضد میکروبی	مقاوم تعداد(درصد)	MIC(µg/ml)		
		MIC_{50} *	MIC_{90} **	محدوده MIC حداقل(حداکثر)
سفتی زوکسیم	۱۷ (۱٤/۷)	۱٦	٦٤	۳۲(۱۲۸)
جنتامایسین	٤۷(٤۰)	۸	۱۲۸	۸(۱۰۲٤)
سفوتاکسیم	٥۱(٦۷)	٦٤	۱۲۸	۳۲(۱۰۲٤)
سیپروفلوکساسین	٥۷ (٤۹/٥)	۱۲۸	٥۱۲	٤(۱۰۲٤)
سفتازیدیم	۷٤ (٦٤)	۱۲۸	٥۱۲	۳۲(۱۰۲٤)
سفالکسین	۸٤ (۷۱/۳)	۱۰۲٤	۱۰۲٤	۳۲(۱۰۲٤)
نالیدیکسیک اسید	۸٦ (۷٤/۷)	۱۰۲٤	۱۰۲٤	۳۲(۱۰۲٤)
تتراسایکلین	۹٤(۸۱/۷)	۱۲۸	٥۱۲	۱٦(۱۰۲٤)
آموکسی سیلین	۱۰۸ (۹٤)	۱۰۲٤	۱۰۲٤	۳۲(۱۰۲٤)
تری متوپریم/ سولفامتوکسازول	۱۱۰ (۹٥)	۱۰۲٤	۱۰۲٤	۸(۱۰۲٤)
سفپیم	۳۸(۳۳)	n.d	n.d	n.d

*. حداقل غلظت مهار رشد برای ۵۰٪ ایزوله‌ها

**. حداقل غلظت مهار رشد برای ۹۰٪ ایزوله‌ها

n.d. تعیین نشده‌است.

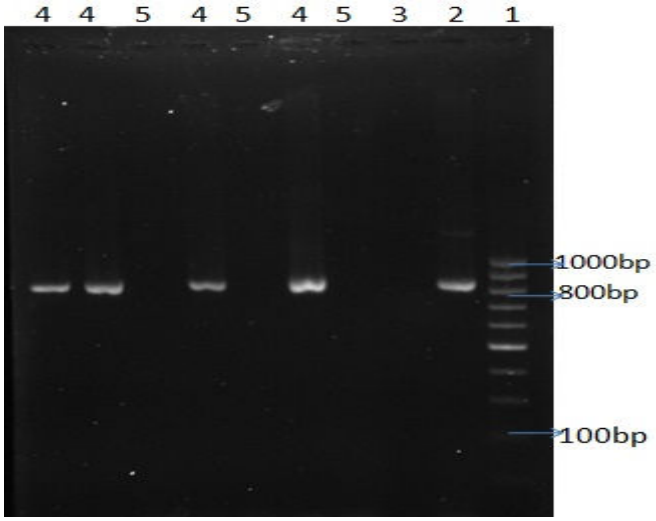


شکل ۱ : *اشریشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف.

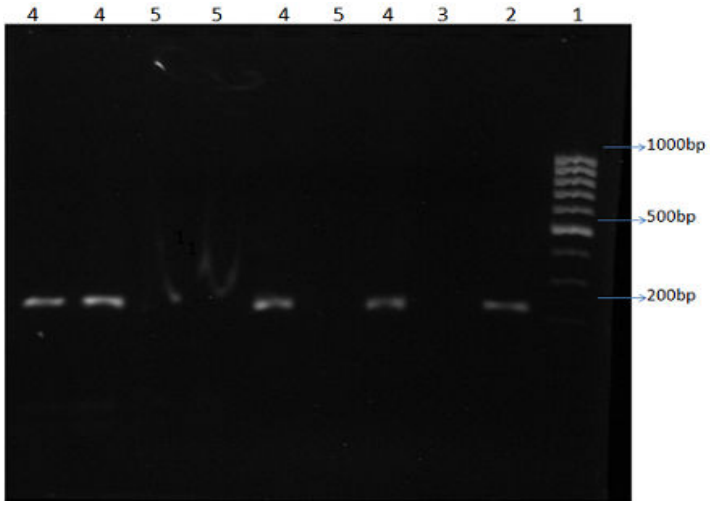
(A= Cefotaxime; B= Cefotaxime + Clavulanic acid; C= Ceftazidime; D= Ceftazidime + Clavulanic acid)

اسید کلاولانیک باعث مهار آنزیم‌های بتالاکتاماز و تشکیل هاله عدم رشد شده است.

آزمایش PCR بر روی DNA پلاسمیدی نشان داد که ٦٠ ایزوله (٧٨/٩٪)، از ٧٦ ایزوله تولید کننده ESBL با مقاومت چند گانه، دارای ژن‌های TEM و SHV بودند. ٣٠ ایزوله (٣٩/٥٪) ژن TEM، ٣٠ ایزوله (٣٩/٥٪) ژن SHV و١٤ ایزوله (١٨/٤٪) دارای هر دو ژن بودند. درآزمایش PCR بر روی DNA کروموزومی ٥٨ ایزوله (٧٦/٣٪)، از ٧٦ ایزوله تولید کننده ESBL با مقاومت چند گانه، دارای ژن‌های TEM و SHV بودند. ٣٦ ایزوله (٤٧/٣٪) ژن TEM، ٢٢ ایزوله(٢٨/٩٪) ژن SHV و ٩ ایزوله(١١/٨٪) دارای هر دو ژن بودند. ٦٧ ایزوله (٨٨/٣٪) تولید کننده ESBL دارای بتالاکتامازهای TEM و SHV بودند. ٤٨ ایزوله(٦٣/١٪) ژن TEM ، ٣٩ ایزوله (٥١/٣٪) ژن SHV و ٢٠ ایزوله(٢٦/٣٪) دارای هر دو ژن بودند. ١٢ ایزوله (١٥/٧٪) بتالاکتامازهای TEM و SHV پلاسمیدی و ١٥ ایزوله (١٩/٧٪) کروموزومی داشتند. (شکل‌های ٢و٣).



شکل ٢: شماره ١ مارکروزن مولکولی، شماره٢ شاهد مثبت ژن TEM(800bp)، شماره‌های ٣و٥ شاهد منفی، شماره ٤ ایزوله حاوی ژن TEM



شکل ٣ : شماره١ مارکروزن مولکولی، شماره ٢ شاهد مثبت ژن SHV(200bp) ، شماره‌های ٣و٥ شاهد منفی، شماره ٤ ایزوله حاوی ژن SHV

بحث :

اشریشیاکلی یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های مجاری ادراری است. متاسفانه مصرف بی‌رویه و نادرست آنتی بیوتیک‌ها موجب بروز پدیده مقاومت به اکثر آنها در ایران و جهان شده است (١٤).

در مطالعه‌ای که در سال ٢٠٠٦ در ژاپن برروی *اشریشیاکلی* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری صورت گرفت ٥٠درصد تولید کننده ESBLs بودند که نشان دهنده سیر افزایشی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام از سال ١٩٩٧ تا سال ٢٠٠٣ در این کشور است(١٥). در بررسی‌های سال‌های ١٩٩٩تا ٢٠٠٤ در اروپا برروی *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری مقاومت به آموکسی سیلین و آمپی سیلین ٦٠ درصد و به تری متوپریم سولفومتکسازول ١٠تا ٣٠ درصد گزارش شده‌است (١٦).

در مطالعه سال ٢٠٠٦ در تایوان کلیه ایزوله‌های *اشریشیا کلی* ادراری به سفتازیدیم مقاوم و تولید کننده ESBLs بودند. هیچکدام از ایزوله‌ها به سفپیم و ایمیپنم مقاوم نبودند(١٧). در مطالعه‌ای (٢٠٠٩) در نیوزیلند ٦٥/٥ درصد از ایزوله‌های ادراری *اشریشیا کلی* به بیش از سه آنتی-بیوتیک مختلف مقاوم بودند. بیشترین مقاومت به سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم و توبرامایسین بود، اما هیچکدام به ایمیپنم مقاوم نبودند(١٨). در تهران در سال ٢٠٠٦ تمام ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری به آموکسی سیلین مقاوم بود. میزان مقاومت آنها به سفالکسین ،سفتیزوکسیم و سفوتاکسیم به‌ترتیب ٥٠ درصد، ١/٣ درصد و ٢/٦ درصد و میزان شیوع بتالاکتامازهای TEM وSHV به ترتیب ٦٠ درصد و ٢٦ درصد گزارش شده است (١٩). مقایسه این بررسی و مطالعه حاضر نشان دهنده بالا بودن میزان این نوع از بتالاکتامازها در کشور است. در بررسی که در سال ١٣٨٦ بروی ٢٠٠ ایزوله *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهر تهران انجام شد ٨٣.٥ درصد از مقاومت‌های دارویی مربوط به نمونه‌های ادراری جدا شده بود. در این بررسی ٥٢/٥ درصد از نمونه‌ها تولید کننده ESBL بودند که مانند مطالعه حاضر کمترین مقاومت دارویی به سفتی‌زوکسیم بود و هیچ نوع مقاومتی به ایمیپنم گزارش نشد(٢٠). بیشتر گزارشات در مورد مقاومت دارویی و تولید ESBLs در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری در ایران نشان دهنده حساسیت بسیار بالای آنها به ایمیپنم و سفتی‌زوکسیم است. بیشترین میزان مقاومت به آموکسی-سیلین, تری متوپریم/ سولفامتوکسازول و تتراسایکلین است(٢، ٢٢-٢٠).

در بررسی حاضر شیوع تولید بتالاکتامازها ٦٦ درصد و مقاومت چندگانه٧٤/٧ درصد است. هرچند میزان مقاومت دارویی ایزوله‌های دارای ژن TEM به برخی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به‌ویژه سفپیم و سفوتاکسیم به میزان قابل توجهی نسبت به ایزوله‌های دارای ژن SHV بالاتر بود، اما این اختلاف معنی دار نبود. درمطالعه مشابه که در سال ٢٠٠٢ در همین منطقه انجام شد نیز بیشترین مقاومت مربوط به سه آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم/ سولفامتوکسازول، آموکسی سیلین و تتراسایکلین بود. ولی مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه بتالاکتام افزایش داشته است. به‌طوری که مقاومت به سفتی‌زوکسیم از صفر به حدود ١٤/٧ درصد افزایش یافته است و مقاومت به جنتامایسین از ١١ درصد به ٤٠ درصد افزایش داشته-است(٢٣). در صورت نیندیشیدن تدابیر خاص برای کنترل تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشور در اینده با مشکلات جدی در درمان عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های بیمارستانی مواجه خواهیم شد. این پدیده بیشتر توسط ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه خواهد بود که سبب مرگ و میر بیشتر خواهد شد(٢٤).

از مقاومت نسبت به سفپیم در این ناحیه اطلاعاتی وجود ندارد. لذا، نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده مقاومت به سفپیم در این ناحیه است. به‌علاوه، مقاومت به ایمیپنم و آنتی‌بیوتیک‌های هم خانواده آن در باکتری‌هایی مانند *کلبسیلا پنمونیه* و *پسودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده است(٢٦،٢٥).

طیف وسیعی از تایپ‌های بتالاکتامازهای TEM و SHV به‌صورت کروموزومی و پلاسمیدی گزارش شده-اند. TEM-12 ، TEM-6,28,43 و SHV-6,4,2,1 به صورت کروموزومی و تعدادی مانند SHV-18 به‌صورت پلاسمیدی هستند. در این صورت توانایی انتقال آنها به ایزوله‌های حساس وجود دارد که به راحتی در محیط‌های بیمارستانی از یک ایزوله مقاوم به یک ایزوله حساس منتقل می‌شود. پس درمان عفونت‌های حاصل از آنها هم با مشکلات جدی روبرو می‌شوند (٢٧، ٢٨). برای تعیین منشاء کروموزومی و یا پلاسمیدی ژن‌ها به بررسی‌های دقیق‌تری مانند کونژوگیشن، Curing(حذف پلاسمید) و تعیین توالی نیاز می‌باشد تا مکان واقعی این ژن‌ها تعیین

شود. صرف نظر از مکان واقعی ژن‌ها، مسئله مهم ایجاد مقاومت و چگونگی جلوگیری از شیوع هر چه بیشتر آنها است.

نتیجه گیری:

میزان مقاونت ایزوله‌های ادرای *اشریشیاکلی* در بیماران بستری به آنتی بیوتیک‌ها زیاد است و مقاومت چندگانه در آنها شایع است. وجودآنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف TEM وSHV نیز باعث مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می گردد. در نتیجه درمان عفونت‌های حاصل از این نوع ایزوله‌ها مشکل و پر هزینه می شود.

مطالعات نشان دهنده افزایش مقاومت‌های دارویی در کشور است. با روند رو به افزایش مقاومت‌های دارویی، عدم اقدام مناسب در کنترل تجویز و مصرف منطقی آنتی بیوتیک‌ها و عدم شناسایی ایزوله‌های تولید کننده آنزیم-های بتالاکتاماز در آزمایشگاها در اینده نه تنها سفالوسپورین‌های نسل سوم بلکه داروهای جدیدتر و با طیف اثر وسیع‌تر مانند سفپیم دیگر در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری کارایی مناسب نخواهند داشت.

تقدیر و تشکر:

در پایان مولفان سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به خاطر تامین بودجه این طرح تحقیقاتی اعلام می‌دارند.

فهرست مراجع:

1. Struelens M J, Denis O, Villalobos H R. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes Infection* 2004; **6**: 1043–1048.
2. Farajnia S, Alikhani M Y, Ghotaslou R ,Naghili B , Nakhlband A. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **13**: 140-144.
3. Paterson L D. Resistance in Gram-negative Bacteria : *Enterobacteriaceae*. *Am J Med* 2006 **; 119**(6A): 20-8
4. Paterson L D, Bonomo A R. Extended-Spectrum β-Lactamase: a clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**(4): 657-86.
5. Poole K . Resistance to *β*-lactam antibiotics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 2004; **61**: 2200–2223.
6. Jacoby A George , Munoz-Price LS. Mechanisms of disease the new β-lactamase. *N Engl J Med* 2005; **325**: 380-91.
7. Helfand MS , Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of Extended-Spectrum β-lactamases and metallo-β-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Curr Opin Pharmacol* 2005; **5**:452–458.
8. Jesudason M V, Kandathil A J, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-β- lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005;121: 780-783.
9. Bradford P A. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this tmportant resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**:933-951.
10. Joon Park Y, Young Park S, Oh Jee E, Park Jun J, Lee Young K, Woo Jo G, *et al*. Occurrence of extended-specterum β-lactamase among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**: 265-69.
11. Chachaty E , Saulnier P. *Isolating chromosomal DNA from Bacteria*. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Totowa ,New Jersey; Humana Press . 2000 ; PP:;29-32.
12. Shakibaie M R, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli N S. Detection of TEM, SHV and PER type extended-spectrum β-lactamase genes among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa-hospital, kerman . *Iranian J Basic Med Sci* 2008; **11**(2): 49-54.
13. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid –mediated AmpC β-lactamases in *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis. J Clin Microbiol* 2005; **43**(8):4163-4167.
14. Baum VH, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol*.2005;**295**:503-511
15. Tetsuro Muratani T, Matsumoto T . Urinary tract infection caused by fluoroquinolone- and cephem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*2006; 28 : 10-13.
16. Denton M. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **3**:9-22.
17. Wu TL, Chia JH, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ. Ma L, *et al*. CMY-2 β-lactamase-carrying community-acquired urinary tract *Escherichia coli*: genetic correlation with *Salmonella enterica*serotypes *Choleraesuis* and *Typhimurium*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **29**: 410-416.

18. Heffernan HM, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK. Prevalence and types of extended-spectrum β-lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. in New Zealand. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**:544-549.

19. Eftekhar F, Hosseini-Mazinani SM, Ghandili S, Hamraz M, Zamani S. PCR detection of plasmid mediated TEM , SHV and AmpC β-lactamases in community and nosocomial urinary isolates of *Escherichia coli*. *Iranian J Biotechnol* 2005; **3**(1): 48-54.

۲۰ .شاهچراغی فرشته، نصیری سیاوش، نویری هانیه. بررسی وجود ژن‌های بتالاکتامازی bla_{TEM}, bla_{SHV} در سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به آنتی بیوتیک جداشده از نمونه‌های کلینیکی از بیمارستان‌های تهران. *مجله میکرب شناسی پزشکی ایران* ۱۳۸٦، سال۱، شماره۳، صص ۱ تا ۸

21. Hosseini-Mazinani S M, Eftekhar F, Milani M , Ghandili S. Characterization of β-lactamases from urinary isolates of *Escherichia coli* in Tehran. *Iranian Biomedical J* 2007; **11** (2): 95-99.

22. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-produsing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:147-151.

23. Mansouri S, Shareifi S. Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* causing urinary tract infection, and that of human fecal flora in the southeast of Iran. *Microbial Drug*. 2002;**2**(8):123-128.

24. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals. *Public Health Rep* 2002; **122** (2): 160–6.

25. French GL. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv Drug Delivery Rev* 2005; **57** : 1514– 1527.

۲٦. داود کلانتر، شهلا منصوری، مژده رضوی. ظهورمقاومت به ایمیپنم و وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز در باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو، جدا شده از نمونه‌های کلینیکی شهر کرمان در سال ۱۳۸۷-۱۳۸٦. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان* ۱۳۸۹، شماره ۳، صص ۲۰۸ تا ۲۱٤.

27. Weber DA, Sanders CC, Bakken JS, Quinn JP. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli. J Infect Dis* 1990; **162**(2):460-5.

28. Yang Y, Bhachech N, Bradford AP, Jett B, F.Sahm d, Bush K. Ceftazidime- Resistant *Klebsiella pneumonia*e and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 β-lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 ; **42**(7):1671-76.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۷۹-۷۴

شیوع گاستروانتریت حاد ناشی از انتریک آدنوویروس تیپ‌های Ad40 Ad41, در کودکان زیر ۵ سال، بستری در بیمارستان بهرامی تهران در سال‌های ۸۸-۱۳۸۷با روش PCR

مریم رضائی [۱] ، رزیتا عدالت[۲]، امیر سهرابی [۲]، سید داور سیادت [۳]، مهدیه معتمدی‌راد [۲]، جلیل وندیوسفی[۱]، شهاب مدرس گیلانی[۲]*

۱) گروه میکرب شناسی دانشکده علوم پایه ، دانشگاه آزاداسلامی، واحد کرج
۲) گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران ،تهران
۳)گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران
نویسنده رابط: شهاب مدرس گیلانی: گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران
تلفن:۰۲۱٤٤۲۱٦٤۲٥ **Mary_1486@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله:۸۸/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱۷

چکیده:

زمینه واهداف: انتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40و Ad41 به‌عنوان دومین عامل گاستروانتریت حاد کودکان معرفی شده‌اند.این مطالعه به منظور تعیین اپیدمیولوژی مولکولی گاستروانتریت حاد ناشی ازانتریک آدنوویروس-های Ad40و Ad41 درکودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان بهرامی تهران در سال ۸۸-۱۳۸۷انجام شد.

روش بررسی: از تابستان ۱۳۸۷ تا پایان بهار ۱۳۸۸ جمعا ۱۰۰ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال، که با علایم بالینی گاستروانتریت حاد در بیمارستان بهرامی تهران بستری بودند، جمع آوری شد. بااستفاده از کیت استخراج DNA، ژنوم ویروسی نمونه‌ها استخراج شد. سپس به کمک پرایمر های اختصاصی و با روش PCR جنس و تیپ انتریک آدنوویروس های Ad40و Ad41 شناسایی شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه مدفوع، ۸ نمونه (۸٪) ازنظر انتریک آدنوویروسAd40 و Ad41 مثبت شدند. بیشترین موارد مثبت در کودکان گروه سنی کمتراز۲٤ ماهگی ،٦ مورد (۷۵٪) بود. تعداد موارد مثبت در دختران ٥ مورد (٦۲.٥٪)و در پسران ۳ مورد (۳۷.٥٪)مشخص شد. بیشترین موارد مثبت در فصل زمستان ۳ مورد(۳۷.٥٪)، بیشترین موارد مثبت در کودکان تغذیه شده با شیرخشک ٥ مورد (٦۲.٥٪) و کمترین موارد در کودکان تغذیه شده با شیر مادر ۱ مورد (۱۲.٥٪) بود.

نتیجه گیری: با انجام روش‌های تشخیص مولکولی، با حساسیت و ویژگی بالا، می‌توان گام موثری درتشخیص این عوامل برداشت تا بتوان راهکارهای مناسبی را اتخاذ کرد

کلید واژه‌ها: اپیدمیولوژی مولکولی، آدنوویروس ، گاستروانتریت حاد ، PCR

مقدمه:

آدنوویروس‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل اتیولوژیک شایع گاستروانتریت‌های حاد در کودکان زیر ۵ سال در سراسر جهان، به‌ویژه کشورهای در حال توسعه، شناخته شده‌اند. انتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40وAd41، بعد از روتاویروس ها، به‌عنوان دومین عامل گاستروانتریت حاد کودکان معرفی شده‌اند. به‌طوریکه بیش از ۱۵٪ گاستروانتریت‌های ویروسی کودکان را تشکیل می دهند (۱، ۲). به‌طور کلی بعد از روتاویروس‌های گروه A ، در حد پایین تری انتریک آدنوویروس‌های تیپ ٤٠ و ٤١ و دیگر عوامل ویروسی به‌عنوان عوامل مهم گاستروانتریت حاد کودکان در سراسر جهان مطرح هستند (٥-٣). با استناد به نتایج مطالعات انجام گرفته، شیوع عفونت‌های آدنوویروسی متغیر است. در کشورهای صنعتی، شیوع ویروس ۱٪ تا ۸٪ است در حالیکه در کشورهای در حال توسعه از ۲٪ تا ۳۱٪ تغییر می کند (۳). آدنوویروس‌های انسانی (Human Adenoviruses : HAdvs) ابتدا به عنوان مشکل مهم درافراد مبتلا به اختلال ایمنی (mmunocompromised) که عفونت‌های نهفته داشتند و باعث بیماری‌های منتشره مهلک می شدند ، شناسایی شدند. HAdVs طیف وسیعی از سندرم‌های بالینی را باعث می شوند. آدنوویروس‌ها می‌توانند بر سیستم‌های گوارشی، تنفسی، ادراری و چشم اثر بگذارند و غالباً از گلو و مدفوع کودکان فاقد علائم بیماری نیز جدا شده‌اند . انتقال HAdVs از راه‌های مختلف صورت می گیرد. تماس شخص به شخص و مدفوعی-دهانی از مهم-ترین راه‌های انتقال می باشد. HAdVs بسیار مسری هستند و شیوع محلی متداول دارند (٦). آدنوویروس‌ها در ۷ گونه A-G ، که شامل ٥٤ سروتایپ هستند ، طبقه بندی می شوند (٥). در بیماران مبتلا به AIDS ، گاستروانتریت مربوط به سروتایپ D بوده است. در حالی که در بیماران مبتلا به اختلال ایمنی گاستروانتریت به تایپ های $A_{٣١}$ ، $C_{٢}$ ،$F_{٤}$ و $F_{٤١}$ مربوط می شود(٦). انتریک آدنوویروس‌ها از عوامل مهم اتیولوژیک مربوط به عفونت-های اسپورادیک و بروز گاستروانتریت حاد در کودکان زیر۵ سال درسراسر دنیا می باشند که عفونت غالب بین گروه سنتی ٢٤-٦ ماهگی گزارش شده است (۷). در ایران به‌خصوص در تهران مطالعه اپیدمیولوژیک مولکولی جامع صورت نپذیرفته است. در این زمینه دو مطالعه سرو اپیدمیولوژیک توسط مدرس و صادری انجام گرفته که نشان دهنده شیوع تقریبا ۷٪ تا ۸٪ انتریک آدنوویروس ها در تهران می باشد (۸). این مطالعات ، شیوع زیاد آدنوویروس‌های روده‌ای را در جامعه ایران نشان داد. به همین دلیل تحقیقات بیشتر چه در زمینه اپیدمیولوژی و چه طراحی روش‌های سریع و مؤثر ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه تعیین اپیدمیولوژی مولکولی گاستروانتریت حاد ناشی ازانتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40وAd41 درکودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان بهرامی تهران به روش PCR بود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی- مقطعی Cross-Sectional به روش تصادفی ساده ، ۱۰۰ نمونه مدفوع از کودکان زیر۵ سال بستری در بیمارستان کودکان بهرامی تهران جمع‌آوری شد. تمام کودکان به تشخیص پزشک متخصص علائم بالینی گاستروانتریت حاد داشتند. مشخصات بیماران از جمله جنس، سن و علائم بالینی شامل تعداد دفع در روز، وجود تهوع و یا استفراغ ، تب ، درد شکم ، علائم تنفسی و نوع تغذیه در پرسشنامه تهیه شده ثبت و رضایت نامه از والدین بیماران اخذ گردید. در پرسشنامه‌ها بیماری‌های زمینه‌ای و پس زمینه‌ای خاصی (نقص سیستم ایمنی , ...) ذکر نشده بود. انتقال نمونه‌ها از طریق ظروف پلاستیکی مخصوص نمونه‌گیری و در دمای سرد (با استفاده از یخ خشک) و در اسرع وقت به آزمایشگاه ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در شرایط استاندارد (یخچال 20'c-) نگهداری شدند. برای وجودارتباط معنی دار بین متغیرهای فردی(سنی و جنسی ، تغذیه ، فصلی و شدت دهیدراتاسیون) با وجود آدنوویروس روده‌ای تیپ , Ad40, Ad41ازآزمون استقلال (test of independence) و مربع کای استفاده شد. آزمون‌ها درسطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شدند.

- استخراج DNA ویروسی :

استخراج DNA ، توسط کیت استخراج QlAamp DNA stool (شرکت کیاژن) طبق دستورالعمل کیت انجام شد .

-Polymerase Chain Reaction (PCR) :

DNA نمونه‌های استخراج شده یکبار با پرایمر ساخته شده(۹) اختصاصی گروه آدنوویروس‌ها (محصول شرکت

آرمین طب)، تحت آزمایش PCR قرار گرفت. نمونه‌های مثبت مرحله اول بار دیگر با پرایمر طراحی شده اختصاصی گروه F آدنوویروس‌ها ، جهت تعیین تایپ‌های ٤٠ و ٤١، PCR شدند (جدول ١). واکنش PCR در حجم نهایی ٢٥µl انجام گرفت. هر لوله در هر ٢ مرحله PCR، به طور کامل حاوی λ Master 2x١٢/٥ λ ، ١ از هر پرایمر (10µM) و λ ٠/٢ آنزیم Taq Polymerase (5u/ul) (Fermentase) و λ ٥/٣ d.H2O و λ ٥ DNA نمونه استخراج شده بود.

جدول ١ : پرایمرهای طراحی شده اختصاصی گروه F آدنوویروس‌ها، جهت تعیین تایپ‌های ٤٠ و ٤١

Species	Primer	Gene	Position	Sequence (5´ → 3´)	Amplicon
A to F	Ad1	Hexon	1834–1853	TTCCCCATGGCICAYAACAC	482
A to F	Ad2	Hexon	2315–2296	CCCTGGTAKCCRATRTTGTA	482
F	AdF1	Fiber	1734–1754	ACTTAATGCTGACACGGGCAC	541–586
F	AdF2	Fiber	2274–2253	TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	541–586

برنامه PCR برای تعیین گروه آدنوویروس‌ها به‌صورت ذیل بود: دناتوراسیون اولیه به مدت ٥ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی گراد و سپس برای هر چرخه ٣ بخش به شرح ذیل در نظر گرفته شد: بخش اول، دناتوراسیون در ٩٤ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه، بخش دوم آنیلینگ پرایمرها در دمای ٥٨ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه و بخش سوم طویل سازی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و به مدت ٥٠ ثانیه. این مراحل ٣٠ بار تکرار شد. مرحله طویل سازی نهایی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و به مدت ٥ دقیقه انجام گرفت. برای تعیین تیپ گروه F آدنوویروس‌ها برنامه نظیر برنامه آدنوویروس بود با این تفاوت که آنلینگ پرایمرها دردمای ٥٦ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه انجام شد و مرحله طویل سازی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد به مدت ١ دقیقه بود. برای آشکارسازی نتایج واکنش PCR از ژل آگارز ٪١/٥ با ولتاژ ١٠٠ v استفاده شد. نتایج با ترانس لومینیاتور مشاهده گردید. همچنین از بین نمونه‌های مثبت اعلام شده ٥ نمونه که باندهای بهتر داده بودند، انتخاب و بعد از آماده سازی برای تعیین توالی به شرکت فزا پژوه فرستاده شدند. بعد از ویرایش نمونه‌های سکانس شده با نرم افزار Bio Edit و BlAST نتایج بررسی شدند. نمونه‌های تعیین توالی شده در بانک جهانی ژن نیز ثبت شدند.

یافته‌ها:

از ١٠٠ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد، ٨ نمونه (٨٪) از نظر انتریک آدنوویروس Ad40وAd41 مثبت شدند(شکل ١). بیشترین موارد مثبت در کودکان گروه سنی کمتراز٢٤ ماهگی ، ٦ مورد (٧٥٪) بود(جدول ٢). تعداد موارد مثبت در دختران ٥ مورد (٦٢.٥٪) و در پسران ٣ (٣٧.٥٪) مورد بود . بیشترین موارد مثبت در فصل زمستان ٣ مورد (٣٧.٥٪) بود. با توجه به نوع تغذیه کودکان (شیر مادر و شیر خشک)، بیشترین موارد مثبت در کودکان تغذیه شده با شیر خشک ٥ مورد (٦٢.٥٪)و کمترین موارد در کودکان تغذیه شده با شیر مادر (١ مورد ١٢.٥٪) بود. در ٥٠ ٪ نمونه‌های مثبت (٤ مورد)، دهیدراتاسون خفیف گزارش شد.

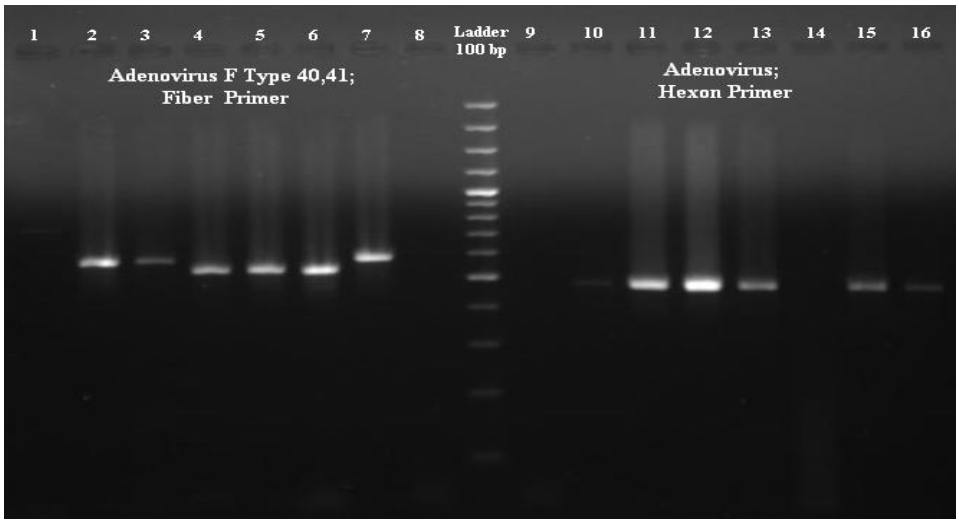
٥ نمونه ارسال شده برای تعیین سکانس ، BLAST شدند، ١ نمونه Ad40 و بقیهAd41 گزارش شد . شماره های ثبت شده در بانک جهانی ژن(NCBI / Pub MED) به شرح ذیل می‌باشد :

GU245891,1- GU245892,1- GU245893,1
GU245890,1 - GU245889,1-_

بین متغیرهای سن و تغذیه با وجود عفونت آدنوویروسی ارتباط معنی دار مشاهده گردید ($p<0.05$) بین دیگر متغیرهای فردی و وجود عفونت ادنوویروسی ارتباط آماری معنی دار مشاهده نشد.

جدول ۲ : عفونت آدنوویروسی در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد به تفکیک گروه‌های سنی

سن (ماه)	مثبت	منفی	جمع
٦-٠ ماهگی	٠	٤	٤
١٢-٦ ماهگی	٣	٢٧	٣٠
٢٤-١٢ ماهگی	٢	٢١	٢٣
٣٦-٢٤ ماهگی	١	١٣	١٤
٤٨-٣٦ ماهگی	١	١٦	١٧
٦٠-٤٨ ماهگی	١	١١	١٢
جمع	٨	٩٢	١٠٠



شکل ۱: نتایج حاصل از PCR

سمت راست : نمونه‌های PCR شده با پرایمرهای Ad1 و Ad2 برای تشخیص آدنوویروس.

سمت چپ : نمونه‌های PCR شده با پرایمرهای AdF1 و AdF2 برای تشخیص گروه F آدنوویرو س‌ها

بحث:

در مطاالعه حاضر ۸٪ گاستروانتریت‌های حاد کودکان ناشی از انتریک آدنوویروس بود. غالب بودن تیپ ٤١ بر ٤٠ مشهود است. نتیجه حاضر با نتایج مطالعات مشابه نظیر مطالعه بالی و همکاران در تونس (٢٠٠٩)، ورما و همکاران در استرالیا(٢٠٠٢) و لی در آسیا(٢٠٠٤)، که به علت تغییرات آنتی ژنیک حادث گردید، با غالب بودن تیپ ٤١ بر ٤٠ مطابقت دارد (١٠و١١).

به طور کلی گاستروانتریت حاد ، بعد از عفونت‌های تنفسی حاد ، از جمله بیماری‌های متداول عفونی گزارش شده-است. علت بسیاری از بیماری‌های گاستروانتریت هنوز به خوبی تشخیص داده نمی شوند. چون برای تشخیص آنها به‌طور دقیق روش متداولی در دسترس نیست. در سال‌های اخیر انتریک آدنوویروس‌ها، روتاویروس‌ها، کالسی ویروس‌ها و آستروویروس‌ها به صراحت در ارتباط با گاستروانتریت‌ها در کودکان مطرح می‌باشند (١٠).

گاستروانتریت حاد یک مشکل بهداشت جهانی است و یک عامل مهم بیماری و مرگ و میر در دوران کودکی در سراسر جهان گزارش شده‌است . تقریبا ۱/۷٦ میلیون مرگ در اثر گاستروانتریت در کودکان زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته اتفاق افتاده است. . براساس این مطالعه ، بیشترین موارد مثبت عفونت در گروه سنی کودکان پایین تر از ۲٤ ماهگی با شیوع ۷۵ درصد در جمعیت مثبت تعیین گردید. مطالعات انجام شده در کشورهای در حال توسعه هم تقریبا توزیع سنی مشابهی را گزارش کرده‌اند (۱٦-۱۲).

با توجه به اهمیت موضوع روش‌های تشخیصی از اهمیت ویژه برخوردارند. روش‌های تشخیص گاستروانتریت آدنوویروسی از قبیل کشت سلول، الیزا و ...چندان دقیق وخالی از اشکال نیستند (۱۷، ۱۸). چون حساسیت و برتری روشPCR نسبت به دیگر روش‌ها، برای شناسایی انتریک آدنوویروس‌ها مشخص شده‌است ،از این روش استفاده شد (۹، ۱۹). همان طور که می‌دانیم PCR در شناسایی DNAی ویروسی شامل سرعت بالا ، حساسیت ، توانایی شناسایی ویروس‌های مرده و حذف اثرات سمی نمونه‌ها و نیز حذف اثر آلودگی‌های باکتریایی است (۱۹). به‌علاوه، ثابت شده است که PCR در شناسایی آدنویروس‌های گوارشی، نسبت به کیت‌های تجاری و در دسترس ایمنی سنجی آنزیم و جداسازی آدنوویروس‌ها، حساس‌تر است (۲۰، ۲۱). کیت‌های تجاری در دسترس از قبیل ELISA و ایمونوکروماتوگرافی قابلیت تمایز تیپ Ad40 و Ad41 را ندارند (۱۹).

پرایمرهای مورد استفاده به نحوی طراحی شده بودند که تنها همین دو آدنوویروس تیپ ٤۰ و آدنوویروس تیپ ٤۱ را شناسایی کنند و دیگر آدنوویروس‌ها را شناسایی نکنند. اگر چه روش‌های زیادی برای شناسایی آدنوویروس‌ها وجود دارد، اما این روش‌ها تمام سویه‌های آدنوویروسی را با هم شناسایی می کنند. لذا، برای شناسایی هر سویه به تنهایی به بررسی با آنزیم‌های محدود کننده نیاز است. از آنجایی که تنها آدنوویروس‌های روده‌ای هستند که ارتباط معنی‌دار با گاستروانتریت کودکان نشان می دهند، به لحاظ بالینی حائز اهمیت است که آنها را با دقت بالا و در حداقل زمان شناسایی کنیم. از آنجا که هر دو، آدنوویروس تیپ ٤۰ و آدنوویروس تیپ ٤۱ ، به لحاظ بالینی یکسان تلقی می‌شوند نیازی به تشخیص مجزای آنها نیست.

در این مطالعه ٦۲.۵ درصد موارد مثبت عفونت در دختران و ۳۷.۵ درصد در پسران بود. مطالعه مشابه دوگان و همکاران در سال۲۰۰۰ برتری جنسیتی دختر به پسر با نسبت ۵ به ۱ را نشان داده است. اما در دیگر مطالعات و همچنین در مطالعه انجام شده این طرح، برتری جنسی یا نژاد خاص به طور مطلق ذکر نشده است. در تجزیه و تحلیل آماری مطالعه حاضر مانند سایر مطالعات (۲۲)نیز ارتباط معنی داری بین متغیر جنس و وجود عفونت انتریک آدنوویروس‌ها مشاهده نشد . بیشترین موارد مثبت گاستروانتریت کودکان در ماه‌های سرد و معتدل سال بود (زمستان ۳۷.۵ درصد). اما در مطالعات انجام شده در دیگر مناطق بر اساس شرایط اقلیمی متفاوت میزان شیوع در فصول مختلف متغیر بوده است. (۲۲). اما آنچه مشخص شده است در همه مطالعات انجام گرفته ارتباط آماری معنی داری بین فصل و میزان شیوع عفونت انتریک آدنوویروس گزارش نشده‌است (۵). به عبارتی عفونت آدنوویروسی زیرگروه F در همه فصول می‌تواند روی دهد. سرانجام، در مطالعه حاضر بیشترین موارد گاستروانتریت در کودکان تغذیه شده با شیر خشک(٦۲.۵ درصد) و کمترین موارد درکودکانی که با شیر مادر تغذیه نموده بودند (۱۲.۵درصد) مشاهده گردید. احتمالاً آنتی بادی منتقله از مادر نقش حفاظتی مهمی در برابر ابتلاء به اسهال آدنوویروسی دارد. در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین نوع تغذیه کودک و بروز عفونت آدنوویروسی مشاهده شد ($P<0.05$).

نتیجه گیری :

البته مطالعه حاضر با محدودیت هایی از جمله محدودیت مالی (جهت تعیین توالی بیشتر نمونه‌ها) مواجه بود. این مطالعه بر اهمیت عفونت‌های گاستروانتریت حاد کودکان، ناشی از انتریک آدنوویروس‌ها، تاکید می‌کند. مطالعات اپیدمیولوژیک و اطلاعات منطقه‌ای انتریک آدنوویروس‌ها می تواند در ساخت واکسن مناسب راهگشا باشد. استفاده از روش‌های سریع مولکولی آزمایشگاهی، برای تشخیص صحیح و سریع سروتیپ‌ها و جلوگیری از مصرف غیرضروری آنتی بیوتیک‌ها، باید مد نظر قرار گیرد. به-علاوه، فراموش نشود که رعایت اصول بهداشتی به طور قابل ملاحظه‌ای در کاهش این دسته از عفونت‌ها موثر است.

فهرست مراجع:

1. Walls T,Shankar AG,Shingadia D. Adenovirus:an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 2003**;3:**79-86.
2. Gu Z,Belzer SW,Gibson CS,Bankowski MJ,Hayden RT.multiplexed,real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. J *Clin Microbiol* 2003; **41**: 4636-4641
3. Carraturo A, Catalani V, Tega L. Microbiological and epidemiological aspects of Rotavirous and enteric adenovirous infections in hospitalized children in Italy. *New Microbialogica* 2008 ;**31**:329-336
4. Logan C, O'Leary j, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:3189-3195
5. Fukuda S, Kuwayama M, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K. Molecular epidemiology of subgenus F adenoviruses associated with pediatric gastroenteritis during eight years in Hiroshima Prefecture as a limited area. *Arch Virol* 2006;**151**: 2511–2517
6. Magwalivha M, Wolfaardt M, M. Kulia N, B.Van Zyl W, M.Mwenda J, B. Taylor M . High Prevalence of species D Human Adenoviruse in Fecal specimens from urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol* 2010; **82**:77-84
7. Verma H, D.Chitambar Sh, Varanasi G . Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis . *J Med Virol* 2009;**81**:60-64
8. Saderi H, Roustai MH, Sabahi F, Sadeghizadeh M, Owlia P, De Jong JC. Incidence of enteric adenovirus gastroenteritis in Iranian children: *J clini virol* 2002 ; **24**: 1-5.
9. Wanhong Xu , C.Mcdonough M , D.Erdman D . Species specific identification of human Adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(1): 4114-4120
10. Grimwood K, Carzino R, Barnes GL, Bishop RF. Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 131–136
11. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, *et al* . Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 2005;**49**: 121–128
12. Boga JA, Mel´on S, Nicieza I, de Diego I,Villar M, Parra F, *et al*. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2668–2674
13. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, Pothier P, *et al* .Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 3055–3058
14. De Jong JC, Bijlsma K,Wermenbol AG,Verweij-Uijterwaal MW, Van DerAvoort HGAM, Wood DJ, *et al.* Detection, typing, and subtyping of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1562–1569
15. Jarecki-Khan K, Tzipori SR, Unicomb LE . Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 484–489
16. Kim KH, Yang JM, Joo SI, Cho YG, Glass RI, Cho YJ. Importance of rotavirus and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2279–2284
17. Cooper RJ , Yeo AC, Bailey AS , Tullo AB. Adenovirus Polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis . *IOVS* 1999;**40**(1) : 90-95
18. Scott-taylor T ,Ahluwalia G,Klisko B,W.Hammond G. Prevalent enteric adenovirus variant not detected by commericial monoclonal antibody enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990; **28** (12) : 2797-2801
19. Li L, Shimizu H, Doan LTP, Phan TG, Okitsu S, Nisho O , *et al* . Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea . *J Clin Microbiol* 2004;**2**: 4032– 4039
20. Sdiri-Loulizi Kh, Gharbi-Khelifi H , Rougemont A, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, *et al* . Molecular epidemiology of Human Astrovirus and Adenovirous serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *J Med.Virol* 2009;**81**:1895-1902
21. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of Adenovirusesin stool samples. *J Clin Microbiol* 1990; **28**(12): 2659–2667

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات۸۶-۸۰

بررسی آلودگی گاوداری‌های استان ایلام به ویروس سینسیتیال تنفسی

علی محمد بهرامی، مرتضی شمسی*، رضاهوشمندفر

آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام
نویسنده رابط: مرتضی شمسی ، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام
تلفن: ۰۸٤۱-۲۲۲٤۳۰۸ **shamsi_ilam@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/٦/۱۰

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت ناشی از ویروس سینسیتیال تنفسی گاو (BRSV : Bovine respiratory syncytial virus) بیشتر در گوساله‌های از شیر گرفته شده و گوساله‌های جوان و دام‌هایی که در محیط بسته نگهداری می-شوند، دیده می شود. در موارد حاد بیماری، برونکوپنمونی عارض می‌شود وموجب مرگ دام می گردد. هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع آلودگی ویروس سینسیتیال تنفسی و میزان آنتی بادی ضد BRSV در گاو داری‌های استان ایلام بود.

روش بررسی: این مطالعه در طول یک سال (پاییز ۱۳۸٦ لغایت پاییز ۱۳۸۷)، با خون گیری از ٤۰۰ رأس گاو با سنین مختلف که ۳٥٦ رأس(۸۹٪) ماده و ٤٤ رأس (۱۱٪) نر بودند به‌صورت خوشه‌ای تصادفی از شهرستان های مختلف استان، در فصول مختلف سال به نسبت ۸٥٪ از مراکز صنعتی و ۱٥٪ از مراکز سنتی انجام گردید. اطلاعات کلی از قبیل سن، جنس، تاریخ و محل نمونه گیری، نحوه تغذیه و سابقه مشکلات تنفسی دام ثبت می‌شد. شناسایی آنتی بادی ضد BRSV با روش الیزا انجام شد. داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS و آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: در مجموع ۳۱۹ (۷۹.۷٪) رأس گاو، شامل ۲۹۸ رأس گاو ماده (۸۳.۷٪) و ۲۱ رأس گاو نر (٤۷.۷٪)، دارای آنتی بادی ضد BRSV بودند. بین میزان آلودگی در گاوها برحسب فصول مختلف سال اختلاف معنی دار مشاهده نشد($P> 0.05$)، اما بر حسب جنسیت معنی دار بود($P< 0.05$). بالا ترین (۸٥٪) و پایین ترین (۷۱٪) میزان آلودگی به ترتیب در شهرستان‌های ایلام و ایوان بود. کمترین(٦٤٪) و بیشترین(۹۰٪) میزان آلودگی به ترتیب در گروه سنی هفت سال و سه سال برآورد شد.

نتیجه گیری: میزان آلودگی چشمگیر است و با عواملی چون جنسیت، سن و مشکلات تنفسی وابستگی مستقیم دارد. با اعمال مدیریت صحیح و اصولی و بررسی تاثیر آلودگی بر روند سلامتی و تولید در استان، می‌توان از راهکار-های مناسب جهت پیشگیری از بیماری بهره برد.

کلید واژه ها: ویروس سینسیتیال تنفسی، گاو، سرولوژی، الیزای غیر مستقیم ، ایلام.

مقدمه:

ویروس سینسیتیال تنفسی گاو (BRSV : Bovine respiratory syncytial virus) اولین بار در سال ۱۹۷۰ در کشورهای بلژیک، سوئیس و ژاپن از گاوهای مبتلا به بیماری تنفسی جدا شد. این ویروس متعلق به جنس پنموویروس از خانواده پارامیکسویروده است. محل انتخابی تکثیر ویروس ، سلول‌های دستگاه تنفس می‌باشد. این ویروس را به سختی می‌توان جدا کرد (۳-۱).

عفونت ناشی از ویروس سینسیتیال تنفسی، به‌خصوص در گوساله‌های از شیر گرفته شده و گوساله‌های جوان، موجب پنمونی، ادم ریوی بینابینی و آمفیزم می‌شود. عفونت با این ویروس در دام‌هایی که در محیط بسته نگهداری می شوند، بسیار حائز اهمیت است. بیشترین حساسیت نسبت به BRSV در بین گوساله‌های ٦ تا ۱۳ ماه مشاهده می-شود. علایم بیماری شامل تب ناگهانی، بی حالی، سرفه، افزایش حرکات تنفسی، تورم مخاط بینی و در برخی موارد التهاب برونشیول‌ها، بروز کانون‌های متعدد از پنمونی بینابینی، ادم بینابینی و آمفیزم است(٦-٤). در موارد حاد بیماری، برونکوپنمونی عارض شده وموجب مرگ دام می شود. تلفات گوساله‌هایی که به‌خوبی تغذیه می‌شوند، بیشتر از سایر گوساله‌های مبتلا است. زیرا برخی معتقدند که بعضی از اجزای خوراک دام مانند سیلوی ذرت، حیوان را مستعد ابتلاء به عفونت می کند. به‌طور کلی میزان ابتلاء به بیماری، زیاد ولی مرگ ومیر ناشی از آن کم و در حدود ۲۰-۰ درصد می باشد (۱۱-۷). در مطالعه سرولوژی که در گاوداری‌های صنعتی و سنتی استان چهار محال و بختیاری در سال ۱۳۸۱ انجام گرفت، پس از انجام آزمایش به روش الیزا مشخص گردید که از تعداد ۳۸٤ نمونه، ۳۱۱ نمونه در این آزمون دارای پاسخ مثبت هستند(۱۲).

در حال حاضر استفاده از فناوری PCR، بهترین روش برای تشخیص بیماری ناشی از BRSV محسوب می-شود(۱۵-۱۲). برای بررسی‌های سرولوژیک و شناسایی آنتی بادی‌های ضد این ویروس نیز می توان از آزمایش-های خنثی سازی سرم، هماگلوتیناسیون غیر مستقیم و الیزا استفاده کرد. حساسیت این آزمایش‌ها برای مشخص نمودن حضور آنتی بادی علیه این ویروس در سرم به ترتیب ۹۲،۹۵ و ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۸-۱٦).

استان ایلام از مراکز مهم دام پروری وپرورش دام کشور به شمار می رود. طبق اطلاعات موجود تاکنون مطالعه ای در مورد میزان شیوع BRSV در این استان انجام نشده است. هدف از انجام این مطالعه تعیین آلودگی گاوداری های استان ایلام به ویروس سینسیتیال تنفسی بود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در فاصله پاییز سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸٦، با خون گیری به مقدار ۵ میلی لیتر از٤۰۰ رأس گاو با سنین مختلف به‌صورت خوشه‌ای تصادفی، انجام شد. نمونه‌ها از شهرستان‌های استان، در فصول مختلف سال و به نسبت ۸۵٪ از مراکز صنعتی و ۱۵٪ ازمراکز سنتی جمع آوری شد. در هنگام نمونه‌گیری اطلاعات لازم مانند سن، جنس تاریخ و محل نمونه گیری، نحوه ی تغذیه و سابقه مشکلات تنفسی دام ثبت شد. نمونه‌ها پس از انعقاد و انتقال به آزمایشگاه آموزشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام، با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سرم نمونه‌ها جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱). شناسایی آنتی بادی ضد BRSV با روش الیزا و با استفاده از کیت تجارتی(Sigma cat: Z379603)محصول کشورآلمان انجام شد(۲۱-۱۸).

کیت مذکور برای تشخیص پادتن‌های ایجاد شده علیه ویروس BRSV در بدن گاوهای آلوده به روش الیزا است این کیت قادر است پادتن‌های اختصاصی ضد BRSV را در سرم یا شیر تشخیص دهد . کیت مزبور بر اساس الیزای فاز جامد و سنجش ایمنی به وسیله آنزیم استوار است. گوده‌های میکروپلیت الیزا با پادتن غیر عفونی ویروس BRSV پوشانده شده‌اند. نمونه‌های سرم مورد آزمایش با پادگن های موجود در گوده‌ها مجاور می‌شوند. در صورت وجود پادتن‌های ضد BRSV در نمونه‌های سرم، این پادتن‌ها به پادگن‌ها متصل شده و در اثر شستشو کنده نمی‌شود. در مرحله بعد محلول کونژوگه پراکسیداز Anti- bovin IgG اضافه می‌شود که به پادتن‌های

موجود در گوده‌ها متصل می‌گردد. میکروپلیت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. متعاقباً، میکروپلیت تخلیه و سه مرتبه با PBS شستشو می‌شد و به آن محلول سوبسترا کروموژن اضافه می‌گردید. پس از ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، تغییر رنگ حاصله که به علت تأثیر کونژوگه آنزیم روی سوبسترا است، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار به‌عنوان ماده متوقف کننده واکنش،متوقف می‌شد. میزان دانسیته اپتیک(OD)رنگ تولید شده با قرائت کننده الیزا مدل(BioRad-650) در طول موج ٤٥٠ نانومتر سنجیده می شد. سرم‌های مورد آزمایش با OD سرم‌های شاهد مثبت و منفی مقایسه شدند. جهت تفسیر آزمایش می بایست OD تصحیح شده هر زوج خانه که به سرم‌های شاهد مثبت، منفی و سرم‌های مورد آزمایش اختصاص یافته بودند، مطابق فرمول زیر سنجیده می شد(۲۲-۱۹).

مطابق توصیه‌های شرکت سازنده کیت ارزش ODcorr برای نمونه سرم مثبت مرجع است و برای هر کدام از نمونه های سرم مورد آزمایش از طریق ذیل محاسبه گردید:

OD BRSV - OD Control = Corrected Value

نمونه‌هایی که ODcorr آنها کمتر از ۰/۲ بود، نمونه منفی و نمونه هایی که ODcorr آنها بیشتر از ۲ برابر OD اصلاح شده شاهد منفی بودند، به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته می شدند. نتایج با استفاده از مربع کای (Chi-square) با حدود ۹۵ درصد اطمینان با نرم افزارآماری Spss ویرایش شانزدهم تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها:

از مجموع ٤٠٠ رأس گاو، ٣٥٦ رأس (٨٩٪) ماده و ٤٤ رأس (١١٪) نر بودند. ۲۹۸ رأس (۸۳/۷٪) گاو ماده و ۲۱ رأس (٤٧/٧٪) گاو نر، جمعاً ۳۱۹ رأس (۷۹/۷٪) از گاوهای تحت مطالعه دارای آنتی بادی ضد BRSV بودند. رابطه بین آلودگی و جنسیت معنی دار بود ($P<0.05$). بین آلودگی و فصول مختلف سال اختلاف معنی دار مشاهده نشد($P>0.05$). فراوانی آلودگی در پاییز و زمستان بیشتر از بهار و تابستان بود. ٣٠٤ رأس گاو (٧٦٪) واجد اختلالات تنفسی بودند. از این تعداد واکنش سرمی ٢٦٤ رأس (٨٦٪) مثبت بود. از ٩٦ رأس (٢٤٪) که هیچ گونه مشکل تنفسی نداشتند ٥٥ رأس (٥٧٪) به ویروس BSRV آلوده بودند (جدول ۱). بین آلودگی به BRSV و وجود سابقه مشکلات تنفسی رابطه معنی‌دار یافت شد($P>0.05$)(جدول ۱).

بالاترین میزان آلودگی مربوط به شهرستان ایلام(۸۵٪) و پایین ترین میزان مربوط به شهرستان ایوان(۷۱٪) بود (جدول ۲). کمترین میزان آلودگی در گروه سنی ۷ سال و بالاتر (٦٤٪) و بیشترین میزان آلودگی در گروه سنی ۳ سال (۹۰٪) برآورد گردید(جدول ۳). مقادیر قابل انتظار و قابل مشاهده بر حسب متغیرهای مورد مطالعه در جدول ٤ نشان داده شده‌است.

جدول ۱ : توزیع فراوانی پادتن ضد BRSV در گاوهای استان ایلام

نمونه های مورد آزمایش		تعداد	درصد	درصد تجمعی
جنسیت	ماده	٣٥٦	٨٩	٨٩
	نر	٤٤	١١	١٠٠
جمع		٤٠٠	١٠٠	
ماده	الیزا مثبت	٢٩٨	٧٤/٥	٧٤/٥
	الیزا منفی	٥٨	١٤/٥	٨٩
نر	الیزا مثبت	٢١	٥/٢٥	٩٤/٢٥
	الیزا منفی	٢٣	٥/٧٥	١٠٠
جمع		١٠٠	١٠٠	
فصول	بهار	٩٩	٢٤/٧٥	٢٤/٧٥
	تابستان	١٠١	٢٥/٢٥	٥٠
	پاییز	٩٠	٢٢/٥	٧٢/٥
	زمستان	١١٠	٢٧/٥	١٠٠
جمع		٤٠٠	١٠٠	
سابقه	**باسابقه مشکلات تنفسی**	٣٠٤	٧٦	٧٦
	بدون سابقه مشکلات تنفسی	٩٦	٢٤	١٠٠

	۱۰۰	٤۰۰	جمع
٦٦	٦٦	۲٦٤	الیزا مثبت با سابقه مشکلات تنفسی
۱۰۰	۳٤	۱۳٦	الیزا مثبت بدون سابقه مشکلات تنفسی
	۱۰۰	٤۰۰	جمع

جدول ۲: توزیع فراوانی آلودگی به ویروس B RSV به تفکیک شهرستان‌های استان ایلام

شهرستان	تعداد، درصد	تعداد و درصد کل
ایلام	۱۲۸ ٪۸۵	۱۵۰ ٪۱۰۰
ایوان	٤۷ ٪۷۱	٦٦ ٪۱۰۰
شیروان چرداول	٤۹ ٪۷۹	٦۲ ٪۱۰۰
دهلران	۵۰ ٪۷۹	٦۳ ٪۱۰۰
دره شهر	٤۵ ٪۷٦	۵۹ ٪۱۰۰
جمع کل	۳۱۹ ٪۷۹	٤۰۰ ٪۱۰۰

جدول ۳ : توزیع فراوانی آلودگی به ویروس BRSV به تفکیک گروه‌های سنی دام

گروه سنی	تعداد نمونه	تعداد و درصد	تعداد درصد موارد کل
۱	۵٦	٤۹ ٪۸۷	۵٦ ٪۱۰۰
۲	٦٤	۵۷ ٪۸۹	٦٤ ٪۱۰۰
۳	٦۰	۵٤ ٪۹۰	٦۰ ٪۱۰۰
٤	۵۹	۵۰ ٪۸٤	۵۹ ٪۱۰۰
۵	۷۱	۵۰ ٪۷۰	۷۱ ٪۱۰۰
٦	۵۱	۳٤ ٪٦٦	۵۱ ٪۱۰۰
۷	۳۹	۲۵ ٪٦٤	۳۹ ٪۱۰۰
جمع کل	٤۰۰	۳۱۹ ٪۷۹	٤۰۰ ٪۱۰۰

جدول ٤: مقادیر قابل انتظار و قابل مشاهده بر حسب متغیرهای مورد مطالعه

متغیر	قابل مشاهده	قابل انتظار	باقی مانده
ماده	۳٥٦	۲۰۰	۱٥٦
نر	٤٤	۲۰۰	-۱٥٦
الیزا مثبت	۲۹۸	۱۰۰	۱۹۸
الیزا منفی	٥۸	۱۰۰	-٤۲
الیزا مثبت	۲۱	۱۰۰	-۷۹
الیزا منفی	۲۳	۱۰۰	-۷۷
بهار	۹۹	۱۰۰	-۱
تابستان	۱۰۱	۱۰۰	۱
پاییز	۹۰	۱۰۰	-۱۰
زمستان	۱۱۰	۱۰۰	۱۰
الیزا مثبت بهار	۷٦	٥۰	۲٦
الیزا منفی بهار	۲۳	٥۰	-۲۷
الیزا مثبت تابستان	۷۹	٥۰	۲۹
الیزا منفی زمستان	۲۲	٥۰	-۲۸
الیزا مثبت پاییز	۷٥	٥۰	۲٥
الیزا منفی پاییز	۱٥	٥۰	-۳٥
الیزا مثبت زمستان	۹۱	٥۰	٤۱
الیزا منفی زمستان	۱۹	٥۰	-۳۱
الیزا مثبت با سابقه مشکلات تنفسی	۲٦٤	۱۰۰	۱٦٤
الیزا منفی با سابقه مشکلات تنفسی	٤۰	۱۰۰	-٦۰
الیزا مثبت بدون سابقه مشکلات تنفسی	٥٥	۱۰۰	-٤٥
الیزا منفی بدون سابقه مشکلات تنفسی	٤۱	۱۰۰	-٥۹
جمع	٤۰۰		

بحث:

BRSV از مهم‌ترین عوامل دخیل در ایجاد سندرم بیماری‌های تنفسی گاو محسوب می‌شود. بین سابقه مشکلات تنفسی و آلودگی به ویروس ارتباط تنگاتنگ وجود دارد. علائم عفونت و فراوانی آلودگی به BRSV تحت تاثیر تغییرات و استرس‌های آب و هوایی قرار دارد(۲۳).

آلودگی به ویروس BRSV در اکثر کشورهای دنیا گزارش شده است. این گزارشات معمولاً بر اساس انجام آزمایش‌هایی مانند خنثی سازی سرم، ممانعت از هماگلوتیناسیون و الیزا صورت می گیرند(۱۸، ۲٤ و ۲٥). فراوانی آلودگی به این ویروس در یونان ٥۷٪- ۱٦٪، در آلمان ٥۰٪، در کانادا ۳٦/۷٪، در سوریه ٦۲/۱٪ و در ترکیه ۹/۸٪ گزارش شده است. در آمریکا نیز میزان شیوع آنتی بادی ضد BRSV در جمعیت دام‌های بزرگ ۸۱٪ - ٦٥٪ گزارش شده است(۲۸-۲٦). در یک بررسی در شمال آلمان شیوع BRSV در گاوهای نژاد هولشتاین بالغ بر ٥۰ درصد گزارش گردید(۲۹). در شمال غربی سوریه تیتر آنتی‌بادی ۲٤۳ گاو نژاد هولشتاین به روش IFA ۸۸درصد

محال و بختیاری هم عبارت است از: شهرکرد ۸۶/۸۰٪، فارسان ۷۱/۴۲٪، بروجن ۸۱/۳۵٪، لردگان ۸۰/۳۲٪ و اردل ۷۷/۹۹٪ (۱۲). میزان آلودگی در مطالعه حاضر (۷۹/۷٪) با حداکثر میزان آلودگی در مطالعات مذکور برابری می کند.

در این مطالعه میزان آلودگی در پاییز و زمستان بیشتر از بهار و تابستان است. در فصول سرد آلودگی بیشتر رخ می دهد. زیرا، دام‌ها در محیط بسته وبا تراکم بالا نگهداری می شوند و این امر باعث تسریع و تسهیل در انتقال ویروس از یک دام به دام دیگر می‌گردد. در بررسی‌های انجام شده نیز میزان آلودگی در پاییز و زمستان بیشتر از بهار و تابستان گزارش شده است (۲۳-۲۰). در سه مزرعه پرورش گاو در جنوب شرقی اسکاتلند این میزان در فصل پاییز (۸۵/٤٪) بیشتر از بهار(۷٤/۲٪) بوده است(۳۱).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از گسترش چشم‌گیر بیماری در استان است. شهرستان ایلام با ۸۵درصد نسبت به سایر آلودگی در شهرستان ایلام در مقایسه با شهرستان‌های دیگر استان‌ها نیز در حد بالا قرار دارد. به‌طوری که آلودگی در آن در مقایسه با مطالعه استان چهار محال و بختیاری فقط با میزان آلودگی در شهرکرد (۸٦/۸۰٪) قابل مقایسه است. در این مطالعه هم بین میزان آلودگی و محل شهرستان اختلاف معنی دار مشاهده نشده است (۱۲).

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر حاکی از شیوع نسبتاً بالای آلودگی با BRSV در میان گاوهای منطقه است. ضروری است با مطالعات بیشتر و بررسی تاثیر آلودگی بر روند سلامتی و تولید در حیوانات این استان، از راهکارهای مناسب برای کنترل آلودگی بهره برد.

فهرست مراجع:

1- Alkan F,Oza, Bilge Dagalp S, Yesilbag k, Oguzoglu TE, Akcay *et al*. Virological and serological studies on the of pl-3 virus BRSV ,BHV- 1 on respiratory infections of cattle.I. the detection of etiological agents by direct immunofluorescence technique. *Dtsch tierarztl wochenschr*,2000;**107**(5)**:**193-5.

2- Van der poel WHM, Brand A, Kramps JA, Van oir schot JT. Respiratory Syncytial Virus infection in human beaings and in cattle. *J infec* 1994;29:215-228.

3- Belanger RD. A seroepidemiological study of the importance in cow-calf pairs of respiratory and enteric viruses in beef operations from northwestern Quebec. *Can J Vet Res*1995;**59**(1)**:**26-33.

4- Maglione E, Guercio A. BRSV ; epidemiological relationships between wild and domestic ruminants sharing the sae habitst,Atti dela- scocieta Italian da – *Buirtria* 1992;**24**:545-552.

5- Giangaspero M , Vacirca G. Epidemiological survey on virus disease of cattle in northwest Syria. *Tropicultura*(Belgium)1992; **10**(2):55 – 57.

6- Heckert HP, Steinhage P. Clinical features and epidemiology of BRSV in cattle in northern Germany, proceedings 18 th world buiatrics congress: 26 th congress of the Italian Association of buiatticas , bologna, Italy1994;PP:777-780.

7- Rontved CM, Tjornehoj K, Viuff B, Larsen LE, Godson DL,Ronsholt L, *et al*. Increased pulmonary secretion of tumor necrosis factor-alpha in calves experimentally infected with bovine respiratory syncytory virus.*Vet Immunol Immunopathol*2000;**76**(3-4)**:**199-214.

8- Kalina WV, Anderson ML, Gershwin LJ. Alternaria aerosol during a bovine respiratory syncytial virus infection alters the severity of subsequent re-infection and enhances IgE production. *Comp immunol microbiol infect dis*2006;**29**(2-3)**:**138-56.

۹- کیوانفر ه، کریمی ن. *ویروس شناسی دامپزشکی(بخش بیماری‌ها)*، چاپ اول، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران،۱۳۷٦، صص ۳۳۵-۳۲٤.

10- Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML,Corbeil LB. Immune mechanisms of pathogenic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with Haemophilus somnus and bovine respiratory syncytial virus. *Vet immunol immunopathol*2000;**107**(1-2)**:**119-30.

11- Cho KO, Hasoksuz M, Nielsen PR, Chang KO,Lathrops IJ. Cross-protection

studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery corona virus strains in calves and calf- per and nested per for their detection .*Arch Virol* 2001;**146**(12)**:**2401-19.

۱۲- تاجبخش ا، ممتاز ح. بررسی سرمی آلودگی گاوهای استان چهار محال و بختیاری به ویروس سنسیتیال تنفسی (BRSV) و تعیین میزان آلودگی آن ها. *مجله پژوهش و سازندگی*. بهار ۱۳۸٤، دوره هفدهم، شماره٤ (پیاپی٦٦)، صص ۹۸ تا ۱۰۳ .

13- Vilcek S, Elvander M, Ballagipordany A, Belak S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994; **32**:2225-2231.

14- Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loanr w, Bbriggs RE, *et al*. Bovine viral diarrhea viral infection in feeder calves with respiratory disease :interaction with pasteurella spp., para influenza -3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*2000;**64**(3):151-9.

15- Sorden SD. Diagnostic methods for respiratory dieases, In Howard JL, Smith RA(eds). *Current veterinary Therapy*: *Food Animal Practice.* 4th ed. Philadelphia ; *WB Saunders.* 1999;PP: 455-460.

16- West K, Bogdan J, Hamel A, Nayar G, Paul SM, Deborah MH, John AE. A Comparison of Diagnostic Methods for the Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Experimental Clinical Specimens.*Can J Vet Res* 1998;**62**:245-250

17- Baker JC. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin North Am* 1985;**1**:259-275.

18- Dubovie J. Diagnosing BRSV infection:A laboratory perspective.*Vet Med* 1993; **88**(9): 888-893.

19- Gillete KG. Enzyme-linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory syncytial virus: comparison with complement fixation and neutralization tests. *Am J Vet Res*1983;**44**: 225 1-2255.

20- Gerham, DA , Moshane. J. Evaluation of single dilution of ElISA system for detection of BRSV. PI32001;(5):120-122.

21- Rhodes MB, Klucas CA, Frey ML, Anderson GA. A blocking ELISA for the detection of specific antibodies to bovine respiratory syncytial virus. *J Vet Diag nvest* 1988;**1**:359-369.

22- Mcintosh K, Hendry RM, Fahnestok ML, Pierik LT. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: applications to clinical samples. *J Clin Microbiol*1982;**16**:329-333.

23- Mars MH. Airbornne transmission of BHV-1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol*1999;**66**:197-207.

24- Perino LJ, Aply M. Bovine respiratory disease, In Howard JL, Smith RA(eds): *Current veterinary Therapy: Food Animal Practice.* 4th ed. Philadelphia ; *WB Saunders.* 1999;PP: 446-455.

25- Martin WS, Meek AH, Willeberg P. *Veterinary epidemiology.* Ames, USA, Iowa State University Press1987; P: 343.

26- Bryson DG. Infectious bovine respiratory dieases- emerging issues and progress towards control.*1996;19th World Buiatrics Congress- BCVA Edinburgh.UK.*

27- Ellis J,West K, Konoby C, Leard T, Gallo G,Conlon J, *etal*. Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves. *J Vet Med Assoc*;2001;**218**(12)**:**1973-80.

28- Bryson DG. The calf pneumonia Complex- Current thoughts on aetiology.J *Cattle Practice*2000;8:103-107.

29- Heckert HP, Steinhage P. Clinical features and epidemiology of BRSV in cattle in northern Germany, proceeding 18th world Buiatrics congress : 26th congress of the Italian Association of Buiatticas, Bologna, Italy1994;Volumer: 777-780.

30- Ginagaspero M, Vacsrca G. Epidemiological survey on virus disease of cattle in north west Syria.1992;**10**:2,55-57.

31- Scott R. Epidemology and treatment of bovine respiratory disease in beef cattle. *J Cattle practice*1997;**5**(4)**:** 283 -288.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۹۰-۸۷

تظاهرات بالینی ژیاردیازیس در شهر همدان در سال ۱۳۸۵

حشمت ا... طاهرخانی[۱]، مصطفی انصاری[۲]، محمد فلاح[۳]، صادق صبا[٤]، صفورا شریعتی[٥]غلامرضاروشندل[*٦]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۲) گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۳) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
٤) گروه بیماری‌های اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
٥) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
٦) مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
نویسنده رابط: غلامرضا روشندل، پلی کلینیک شهید نبوی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان.
تلفن:۰۱۷۱-۲۲٤۰۸۳٥ roshandel_md@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۹/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/۱/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: ژیاردیازیس علائم بالینی گسترده‌ای دارد و شیوع ابتلاء به آن در استان همدان به‌طور قابل توجهی بالا است. لذا این مطالعه با هدف تعیین شکایات اصلی و سایر علائم بیماران مبتلا به ژیاردیازیس علامت دار در شهر همدان صورت پذیرفت .

روش بررسی: این مطالعه مقطعی و از نوع توصیفی می‌باشد. مطالعه بر روی ٦٤ بیمار مبتلا به عفونت ژیاردیا، از میان ٤۰۰۰ مراجعه کننده جهت آزمایش مدفوع،انجام شد، که ۳۲۰ نمونه مشکوک به ژیاردیا با علائم مورد نظر وجود داشت. ۲٦ نفر (٤۰/٦٪) زن و ۳۸ نفر (٥۹/٤٪) مرد بودند. جهت تفکیک علائم ژیاردیازیس از سایر بیماری-های گوارشی مانند بیماری سلیاک، تست سرولوژی آنتی گلیادین و TTG (Anti-tissue transglutaminase antibody) انجام شد. نتیجه حاصل از آزمایشات با آزمون χ^2 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: بیشترین آلودگی به ژیاردیا در گروه سنی ۲۰-۱٦ سال (۱۳ نفر ، ۲۰/۳٪) و در جنس مذکر (۳۸ نفر، ٥۹/٤٪) و نیز در سطح تحصیلات مقطع ابتدایی (۲۰ نفر، ۳۱/۲٥٪) دیده شد. شایع‌ترین شکایت مبتلایان شکم درد(۲۷ نفر، ٤۲/۱٪) بود. پس از آن نفخ و اسهال به ترتیب با شیوع ۲۳/٤٪ و ۹/٤٪ در رتبه های دوم و سوم قرا گرفتند.

نتیجه گیری: علائم اصلی مشاهده شده مشابه علائم برخی از بیماری‌های غیر انگلی مانند بیماری‌های گوارشی نظیر سلیاک و بیماری‌های باکتریایی است. توصیه می شود در بررسی بیماران مبتلا به علائم گوارشی، احتمال عفونت با ژیاردیا در نظر گرفته شود.

کلید واژه ها : عفونت انگل روده‌ای، ژیاردیازیس، تظاهرات بالینی، همدان.

مقدمه:

ژیاردیا لامبلیا تک یاخته‌ای است که در دوازدهه و ژژنوم انسان به صورت کیست یا تروفوزوئیت زندگی می کند، و سبب بیماری ژیاردیازیس می‌شود(۱). ژیاردیازیس شایع ترین عفونت تک یاخته‌ای است که در تمام مناطق دنیا مخصوصاً در آب و هوای گرم و مرطوب دیده می شود(۲). این انگل سالیانه ۲/۸ میلیون نفر را در جهان آلوده می کند و در کشورهای توسعه یافته آلودگی تقریباً در ۲٪ از بزرگسالان و ۸-٦ ٪ از کودکان دیده می‌شود(۳). مطالعات اپیدمیولوژیک و بالینی نشان می‌دهد که ۸٤-۲۰ ٪ از افراد آلوده بدون علامت می باشند. گرچه ژیاردیازیس به عنوان عفونت شدید مورد توجه نیست اما ممکن است گاهی اوقات عوارض شدیدی ایجاد کند(۳). آلودگی با ژیاردیا ممکن است با شکم درد،اسپاسم شکم،نفخ،کاهش وزن، حالت تهوع،استفراغ، خستگی، لرز، مدفوع متعفن و چرب همراه باشد. در اینصورت ممکن است منجر به سوءجذب چربی، پروتئین و ویتامین‌های محلول در چربی، کمبود گاماگلبولین ، عدم تحمل لاکتوز ، کم خونی ناشی از فقر آهن و اسید فولیک و ..... شود (۳و٤). عارضه دیگر آن اسهال است که در بعضی موارد مزمن شده و چند سال طول می کشد(۱و۳). گزارشات برخی از پزشکان شهر همدان حاکی از آن است که علت مراجعه اغلب بیماران مبتلا به ژیاردیازیس علائم گوارشی به‌ویژه نفخ شکم ذکر می‌شود و غالباً نشانه دیگری ندارند. با توجه به گستردگی علائم بالینی ژیاردیازیس و وفور انگل در منطقه، مطالعات دقیق برای تعیین اصلی‌ترین شکایت و چهره بالینی ژیاردیازیس در شهر همدان ضروری به نظر می رسید. لذا، این مطالعه با این هدف و به منظور کمک به پزشکان در جهت تسریع و تسهیل تشخیص بالینی صورت پذیرفت .

مواد و روش‌ها:

این مطالعه مقطعی از نوع توصیفی می‌باشد که در طول چهار ماه از ابتدای اردیبهشت ماه لغایت پایان مرداد ماه ۱۳۸۵ طول کشید. از مجموع بیش از ٤۰۰۰ نفر مراجعه کننده جهت آزمایش مدفوع به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان همدان تعداد قریب به ۳۲۰ نمونه مشکوک به ژیاردیا با علائم مورد نظر مشخص گردید. پس از انجام آزمایشات لازم مطابق پرسشنامه ٦٤ بیمار مبتلا به ژیاردیای خالص (همراه با علائم) تفکیک گردید. لازم به ذکر است که برای هر بیمار یک پرسشنامه حاوی اطلاعات فردی و نیز اطلاعاتی راجع به شکایات و علائم بالینی تکمیل شد. نمونه مدفوع پس از جمع‌آوری، از نظر وجود یا عدم وجود انگل‌های مختلف از جمله ژیاردیا به روش فرمالین-اتر بررسی گردید (۵). در این مطالعه بیماران مبتلا به بیماری‌های انگلی غیر از ژیاردیا و یا توأم با ژیاردیا مشخص و از مطالعه حذف شدند. بنابراین، مطالعه فقط بر روی ٦٤ بیمار صورت پذیرفت که فقط به ژیاردیا آلوده بودند. جهت تفکیک علائم ژیاردیا از سایر بیماری‌های گوارشی مانند بیماری سلیاک، تست سرولوژی آنتی گلیادین و TTG(Anti-tissue transglutaminase antibody) انجام شد. برای افتراق از بیماری‌های باکتریایی نظیر *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) از کشت باکتریایی استفاده شد. جهت رد علل ویروسی، نمونه‌های اسهالی با طول مدت بیشتر از ۲ هفته وارد مطالعه شدند. زیرا ژیاردیازیس دوره کمون طولانی تری از سایر عفونت‌های روده‌ای دارد(٦). در بیماران مشکوک جهت رد تغییرات آناتومیک غیر ژیاردیازیس با تشخیص پزشکان معالج از رادیوگرافی استفاده شد. نتیجه حاصل از آزمایشات علاوه بر ثبت در پرسشنامه و تجزیه و تحلیل آماری به روش χ^2 جهت ادامه درمان به پزشکان معالج نیز گزارش داده شد.

یافته ها:

شیوع آلودگی به ژیاردیا در افراد مورد مطالعه، ۲۰٪ (٦٤ نفر از ۳۲۰ نفر) بود. ٦٤ بیمار آلوده به ژیاردیا وارد این مطالعه شدند که ۳۸ نفر (۵۹/۳٪) مرد و ۲٦ نفر (٤۰/٦٪) زن بودند. بیشترین آلودگی به ژیاردیا در گروه سنی ۲۰-۱٦ سال با ۲۰/۳٪ (۱۳ نفر) و در سطح تحصیلات مقطع ابتدایی با ۳۱/۲۵٪ (۲۰نفر) دیده شد. شایع‌ترین شکایت در بیماران، شکم درد در ۲۷ نفر (٤۲/۱٪) (۵۹/۲٦٪ در مردان و ٤۰/۷٤٪ در زنان) بود. سایر علائم عبارت بودند از: نفخ، سرگیجه، ضعف، اسهال و استفراغ (جدول ۱). میزان بروز علائم در بین گروه‌های مختلف سنی تفاوت معنی دار نداشت ($P>0.05$) . شیوع نفخ ($P=0.003$)و درد شکم ($P=0.001$) در مردان به‌طور معنی دار بیشتر از زنان بود (جدول ۱). بین شیوع سایر علایم بالینی در مردان و زنان اختلاف معنی دار مشاهده نشد($P>0.05$).

جدول ۱: تظاهرات بالینی در بیماران مبتلا به ژیاردیازیس در شهر همدان – ۱۳۸۵

تظاهرات بالینی	مردان (درصد)	زنان (درصد)	کل		P-value
			تعداد	درصد	
اسهال	۳۳/۳	٦٦/۷	٦	۹/٤	۰/۹۵
نفخ	٦٦/۷	۳۳/۳	۱۵	۲۳/٤	۰/۰۰۳ *
ضعف	٦٦/۷	۳۳/۳	۳	٤/۷	۰/۲۳
تهوع و استفراغ	۷۵	۲۵	٤	٦/۳	۰/۱۱
بی اشتهایی	۷۵	۲۵	٤	٦/۳	۰/۱۱
دلپیچه	۱۰۰	۰	۱	۱/٦	۰/۳٤
یبوست	۰	۱۰۰	۲	۳/۱	۰/٤۳
کاهش وزن	۵۰	۵۰	۲	۳/۱	۰/۵۷
درد شکم	۵۹/۳٦	٤۰/۷٤	۲۷	٤۲/۱	۰/۰۰۱ *

* ارتباط معنی دار

بحث:

شیوع ژیاردیایس در مطالعات قبلی انجام شده در نقاط مختلف ایران ۵ تا ۲۳ درصد گزارش شده است(۷). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژیاردیایس در بین بیماران دارای علائم و شکایات گوارشی ۲۱/۳ درصد است . این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه دوامی و همکاران در سال ۱۳۸۱ در اراک (۱٦/٦ درصد)، نائینی و همکاران در سال ۷۹-۱۳۷۸ در شهر ری (۱۰/۱ درصد) مطابقت دارد. در حالیکه با مطالعه طاهرخانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ بر روی دانش آموزان عقب مانده ذهنی شهر همدان (۳۲/۹ درصد) مشفع و همکاران در سال ۱۳۷۹ در یاسوج (۳۲/۲ درصد) و نیز Nimri در سال ۲۰۰٤ در قطر(٤۰ درصد) متفاوت می باشد. تفاوت شیوع مطالعات به‌دلیل وضعیت بهداشتی پایین و نیز وجود کودکان عقب مانده می باشد (۱۱-۷).

در مطالعه حاضر شیوع ژیاردیازیس در جنس مذکر بیشتر است. هر چند در بعضی مطالعات شیوع دختران بیشتر گزارش شده است(٦). در این مطالعه گروه سنی ۲۰-۱٦ سال با ۲۰/۳ درصد از کل مبتلایان به ژیاردیا دارای بالاترین درصد ابتلا به ژیاردیایس بین کلیه گروه‌های سنی می باشد. در حالیکه در کشورهای توسعه یافته وقوع ناگهانی ژیاردیازیس در کودکان مهدکودک‌ها به‌وفور دیده می شود.

در مطالعه حاضر شایع‌ترین علائم بالینی شکم درد و نفخ شکم است که با مطالعه Vandenberg (۲۰۰۵) در انگلستان که شکم درد گزارش شد (٦)، مشابهت دارد. در حالیکه در مطالعه دیگری که در این منطقه توسط طاهر خانی و همکاران انجام شد بیشترین شکایت اصلی مبتلایان دردشکم بود (۸۰/۳ درصد) اما شایع‌ترین علامت اسهال و استفراغ بوده است (۱۲). شاید دلیل تفاوت در علائم مبتلایان این باشد که در مطالعه‌ای که چند سال گذشته انجام شده تست‌های افتراقی همچون سلیاک و آزمایش-های میکربی روی نمونه‌های ژیاردیا مثبت انجام نگرفته است. در حالیکه در مطالعه حاضر جهت افتراق نمونه‌های ژیاردیا مثبت از بیماری سلیاک و بیماری‌های باکتریایی، که علائم مشابه ژیاردیوز ایجاد می کنند، آزمایشات کشت باکتریایی و تست‌های سرولوژی مربوط به سلیاک انجام گرفت. با توجه به این نتایج بیشترین علامت و شکایت بیماران شکم درد و نفخ شکم گزارش شد که وقوع آن می تواند به وضعیت سیستم ایمنی میزبان و قدرت ویرولانس سویه‌های احتمالی ژیاردیای شایع در همدان مربوط باشد. استفراغ در مقایسه با علائم دیگر چون شکم درد و نفخ و.... از شیوع کمتری برخوردار بود (۱/۹٤ درصد). استفراغ در مطالعات ۲٤ درصد و ۳۵-۱۱ درصد گزارش شده است که با مطالعه Vandenberg مطابقت نداشت

(٦ و ٧). در این مطالعه بیشترین علائم بالینی در جنس مؤنث اسهال بود که با مطالعه Canete در سال ٢٠٠٦ در کوبا و wolfe در سال۱۹۹۲ درآمریکا مطابقت دارد (۱۳و١٤). علائم متفرقه دیگری همچون لاغری ، عدم وزن گیری و یبوست مشاهده شد که وقوع علائم و شدت آنها به وضعیت ایمنی میزبان، سویه و ویرولانس انگل و نیز داروی انتخابی مؤثر بر آنها بستگی دارد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه دقت ثبت علائم و تظاهرات در بیماران بود. سعی شد با مشاوره با پزشکان مجرب حتی‌الامکان دقت این اطلاعات افزایش یابد.

نتیجه گیری:

در بین جمعیت تحت مطالعه که دارای علائم ژیاردیا بودند، علائم اصلی مشابه علائم برخی از بیماری‌های غیر انگلی مانند بیماری‌های گوارشی نظیر سلیاک و بیماری‌های باکتریایی بود . لذا، به پزشکان توصیه می شود با مشاهده این علائم در بیماران احتمال آلودگی انگلی را در نظر داشته باشند. به پژوهشگران توصیه می شود سویه‌های ژیاردیای موجود در منطقه و ویرولانس آنها را مورد تحقیق قرار دهند. در نهایت باید یادآوری نمود که؛ با آموزش بهداشت فردی و اجتماعی، استفاده از آب‌های آشامیدنی سالم و بهداشتی جهت شرب، و ضدعفونی کردن سبزیجات و میوه جات، در چارچوب برنامه‌های کنترلی می توان از شیوع عفونت به مقدار زیادی کاست.

فهرست مراجع:

روده ای در کودکان ۱۳-۱ ساله ساکن در شهرک ولیعصر اراک در سال ۱۳۷۸. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک* ۱۳۸۱، دوره ۵، شماره ۱۹: صص ۵ تا ۱۰.

۹. طاهرخانی ح. بررسی وفور انگل‌های روده‌ای در بین دانش آموزان عقب مانده ذهنی شهر همدان در سال ۱۳۷۹. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اهواز* ۱۳۸۱، شماره ۳۲، صص ۵۸ تا ٦۳.

۱۰. مشفع ع، شریفی ا. شیوع آلودگی های انگلی روده‌ای در دانش آموزان دبستانی شهر یاسوج. *فصلنامه علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج* ۱۳۷۹، دوره ۵، شماره ۱۸-۱۷، صص ۱ تا ۹.

11. Nimri LF. Prevalence of giardiasis among primary-school children. *Child Care Health Develop* 1994; **20**(4): 231–237.

۱۲. طاهرخانی ح، سرداریان خ. اپیدمیولوژی و تظاهرات بالینی آلودگی ژیاردیائی در بیماران ارجاعی به آزمایشگاه تحقیقات انگل شناسی دانشکده پزشکی همدان در سال‌های ٨٤-۱۳۸۳. *مجله علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان* ۱۳۸٦، دوره ۱، شماره ۱، صص ٤٣ تا ٤٧.

13. Canete R, Escobedo AA, Gonzalez ME, Almirall P , Cantelar N. A randomized, controlled, open-label trial of a single day of mebendazole versus a single dose of tinidazole in the treatment of giardiasis in children. *Curr Med Res Opin* 2006; **22**(11): 2131-2136.

14. Wolfe MS. Giardiasis. *Pediatr Clin North Am* 1979; **26**(2): 295–303.

1. Adam RD. The biology of *giardia spp*. *Microbiol Rev* 1991; **55 (4)**: 706-732.

2. Douglas AS, Bennett S. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th edition. Philadelphia; Churchill livingstone. 2002; pp: 2888-2892.

3. Timothy B, Gardner R, David RH. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2001; **4** (1): 114-128.

4. Takahashi M, Katayama Y, Takada H, Hirakawa J, Kuwayama H. Silent infection of *Giardia lamblia* causing bleeding through vitamin K malabsorption. *J gastroent Hepato* 2001; **16**: 1171-1174.

۵. ادریسیان غ، رضاییان م، قربانی م، کشاورز ح و محبعلی م. *تک یاخته شناسی پزشکی*. تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸٦، صص،۲۵ تا۳۵

6. Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, Scheen R *et al*. Clinical and microbiological feature of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: A comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *Intern J Infect Dis* 2006; **10**: 255-261.

۷. نائینی ع، شیخانی ا، فلاح ن. بررسی شیوع انگل های روده ای در خانوارهای شهر سالم (منطقه سیزده آبان شهرستان ری)، سال ۱۳۷۸. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه شاهد* ۱۳۸۰، دوره ۸، شماره ٣٤، صص ٦٥ تا ۷۰.

۸. دوامی م، خزاعی م، اسلامی راد ز، مستوفی م، مدرسی م. بررسی شیوع و عوامل دموگرافیک موثر بر آلودگی‌های انگلی

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات۹۹-۹۱

شناسایی گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه خون بیماران مبتلا به کاندیدمی به روش Seminested PCR

محمد حسن شاه حسینی[۱*]، محمد نعمتیان سوته[۲]، محمد قهری[۳] سارا سعادتمند[۲] سید احمد حسینی[٤]

۱) گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
۲) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۳) گروه میکرب شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)
٤) آزمایشگاه رسالت، تهران
نویسنده رابط: دکتر محمد حسن شاه حسینی، گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
همراه ۰۹۱۲۳۳۰٤۰٦۹ shahhosseiny@yahoo.com

تارخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲٤ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: شاهد شیوع عفونت‌های قارچی از جمله *کاندیدا* و شیوع بیشتر بیماری ایدز، بدخیمی ها و افزایش اختلالات سیستم ایمنی هستیم. این امر زمینه را برای افزایش شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی‌سمی کاندیدایی خصوصا با گونه‌های غیر *آلبیکنس کاندیدا* فراهم کرده است. هدف از این مطالعه تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های کشت خون با استفاده از روش Seminested PCR بود.

روش بررسی: ۲۵۱٦ نمونه کشت خون در بیمارستان بقیه ا... در سال ۱۳۸۸از نظر رشد عوامل مخمری بررسی شد. نمونه‌های مثبت از جهت حضور *کاندیدا* با آزمون های فنوتیپی (مورفولوژی، بررسی رنگ کلنی روی محیط کروم آگار کاندیدا، آزمون لوله زایا و تولید کلامیدوسپور)و ژنوتیپی (Seminested PCR)، بررسی شد. DNAی همه نمونه‌ها به‌طور مستقیم ازکشت خون و با استفاده از کیت DNG-plus استخراج شد. برای PCR مرحله اول از پرایمرهای CTSF و CTSR که قطعه ITS2 (Internal Transcribed Spacer2) را تکثیر می کند استفاده شد. محصول مرحله اول به عنوان DNAی الگو برای انجام PCR مرحله دوم با استفاده از پرایمر عقبی مرحله اول(CTSR) و در حضور پرایمرهای اختصاصی گونه به نام های CADET ، CPDET، CTDET، CGDET و CDDET استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی به ترتیب برای شناسایی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا دابلینینسیس* بود. گونه مخمر با توجه به الگوی باندهای ایجاد شده روی ژل و اندازه آن تشخیص داده شد.

یافته ها: از ۱٤ (۰.۵٪) نمونه کشت خون ۱٦ ایزوله *کاندیدا* جدا و شناسایی شد. از این تعداد، ٦ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس*، ٤ ایزوله *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزوله *کاندیدا گلابراتا*، ۲ ایزوله *کاندیدا تروپیکالیس* بود. در دو نمونه خون، به‌طور همزمان دو گونه *کاندیدا* مشاهده و تعیین هویت شد(عفونت مخلوط). *کاندیدا دابلینینسیس* از هیچ نمونه‌ای جدا نشد.

نتیجه گیری: با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR ، امکان تشخیص سریع گونه های پاتوژن *کاندیدا* از نمونه‌های خون با حساسیت و ویژگی بالا، فراهم شد.

کلید واژه‌ها: *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیداهای غیر آلبیکنس*، کشت خون، Seminested PCR ، ITS2 .

مقدمه:

کاندیدا مخمرهای کوچکی با دیواره نازک هستند(٦-٤ میکرون) که از طریق جوانه زدن تکثیر می یابند. جنس *کاندیدا*، متعلق به رده ساکارومایستال و خانواده ساکارومایستاسه می باشد. هفت گونه در جنس *کاندیدا*، عامل فرصت طلب شناخته شده‌اند. در حالی که، بیماری-زایی سایر گونه‌ها به صورت موردی گزارش شده است (۱، ۲). کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه‌های مختلف *کاندیدا*، به‌خصوص *کاندیدا آلبیکنس*، ایجاد می شود. در طی دو دهه اخیر فراوانی و شدت این عفونت‌ها به‌دنبال استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی، افزایش چشمگیر یافته است. گونه‌های *کاندیدا* به صورت همزیست انسانی و حیوانی، در همه جا یافت می شوند. گونه‌های متعددی باعث کاندیدیازیس پوست، کاندیدیازیس دهان، واژینیت کاندیدایی، اونیکومایکوزیس(عفونت ناخن) کاندیدایی و سایر عفونت‌های سطحی می شوند. این موارد در افراد سالم نیز دیده می شود. عفونت‌های عمقی کاندیدایی که خون و یا سایر احشاء داخلی را درگیر می سازد (کاندیدیازیس سیستمیک) در افرادی که دچار ضعف یا نقص سیستم ایمنی هستند، دیده می شود(۵-۳).

امروزه بیماری کاندیدیازیس به عنوان یک مشکل مهم و به‌خصوص در بیماران بستری در بیمارستان قلمداد می شود. تا سال ۱۹۸۰ گونه *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان شایع ترین گونه بیماری‌زا معرفی می شد. ولی از دو دهه گذشته با شیوع روزافزون ایدز، بدخیمی‌ها و افراد دچار سرکوب ایمنی ، روز به روز بر شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی‌سمی کاندیدایی خصوصا با عواملی غیر از گونه *کاندیدا آلبیکنس* افزوده شده است (٦). مهم ترین چالش در مواجهه با کاندیدیازیس، ضایعات ناشی از گونه‌های غیر از *کاندیدا آلبیکنس* است، که به علت مقاومت دارویی آنها به داروهای متداول ضد قارچی می باشد. این گونه‌ها که تحت عنوان پاتوژن‌های نوپدید مطرح‌اند، عامل عفونت‌های غیرقابل کنترل بیمارستانی هستند. به‌عنوان مثال، گونه‌های *کاندیدا کروزئی* و *کاندیدا گلابراتا* به فلوکونازول و گونه-های *کاندیدا لوزیتانیا* و *کاندیدا تروپیکالیس* به آمفوتریسین B مقاوم می باشند. بنابراین، تعیین هویت سریع گونه‌های بیماری‌زا و تشخیص عوامل اتیولوژیک با چندین عامل بیماری‌زای کاندیدایی (عفونت مخوط) الزامی است(٦، ۷). خوشبختانه فناوری‌های مولکولی شناسایی بر پایه DNA ، افتراق صحیح و سریع گونه‌های *کاندیدا* را ممکن می سازد. روش‌های متعددی از گذشته تا حال برای تعیین هویت گونه‌های بیماری زای *کاندیدا* به کار رفته است. این روش ها را به‌طور کلی می توان به دو گروه فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم کرد. از روش های فنوتیپی می‌توان بررسی خصوصیات مورفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، جذب و تخمیر قندها، روش‌های سرولوژی، استفاده از محیط‌های رنگ زای تجاری همانند محیط کشت کروم آگار کاندیدا و روش‌های دیگر را نام برد(۸، ۹). روش‌های ژنوتیپی نیز متنوع می باشند. از جمله می توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR ، تعیین توالی نواحی ژنی خاص، و real-time PCR اشاره کرد(۱۰، ۱۱). تمام این روش‌ها مفید هستند و هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. روش‌های سنتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه‌های مخمری از جمله *کاندیدا* قابل استفاده است. ولی این روش بسیار وقت گیر است و برای بیمار و پزشک مفید نیست. زیرا، حداقل به یک تا دو هفته زمان نیاز دارند. این روش‌ها همچنین غیر حساس، پرهزینه و پرزحمت است(۱۲). روش های دیگر تشخیص، نظیر ردیابی آنتی بادی، عمدتا در افراد مبتلا به سرکوب ایمنی غیرقابل استفاده است. زیرا، این افراد توانایی پاسخ به عفونت از طریق تولید آنتی بادی را ندارند و یا در صورت تولید ، مقدار آن برای ردیابی ناکافی می باشد. ولی استفاده از روش‌های تشخیصی بر پایه DNA همانند PCR دارای حساسیت و ویژگی بالا است. روش مولکولی Seminested PCR برای تشخیص *کاندیداهای* مهم پاتوژن شامل *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا دابلینینسیس* استفاده می‌شود(۱۳، ١٤). هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های کشت خون با استفاده از روش Seminested PCR بود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه توصیفی مقطعی برای شناسایی و تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* در نمونه خون بیماران، با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR (snPCR) انجام شده است. بین ماه‌های اردیبهشت تا آذر ۱۳۸۸، از ۲۵۱٦ نمونه خون بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان بقیه ا... که به آزمایشگاه میکرب شناسی آن بیمارستان ارسال

شده بود، کشت ۱٤ نمونه (۰.۵٪) از نظر عوامل مخمری مثبت بود. این دسته از نمونه‌های خون جمع‌آوری شد تا با انجام آزمون‌های مختلف فنوتیپی و آزمون مولکولی، تعیین هویت شوند.

سویه‌ها: شامل دو گروه بودند: الف) سویه‌های استاندارد که عبارت بودند از: *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 10231)، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (ATCC 22092) ، *کاندیدا تروپیکالیس* (ATCC 0750) ، *کاندیدا گلابراتا* (ATCC 90030) و *کاندیدا دابلینینسیس* (CD36) . این سویه‌ها در لوله‌های حاوی گلیسرول۲۰٪، در فریزر با دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند). ب) ایزوله-های مخمری جدا شده از نمونه کشت خون بیماران. ۱٦ ایزوله *کاندیدایی* که از ۱٤ نمونه خون بیمار جدا و شناسایی شد.

کشت بر روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا: سویه‌های استاندارد برای کنترل آزمایش‌ها و همچنین بهینه نمودن PCR استفاده شد.این گونه‌ها روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار(Merck) کشت شد و در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ٤۸ تا ۷۲ ساعت با فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل مقدار کمی از کلنی آنها بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا(CHROMagar Company,France) کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ٤۸ ساعت، کلنی‌ها از نظر مورفولوژی و رنگ پیگمان بررسی شدند. این آزمایش بر روی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های خون هم انجام شد.

آزمون لوله زایا : با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت شد و درون نیم میلی‌لیتر سرم انسان کاملا مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت نگهداری شد. سپس با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل یک قطره از سوسپانسیون فوق روی لام گذاشته شد و روی آن لامل قرار گرفت. وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ضعیف (٤۰ X) بررسی شد.

بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰ (*CMA-T80*): مخمرهای هر دو گروه (سویه‌های استاندارد و جدا شده از نمونه کشت خون بیماران) ابتدا بر روی محیط سابوردکستروز آگار کشت داده شدند. سپس با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل به صورت شیارهای کم عمق و موازی بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین۸۰ (Himedia) تلقیح شد. محیط های کشت به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکرسکوپ وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی بررسی شد.

استخراج *DNA* کاندیدا: جهت استخراج DNA از سویه های استاندارد *کاندیدا که* در محیط سابورو دکستروز آگار رشد کرده بودند، از روش جوشاندن استفاده شد. برای این منظور یک حلقه از کلنی تازه برداشته شد و به لوله ۱/۵میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شد. سپس لوله در آب در حال جوش قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه لوله خارج شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی که حاوی DNA مخمر بود وارد لوله جدید شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج DNA از نمونه‌های کشت خون بیماران از کیت DNG-plus شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل آن استفاده گردید.

واکنش PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد: ۲/۵میکرولیتر بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، ۱ میکرولیتر(10mM) dNTPs،۱میکرولیتر پرایمر جلویی CTSF ، ۱میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µl) ، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۱۵/۵میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده. سیکل‌های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR مرحله اول بدین شرح بود: دناتوراسیون ابتدایی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ سیکل به صورت زیر دنبال می شد: دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله تکثیر انتهایی ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۷ دقیقه.

واکنش PCR مرحله دوم: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، ۱ میکرولیتر(mM 10) dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی گونه، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase(5u/µl) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱٦/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده تا

حجم کل را به ۲۵ میکرولیتر برساند. دستور دمایی برای انجام PCR مرحله دوم همانند مرحله اول است، ولی تعداد سیکل‌ها از ۳۰ به ۲۵ کاهش یافت.

جهت بهینه سازی تستPCR ، غلظت پرایمر، MgCl2، dNTP ، آنزیم Taq DNA Polymerase و همینطور دستور حرارتی طبق قواعد استاندارد آزمایش شد.

مشاهده محصول PCR : محصول PCR مرحله اول(بین bp ۳۰۹ تا bp ٤١٣ متناسب با نوع *کاندیدا*) در ژل آگارز ۱/۸٪ و محصول PCR مرحله دوم در ژل آگارز ۲/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن 10 mg/ml) در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید.

تعیین اختصاصیت و حساسیت تست PCR بهینه شده : برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده، DNA گونه‌های *کاندیدا* و DNA جنس‌های مختلف باکتریایی از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس*، *پسودوموناس آئرژنوزا* و همچنین نمونه DNA انسان استخراج شد. با انجام PCR روی این نمونه‌ها، ویژگی تست ارزیابی شد. برای تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، رقت‌های سریال از گونه *کاندیدا آلبیکنس* تهیه شد و تعداد مخمرها با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش شد. از هر رقت برداشته شد و DNA با روش جوشاندن استخراج شد. سپس با استفاده از DNA های استخراج شده و نمونه شاهد مثبت و منفی، حساسیت تست PCR تعیین گردید.

توالی یابی : تعیین توالی DNA در هر دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره(Dideoxy ChainTermination) و به‌وسیله کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

یافته ها

١٦ایزوله *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های خون به ترتیب به صورت ذیل تعیین هویت شدند: ٦ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس*، ٤ ایزوله *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزوله *کاندیدا گلابراتا* و ۲ ایزوله *کاندیدا تروپیکالیس*. در دو نمونه خون به طور همزمان، دو گونه مختلف *کاندیدا* مشاهده شد (*کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* در نمونه بیمار اول، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در نمونه بیمار دوم). در هیچ یک از نمونه‌های بالینی *کاندیدا دابلینینسیس* جدا نشد.

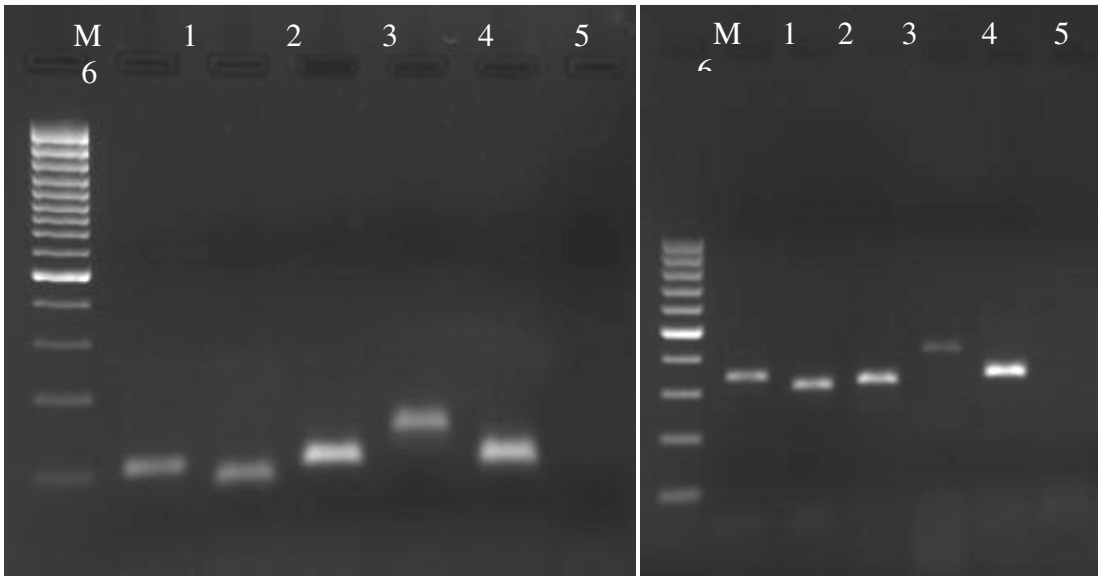
شناسایی فنوتیپی:الف) گونه‌های *کاندیدا* که از قبل هویت آنها مشخص بود. در محیط کشت کروم آگار کاندیدا ، کلنی های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا دابلینینسیس* به ترتیب به رنگ سبز، صورتی پر رنگ، کرم- صورتی کم رنگ، آبی و سبز نمایان شدند. البته شناسایی از روی رنگ (با توجه به رنگ‌های معرفی شده در دفترچه شرکت سازنده) بین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* دشوار بود. در ضمن رنگ کلنی *کاندیدا پاراپسیلوزیس* غیر اختصاصی بود. آزمون لوله زایا در گونه-های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* مثبت بود.

بر روی این پنج گونه *کاندیدا*، تست کورن میل آگار توئین ۸۰ انجام شد. نتایج عبارت بودند از: مشاهده بلاستوسپور، هایف‌های کاذب و حقیقی به همراه کلامیدوکونیدی در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس*، در *کاندیدا گلابراتا* فقط بلاستوسپور ، در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* علاوه بر بلاستوسپور، هایف‌های کاذب نیز مشاهده شد.

در این آزمون، کلنی‌های مربوط به دو بیمار که مبتلا به عفونت مخلوط بودند به صورت تک رنگ نبود. از این‌رو با دقت کلنی‌ها جدا شدندو به محیط کشت جدید برای بررسی بیشتر منتقل شدند. آزمون لوله زایا ٦ ایزوله از ١٦ ایزوله جدا شده از نمونه خون، که بر روی کروم آگار کاندیدا کلنی های سبز روشن تولید کرده بودند، مثبت بود. این ٦ ایزوله در محیطCMA T80 کلامیدوکونیدی تولید کردند. ٤ایزوله، کلنی‌هی صورتی کم رنگ ایجاد کرده بودند و روی محیط CMA T80 ، بلاستوسپور به همراه هایف-های کاذب تولید کردند. آزمون لوله زایا در آنها منفی بود. ٤ ایزوله در محیط رنگ زای کروم آگار کاندیدا کلنی‌های صورتی براق و گنبدی شکل تولید کردند. آزمون لوله زایا در آنها، منفی بود و روی محیط CMA T80 فقط بلاستوسپور تولید کردند. ۲ایزوله نیز کلنی‌هایی به رنگ آبی ایجاد کرد و آزمون لوله زایا آنها منفی بود. این ایزوله‌ها در محیط CMA T80 بلاستوسپور به همراه هایف‌های کاذب تولید کردند.

شناسایی ژنوتیپی: شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR مرحله اول و دوم بعد از بهینه سازی را نشان می‌دهد. در این مورد DNAی الگو به طریق جوشاندن از سویه‌های استاندارد *کاندیدا* استخراج شد.

حساسیت تست Seminested PCR در این مطالعه ۷ سلول *کاندیدا آلبیکنس* تعیین شد. همچنین این تست دارای ویژگی بسیار بالا بود. به‌طوری که جز با DNA *کاندیدا آلبیکنس* با هیچ کدام از DNA های بکار رفته در این آزمایش واکنش نشان نداد.(شکل ۲).

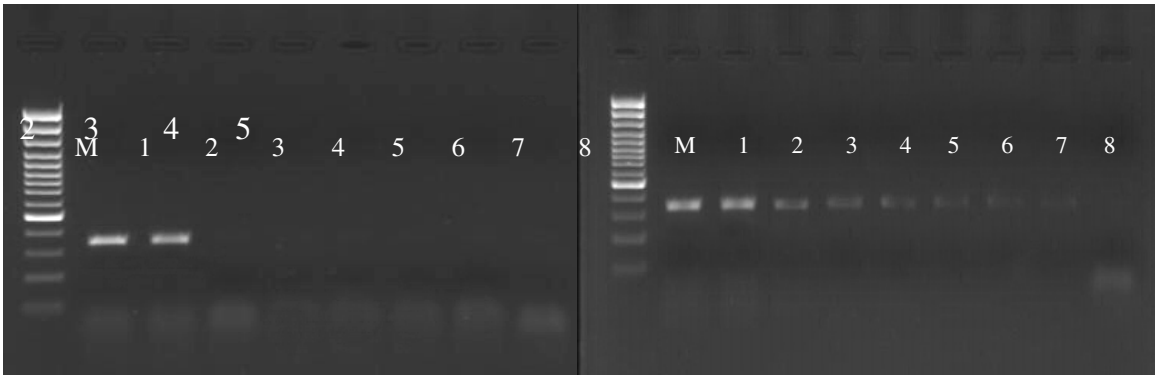


شکل 1b شکل1a

شکل۱- محصولات مرحله اول و دوم **PCR** بهینه سازی شده.

شکل **۱a** : ستون **M** ،سایز مارکر شرکت فرمنتاس **100bp DNA ladder** ۱: محصول **PCR** مرحله اول حاصل از **DNA**ی ژنومی *کاندیدا آلبیکنس*،۲: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*،۳: *کاندیدا تروپیکالیس*،٤: *کاندیدا گلابراتا*، ٥: *کاندیدا دابلینینسیس*،٦: شاهدمنفی.

شکل **۱b**: ستون **M** : سایز مارکر شرکت فرمنتاس **100bp DNA Ladder plus** ، ۱ : محصول **snPCR** حاصل از **DNA**ی *کاندیدا آلبیکنس*، ۲: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ۳: *کاندیدا تروپیکالیس*، ٤: *کاندیدا گلابراتا*، ٥: *کاندیدا دابلینینسیس*، ٦: شاهد منفی.



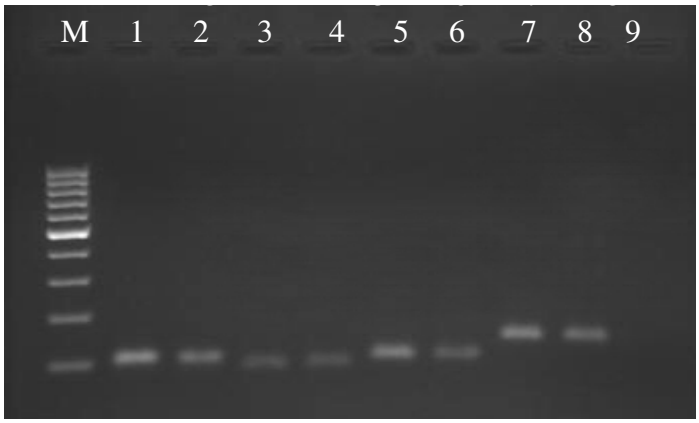
شکل ۲b شکل a **2**

شکل ۲- حساسیت و ویژگی تست **PCR** .

شکل **۲a**: ستون **M**، سایز مارکر شرکت فرمنتاس **100bp DNA Ladder plus** ، ۱: شاهد مثبت، ۹-۲: نمونه های مشخص وبه ترتیب شامل۲: **42250 CFU** ، ۳: **7605 CFU** ،٤: **1690 CFU** ،٥: **338 CFU** ،٦: **64 CFU** ، ۷: **18 CFU** ، ۸: **7 CFU** ، ۹: شاهد منفی.

شکل **b ۲** – ستون **M** : سایز مارکر شرکت فرمنتاس **100bp DNA Ladder plus** ، ۱: شاهد مثبت (*کاندیدا آلبیکنس*)، ۲: *کاندیدا آلبیکنس*، ۳: **DNA**ی انسان، ٤: **DNA**ی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ٥: **DNA**ی *پسودوموناس آئرژئوزا*، ٦: **DNA**ی *اشریشیا کلی* ، ۷: **DNA**ی *باسیلوس سرئوس*، ۸: شاهد منفی.

نتـایج روش تشخیصـی Seminested PCR بـر روی نمونه‌های بالینی شامل شناسایی و تعیـین هویـت ٦ ایزولـه *کانـدیدا آلبیکنس*،٤ ایزوله *کانـدیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزولـه *کانـدیـدا گلابراتـا* و ۲ ایزولـه *کانـدیـدا تروپیکـالیس* بـود (شکل۳). نتیجه آزمون ژنوتیپی با آزمون‌های فنوتیپی کـاملا مطابقت داشت. جهت بررسـی و نایید محصـولات PCR مرحله دوم مربوط به گونه‌های مختلـف *کانـدیـدا*، قطعـات DNA توسط تکنیک sequencing تعیین تـوالی شـدند. مقایسه توالی های حاصل با سکانس های موجود از طریـق برنامه BLAST ، مطابقت حدود ۱۰۰درصد را نشان داد.



شکل ۳: محصول PCR مرحله دوم چهار گونه کاندیدا شناسایی شده در نمونه های خون در کنار شاهد مثبت را نشان می دهد.
ستون M: سایز مارکر شرکت فرمتاس 1oobp DNA Ladder ، ۱: شاهد مثبت *کاندیدا آلبیکنس*، ۲: *کاندیدا آلبیکنس جدا شده*، ۳: شاهد مثبت *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤: *کاندیدا پاراپسیلوزیس* جدا شده ، ٥: شاهد مثبت *کاندیدا تروپیکالیس*، ٦: *کاندیدا تروپیکالیس* جدا شده ، ۷: شاهد مثبت *کاندیدا گلابراتا*، ۸: *کاندیدا گلابراتا جدا شده* ، ۹: *شاهد منفی*.

بحث:

در مطالعه حاضر DNA گونه‌های مختلف *کاندیدا* به‌طور مستقیم از نمونه‌های خون استخراج شد و به عنوان DNA الگـو مـورد اسـتفاده قرارگرفـت. بـا اسـتفاده از روش Seminested PCR ، عفونت‌های مخلوط تشخیص داده شد و گونه‌های *کاندیدا* درگیر در این نـوع عفونـت تعیـین هویت شد. کارایی ایـن روش تشخیصـی بـرای شناسـایی سویه های استاندارد و همچنین برای شناسایی ایزولـه‌هـای خونی مجهول بیماران، نشان داده شد.

امروزه بـه‌دلیـل شـیوع بیمـاری کاندیـدیازیس و همچنـین مقاومت دارویی بعضی از گونه‌های *کاندیدا*، تعیـین هویـت عوامل بیماریزا در سطح گونه بسیار ضـروری بـه‌نظـر مـی رسد. کاندیدیازیس خونی با مرگ و میر چشمگیری همـراه است. بنابراین، این دسته از بیماران باید هر چـه سـریع تـر تحـت درمـان ضـد قـارچی قـرار بگیرنـد. اغلـب مـوارد کاندیدیازیس عمقی در میزبان تضعیف شده دیده می شود. اشـکال احشـایی و کشـنده کاندیـدایی بیشـتر در افـراد نوتروپنیک مبتلا بـه بـدخیمی تحـت درمـان و یـا بیمـاران بخش جراحی یا سوختگی دیده می شود. سـرکوب ایمنـی منجر به عفونت خونی کاندیـدیازیس مـی شـود (٤، ١٥ و ١٦). مهم ترین عوامل مستعد کننـده عبارتنـد از: بـدخیمی خونی، پیوند مغز استخوان یا پیوند عضو و درمان سرکوب کننـده ایمنـی شـامل شـیمی درمـانی سـرطان، درمـان بـا کورتیکواستروییدها و غیره (۱۷، ۱۸).

با اسـتفاده از روش‌هـای تشـخیص آزمایشـگاهی مرسـوم همانند به‌کارگیری محیط‌های کشت معمولی مانند سـابورو دکستروز آگار، امکان تعیین گونه‌های *کاندیدا* وجود نـدارد. به‌کارگیری محیط کشت افتراقـی کـروم آگـار کاندیـدا کـه کروموژنیک می باشد، محدود بـه شناسـایی چنـد گونـه از کاندیداهای پاتوژن است. بـه‌عـلاوه نسـبت بـه روش‌هـای مولکولی نوین، به زمان بیشتری برای دسـتیابی بـه جـواب نیازمند است (۹، ۱۹). آزمون‌های بیوشیمیایی وقـت گیـر و یا در بعضی موارد پرهزینه است. به‌طور کلی آزمایش‌هـای سرولوژی که در حال حاضر در دسترس هستند، حساسیت یا جنبه اختصاصی محدودی دارنـد. آنتـی بـادی سـرمی و

ایمنی با واسطه سلولی در اکثر افراد قابل مشاهده هستند که ناشی از تماس دائمی با *کاندیدا* است. متاسفانه شناسایی آنتی‌بادی‌های *کاندیدا* در مدت زمان کوتاهی به سرعت، حساسیت و ویژگی خود را از دست می دهد. در ضمن آنتی بادی در افراد با ایمنی سرکوب شده به علت عدم توانایی پاسخ به عفونت ، دشوار است. در مورد آشکار سازی آنتی‌ژن‌ها، ردیابی مانان دیواره سلولی در گردش خون، با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس یا الیزا، بسیار اختصاصی تر است. ولی این آزمایش فاقد حساسیت می باشد، چون بسیاری از بیماران فقط به‌طور گذرا مثبت می شوند، بنابراین عیارهای قابل توجه و قابل ردیابی از آنتی ژن پیدا نمی کنند(۲۰). آزمون بررسی تولید لوله زایا یکی از ابتدایی‌ترین روش های تشخیص *کاندیدا آلبیکنس* است. ۹۵تا ۹۷ درصد ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* توانایی تولید لوله زایا را دارند. بنابراین، با مثبت بودن جواب آزمایش، نمی توان آن را به‌طور یقین به *کاندیدا آلبیکنس* نسبت داد. برای متمایز نمودن این دو گونه *کاندیدا* نیاز به آزمایش‌های تکمیلی ضروری به‌نظر می رسد. جهت جدا نمودن *کاندیداهای غیر آلبیکنس* از *کاندیدا آلبیکنس* از محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ استفاده می شود. در این محیط، علاوه بر *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا دابلینینسیس* نیز قادر به ایجاد کلامیدوکونیدی(کلامیدوسپور) می باشد، به‌علاوه، این آزمایش نیز وقت گیر است.

امروزه روش های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها کمک شایانی می کند. لذا، در این مطالعه استفاده از روش مولکولی بر پایه PCR برای تعیین هویت گونه‌های شایع و بیماریزای *کاندیدا* مورد بررسی قرار گرفت. در طی دهه اخیر، جهت PCR برای تشخیص کاندیدیازیس، از ژن‌های مختلف چون منطقه متغییر D1/D2 در ناحیه ژنی rDNA ، hsp90 ، ERG11 ، کیتین سنتاز، آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، DNA میتوکندریایی، اکتین، توبولین، تعدادی از قطعات ژنی rRNA مشتق از نواحی نسخه برداری شده درونی(ITS) و 5S rRNA ، 18S rRNA و 28S rRNA انجام شده است. در این مطالعه DNA هدف، قطعه rDNA بود. از این قطعه ژنی چندین نسخه در هر ژنوم کاندیدا وجود دارد(۱۰۰-۵۰کپی). به‌طور معمول تست PCR در صورتی که DNA هدف واجد توالی‌های تکرار شونده باشد نسبت به اهداف تک نسخه ، از حساسیت بیشتری برخوردار است (۲۱، ۲۲). از جمله زیر مجموعه‌های فوق العاده حفاظت شده rDNA ، قطعات ITS می باشد که در میان گونه‌های مختلف *کاندیدا* دارای سکانس‌های منحصر بفرد است. بنابراین، با استفاده از پرایمرهای مرتبط به این نقاط، شناسایی گونه-های مختلف *کاندیدا* امکان پذیر شد. اگرچه اخیرا چندین آزمون PCR برای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسایی گونه‌ها شامل انجام آزمون‌های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می توان به هضم آنزیمی محصول PCR به‌وسیله آنزیم‌های محدودالاثر(۲۴و۲۳)، استفاده از پروب‌های نشان دار با مواد رادیو اکتیو ، آنزیم‌های نشان دار و تعیین توالی محصول تکثیر شده را نام برد (۲۸-۲۵). بسیاری از این فرایندها، زمان بر، پر هزینه و با توجه به بکارگیری مواد رادیو اکتیو خطرناک هستند. در مقابل روش Seminested PCR که در این مطالعه به‌کار گرفته شد به مدت زمان کمتر (به طور میانگین ۷ تا ۸ ساعت) نیاز دارد و به پروب‌های هیبریدیزاسیون و مواد رادیو اکتیو احتیاج ندارد. اما از معایب آن می توان به خطر بالاتر آلودگی و همینطور زمان طولانی تر نسبت با آزمون‌های تک مر حله‌ای اشاره کرد.

Fujita و همکاران از سیستم Multiplex PCR برای تکثیر قطعات ژنی ITS1وITS2 استفاده کردند. در آن روش به تعداد DNA الگو بیشتری احتیاج بود در نتیجه نسبت به روش Seminested PCR از حساسیت کمتری برخوردار است (۱۳، ۲۶). میرهندی و همکاران روش PCR-FSP را برای تکثیر قطعه ITS1 و ITS2 و شناسایی گونه‌های *کاندیدا* استفاده کردند. اما افتراق *کاندیدا آلبیکنس* از *کاندیدا دابلینینسیس* با این روش میسر نبود (۳۰). سهیل احمد و همکاران در کنار سیستم‌های تشخیصی Vitekو ID32C برای شناسایی *کاندیداهای* بیماری‌زا از نمونه های سرم بیماران از روش Seminested PCR استفاده کردند. با توجه به نتایج به دست آمده، ویژگی این آزمون ۹۹ درصد و حساسیت آن به اندازه تشخیص یک ژنوم *کاندیدا* در هر میلی لیتر سرم بیان شد (۱۳).

در مطالعه حاضر کارایی Seminested PCR ، برای شناسایی سویه‌های استاندارد و ایزوله‌های خونی مجهول بیماران، نشان داده شد. این روش به عنوان یک روش سریع، مطمئن و دارای حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص گونه‌های بیماریزای *کاندیدا* در آزمایشگاه‌های بالینی توصیه می شود.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج به‌دست آمده می توان بیان کرد که روش Seminested PCR ، که در این مطالعه برای شناسایی *کاندیداهای* پاتوژن استفاده شد، حساسیت و ویژگی بالا دارد. این روش نسبت به روش‌های متداول تشخیصی به مدت زمان کمتری نیاز دارد.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از آقای داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه رسالت، خانم بیرقی، خانم عبدلی و کارکنان آزمایشگاه رسالت به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و همکاری های صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. همچنین مراتب تشکر خود را از آقای دکتر سلطان پور، خانم مجیدی و خانم جدی و آقای افشار از بیمارستان بقیه ا... برای در اختیار گذاشتن نمونه‌های کشت خون و خانم آقاپور از بیمارستان شریعتی ابراز می دارد.

فهرست مراجع:

1. Dalle F, Franco N, Lopez J. comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin Microbial* 2000; 38:4554-9.
2. Karahan Z.C, Guriz H, Agirbasli H,Balaban N, Gocmen J.S, Aysev D, *et al*. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness.*Mycoses* 2004;47:465-469.
3.Reise E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D C, ebeaupuis J P, *et al*. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol.*1998; 36(Suppl.1):249-25.
4.Martin GS, Mannimo DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. *New Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.
5. Bodey GP, Anaissie Ey, Edwards JE. Definition of *Candida* infection – In: Bedey GP, ed. *Candidiasis : pathogenesis, diagnosis, and treatment*. New York, Raven Press, 1993; pp:407-408.
6. Yun-liang Y, Shu-Ying L, Hsiao-Hsu C, Hsiu-jung L. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1990 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 83-99.
7. Sandven P. lassen G. Importance of selective media for recovery of Yeasts from clinical speciments. *J Clin Microbiol* 1990; 37(11): 3731- 3733.
8.Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindos G, Sentandreu R, Ponton J: Comparison Of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in *Canada*. *Mycoses* 1997; 40 :445-450.
9. Freydie’re AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. *Candida* ID. A new chromagenic medium compared to *Albicans* ID2. *Clin Microbial Infect* 2000; 6(supp1.1): 181.
10.Lott TJ, Burns BM, Zancope-Oliveira R, Elie DM, Reiss E: Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within genus *Candida*. *Current Microbiol* 1998; 36:63-69.
11.Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, *et al*. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Mirobiol* 2000; 38: 2302-2310.
12. Ajello L, Hay RJ. Unicelluar Ascomycetous, *Candida* species. *Medical mycology* , Arnold Publication, Ninth edition. 1999; PP:423-450.
13. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2483–2489
14. Suhail Ahmad, Eiman Mokaddas, Noura Al-Sweih, Zia U Khan. Phenotypic and molecular characterization of *Candida dubliniensis* isolates from clinical specimens in Kuwait. *Med Princ Pract* 2004;14(suppl 1):77–83
15.Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40:87-109.
16. Mannarelli B.M, Kurtzman C.P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J. Clin. Microbial* 1998; 36(6): 1634-1641.

17. Dinubile M.J, Hille D, Sable C.A, Kartsonis N.A. Invasive candidiasis in cancer patients: observation from a randomized clinical trial. *J Infect*. 2005; 50: 443-449.
18. Body G.P, Mardani M, Hanna H.A. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*.2002; 112:380-5.
19. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. Evaluation of *Candida* ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. *J Clin Microbial* 2005; 39:1647-1649.
20. Arjuna N.B Ellepola , Christine J. Morrison. Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. *J Microbiol* .2005; 43:64-85.
21.Mitchel, T. G., R. L. Sandin, B. H. Bowman, W. Meyer, W, G. Merz. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology . *J. Med. Vet. Mycol.*1994; 32(Suppl. 1): 351- 366.
22.Reiss, E., K. Tanaka, G. Bruker, V. Chazalet, D. Coleman. J. P. Debeaupuis, *et al*. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol*.1998;36(Suppl. 1) :249- 257.
23.Morace, G., L. Pagano, M. Sanghinetti, B. Posteraro, L. Mele, F. Equitani, G. *et al*. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrible patiens with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol*.1999; 37:1871-1875.
24. Williams, D. W., M. J. Wilson, M. A. Lewis, A. J. Potts. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol*.1995; 33:2476-2479.
25.Botelho, A. R. , and R. J. Planta. Specific identification of *Candida albicans* by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers. *Yeast* 1994; 10:709-717.
26. Fugita, S., Y.Senda, S. Nakagughi, T. Hashimoto. Multiplex PCR using internal transcribed spwcer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strain. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39:3617-3622.
27. Kan, V. L. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J. Infect. Dis*.1993; 168:779-783.
28. Shin, J. H., F. S. Nolte, and C. J. Morrison. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J.Clin. Microbiol* 1997;35: 1454-1459.
29. Chang, H. C., S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Whu, and T. C. Chang. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J. Clin. Microbiol*.2001; 39: 3466-3471.
30. Mirhendi H, Idin H , Shidfar MR , Kordbacheh P , Hashemi SJ , Moazeni M, *et al*. Identification of pathogenic *Candida* species by PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) method. *Ira J Public Health*. 2008; 66(9): 639-645.

مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۰۳-۱۰۰

مقاله کوتاه

مطالعه فیلوژنتیکی ویروس انفلوآنزا A، ساب تایپ H5N1 ، در همسایگان ایران طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۳

علی نجفی[۱]، حمید رضا توکلی *[۲] ، علی مهرابی توانا [۳] ،مهدی قربانعلی زادگان [۱]، رضا رنجبر[۱]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج).
۲) گروه تغذیه ، مرکز تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۳) مرکز تحقیقات بهداشت و مدیریت سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
نویسنده رابط: حمید رضا توکلی، گروه تغذیه، مرکز تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
همراه: ۰۹۱۲۲۳۹۳۳۱۹ **h.tavakoli1344@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۷/ ۸۹/۱

چکیده:

زمینه و اهداف: ساب تایپ H5N1 ویروس انفلوآنزا، که با قدرت کشندگی بالا می باشد، در سال‌های اخیر باعث تلفات زیادی در منطقه آسیا و به‌ویژه در کشورهای آسیای شرقی و خاور میانه شده‌است. هدف این مطالعه تعیین فیلوژنتیک ویروس انفلوآنزا A، ساب تایپ H5N1 ، در همسایگان ایران طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۳ بود.

روش بررسی: از الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی همترازی سکانس‌ها استفاده شد. سکانس‌های ژنی و پروتئینی ژن هماگلوتینین ساب تایپ H5N1 ویروس انفلوآنزا که در بانک‌های ژنی و پروتئینی کشورهای همسایه ایران گزارش شده بود، استخراج شد و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: بین سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۳، از بروز عفونت انفلوآنزا ساب تایپ H5N1 در کشورهای همسایه ایران ۲۳۷ گزارش به بانک ژنوم (GenBank) گزارش شده بود. پس از بررسی ٦٤ مورد سکانس غیر تکراری استخراج شد. در نهایت ٦٤ سکانس ژن و پروتئین هماگلوتینین با استفاده از الگوریتم بیوانفورماتیکی Clustal و نرم افزارهای clustalWو MEGA4 سکانس ژنومی و اسیدآمینه بررسی و تجزیه و تحلیل شد. سرانجام درخت فیلوژنتیکی این ویروس‌ها تعیین گردید. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن هماگلوتینین نشان داد که این ویروس از مرزهای شمالی کشور به‌ویژه روسیه و کشورهای تازه استقلال یافته آسیای میانه وارد ایران شده است. سپس از منطقه شمالی در داخل کشور گسترش یافته است.

نتیجه گیری: ویروس انفلوانزای نوع H1N1 از طریق کشورهای همسایه شمالی وارد کشور ایران شده‌است.

واژگان کلیدی: فیلوژنتیک، انفلوآنزا A ، H5N1، ایران

مقدمه :

انفلوآنزا و عوارض آن سالانه باعث مرگ و میر هزاران نفر در جهان می‌شود. وحشتناک‌ترین همه گیری جهانی در قرن بیستم، انفلوآنزا اسپانیایی (۱۹۱۸) بود که طی آن حدود ٤٠ میلیون نفر (بیش از تلفات جنگ جهانی اول) کشته شدند. از آن سال تا حدود دو دهه پیش، به‌طور متوسط هر ۱۰ تا ۱۵ سال، یک همه گیری جهانی از انفلوآنزا رخ داده است(۳-۱).

گلیکوپروتئین‌های آن ویژگی‌های متنوعی دارند. تغییرات ژنتیکی در ژنوم HA و NA باعث تفاوت در ساختمان پروتئینی آنها و بروز ساب تایپ‌های آنتی‌ژنیک می‌شود. ویروس انفلوآنزا تایپ A، ١٦ ساب تایپ از هماگلوتینین و ۹ ساب تایپ از نورآمینیداز دارد. ساب تایپ‌ها با یکدیگر تلاقی داشته و ویرو س‌های جدیدی ایجاد می کنند. لذا، یک منبع عظیم از ویروس‌های انفلوآنزا فراهم می شود که به‌طور دایم دربین پرندگان درحال انتشار است(۱).

بروز عفونت و حدت آن وابسته به سویه ویروسی و گونه میزبان است. این امر ناشی از فعالیت آنزیمی میزبان در ایجاد واکنش پروتئولیتیک در پروتئین HA به عنوان پیش نیاز اصلی عفونت‌زائی ویروس در میزبان‌های مختلف می باشد (٤و ٥).

از ۱۹۹٦ ویروس انفلوآنزای پرندگان ساب تایپ H5N1 به عنوان بزرگترین خطر پاندمی بعدی مطرح است. طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ این ویروس بیش از ۱۰۰نفر با تلفات بیش از ۵۰ درصد، را مبتلا نموده‌است. در حال حاضر، این ویروس شدیداً بیماریزا در میان پرندگان آسیای دور تقریبا اندمیک است. بروز اسپورادیک آن در انسان‌ها از مناطق مختلف گزارش شده‌است. یعنی ممکن است ویروس با موتاسیون و یا با امتزاج با عناصر ژنتیکی ویروس انفلوآنزای انسانی یک ویروس جدید ایجاد نماید، که بتواند بالقوه باعث انتقال انسان به انسان هم شود. لذا، سازمان جهانی بهداشت (WHO) روند افزایشی ابتلاء انسان به ویروس H5N1 را یک بحران بهداشت عمومی تلقی نموده‌است. همچنین احتمال وقوع پاندمی انفلوآنزایی با منشاء ویروس انفلوآنزای پرندگان ساب تایپ H5N1را پیش بینی نموده‌است(٤و ٥).

هدف از انجام این مطالعه تعیین تغییرات ژنومی و پروتئینی هماگلوتینین HA ویروس H5N1 و در نتیجه تعیین مسیر انتشار ویروس در منطقه خاور میانه به‌وسیله پرندگان و به تبع آن در انسان‌ها بود.

در این مطالعه تعداد ۲۳۷ گزارش مربوط به بروز عفونت انفلوآنزا ساب تایپ H5N1 ،که از سال ۲۰۰۳ الی ۲۰۰٦ در کشورهای همسایه ایران به بانک ژنوم (GenBank) گزارش شده بود، جمع آوری گردید. این کشورها شامل: افغانستان (۷ مورد)، ایران (۲مورد)، روسیه(۵۳ مورد)، ترکیه(۱۵۷ مورد)، پاکستان (۳ مورد)، عراق (۱ مورد)، قزاقستان (٤ مورد) و عربستان (۱ مورد) بود.

از مجموع ۲۳۷ مورد گزارش به GenBank ، پس از بررسی تعداد ٦٤ مورد سکانس غیر تکراری جهت آنالیز استخراج گردید. در نهایت تعداد ٦٤ سکانس ژن و پروتئین هماگلوتینین با استفاده از الگوریتم بیوانفورماتیکی Clustalو نرم افزارهای clustalW و MEGA4 سکانس ژنومی و اسیدآمینه مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سرانجام درخت فیلوژنتیکی این ویروس‌ها تعیین گردید.

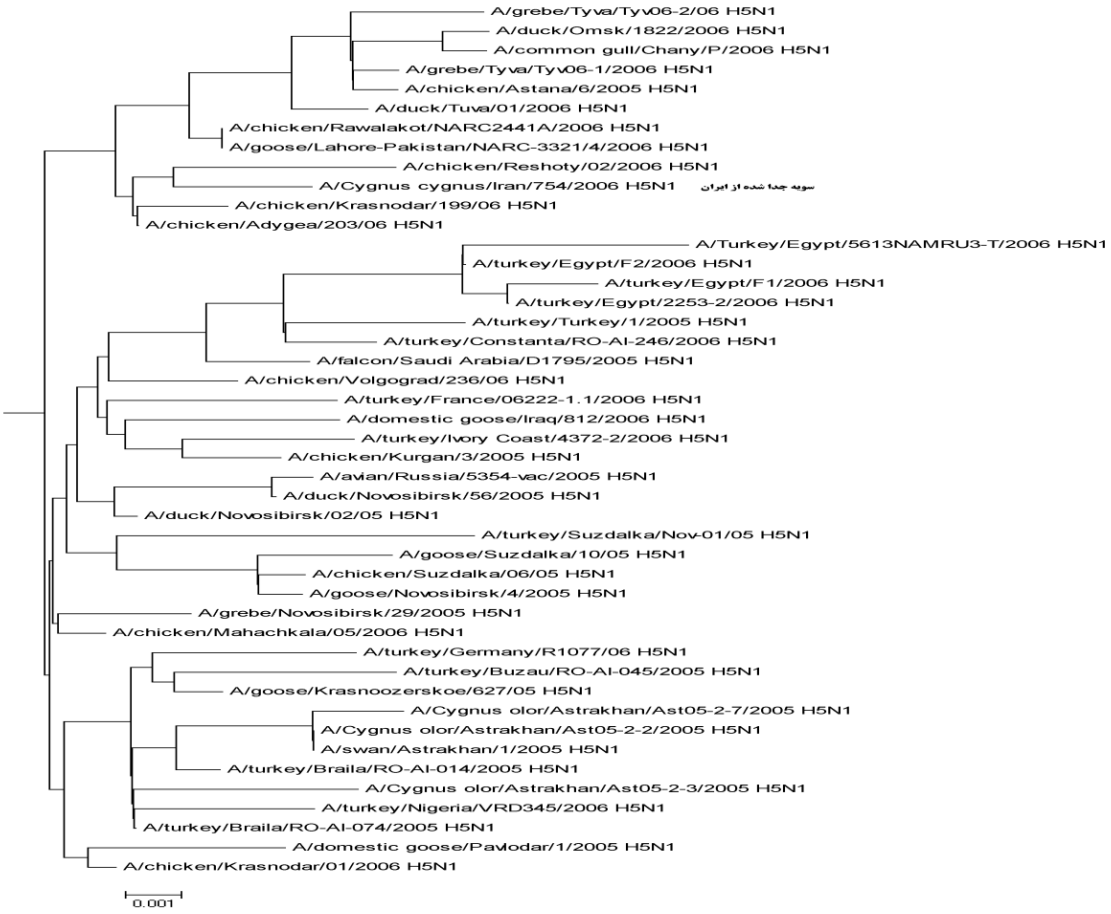
در این مطالعه، مقایسه سکانس‌های ژنومی و پروتئینی ژن هماگلوتینین ساب تایپ H5N1 نشانگر تغییرات جزئی در برخی از مناطق سکانس ژنی و به تبع آن در اسید آمینه-های سکانس پروتئینی آن است. این تغییرات در اثر دریفت‌های ژنتیکی در این ساب‌تایپ ایجاد شده‌است (۲و ۳). در مطالعات فیلوژنتیکی هر چه سکانس‌های ژنومی و پروتئینی دارای شباهت بیشتری باشند، به معنی داشتن جد نزدیک تری است. در نتیجه به این معنی است که از یک منشاء مشترک نشات گرفته‌اند. از طرفی هر چه تفاوت نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای بین سکانس ها بیشتر باشد نشان دهنده منشاء دورتری است (٦و ۷) (شکل ۱). تغییرات آنتی‌ژنی بیشتر در پروتئین‌های نورآمینیداز و هماگلوتینین ویروس انفلوآنزا رخ می‌دهد. دراین میان تغییرات هماگلوتنین (HA) به مراتب شایع‌تر از بقیه پروتئین‌های ویروس است.

به‌طور کلی پذیرفته شده‌است که دریفت آنتی‌ژنی در اثر موتاسیون‌های نقطه‌ای است که در قطعه‌های RNA کد کننده هماگلوتینین و نورآمینداز رخ می دهد. این موتاسیون‌ها منجر به تغییر در یک یا چند اسیدآمینه در ساختمان پروتئین شده و لذا باعث تغییرات مختصری درخاصیت آنتی‌ژنی ویروس می‌گردد. از این‌رو، با استفاده

از این موتاسیون‌ها می‌توان منشاء هر ساب تایپ را مشخص نمود. .بدیهی است ساب تایپ‌هایی که در ژن هماگلوتینین قرابت ژنتیکی بیشتری دارند از یک منشاء و یک محل جغرافیایی نشات گرفته‌اند (۸و ۹). با استفاده از نتایج این بررسی می‌توان مناطق آلوده رامشخص نمود، و نوع پرندگانی را هم که بیشتر باعث انتقال ویروس می شوند، مشخص کرد.

در این مطالعه مشخص شد سویه انفلوآنزا که در سال ۲۰۰۶ از تالاب بندر انزلی جدا شده با سویه‌ای که در شهر Reshotey روسیه جدا سازی شده‌است جد مشترک دارند، و از یک منشاء نشات گرفته‌اند. با بررسی‌های بیشتر روی درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده می توان به نتایج زیادی از جمله مسیر انتشار ویروس و منشاء اولیه این سویه از ویروس در منطقه کشورهای همسایه ایران دست یافت.

با بررسی دقیق سکانس‌های نوکلئوتیدی و پروتینی ژن هماگلوتینین معلوم شد ویروس مذکور بیشتر از سمت شرق و شمال منطقه خاور میانه شیوع و گسترش پیدا کرده است. همچنین با استفاده از نتایج این بررسی مناطق آسیب‌پذیر کشور در ارتباط با مراودات بین کشورهای همسایه تجزیه و تحلیل شد. نتایج حاصل از آن با مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در کشور همخوانی دارد (۱۰). این گونه مطالعات در کشورهای دیگر آسیای شرقی مثل ژاپن، هنگ گنگ و چین نیز صورت گرفته است. نتایج همه مطالعات حاکی از این است که این ساب تایپ از یک منشاء واحد یعنی از کشورهای خاور دور نشات گرفته است، و سپس به سمت خاور میانه شیوع یافته است (٦و ۷).



شکل ۱: درخت فیلوژنتیکی (فیلوگرام) ویروس انفلوآنزا ساب تایپ H5N1

فهرست مراجع:

1. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, *et al*. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol*. 2005;**79**: 2814-22.

2. Smith GJ,Naipospos TS, Nguyen TD.de Jong MD,Vijaykrishna D,Usman TB *et al*. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 2006; **350**: 258-68.

3.Chen M, La T, Zhao P, Tam J, Rappaport R, Cheng S. Genetic and phylogenetic analysis of multi-continent human influenza A(H1N2) reassortant viruses isolated in 2001 through 2003. *Virus Research*. 2006;**12:** 200–205.

4.Saberfar E , Najafi A , Goodarzi Z, Lashini H. Multiplex RT-PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza A (H7 & H9) Virus in Iran. *I J P H*. 2009; **38**:29-34.

۵. صابرفر ا، فرقانی فرد م ، نجفی ع. شناسایی اختصاصی ویروس انفلوانزا و ساب تایپ H7 با روش مولکولی RT-PCR *مجله پزشکی کوثر*۱۳۸۵، دوره ۱۱، شماره ۲، صص۱۱۹ تا ۱۲٤ .

.6.Midilli K, Yilmaz G, Ergin S, Aygun G, Istanbullu A, Turkoglu S, *et al*. Phylogenetic analysis of human influenza viruses in three consecutive seasons in Istanbul. *J Clin Virol.* 2006; **36**: 520-521.

7.Masaji M, Kenji T, Tadao I, Kunitoshi I, Nobuhiko T, Kikuyasu N, *et al*. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003–2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology*. 2005;**332**: 167– 176.

8.W.H.O. Global Influenza Program Surveillance Network. Evaluation of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. *Emerg Infect Dis*. 2005;**11**: 1515-1521.

9.Pattnaik B, A. Pateriya K, Khandia R, Tosh C, Nagarajan S, Gounalan S, *et al*. Phylogenetic analysis revealed genetic similarity of the H5N1 avian influenza viruses isolated from HPAI outbreaks in chickens in Maharashtra, India with those isolated from swan in Italy and Iran in 2006. *Current Science*. 2006;91: 77-81.

۱۰. ایزدی م ، نجفی ع. رویکرد به انفلوآنزای پرندگان به‌عنوان یک عامل بالقوه حملات بیولوژیک با نگرشی به وضعیت فعلی آن در ایران و جهان. خلاصه مقالات سومین گنگره طب نظامی. دانشگاه بقیه ا... (عج).تهران، ۱۳۸٤ ص ٥٦.

واژه گزینی در میکرب شناسی - قسمت ۳

زبان علم

زبان علم گونه‌ای از زبان است که نقش اصلی آن برقراری ارتباط میان اهل علم و بیان مطالب علمی در گفتار و نوشتار است و در عین تعامل با دیگر گونه‌های زبان و بهره گیری از واژگان و فرایندهای واژه سازی آنها ، دارای واژگان ویژه و روش‌های خاص خود در واژه گزینی است.

وقتی از زبان علم سخن به میان می آوریم در حقیقت با زبانی در درون زبان دیگر سروکار داریم و این همان است که در اصطلاح زبان شناسان گونه کاربردی زبان (register) خوانده می شود. به بیان دیگر، "زبان علمی فارسی" یکی از گونه های کاربردی زبان فارسی است. اما، بدیهی است که علم شاخه‌های مختلف دارد و هر شاخه ای از اصطلاحات و سنت‌های خاص خود برخوردار است. بنابراین، در هر زبان صرفا با یک گونه کاربردی برای مطلق علم سروکار نداریم، بلکه با گونه های کاربردی مختلف که هر کدام به یک حوزه علمی خاص تعلق دارد روبرو هستیم. برای مثال، زبان علم فیزیک و زبان حقوق و زبان علم رایانه هر کدام یک گونه کاربردی در درون زبان فارسی است. با وجود این ، همه این گونه‌ها ویژگی‌های مشترکی نیز دارند و برمبنای همین ویژگی های مشترک است که می‌توان از "زبان علم" به مفهوم کلی آن سخن گفت. مهم‌ترین ویژگی های زبان علم که آن را به خصوص از زبان روزمره و زبان ادبیات متمایز می سازد به قرار زیر است:

۱- زبان علم زبانی است درای یک لایه معنایی و تا حد امکان صریح و دقیق و به دور از تعارض

۲-نقش اصلی زبان علم اطلاع رسانی است نه زیبایی آفرینی و بیان عاطفی ، از همین رو، بیان علم ترجمه پذیرترین گونه زبانی است

۳- در زبان علم ، برای هر شاخه‌ای از دانش دستگاه اصطلاح شناختی ویژه ای ساخته و پرداخته می شود که نزد اهل آن علم شناخته شده است و نزد دیگران ناشناخته و اینکه می گویند فلان کس اهل اصطلاح است، اشاره به همین معنی است. برای مثال، "شاخص" در ریاضی چنین تعریف می شود : "عددی که نسبت یا وضعیت یک شی ء ریاضی را در مقایسه با شی ء ریاضی دیگر بیان می کند". بدیهی است که عموم فارسی زبانان از واژه شاخص چنین مفهومی را در نمی یابند.

زبان علم بر متن زبان طبیعی ساخته و پرداخته می شود و از همین رو، در همه حوزه‌های دستور، یعنی آواشناسی و ساخت واژه و نحو ومعنی شناسی ، در اساس و بنیاد تابع زبان طبیعی است، ولی ممکن است ویژگی های متمایزی نیز در آن پدید آید. از میان این ویژگی‌ها ، آنچه به واژه گزینی مربوط می شود، در بخش ضوابط واژه گزینی آمده است.

دکتر مسعود شریفی

مدیر گروه واژه گزینی انجمن علمی میکرب شناسی ایران

و

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

فراخوان

همکار گرامی

با سلام

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

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

لذا ،خواهشمنداست با عنایت به راهنمای تهیه کارنامک ، اطلاعات مربوط به خود را به صورت تایپ شده و یا در لوح فشرده آماده نمایید. اطلاعات را یا به آدرس جدید انجمن علمی میکرب شناسی و یا از طریق پست الکترونیک (microbiologyhistory@gmail.com و microbiologyhistory@yahoo.com) ارسال فرمایید. در صورت لزوم با شماره تلفن همراه ۰۹۱۲۳۸۱۹۰۵٤ (آقای دکترمسعود شریفی) تماس بگیرید.

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

با تشکر

دکتر غلامرضا ایراجیان

رئیس انجمن علمی میکرب شناسی ایران

راهنمای تهیه کارنامک

۱. **کارنامک باید گویا، مختصر و مفید بوده و به‌خوبی سازماندهی شده باشد.**

۲. **کارنامک باید شامل بخش‌های ذیل باشد:**

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

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

- کلیه پاراگراف‌ها از سمت راست و چپ تراز شوند .
- برای نگارش متن حتماً در هر مورد از قلم پیشنهاد داده شده استفاده گردد.
- کارنامک حتماً باید مطابق فایل موجود در سایت انجمن تهیه گردد.
- متن کارنامک باید با قلم B Yaghut،اندازهٔ ۱٤ (سر تیترها باید Bold باشند) تحریر شود.
- مکان عکس در هر قسمت از کارنامک در مرکز صفحه (بعد از کپی نمودن عکس در فایل Word و کلیک راست ماوس، انتخاب فیلدهای مربوطه مقابل، Format picture- Lay out- In front of text- Other و سایز Height: 7.93cm و Width: 6.4cm) تنظیم گردد.
- تمام عکس‌ها و تصاویر باید با رزولوشن بالا (300 dpi) و اندازهٔ کمتر از ۳۰۰-۲۰ کیلو بایت ارسال شود.
- علاوه بر افزودن عکس در فایل Word، فایل اسکن شده عکس نیز جداگانه ارسال گردد.

راهنمای اشتراک مجله

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

۱-پرداخت هزینه اشتراک بر اساس جدول ذیل به حساب جاری شماره ٦٠٠٤٠٧٨ بانک رفاه کارگران شعبه بیمارستان مصطفی خمینی تهران (کد ١٦٣) به نام انجمن میکرب شناسی ایران

۲-تکمیل فرم اشتراک و ارسال آن به همراه اصل فیش بانکی به آدرس دفتر مجله (تهران- صندوق پستی ١٦٤٦-١٣١٤٥) با پست سفارشی

۳-اعضاء انجمن میکرب شناسی می بایست کپی کارت یا شماره عضویت خود را نیز به پیوست ارسال نمایند.

٤-مراکز علمی (کتابخانه‌ها، مراکز تحقیقاتی و ...) وابسته به دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور می‌توانند درخواست خود را برای اشتراک رایگان به دفتر مجله ارائه نمایند.

فرم اشتراک

نام:..... نام خانوادگی :..... میزان تحصیلات:.....

اینجانب..... مبلغ ..... ریال، بابت هزینه اشتراک تعداد ..... جلد از مجله میکرب شناسی پزشکی ایران (از شماره .....تا.....) به شماره حساب ٦٠٠٤٠٧٨ بانک رفاه کارگران شعبه بیمارستان مصطفی خمینی تهران (کد ١٦٣) به نام انجمن میکرب شناسی ایران ، واریز و اصل فیش پرداختی به شماره ..... را به آدرس مجله ارسال می‌نمایم.

آدرس کامل پستی:

کد پستی:

تلفن:

E-mail:

امضاء و تاریخ:

نوع اشتراک

اشتراک سالیانه (٤ شماره) با احتساب هزینه پست:

□ اعضاء انجمن میکرب شناسی ٤٥٠٠٠ ریال

□ آزاد ٨٥٠٠٠ ریال

اشتراک تک شماره با احتساب هزینه پست:

□ اعضاء انجمن میکرب شناسی ١١٠٠٠ ریال

□ آزاد ٢١٠٠٠ ریال

Phylogenetic Study of Influenza A Virus Subtype H5N1 in Iran and neighboring countries during 2003 and 2006

Najafi A[1], Tavakoli HR*[2], Mehrabi Tavana A[3],Ranjbar R[1] , Qorbanalizadgan M[1]

1) Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran , Iran
2)Department of Nutrition, Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences,Tehran, Iran
3)Health Research Center , Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran , Iran

Corresponding author: Tavakoli HR, Department of Nutrition, Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Mobil: 09122393319 E.mail: h.tavakoli1344@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Influenza viruses, especially the subtype H1N1, are continuously evolving viruses, which have caused significant morbidity and mortality in Eastern Asian countries as well as in the Middle East. The aim of this study was to analyze genetic variations in hemaglutinin (HA) gene of the H1N1 viruses circulating in the countries neighboring Iran during 2003 till 2006

Material and methods: In this study we used multiple sequence alignment software for analysis of sequences. Genetic analyses were performed on 64 hemagglutinin gene in influenza A(H5N1) viruses derived from GeneBank reported in Iran and neighboring countries between 2003 and 2006.

Results: HA phylogenetic analysis of these viruses showed multiple clades circulated around the world with regional prevalence patterns. Our analysis seems to indicate that the H1N1 viruses have initially entered Iranian borders from its northern bordering countries, such as Russia and the other CIS countries. They have subsequently spread inward towards the interior of mainland Iran.

Conclusion: This study suggested that influenza A (H5N1) viruses might have migrated from neighboring countries of Iran to this country.

Key word: Phylogenetic, influenza A, H5N1, Iran

Identification of *Candida* Species by Seminested PCR in Candidemia

Shahhosseiny MH[1*] , Nematian Soteh M[2], Ghahri M [3], Saadatmand S[2], Hosseiny A[4]

1) Department of Microbiology , Islamic Azad University,Shahr-e- Qods Branch, Tehran, Iran.
2)) Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research branch , Tehran, Iran
3)) Department of Biology , Imam Hossein University ,Tehran, Iran
4- Resalat medical laboratory, Tehran, Iran

Corresponding author: Shahhosseiny MH, Department of Microbiology, Islamic Azad University,Shahr-e- Qods Branch, Tehran, Iran.

Mobile: 09123304069 E-mail: Shahhosseiny@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objective: In recent decades, the incidence of fungal infections has increased. Invasive *Candida* infection is an increasing cause of morbidity and mortality in the immunocompromised patients, for example, neuropenic patient with hematological malignancies, recipients of allogeneic transplants and HIV-infected individuals. There is an increasing incidence of bloodstream infections caused by *Candida* species. In this study, we applied Seminested PCR for detection and identification of *Candida* species in blood specimens.

Materials and Method: A total of 2516 blood culture samples in Baghiyetollah hospital were investigated for the presence of yeast cells during the year 2009. Fourteen blood samples which were found to be infected with *Candida* species, as proved by culture, were analysed. All yeasts cells were identified by germ tube test, chlamydospor production on cornmeal agar and using CHROMagar Candida medium. DNA was extracted by DNG-plus kit from whole blood. The universal outer primers (CTSF & CTSR) amplified the Internal Transcribed Spacer2 (ITS2). The species-specific primers (CADET, CPDET, CTDET, CGDET and CDDET), complementary to unique sequences within the ITS2 of each test species, amplified species-specific DNA in the reamplification step of snPCR. PCR products were identified by electrophoresis.

Results: Among the 14 (0.5%) blood samples, 16 *Candida* species were detected and identified by using snPCR. Using snPCR for *Candida* species identification indicated that 6 isolates were *C. albicans*, 4 isolates of *C. parapsilosis*, 4 isolates of *C. glabrata*, and 2 isolates of *C. tropicalis*. Two of the patients had dual infection with *C. tropicalis* and either *C. albicans* or *C. glabrata*. *C. dubliniensis* wasn't detected in blood samples.

Conclusion: The Seminested PCR that was applied and evaluated in this study is a rapid, specific and sensitive method for the diagnosis of candidemia or hematogenous candidiasis caused by common pathogenic *Candida* species.

Key words: *Candida albicans*, Non *Candida albicans*, Seminested PCR, ITS2.

Manifestations of Giardiasis in Hamadan province of Iran in 2006

Taherkhani H[1], Ansari M[2], Fallah M[3], Saba S[4], Shariati S[3], Roshandel Gh[5]

1) Department of parasitology, School of medicine, Golestan University of Medical Sciences. Iran
2) Department of internal medicine, School of medicine, Hamedan University of Medical Sciences. Iran
3) Department of parasitology, School of medicine, Hamedan University of Medical Sciences. Iran
4)) Department of pediatrics, School of medicine, Hamedan University of Medical Sciences. Iran
5) Research Center of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences. Iran

Corresponding Author: Roshandel Gh , Research Canter of Gastroenterology and Hepatology, Golestan University of Medical Sciences. Iran

Tel: +98-171-2240835 E.mail: roshandel_md@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Giardiasis has multiple clinical manifestations and its prevalence is relatively high in Hamadan province of Iran. This study was conducted to determine the most frequent clinical sign and symptoms of Giardiasis in Hamadan province of Iran in 2006.

Material and Methods: This was a descriptive cross sectional study. Sixty four patients (26 women and 38 males) found to be infected with Giardia were recruited. Anti-glidin antibody and TTG (Anti-tissue transglutaminase antibody) tests were performed to roll out celiac disease. Chi-square test was used for statistical analysis.

Results: Giardiasis was most common in cases aged 16-20 years old (20.3%), in males (59.4%) and in patients with educational status of primary school (31.25%). The most frequent symptom was abdominal pain (42.1%). Bloating and diarrhea with 23.4% and 9.4%, respectively, were the next ones.

Conclusion: We found that the clinical manifestations of giardiasis are similar to other gastrointestinal diseases such as celiac. So giardiasis should be considered as probable diagnosis in patients with gastrointestinal problems.

Key words: Intestinal parasitic infection, Giardiasis , Clinical manifestations, Hamadan.

The contamination rate of Ilam province bovine population with respiratory syncytial Virus

Bahrami AM, Shamsi M*, Hoshmandfar R

1)Veterinary School, Ilamuniversity

Corresponding author: Shamsi M, Veterinary School, Ilam university

Tel: +98-841-2224308 shamsi_ilam@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) are from the pneumovirus genus and belongs to Paramixoviridea family. The growth place of this virus is the respiratory tract. The infection mostly appears in calves and young animals which are often kept in close stables. For serological and identification antibody study of this virus, natural serum test, indirect heamoglutanation and ELISA assays can be used. The percentage of sensitivity of these tests for antibody presence against virus in serum is 92%, 95%, and 100%, respectively. The aim of this study was to analyze the rate of prevalence of BRSV antibody infection in dairy farms cattle population of Ilam province.

Materials and methods: This study had been performed from autumn 2008 to the end of autumn 2009. Blood samples were collected from 400 heads of dairy cattle with different ages. 356 (89%) female and 44 (11%) male cows were randomly selected from different regions in the province and in different seasons of the year. In overall, 85% of the samples were from industrial and the remaining 15% were from native dairy farms. Ántibody against BRSV were measured using a specific ELISA assay. The data were analyzed using qui-square test.

Results: Of the total number of cows under study, 298 (83.7%) heads of female and 21(47.7%) heads of male cows had antibody against BRSV. This was equivalent to 79.9% (319 cows) of the total animal population under study.

Conclusion: The rate of cattle infection is significantly high in Ilam province and it appears as though the infection rate has a direct correlation with features like sex, age, and season. Therefore, it is postulated that by proper management and effective handling of the respiratory ailments, we can observe a significant improvement on cattle health, as well as, in milk and beef production.

Key words: Respiratory Syncytial virus, cattle, serology, ELISA, Ilam.

The Survey of prevalence of acute gastroenteritis caused by entric Adenoviruse type Ad40, Ad41 in hospitalized children younger than 5 years in Bahrami hospital in Tehran by PCR method,2008-2009

Rezaei M [1], Edalat R [2], Sohrabi A[2], Seyed Davar Siadat [3], Motamedirad M [2], Vand Yousefi J [1], Modarres Gilani Sh [2]*

1. Department of Microbiology- Azad Islamic University of Karaj, Iran
2. Department of Virology, Pasteur Institute of Iran
3. Department of Hepatitis and AIDS , Pasteur Institute of Iran

Corresponding author: Modarres Gilani Sh, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran

Tel: +98-21-44216425 E-mail: Mary_1486@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives : Human Adenoviruses are one of the most common and serious etiologic agents of acute gastroenteritis in children younger of 5 years old in word wide, especially developing countries. The purpose study was a survey of molecular epidemiology of enteric Adenoviruses in acute gastroenteritis in hospitalized children in Bahrami hospital in Tehran, 2008-2008.

Materials and Methods: We obtained 100 stool specimens from hospitalized children under 5 years of age with clinical presentation of acute gastroenteritis in Tehran from June 2008 to June 2009. Viral DNA was extracted by extraction kit of DNA. Then extracted viral DNA by use of PCR method with genus specific and type 40, 41 primers, enteric Adenoviruses were diagnosed.

Results :Adenoviruses Ad40, Ad41 have been detected in 8 (8%) of patients with diarrhea. The highest prevalence of infection occurred in children aged 0 to 24 months (75%). The rates of infection were 60% for male and 40%for females. Our data indicated that the outbreaks of Adenoviruses infection were in winter(50%).The frequency of the Adenoviruses Ad40,Ad41 among breast-fed and bottle-fed, was 12.5%and 62.5% respectively.

Conclusion: Molecular diagnostic methods should be with high features such as PCR and effective step in the recognition of these factors can be harvested as the appropriate strategy for treatment adopted.

Keywords: Molecular Epidemiology, Adenovirus, Acute gastroenteritis, PCR .

The antibiotic resistance and molecular detection of extended spectrum β-lactamases TEM and SHV in multi drug resistance *E.coli* isolated from urine of hospitalized patients in Kerman, 2007-8

Mansouri S[1], Kalantar D[*1], Shokouhi M[2],Abbasi S[1]

1) Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical sciences, Kerman, Iran
2) Kerman Physiology Research Center, Vice Chancellor for Research, Kerman University of Medical Sciences, Iran
Corresponding author: Kalantar D. Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Mobile: 09193916610 E.mail: Davoud1362@gmail.com

ABSTRACT

Background and Objectives: *Escherichia coli* is the most common cause of nosocomial infection including urinary tract infections (UTI_S). Due to the presence of various resistance mechanisms against antibacterial agents specially extended spectrum β-lactamases (ESBLs), the treatment of infections caused by these bacteria is problematic. Since detection of bacterial resistance and SHV and TEM type ESBLs which are the common type of β-lactamases is required for a better management of infection caused by these bacteria, the aim of this study was to determine the antibacterial resistance pattern and the prevalence of bla_{SHV} and bla_{TEM} β-lactamases genes in clinical isolates of *E.coli* from urine of hospitalized patient in Kerman.

Material and Methods: This study was performed on 115 *E.coli* strains isolated from urine specimens of hospitalized patients in 3 hospitals in Kerman. Agar dilution method was used for determination of minimum inhibitory concentration to selected antibacterial agents. ESBLs production was detected by combined disc method. TEM and SHV type β-lactamases were detected by PCR method using plasmid and chromosomal DNA.

Results: Of the total isolated bacteria, 86(74.7%) showed resistance to ≥3 antibacterial agents from different classes and were considered as multiple drug resistance (MDR). Totally, 76 (66%) of the isolates produced ESBLs. The PCR assay performed on the plasmid and chromosomal DNA, totally 48 (4107%) of the isolates showed TEM, 39 (33.9%) showed SHV, and 20 (17.3%) of the isolates had both TEM and SHV genes. The lowest level of resistance, only in 7 of the isolates (14.7%), was seen towards ceftizoxim. The highest level of resistance was detected to amoxicillin and trimethoprim /sulfamethoxazole which was in the order of 108 (94%) and 110 (95%) isolates, respectively.

Conclusion: MDR trait in urine isolates is common in this area. Due to high resistance to trimethoprim /sulfamethoxazole and amoxicillin, these antibacterial agents are not recommended for treatment of urinary tract infections. In general, the prevalence of TEM gene was found to be much higher than the SHV.

Key word: nosocomial infection, urinary tract infection, ESBLs, Multi drug resistance, *Escherichia coli*

PCR assay for detection of *vanA* and *vanB* genes from intestinal carriers of vancomycin-resistant enterococci in three educational hospitals of Tabriz university of medical sciences

Vahhabi A *[1], Hasani A [2], Nahaei MR [1], Frajnia S [3]

1) Department of Clinical Bacteriology and Virology, Tabriz University of Medical Sciences, Iran
2) Department of Clinical Bacteriology and Viro logy, Research Center of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Iran
3) Applied and Drug Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Iran

Corresponding author: Vahhabi A, Department of Clinical Bacteriology and Virology, Tabriz University of Medical Sciences, Iran

Mobile**:** 09141284749 E.mail: a.vahhabi@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Enterococci are increasingly the causative agents of nosocomial infections. Resistance to antibiotics, especially to vancomycin, ampicillin and high levels of aminoglycosides, is typical in these isolates. Rapid and accurate identification of vancomycin-resistant enterococci (VRE) is crucial in the management and treatment of infected patients, which allows for selection of appropriate treatment programs to prevent the spread of VRE. Using a PCR assay for detection of *vanA* and *vanB* genes in VRE isolated from intestinal carriers was the aim of this study.

Materials and Methods: A total of 432 rectal swabs or stool specimens were collected from patients hospitalized at high risk wards (ICU, Hematology/Oncology, Infectious and Burn) with a hospital stay of longer than 72 hours or attending out-patient clinics (Hematology/Oncology and Infectious clinics and Hemodialysis) of three university teaching hospitals in Tabriz (sina, children and Shahid Ghazi Tabatabaee hospitals). Specimens were inoculated into specific media and enterococci species were isolated. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin was performed by agar dilution and confirmed by E-test for resistant species. PCR assay was carried out for detection of *vanA/vanB* genes.

Results: From the 432 stool specimens, 291(67.3%) enterococci species were isolated. 189 (64.9%) were identified as *Enterococcus feacalis* and 86 (29.5%) as *Enterococcus feacium.* MIC determination confirmed resistance to vancomycin in 15 (5.1%) strains and all of them were *E. faecium*. PCR confirmed *vanA* or *vanB* genes with moderate (MICs, 8-16 µg/ml) or high level (MICs, ≥256 µg/ml) resistance to vancomycin in 54 (18.5%) of enterococcal species. Finally, 42 (66.6%) of the resistant isolates were *E. faecium* and 15 (23.8%) were identified to be *E. faecalis.* Additionally, 54 (85.7%) of the resistant species were isolated from in-patients and 9 (14.2%) from out-patients.

Conclusion: Moderate to high resistance of enterococcal isolates against vancomycin among in-patients and out-patients is a medical concern proposing improvement in treatment policies.

Key words: Enterococci, Vancomycin, Colonization, *vanA*, *vanB*

Prevalence and risk factors of acquired Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in educational and treatment centers in Ghazvin from 2005 to 2007

Karimzadeh T *[1], Mohammadi Tchelkasari F [2], Sharifi M [3], Bijani B [4], alipour Haydari M[5]

1) Research center of metabolic diseases , Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran
2) Shahid Bolandian health center, Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran
3) Department of microbiology, school of medicine, Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran
4) Department of infectious diseases, school of medicine,Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran
5) Department of community medicine, school of medicine , Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran

Corresponding author: Karimzadeh T, Research center of metabolic diseases, Qazvin university of medical sciences, Qazvin, Iran

Mobile: 09127800343 E.mail: TK111479@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Control and treatment of Nosocomial infections due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a worldwide problem. The study aimed to detect the prevalence and risk factors of acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in educational and medical centers in Qazvin from 2005 to 2007.

Materials and Methods: This cross sectional study was performed in three educational and medical centers in Qazvin (2005-2007). The nasal samples were obtained from patients on admission and after discharge. Isolation and detection of *S. aureus* isolates using Oxacillin screening plates were performed according to Clinical and laboratory standards institute (CLSI) procedure. Other personal informations were obtained by questionnaire, face to face conversation or from patients' documents. The data were analyzed by qui-square test.

Results: From the 1083 patients upon admission, 56 (5.2%) carried *S. aureus*, of which 51(4.7%) of them were methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) strains, and 5 (0.5%) were found to be MRSA. From the 793 remaining patients at the time of discharge, 79 (10%) and 15 (1.9%) were colonized with these strains, respectively. Risk factors of MRSA colonization were hospitalized duration, admission, prescribed antibiotics (especially Ciprofloxacin) and using Angiocat ($P<0.05$). There was no significant relation between other variations and MRSA colonization ($P>0.05$).

Conclusion: These findings showed the existence of MRSA strains in Ghazvin population. The incidence of MSSA and MRSA colonization with hospitalizing increased 2.1 and 3.8 respectively in comparison with the carrier state on admission. This will be increased for MRSA and its isolation seems to have a direct relation with the length of hospitalization, especially in surgery and internal medicine words, ciprofloxacin use, and use of Angiocat.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, antibiotics, colonization, risk factors

Role of surface layer nanostructure and production of β–lactamase in penicillin resistant *Bacillus cereus* strains

Jalalpoor Sh*[1], Kermanshahi RK [2], Noohi AS [3], Zarkesh Esfahani H [4]

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

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

ABSTRACT

Background and Objectives: S-layer in bacteria is composed of proteins that inhibit antibiotics entry into the cells and therefore can lead to substantial increase in pathogenicity. Due to the significant role that hospital staff hands and other surfaces plays in transfer of nosocomial infections, contamination with *B. cereus* strains capable of producing S-layer and β–lactamase can lead to the spread of antibiotic resistant nosocomial infections. The objective of this investigation was to survey the frequency of S-layer and β–lactamase production in *B.cereus* hospital isolates. The possible role of S-layer in inhibiting the translocation of penicillin in *B.cereus* strain isolated from staff hands and hospital surfaces were also investigated.

Material and Methods: This Study was performed during 2005/2007 in Al-Zahra Hospital of Isfahan University. A total of 274 samples from staff hand and hospital surfaces were collected. Bacterial cultures were performed for 16 hr in TSA (Trypticase Soy Agar). The S-layer surface proteins were isolated using electrophoresis with 10X SDS-PAGE. Antibiotic susceptibility tests were performed using Kirby Bauer technique, followed by the detection of β–lactamase production with acidimetric method.

Results: Of the 247 collected samples, the frequency of *B.cereus* isolation was 26 (9.49%). The 13 *B.cereus* strains that were isolated from the hospital staff hands, 11 (84.6%) strains and from the 13 *B.cereus* strains isolated from hospital surfaces, 1 (7/7%) strain produced S-layer nanostructure. The Susceptibility test results indicated that, 11 (92.3%) of the S-layer non-producing *B.cereus* strains and 12 (100%) of producing strains were resistant to penicillin. The acidimetric test results indicated that all of the S-layer producing *B.cereus* strains produced β–lactamase.

Conclusion: The higher prevalence of S-layer producing *B.cereus* strains isolated from hospital staff hands; as well as, the much higher rate of penicillin resistance in these isolates may be attributed to the presence of S-layers.

Key Words :S-layer, *Bacillus cereus*, Antibiotic resistance, β-lactamase, Nosocomial Infection

The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing *Klebsiella pneumonia* and *Eschrrichia coli* isolated in Milad hospital of Tehran in 2010

Behrouzi A[1], Rahbar M [2*], Vand Yousefi D[1]

1) Deprtment of micobiology, Islamic Azad university, Karadj branche, Iran
2) Deprtment of microbiology, Reference laboratory , Tehran, Iran

Corresponding author: Rahbar M, Deprtment of microbiology, Reference laboratory , Tehran, Iran

Tel: +98-21-66728112 E.mail: rahbar_refiab@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: Extended – Spectrum beta – lactamase (ESBLs) are certain enzymes that are produced by Gram- negative bacilli such as *K. pneumoniae* and *E .coli*, which cause resistance of these organisms to penicillins, cephalosporins, and monobactams. The aim of this study was to determine prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBL) producing *E. coli* and *K. pneumoniea* isolated from urine cultures in Milad hospital of Tehran in 2010**.**

Material and Methods: This study was performed on 735 Gram negative bacilli isolated from urine of patients admitted to Milad hospital of Tehran from March to June 2009 and which included 620 (84.3%) strains of *E. coli* and 115 (15.7%) strains of *K. pneumoniea* isolates. From antibacterial susceptibility testing as well as for beta-lactamase production disk diffusion method and combined disk diffusion technique were employed; respectively, as recommended clinical laboratory standards institutes (CLSI).

Results: ESBLs resistance was detected in 132 (21%) of the *E.coli* isolates and 18 (12%) of the *K. pneumonia*e strains. Of the 150 patients which had positive ESBLs isolates, 104 of them were outpatients and the other 46 were hospitalized. Resistance of ESBLs producing isolates of *K. pneumoniae* to carbenicillin, ampicillin and amikacin was 99.95%, 100% and 78 %, respectively. The least percentage of resistance among ESBLs positive isolates were observed against ofloxacin (28%). We observed high rate of resistance among isolates of *E.coli* to ampicillin (85%), tetracycline (62%), and trimethoprim /sulfamethoxazole (54%). However, the least rate of resistance was observed among 3 (0.5%) ESBLs positive isolates of *E. coli* against nitrofurantoin.

Conclusion: About one fifth of the *E. coli* and roughly one sixth of the *K. pneumoniae* isolates were producers of ESBLs. Resistance to other commonly used antibiotics among ESBLs producing isolateswere prevalent.

Keywords: ESBLs, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*e , urine

Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria

Soleymani N[1], Sattari M[1*], Sepehriseresht S[2], Daneshmandi S[3], Derakhshan S[1]

1) Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2) Department of Pathology .Tehran Heart Center, , Tehran, Iran
3) Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Corresponding author: Sattari M. Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Tel: +98-21-82883563 E.mail: sattarim@modares.ac.ir

ABSTRACT

Background and objectives: Increasing uses of antibiotics against bacterial infections have resulted in emergence of antibiotic resistance; so extensive studies have been done on new antimicrobial drugs with higher efficacies particularly herbal drugs. The aim of this study was to evaluate the reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria.

Materials and Methods: *Bunium persicum* essential oil was purified from its fruit, and was subsequently analyzed chemically by gas chromatography and mass spectroscopy. Disk diffusion method and MIC (minimum inhibitory concentration) determination method were used for the evaluation of the essential oil effects on some standard bacterial strains. To determine synergistic and antagonistic effects, bacterial strains were cultured on a medium containing essential oil and then antibiotic disks were placed on the medium.

Results: Chemical analysis revealed the extracted essential oil to contain 13 different chemicals. According to disk diffusion method, the largest growth inhibitory zone belonged to *Bacillus cereus* with 45 millimeter diameter. MIC and MBC results showed that the essential oil has the most inhibitory and bactericidal effect on *Escherichia coli*. The synergistic and antagonistic surveys showed synergistic effects of essential oil on gentamicin against *Escherichia coli*, but these results were variable against other bacterial strains.

Conclusions: *Bunium persicum* essential oil, singly or in combination with other antimicrobial agents, can be effective in the treatment of microbial infections. Also this essential oil can strengthen the effects of some antibiotics which particularly propose its usefulness in antimicrobial resistance cases.

Key words: *Bunium persicum*, antimicrobial activity, synergistic and antagonistic effects, essential oil, antibiotic

Detrmination of Vancomycin resistant enterococci (VRE) carriage , molecular epidemiology and the related risk factors in children with ALL in Ali-asghar children hospital and Mahak hospital,Tehran,Iran

Nateghian AR1*,Arjmandi K2,Vosough P3,Karimi A4,Behzad A5,Navidnia M6

1) Department of Pediatric infectious diseases, Ali-asghar children hospital, Tehran University of Medical Sciences,
2) Department of Pediatric Hematology-oncology, Ali-asghar children hospital, Tehran University of Medical Sciences
3) Department of Pediatric Hematology-oncology, Mahak hospital, Tehran University of Medical Sciences
4) Department of Pediatric infectious diseases, Pediatric Infectious diseases research center,Mofid hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
5)Pediatrician, Ali-asghar children hospital, Tehran University of Medical Sciences
6)Department of Microbiology, Pediatric Infectious diseases research center,Mofid hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Corresponding author: Alireza Nateghian, Department of Pediatric infectious diseases ,Ali-asghar children hospital, Tehran University of Medical Sciences

Tel: +98 (21) 22222041 E.mail: Nateghian@hotmail.com

ABSTRACT

Bachground and Objectives: vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) in immune deficient patient is a significant factor for increase in morbidity and mortality. The aim of this study was to determine VRE carriage rate , its molecular epidemiology and to identify risk factors for acquisition of VRE in children with Acute lymphoblastic leukemia (ALL) in 2007-2008.

Material &Methods : In a cross-sectional study, stool samples of children with ALL in Aliasghar and Mahak hospitals were randomly analyzed for detection of VRE . Enterococci were identified by conventional bacteriologic methods and vancomycin resistance was detected by disk diffusion method and E-test. MIC of vancomycin wase determined by macrodilution method. VanA and VanB genes characterization was performed by a multiplex polymerase chain reaction (PCR), which also confirmed the identification. Questionnaires of patient was done to determine risk factors. Data were analyzed by STT , Mann whithney new , Chi-sqare , Fisher exact , Anova and Kruskal-Wallis tests.

Results : In the present study, of 130 child with ALL admitted to our hematology/oncology an infection units, 33(34.7%) of the 130 patient were colonized with VRE(25.3% of total cases) and remainder of patients were colonized with vancomycin-sensitive strains (VSE), serving as controls. 26 isolates(78.8%) of VRE detected with VanA phenotype and seven isolates(21.2%) with VanB phenotype. In the univariate analysis history of ICU admission(P=0.03)was significantly associated with *Enterococcus* colonization and had a trend with VRE colonization. age (P=0,007)was significantly associated with VRE phenotype .There was no significant relationship between gender, duration of disease ,number of admission , another disease, history of severe neutropenia among one month ago and history of antibiotic use in three month ago and VRE colonization.

Conclusion :VRE prevalence is high in children with ALL in Iran ,indicating a prompt intervention strategy in the control of VRE particularly in PICU .

Key words: VRE,risk factors, Acute lymphoblastic leukemia,children

Molecular characterization of PBP2b in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.

Oskoui M[*1], Nobari S[1], Rahmati Ghezelgeh F[1], Shaghaghi B[1], Amirmozafari N[2]

1) Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran
2) Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences
Corresponding author: Oskoui M. Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran

Tel: +98-21-66405535 E.mail: oskoui1@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Objectives: *Streptococcus pneumoniae* remains one of the most important bacterial pathogens associated with pneumonia, meningitis, sinusitis, and otitis media. β-Lactam resistance in clinical pneumococci is mediated by altered PBPs, specifically PBP2b. The purpose of this study was to determine the rates of penicillin and other antibiotics resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* which were isolated from patients in Tehran and to analyze possible mutations in *pbp2b*.

Material and Methods: A total of 54 *S. pneumoniae* strains were isolated from a number of different clinical centers in Tehran (2000-2008) which included Imam Khomeini hospital, Hazrat Rasoul hospital, Sina hospital, Shohada Tajrish hospital, Ali Asger hospital, Children Health Center, and Bahar pathobiology laboratory. After biochemical testing of all the 54 *S. pneumoniae* isolates, susceptibility testings were done by disc diffusion method for oxacillin, erythromycin, cefotaxime, trimethoprim /sulfamethoxazole, ampicillin, vancomycin and tetracycline. MIC values were determined by broth microdilution method for penicillin. *Pbp2b* gene was amplified by PCR and sequenced.

Results: From all the 54 isolates, 44.4% (24 isolates) were penicillin intermediate, 25.9% (14 isolates) were penicillin resistant, 51.9% (28 isolates) were trimethoprim /sulfamethoxazole resistant, 16.6% (9 isolates) were erythromycin resistant, 3.7% (2 isolates) were cefotaxime resistant, and 18.51% (10 isolates) were tetracycline resistant . All of the penicillin resistant and most of the intermediate isolates carried mutations in the catalytic region of the in *pbp2b gene.*

Conclusion: Our results showed that penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* is widespread. However, the prevalence of multiple resistant strains revealed a crisis in treatment of pneumococcal infections. Our investigation demonstrates that alterations in PBP2b tended to parallel with reduced susceptibility to penicillin. We have shown that susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to β-Lactam antibiotics can generally be estimated by determining alterations in *pbp2b* gene.

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, penicillin resistance, multiresistance, PBP2b

5 years in Bahrami hospital in Tehran by PCR method,2008-2009
Rezaei M , Edalat R , Sohrabi A , Seyed Davar Siadat , Motamedirad M ,
Vand Yousefi J , Modarres Gilani Sh

The contamination rate of Ilam province bovine population with respiratory syncytial Virus X
Bahrami AM, Shamsi M*, Hoshmandfar R

Protozoology

Manifestations of Giardiasis in Hamadan province of Iran in 2006 XI
Taherkhani H[1], Ansari M[2], Fallah M[3], Saba S[4], Shariati S[3], Roshandel Gh[5]

Mycology

Identification of *Candida* Species by Seminested PCR in Candidemia XII
Shahhosseiny MH[1*] , Nematian Soteh M[2], Ghahri M [3], Saadatmand S[2], Hosseiny A[4]

Short Communication

Phylogenetic Study of Influenza A Virus Subtype H5N1 in Iran and neighboring countries during 2003 and 2006 XIII
Najafi A[1], Tavakoli HR*[2], Mehrabi Tavana A[3],Ranjbar R[1] , Qorbanalizadgan M[1]

Table of Contents

Bacteriology

Molecular characterization of PBP2b in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* I
Oskoui M , Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Shaghaghi B, Amirmozafari N

Detrmination of Vancomycin resistant enterococci (VRE) carriage , molecular epidemiology and the related risk factors in children with ALL in Ali-asghar children hospital and Mahak hospital,Tehran,Iran II
Nateghian AR ,Arjmandi K ,Vosough P ,Karimi A ,Behzad A ,Navidnia M

Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria III
Soleymani N , Sattari M , Sepehriseresht S , Daneshmandi S , Derakhshan S

The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing *Klebsiella pneumonia* and *Eschrrichia coli* isolated in Milad hospital of Tehran in 2010 IV
Behrouzi A , Rahbar M , Vand Yousefi D

Role of surface layer nanostructure and production of β–lactamase in penicillin resistant *Bacillus cereus* strains V
Jalalpoor Sh , Kermanshahi RK , Noohi AS , Zarkesh Esfahani H

Health-care associated infections

Prevalence and risk factors of acquired Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in educational and medical centers in Qazvin from 2005 to 2007 VI
Karimzadeh T , Mohammadi Tchelkasari F , Sharifi M , Bijani B , alipour Haydari M

PCR assay for detection of *vanA* and *vanB* genes from intestinal carriers of vancomycin-resistant enterococci in three educational hospitals of Tabriz university of medical sciences VII
Vahhabi A , Hasani A , Nahaei MR , Frajnia S

The antibiotic resistance and molecular detection of extended spectrum β-lactamases TEM and SHV in multi drug resistance *E.coli* isolated from urine of hospitalized patients in Kerman, 2007-8 VIII
Mansouri S , Kalantar D , Shokouhi M ,Abbasi S

Wirology

The Survey of prevalence of acute gastroenteritis caused by entric Adenoviruse type Ad40, Ad41 in hospitalized children younger than IX

In the name of God

Iranian Journal of Medical Microbiology

The official publication of the Iranian society of microbiology

Volume4,Numberes 1 & 2 , spring and Sammer 2010

ISNN:1735 – 8612

❊Referencing the material of this journal with referring the source is autorized.

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

Executive Manager:
Reza Ranjbar Ph.D
Editorial English:
Nour Amirmozafari Ph.D
Jamshid Faghri Ph.D

Editorial Bord

Alborzi,Abdolvahab MD – Amir Mozafari,Nour Ph.D
Irajian Gholam Reza Ph.D –Niakan, Mohammad Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D – Sharifi, Massoud Ph.D
Tabaraie, Bahman Ph.D – Taheri Kalani, Morovat Ph.D

Consultants of this Lssue:

Aghamirian, Mohammad Reza Ph.D– Ahanjan, Mohammad Ph.D
Arzanloo, Mohsen PH.D– Irajian,Gholam Reza Ph.D
Haghshenas, Mohammad Reza Ph.D– Ramezanzadeh, Rashid Ph.D
Ranjbar, Reza Ph.D– Rahbar, Mohammad Ph.D, zeini, Farideh Ph.D
Shahnazi, Mojtaba Ph.D– Sabafar, shirin Ph.D
Feizabadi, Mohammad Mehdi Ph.D– Ghaemi, Ezzat Allah Ph.D
Modarres, Shahab Ph.D– Nazari, Naser Ph.D
Nahaee, Mohammad Reza Ph.D– Valizadeh, Saeid Ph.D
Hamkar, Rasoul Ph.D

*This Journal is indexed in:IMWMR, index Copernicus, SID, Iran Medex and Magiran

Designer: Khadijeh Keshavarz Afshar
Address: P.O.Box:13145–1646, Tehran, Iran
Telfax: +98(21)88020916
E-mail: jmicrobiology@gmail.com
Website: www.ism.ir
Print: Ramin