

فهرست مقالات

لاکتوکوکس نو ترکیب، رویکردی جدید برای واکسن‌های خوراکی

علی شریف‌زاده، سارا آرتی*، فاطمه شایسته

بررسی آلودگی سالمونلا انتریتیدیس در گوشت مرغ و بلدرچین عرضه‌شده در استان خوزستان

زهرا متقی، حسین خدابنده شهرکی، مهلا الهی نیا*

بررسی آلودگی گونه‌های ویبریو در ماهیان عرضه شده در بازار شهرستان شهرکرد

مهران خلیلی دهکردی، فرشته صالحیان دهکردی*، مجید اسماعیلی

بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد

مهناز شمعی، مریم رئیسی، حسین خدابنده شهرکی*

بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و ژن اینتگرون کلاس I در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفونامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد

مرضیه فارسی نژاد، مریم رئیسی، جمشید علی بابایی شهرکی، حسین خدابنده شهرکی*

لاکتوکوکس نو ترکیب، رویکردی جدید برای واکسن‌های خوراکی

علی شریف‌زاده^۱، سارا آرتی^{۲*}، فاطمه شایسته^۳

۱- دانشیار میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- کارشناس امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران.

۳- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

*نویسنده مسوول: sa402002@gmail.com

چکیده:

پروبیوتیک‌های نو ترکیب به طور فزاینده‌ای به عنوان حامل برای بیان و تحویل هدفمند مولکول‌های نو ترکیب یا طبیعی به سطوح مخاطی در تغذیه و سلامت عمل می‌کنند. سیستم‌های تحویل با واسطه پروبیوتیک‌ها نیاز به خالص سازی مولکول‌ها در حد وسیع را رفع می‌کنند و امکان تحویل مولکول‌ها به مخاط را ممکن می‌سازند. مفهوم داروی زیستی به تجویز خوراکی میکروارگانیزم‌های نو ترکیب زنده برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های مختلف گفته می‌شود. لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری گرم مثبت از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک است. لاکتوکوکوس لاکتیس برای قرن‌ها در تخمیر مواد غذایی به ویژه پنیر، ماست، کلم ترش و مانند آن استفاده می‌شود، بنابراین به طور کلی توسط سازمان غذا و دارو به عنوان وضعیت ایمن شناخته می‌شود. در این مقاله مروری، مقالات مروری مربوط به لاکتوکوکوس و کاربردهای گسترده آن در مورد تولید واکسن خوراکی از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۲۰ جمع‌آوری شد. بر این اساس، پایگاه‌های اطلاعاتی زیر را جستجو شد. پایگاه‌های اطلاعاتی Scopus، PubMed و Google Scholar. کلمات کلیدی مورد استفاده در این مطالعه شامل "ایمنی، لاکتوکوکوس لاکتیس و واکسن" بود. لاکتوکوکوس لاکتیس به طور کلی به عنوان ایمن (GRAS) شناخته می‌شود و می‌تواند به طور گسترده در صنایع غذایی استفاده شود. لاکتوکوکوس لاکتیس نو ترکیب زنده، به عنوان یک داروی زیستی، به صورت خوراکی به عنوان یک واکسن زنده که آنتی ژن‌های ویروسی و باکتریایی را بیان می‌کند، تجویز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی، لاکتوکوکوس لاکتیس، واکسن

مقدمه

پروبیوتیک‌های نو ترکیب به طور فزاینده‌ای به عنوان حامل برای بیان و تحویل هدفمند مولکول‌های نو ترکیب یا طبیعی به سطوح مخاطی در تغذیه و سلامت عمل می‌کنند. سیستم‌های تحویل با واسطه پروبیوتیک‌ها نیاز به خالص سازی مولکول‌ها در حد وسیع را رفع می‌کنند و امکان تحویل مولکول‌ها به مخاط را ممکن می‌سازند. مفهوم داروی زیستی به تجویز خوراکی میکروارگانیسم‌های نو ترکیب زنده برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های مختلف گفته می‌شود (۱). لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری گرم مثبت از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک^۱ است که قدمت طولانی در فرآوری و تولید محصولات لبنی دارد. ویژگی‌های منحصر بفرد این باکتری، از جمله رشد سریع، تراکم بالای سلولی، قابل استفاده بودن در صنایع تخمیری، عدم تشکیل اجسام انکلوژن^۲، نمایش سطحی^۲ عدم تولید اندوتوکسین، فقدان فعالیت پروتئازی خارج سلولی و دارا بودن کم‌ترین فعالیت پروتئازی داخل سلولی، و مهم‌تر از همه قابلیت ترشح خارج سلولی پروتیین‌ها، باعث شده تا به عنوان یک میزبان بی‌خطر و مناسب برای تولید پروتیین‌های نو ترکیب یوکاریوتی، در تحقیقات و صنعت مورد استفاده قرار گیرد (۲). لاکتوکوکوس لاکتیس برای قرن‌ها در تخمیر مواد غذایی به ویژه پنیر، ماست، کلم ترش و مانند آن استفاده می‌شود، بنابراین به‌طور

کلی توسط سازمان غذا و دارو به عنوان وضعیت ایمن شناخته می‌شود. جدا از ایجاد طعم، لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری اسیدلاکتیک نیز اسید تولید می‌کند که غذا را حفظ می‌کند. برخی از سویه‌ها این خاصیت نگهداری را با تولید باکتریوسین افزایش می‌دهند و در نتیجه نقش آن را در صنایع غذایی تقویت می‌کنند (۳).

در طول دو دهه گذشته با ساخت باکتری‌های اسیدلاکتیک اصلاح شده از نظر ژنتیکی یعنی تولید گونه‌های نو ترکیب لاکتوباسیلوس پلانناروم، لاکتوباسیلوس کازی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس کلاکتیس کارایی این میکروارگانیسم‌ها، به عنوان ناقل زنده در تولید آنتی ژن‌های مشتق از ویروس و توسعه واکسن‌های مخاطی به اثبات رسیده است. به طور کلی قابلیت پروبیوتیک‌های نو ترکیب در زنده ماندن و ساکن شدن در سطوح مخاطی میزبان و توانایی آن‌ها در تنظیم ایمنی آن‌ها را به حامل‌های قابل اعتماد برای عرصه آنتی‌ژن‌های هترولوگ از طریق مسیرهای مخاطی تبدیل می‌کند. هم‌چنین این ناقل‌ها که مدیریت آسان‌تر و ایمن‌تر با تولید ارزان‌تر نسبت به واکسن‌های سنتی دارند می‌توانند برای واکسیناسیون انبوه در کشورهای حال توسعه مناسب باشند. هر چند این استراتژی امیدوار کننده است اما هنوز چالش‌های متعددی وجود دارد که باید بر آن‌ها غلبه کرد (۴).

³ - Surface display

¹ - Lactic Acid Bacteria (LAB)

² - Inclusion body

علی‌رغم ارتباط مشترک لاکتوکوکوس لاکتیس با محصولات لبنی، این باکتری در ابتدا از گیاهانی که گمان می‌رفت در آن نهفته است جدا شد و تنها پس از مصرف توسط نشخوارکنندگان فعال و در دستگاه گوارش تکثیر شد. لاکتوکوکوس لاکتیس که از جنس استرپتوکوکوس سرچشمه گرفته، در سال ۱۹۸۵ در جنس لاکتوکوکوس طبقه‌بندی شد، و در زیر گروه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه‌ی لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه‌ی کرموریس^۴ تقسیم‌بندی می‌شود. از نظر فنوتیپی، به عنوان یک باکتری گرم مثبت، کروی، همولاکتات، غیر اسپورزا، و بی‌هوازی اختیاری روده با صدها گونه و متغیرهای زیستی که تا به امروز منتشر شده است طبقه‌بندی می‌شود (۳).

امروزه داده‌های کافی در دسترس است که نشان می‌دهد باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها گزینه‌های مناسبی برای تحویل پروتئین‌های درمانی در ایجاد راه‌کارهای جدید پیشگیری و درمان هستند (۵).

واکسن‌هایی که برای پیشگیری و کنترل پاتوژن‌ها استفاده می‌شوند شامل واکسن‌های DNA، واکسن‌های زیر واحد، واکسن‌های زنده ضعیف شده و همچنین واکسن‌های ناقل (حامل) هستند. استراتژی‌های فعلی بر توسعه واکسن‌های جدید علیه بیماری‌های عفونی متمرکز شده‌اند. آن‌ها بر اساس شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا هستند که قادر به برانگیختن

پاسخ ایمنی لازم برای مبارزه با پاتوژن‌ها و سیستم انتقال آنها هستند (۷). مطالعه مروری حاضر با هدف معرفی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس غیر بیماری‌زا، غیر مهاجمی و ایمن انجام شد. علاوه بر این، مزایا و محدودیت‌های استفاده از واکسن‌های نو ترکیب مبتنی بر لاکتوکوکوس لاکتیس بررسی شد (۶).

مواد و روش‌ها:

در این مقاله مروری، مقالات مروری مربوط به لاکتوکوکوس و کاربردهای گسترده آن در مورد تولید واکسن خوراکی از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۲۰ جمع‌آوری شد. بر این اساس، پایگاه‌های اطلاعاتی زیر را جستجو شد. پایگاه‌های اطلاعاتی Scopus، PubMed و Google Scholar. کلمات کلیدی مورد استفاده در این مطالعه شامل "ایمنی، لاکتوکوکوس لاکتیس و واکسن" بود.

نتایج

لاکتوکوکوس لاکتیس

علی‌رغم ارتباط مشترک لاکتوکوکوس لاکتیس با محصولات لبنی، این باکتری در ابتدا از گیاهانی که گمان می‌رفت در آن نهفته است جدا شد و تنها پس از مصرف توسط نشخوارکنندگان فعال و در دستگاه گوارش تکثیر شد. لاکتوکوکوس لاکتیس که از جنس استرپتوکوک سرچشمه گرفته، در سال ۱۹۸۵ به جنس لاکتوکوکوس طبقه‌بندی شد، به سه زیرگونه تقسیم‌بندی می‌شود. از نظر فنوتیپی، به عنوان

4 - cremoris

یک باکتری گرم مثبت، کروی، همولاکتات، غیر اسپورزا، و بی‌هوازی اختیاری روده با صدها گونه و متغیرهای زیستی که تا به امروز منتشر شده است طبقه بندی می‌شود (۳).

جنس لاکتوکوکوس، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری غیراسپورزا و غیرمتحرک و جزء گروه باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید محسوب می‌شود. این باکتری‌ها با تخمیر قند، اسیدلاکتیک تولید می‌کنند. باکتری‌های هتروفرمانتاتیو مزوفیل (دمای بهینه رشد حدود 30 درجه) و غیرکومنسال هستند که در دستگاه گوارش سیطره پیدا نمی‌کنند (کلنیزه نمی‌شوند). بنابراین خطر عوارض جانبی طی استفاده دهانی آنها را کاهش می‌دهد. دلیل ایمن بودن آنها کاربرد گسترده‌های در صنایع غذایی و لبنی دارند. سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا، این باکتری‌ها را به عنوان «عموماً سالم قلمداد شده (GRAS)» طبقه‌بندی کرده است. لاکتوکوکوس-لاکتیس نه تنها به دلیل اهمیت اقتصادی، بلکه به دلیل ویژگی‌های مهمی هم‌چون تعیین توالی کامل ژنوم آسان بودن

دست‌کاری ژنتیکی آن تولید و گسترش بسیاری از ابزارهای ژنتیکی در حال حاضر برای آنها مسیر متابولیسمی ساده و غیرپیچیده کسب انرژی با تبدیل قندها به پیرووات از مسیر گلیکولیتیک و از طریق فسفریلاسیون در سطح سوبسترا به عنوان بهترین عضو اسید لاکتیک باکتری‌ها و میکروارگانیسم مدل این گروه مشخص شده است.

لاکتوکوکوس لاکتیس به طور کلی به عنوان ایمن (GRAS) شناخته می‌شود و می‌تواند به طور گسترده در

صنایع غذایی استفاده شود. لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب زنده، به عنوان یک داروی زیستی، به صورت خوراکی به عنوان یک واکسن زنده که آنتی ژن‌های ویروسی و باکتریایی را بیان می‌کند، تجویز می‌شود (۴).

به غیر از عملکرد مهم آن در غذا، لاکتوکوکوس لاکتیس در مهندسی ژنتیک به مدل لاکتیک اسید باکتری‌ها تبدیل شده است. عوامل متعددی از جمله ژنوم کاملاً توالی‌یابی شده در اندازه کوچک (۲,۳ مگابایت بر ثانیه) و توسعه ابزارهای مهندسی ژنتیک سازگار با موفقیت مانند شبیه‌سازی و سیستم‌های بیان با گزینه‌های قابل تنظیم، آن را به یک مدل مطلوب تبدیل کرده است. در طی دو دهه گذشته، لاکتوکوکوس لاکتیس کاربرد خود را از مواد غذایی به یک کارخانه سلول میکروبی موفق تبدیل کرده است. و در بسیاری از موارد، به عنوان یک جایگزین گرم مثبت برای باسیلوس سوتی لیس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم یا همتای گرم منفی اشریشیا کلی عمل می‌کند (۳).

مروری بر تجارب مربوط به استفاده از لاکتوکوکوس-

لاکتیس به عنوان واکسن جهت پیشگیری یا درمان

برخی بیماری‌ها:

درمان عفونت‌های میکروبی نیازمند مصرف آنتی‌بیوتیک است. تحقیقات نشان داده که افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود و از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهد که عفونت‌های ایجاد شده توسط این دسته از باکتری باعث افزایش عوارض ناشی از عفونت،

مرگ و میر و هزینه‌های درمان می‌شود. یکی از روش‌های کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از واکسن‌ها است امروزه واکسن‌های مبتنی بر میکروارگانیسم‌های نوترکیب زنده به عنوان «داروی زیستی» و به صورت تجویز خوراکی جهت پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها کاربرد دارند (۶).

واکسن‌ها مقرون به صرفه‌ترین و مناسب‌ترین وسیله برای کنترل بیماری‌های عفونی هستند. توسعه واکسن اخیر به جای واکسن‌های معمولی، مانند واکسن‌های زنده یا غیرفعال متشکل از پاتوژن‌های کامل، بر واکسن‌های زیرواحد متشکل از اجزای خاص پاتوژن‌ها متمرکز است. به طور کلی تصور می‌شود که واکسن‌های زیر واحد ایمن‌تر از واکسن‌های زنده یا غیرفعال هستند، زیرا واکسن‌های ساخته شده از میکروپ‌های بیماری‌زا کامل حاوی پروتئین‌های زیادی هستند که برای ایمنی محافظتی ضروری نیستند، اما اغلب خطر ایجاد پیامدهای آلرژیک یا واکنش‌پذیری خود را دارند (۷).

کنترل برخی عفونت‌های تنفسی مصرف خوراکی لاکتوکوکوس لاکتیس ترشح کننده پروتئین N نوکلئوکپسید کروناویروس سارس در موش منجر به تولید ایمونوگلوبین اختصاصی ضد پروتئین N در سرم می‌شود و پاسخ چشمگیری ایجاد می‌کند. همچنین مصرف لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب بیان کننده پروتئین A حفاظتی نوموکوکی نوعی ایمنی مخاطی مقابل عفونت نوموکوکی تنفسی ایجاد شده است.

واکسیناسیون یکی از موثرترین راهبردهای بهداشت عمومی برای مبارزه با بیماری‌های عفونی است. یکی از فناوری‌هایی که برای تولید واکسن توسعه می‌یابد، استفاده از باکتری‌ها به عنوان ناقل زنده برای تحویل آنتی‌ژن‌های واکسن نوترکیب به سیستم ایمنی است. چنین واکسن‌هایی پتانسیل تولید آنتی ژن‌های محافظ را در داخل بدن دارند و ساخت آن ارزان است. علاوه بر این، امکان بیان همزمان آنتی ژن‌های متعدد در باکتری‌ها می‌تواند منجر به ایجاد واکسن‌های چند ظرفیتی شود که نیاز به کاهش تعداد تجویز دارد. بیشتر عفونت‌ها فرآیندهای عفونی را در سطوح مخاطی تحت تأثیر قرار داده و پاسخ‌های ایمنی موضعی مخاطی می‌توانند پاتوژن‌ها را در بدو ورود به بدن مسدود نمایند. واکسن‌های باکتریایی زنده می‌توانند پاسخ‌های ایمنی مخاطی و همچنین سیستمیک از راه‌های مخاطی، مانند تجویز خوراکی یا داخل بینی، القا کنند (۸).

بهبود بیماری روده ملتهب

بیماری روده ملتهب یک بیماری مزمن است که به دو شکل مختلف تحت عنوان کراون یا کولیت همراه با زخم شناخته می‌شود. تورم مخاط روده باعث به وجود آمدن این دو شکل بیماری می‌شود. در مورد تکوین این بیماری دیدگاه‌های مختلفی وجود دارد. بر اساس یک فرضیه، بروز تورم روده ناشی از به هم خوردن ترکیب میکروبی روده است که باعث ایجاد و القای پاسخ ایمنی شدید روده و التهاب مخاطی می‌شود. فرضیه دیگر به بروز پاسخ اولیه سیستم ایمنی اشاره می‌کند

مخاطبی را می‌توان از راه مخاطبی افزایش داد. مهم‌تر از همه، این رویکرد می‌تواند عوارض جانبی بالقوه مرتبط با مسیرهای سیستمیک کلاسیک را با تجویز چنین پروتئین‌هایی کاهش دهد. در طول ۲۰ سال گذشته، تعداد زیادی از مزایای سلامتی باکتری‌های اسید لاکتیک نو ترکیب به ویژه لاکتوکوکس‌ها و لاکتوباسیل‌ها، به وضوح نشان داده شده است (۹).

تلاش‌های زیادی از سه دهه اخیر برای مطالعه و شناخت خصوصیات ژنتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید به منظور دستیابی به محصولات صنعتی بهتر انجام شده است. امروزه لاکتوکوکوس لاکتیس به یکی از مناسب‌ترین کارخانه‌های سلولی بیان و ترشح پروتئین هترولوگ تبدیل شده است. یکی از دلایل کاربرد وسیع این باکتری، ترشح پروتئین در این باکتری و خالص‌سازی آسان پروتئین است. لاکتوکوکوس لاکتیس میزبان کارایی برای تولید پروتئین نو ترکیبی جهت مقاصد درمانی است (۶).

بحث و نتیجه گیری

اثرات پروبیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیمی ایجاد می‌شود که می‌تواند ناشی از آزاد شدن متابولیت‌های تولید شده توسط پروبیوتیک‌های هضم شده ب یا از راه تأثیر بر روی سایر میکروب‌های موجود در روده میزبان و تنظیم تولید متابولیت‌ها توسط آن‌ها باشد. بهترین تأثیر پروبیوتیک‌ها در تجویز با واکسن آنفلوانزا گزارش شده است که این اثر به واسطه تنظیم آنتی‌بادی، تنظیم پاسخ ایمنی سلولی یا تی سل‌ها به دنبال تجویز واکسن آنفلوانزا توسط پروبیوتیک‌ها

که منجر به التهاب اولیه می‌شود و سپس ترکیب میکروبی روده به هم خورده و پاسخ ایمنی شدیدتر ایجاد می‌شود. استفاده از داروهای ضدالتهاب و یا استفاده از داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی از روش‌های قدیمی بهبود علائم این بیماری هستند. به هر حال اثرات جانبی و اثربخش نبودن این گونه درمان‌ها باعث شده است که نیاز به روش‌های جدید درمان احساس شود.

لاکتوکوکوس لاکتیس، کارخانه سلولی تولید پروتئین-های هترولوگ

از این باکتری به طور گسترده‌ای برای بیان پروتئین‌های هترولوگ به عنوان کاندید دارو یا واکسن‌های پیشگیری کننده استفاده می‌شود و حتی می‌توان آن را جایگزین مناسبی برای سیستم‌های بیانی پر کاربرد دیگر از جمله همتای گرم منفی آن یعنی *شریشیا کلی* دانست (۲)

باکتری‌های اسید لاکتیک یک گروه ناهمگن از باکتری‌های گرم مثبت هستند و برخی از سویه‌ها نقش مهمی در حفظ هموستاز روده ایفا می‌کنند و اثرات مفیدی دارند. چنین سویه‌هایی به عنوان پروبیوتیک‌هایی به بازار عرضه می‌شوند که ادعان می‌شود دارای ویژگی‌های مفیدی برای مصرف‌کننده هستند. وضعیت ایمنی، فعالیت‌های پروبیوتیک و ظرفیت آن‌ها برای بقا پس از عبور از دستگاه گوارش (GIT) این باکتری‌ها را به کاندیدای عالی برای هدف قرار دادن مولکول‌های درمانی مخاطبی تبدیل می‌کند. در واقع، قدرت و ویژگی پروتئین‌های درمانی برای بیماری‌های مزمن و عفونت‌های

را می‌توان از طریق راه‌های مخاطی تجویز کرد که می‌تواند نسبت به راه‌های تزریق تزریقی کم‌تر تهاجمی باشد. با تکثیر، حتی به میزان محدود، اغلب درون سلولی در سلول‌های اپی-تلیال یا سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APC)، مسیرهای پاسخ ذاتی موضعی ایجاد می‌شوند که منجر به ترشح کموکاین‌ها و سایتوکین‌هایی شده که سلول‌های عرضه‌کننده‌ی آنتی‌ژن، نوتروفیل‌ها و در نهایت سلول‌های T را برای ایجاد ایمنی تطبیقی جذب می‌کنند. القای پاسخ ایمنی مخاطی در یک سطح مخاطی می‌تواند منجر به مهاجرت سلول‌های ایمنی به سایر نقاط مخاطی دورتر شود (۱۱).

لاکتوکوک‌ها به چند دلیل اصلی می‌توانند مصونیت مخاطی (ترشح IgA ترشحی) و ایمنی سیستمیک را القا کنند، در برابر شرایط اسیدی معده مقاومت کنند، به اپی‌تلیوم روده متصل شوند و پاسخ ایمنی را به عنوان یک ادجوانت تقویت کنند. علاوه بر این، پاسخ ایمنی ضعیف در برابر آن‌ها، تحمل ایمنی کم‌تر به آنها، همچنین عوارض جانبی کم‌تر، آن را به گزینه مناسبی از ناقلان زنده در ایمونوتراپی و ایمونوپروپولیاکسی تبدیل می‌کند. با این ویژگی‌ها، ناقل‌های مبتنی بر لاکتیک اسید باکتری‌ها جایگزین مناسبی برای واکسن‌ها برای سویه‌های ضعیف شده میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، لیپوزوم‌ها و میکرو ذرات هستند.

تجویز مخاطی و بدون سوزن واکسن‌ها می‌تواند نیاز به سرنگ را با هزینه اضافی ذاتی و خطر انتقال بیماری کاهش دهد و باعث افزایش انطباق و در نتیجه پوشش برنامه‌های

بوده است. مطالعاتی به بررسی نقش پروبیوتیک‌ها بر فعالیت سلول‌های طبیعی‌کشنده علاوه بر پاسخ‌های آنتی‌بادی به دنبال تجویز واکسن پرداخته‌اند. این مطالعات به نقش این سلول‌ها در ایمنی ناشی از واکسن تاکید داشته‌اند (۶). ناقل‌های مبتنی بر لاکتوکوک‌ی نو ترکیب می‌توانند جایگزین‌های مطلوبی برای واکسن‌های سویه ضعیف شده باشند. علاوه بر این، می‌توان آن‌ها را در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی، به عنوان میزبانی مناسب و ایمن برای تولید محصولات انسانی در نظر گرفت. همچنین پتانسیل بالایی برای تزریق واکسن دارد، به ویژه از طریق روش‌های مخاطی برای پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها. علاوه بر این، لاکتوکوکوس لاکتیس یکی از مناسب‌ترین گیاهان سلولی برای بیان و ترشح پروتئین‌های هترولوگ است. یکی از دلایل استفاده گسترده از این باکتری، ترشح سریع پروتئین در این باکتری و خالص‌سازی امکان‌پذیر پروتئین است. علاوه بر این، لاکتوکوکوس لاکتیس یک میزبان کارآمد برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب برای اهداف درمانی است (۶).

واکسن‌های زنده ممکن است پاتوژن‌های ضعیف‌شده یا واکسن‌های ناقل زنده باشند که در آن‌ها از یک ناقل (پاتوژن ضعیف شده یا ارگانیسم مشترک) برای تحویل یک آنتی‌ژن خارجی استفاده می‌شود که به طور مؤثر نوعی واکسن زیر واحد است. واکسن‌های زنده دارای مزایای کلیدی هستند زیرا مسیر ورود پاتوژن‌ها را تقلید می‌کنند و پاسخ ایمنی مخصوص به محل عفونت طبیعی را تحریک می‌کنند. واکسن‌های زنده

میکروارگانیسیم‌های اصلاح شده ژنتیکی مستلزم مطالعات بالینی و کنترل شده گسترده و ارزیابی مناسب عملکرد و ایمنی این گونه داروها به ویژه برای انسان است (۶).
 یک راه حل ابتکاری، استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک است که به اصطلاح وضعیت GRAS دارند، به این معنی که آن‌ها غیر بیماری‌زا هستند و کاربرد آن‌ها برای انسان و حیوانات بی‌خطر است. عدم وجود لیپوپلی‌ساکاریدها در دیواره سلولی آن‌ها یک مزیت بزرگ است که خطر شوک اندوتوکسیک را از بین می‌برد. علاوه بر این، صنایع غذایی تجربه طولانی و موفقی در تولید در مقیاس بزرگ و ذخیره سازی ایمن این باکتری‌ها دارد که می‌تواند آماده‌سازی و نگه داری واکسن بالقوه را ساده کند (۱۱).

واکسیناسیون شود. اولین ناقل‌های باکتریایی زنده از میکروارگانیسیم‌های بیماری‌زا مانند شیگلا، سالمونلا، لیستریا و مایکوباکتریوم مشتق شده‌اند. در این موارد، جهش‌یافته ضعیف شده پایدار که دیگر بیماری‌زا نیستند، اما ایمنی‌زا باقی می‌مانند، ابتدا باید انتخاب یا ساخته شوند، مرحله‌ای که در بسیاری از موارد خسته‌کننده و زمان‌بر است. بعلاوه، سویه‌های بیماری‌زای ضعیف‌شده که سطح حدت باقی‌مانده را حفظ می‌کنند، بعید است برای واکسیناسیون افراد دارای قابلیت ایمنی جزئی، مانند نوزادان، افراد مسن یا بیماران دچار نقص ایمنی مناسب باشند (۸).
 لاکتوکوک نو ترکیب به عنوان میزبان ایمن برای تولید محصول مورد نظر، غذا یا سایر مصارف انسانی نسبت به سایر سیستم‌های تولید ایمن تر است. با این حال، استفاده از چنین

منابع

- 1- Rahimi Y., Rabbanikhorasani M., Zarkeshesfahani H., Emamzadeh R., Keyvaniamineh H. and Rezaei M. 2018. Cloning of Immunogenic Domain of Clostridium Difficile Toxin B in *Lactococcus lactis* to Develop an Oral Vaccine Based on Lactococcus against *Clostridium difficile* Associated Colitis. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 27 (4): 25-34.
 - 2- Meilina L., Budiarti S., Mustopa A.Z., Darusman A. and Bilhaq M. 2021. Heterologous Expression of Interferon α -2b in *Lactococcus lactis* and its Biological Activity against Colorectal Cancer Cells. Microbiology and Biotechnology Letters. 49 (1): 75-87.
 - 3- Song A.A.I., Lionel L.A., Swee H.E.L. and Raha A.R. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microbial Cell Factories. 16(55): 1-15.
 4. Nabizadeh SF., Dehqan F. and Khashei Varnamkhasti KH. 2022. Recombinant probiotic-Based Vaccines; Attractive vehicles for immunization via mucosal routes. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 30 (4): 4702-4705.
 5. Zarkesh Esfahani S.H., Shaykh Baygloo N., Emami Karvani Z., Sedighy Khoydaki S., Jenab A. and Naghoni A. 2012. Novel Drug and Vaccine Delivery Systems. Journal of Isfahan Medical School. 30 (196): 982-990.
 6. Margolles A., Moreno JA., Ruiz L., Marelli B., Magni C. and de Los Reyes-Gavilán CG. 2010. Production of human growth hormone by *Lactococcus lactis*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 109(4):322-324.
 7. Takahashi K., Orito N., Tokunoh N. and Inoue N. 2019. Current issues regarding the application of recombinant lactic acid bacteria to mucosal vaccine carriers. Applied Microbiology and Biotechnology. 103:5947-5955
 8. Tarahomjoo S. 2012. Development of Vaccine Delivery Vehicles Based on Lactic Acid Bacteria. Molecular Biotechnology. 51(2):183-99.
 9. [Bermúdez-Humarán LG.](#), [Aubry C.](#), [Motta JP.](#), [Deraison C.](#), [Steidler L.](#) and [Langella P.](#) 2013. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. Current Opinion in Microbiology 16(3):278-283.
 10. Safdari M., Razi A., Safarirad M., Pournaghi S.J., Shekari S. and Rameshrad M. 2020. An Overview of Probiotics for Prevention and
- ۲- الهه داورپناه و طاهره طاهری. «لاکتوکوکوس لاکتیس: یک سیستم بیانی مناسب برای تولید پروتئین‌های هترولوگ». تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمنوتراپی و تحقیقات واکسن لیشمانیا.

Treatment. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 49 (13): 1-13.

11. Manohar M.M., Campbell B.E., Walduck .K. and Moore R.J. 2022. Enhancement of live vaccines by co-delivery of immune modulating proteins. Vaccine. 40(40):5769-5780.

12. [Szatraj K.](#), [Szczepankowska A.K.](#) and [Chmielewska-Jeznach M.](#) 2017. Lactic acid bacteria promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. Journal of Applied Microbiology. 123(2): 325-339.



Recombinant lactococcus, a new approach for oral vaccine

Ali Sharifzadeh¹, Sara Arti^{2*}, Fatemeh Shayesteh³

1-Faculty of Veterinary of medicine, Islamic Azad university, Sharekord Branch, Sharekor, Iran

2-Research Affairs Expert, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran ^{1*}

*Corresponding Author: sa402002@gmail.com

ABSTRACT

Recombinant probiotics are increasingly acting as carriers for the expression and targeted delivery of recombinant or natural molecules to mucosal surfaces in nutrition and health. Probiotics-mediated delivery systems eliminate the need to purify molecules to a large extent and make it possible to deliver molecules to the mucosa. The concept of biological medicine is the oral administration of living recombinant microorganisms for the prevention or treatment of various diseases. *Lactococcus lactis* is a gram-positive bacterium from the group of lactic acid bacteria. *Lactococcus lactis* has been used for centuries in food fermentation, especially cheese, yogurt, sauerkraut and the like. Therefore, it is generally recognized as a safe situation by the Food and Drug Organization. In this review article, review articles related to lactococcus and its wide application in oral vaccine production from 1998 to 2020 were collected. Accordingly, the following databases were searched. Scopus, PubMed and Google Scholar databases. The keywords used in this study included "immunity, *Lactococcus lactis* and vaccine". *Lactococcus lactis* is generally recognized as safe and can be widely used in the food industry. Live recombinant *Lactococcus lactis*, as a biological drug, is administered orally as a live vaccine that expresses viral and bacterial antigens.

Key Words: Immunity, *Lactococcus Lactis*, Vaccine

بررسی آلودگی سالمونلا انتریتیدیس در گوشت مرغ و بلدرچین عرضه‌شده در استان خوزستان

زهرا متقی ۱، حسین خدابنده شهرکی ۲، مهلا الهی نیا ۲*

۱. دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول: mahlaelahinia@gmail.com

چکیده

سالمونلوز، توسط باکتری‌های جنس سالمونلا ایجاد شده و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ناشی از مواد غذایی است که با اسهال، تب خفیف، تهوع، دردهای شکم و حتی مرگ، همراهی می‌شود. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی سروتیپ‌های شایع سالمونلا در گوشت مرغ و بلدرچین انجام شد. به این منظور ۱۰۰ نمونه گوشت شامل ۵۰ نمونه گوشت مرغ و ۵۰ نمونه گوشت بلدرچین از مراکز توزیع در سطح استان خوزستان جمع‌آوری و پس از کشت و جداسازی سالمونلا و استخراج ژنوم، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۵ مورد از مجموع ۱۰۰ نمونه به گونه‌ی سالمونلا انتریتیدیس آلوده بودند. با توجه به نتایج حاصل، اعمال نظارت‌ها و آزمون‌های میکروبی دوره‌ای و تدابیر بیشتر از سمت مسئولین اداره دامپزشکی استان به منظور کاهش میزان آلودگی میکروبی بسیار حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، گوشت مرغ، گوشت بلدرچین

مقدمه

در سال‌های اخیر با توجه به پیشرفت‌های انجام‌گرفته در علوم پزشکی و فناوری مواد غذایی، هنوز هم بیماری‌های منتقله از طریق غذا به‌عنوان یک مشکل عمده برای سلامت انسان محسوب می‌شوند. (۲،۱) سالمونلوزیس بیماری زئونوز از شایع‌ترین عفونت‌های غذایی در جهان است و از گستردگی بالایی در کشورهای جهان برخوردار بوده و خسارات زیادی را در ابعاد مختلف بهداشتی و اقتصادی به جوامع انسانی وارد می‌کند (۳،۲). این بیماری به‌وسیله سروتیپ‌های مختلف باکتری سالمونلا از خانواده آنتریباکتریاسه ایجاد می‌شود. باکتری‌های جنس سالمونلا اجرام میله‌ای کوتاه، گرم منفی و به‌اندازه‌ی ۲/۵-۴ میکرون هستند که فاقد کپسول، دارای تاژک اطراف (به‌استثناء سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم که غیرمتحرک اند و اغلب دارای خار یا فیمبریه می‌باشند. سالمونلا قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله انسان و پرندگان می‌باشند و از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیکی بسیار متنوع هستند (۴). طبقه‌بندی این میکروارگانیسم‌ها پیچیده است، چراکه به‌جای یک‌گونه مشخص مجموعه‌ای از گونه‌های مختلف را تشکیل می‌دهد. اعضای این جنس را می‌توان بر اساس اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش‌های بیوشیمیایی و ساختار آنتی‌ژن‌های O,Vi,H در صورت وجود طبقه‌بندی کرد (۲). عفونت در انسان متعاقب مصرف غذای آلوده اتفاق می‌افتد. سندرم‌های بالینی ایجادشده توسط سالمونلاها، به دو گروه اصلی تب تیفوئید و سالمونلوز غیر تیفوئیدی تقسیم می‌شوند. تقریباً سالمونلاهای غیر تیفوئیدی از بیشتر رده‌های حیوانی جدا می‌شوند که ماکیان و فرآورده‌های آنها مهم‌ترین منشأ عفونت انسانی بوده و از بیماری آندمیک ایران به‌حساب می‌آیند (۵،۶). علائم بیماری در انسان به سروتیپ سالمونلا و شرایط میزبان بستگی داشته و می‌تواند به‌صورت مسمومیت غذایی، گاستروانتریت، تب تیفوئید و گاهی سپتی سمی بروز کند و حتی در صورت آلودگی شدید باعث تلف شدن مبتلایان نیز بشود. (۳،۷) مطالعات انجام شده آلودگی بالای مواد غذایی

و بخصوص محصولات گوشتی را به این میکروارگانیسم در نقاط مختلف ایران نشان داده است. (۳-۱) اولین مورد مربوط به وقوع مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا توسط گارت‌ر در آلمان در سال ۱۸۸۸ گزارش شد. (۸،۹) گوشت و فرآورده‌های آن بخصوص گوشت مرغ یکی از منابع انتقال آلودگی به انسان محسوب می‌شوند. بنابراین از آنجایی که تعیین میزان آلودگی مرغ و بلدرچین عرضه شده به سالمونلا می‌تواند مسئولین بهداشتی را در اعمال برنامه‌های پیشگیرانه و کنترلی و در نهایت کاهش آلودگی مواد غذایی به این پاتوژن یاری کند، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی آلودگی به سالمونلا در گوشت مرغ و بلدرچین عرضه شده در بازار مصرف استان خوزستان انجام گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه مرغ و ۵۰ نمونه بلدرچین تازه از مراکز مجاز توزیع کننده محصولات گوشتی در استان خوزستان تهیه شد. نمونه‌ها از قسمت ران، کبد و سنگدان مرغ و بلدرچین اخذ و هر نمونه در کیسه پلاستیکی جداگانه بسته بندی شده و در کنار یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد.

جداسازی باکتری

نمونه‌های تهیه شده در محیط غنی کننده سلنیت F به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد و بعد از رشد، در دو محیط افتراقی مک کانکی آگار (MC) و سالمونلا-شیگلا آگار (SS) کشت داده شدند. پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا را که کلنی‌های بی رنگ با مرکز سیاه هستند. جهت تأیید تشخیص با روش IMViC و کشت در محیط TSI، اوره و Iron Lysin Agar مورد ارزیابی قرار گرفتند. (۱۰).

میکرولیترا (۱۰ mM)، Mgcl₂ (۵۰ mM) (۰/۷۵) میکرولیترا) هرکدام از پرایمرهای F و R (۰/۳) میکرولیترا، آنزیم ۰/۲ میکرولیترا) Smar Taq DNA Polymerase و ۱۹/۵ میکرولیترا آب مقطر صورت گرفت. واکنش PCR انجام شد. برنامه واکنش زنجیره پلیمرز برای تکثیر ژن ۱۶srRNA بدین شرح بود. ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس محصولات طی ۳۵ سیکل (دناتوراسیون در ۳۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سلسیوس برای ۸ دقیقه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند. ۴ میکرولیترا محصولات واکنش زنجیره پلیمرز در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و سپس بارنگ آمیزی DNA safe stain مشاهده شدند.

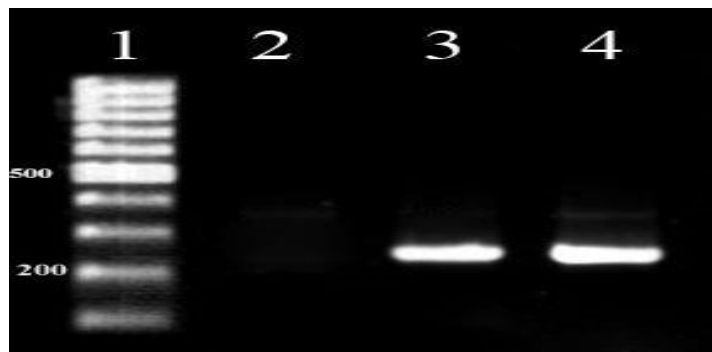
استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)
به منظور استخراج DNA از باکتری‌های مورد مطالعه از روش جوشاندن استفاده شد. برای این منظور ۲۵ میکرولیترا از کشت یک شبه باکتری در محیط مایع قلب مغز با ۵۰۰ میکرولیترا آب مقطر به مدت ۱۲ دقیقه جوشانده شد و پس از ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA استفاده شد. بعد از استخراج DNA، با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن ۱۶ srRNA *سالمونلا انتریتیدیس* (جدول ۱)، تشخیص قطعی ایزوله‌ها انجام شد. واکنش PCR برای هر ژن در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترا متشکل از DNA استخراج شده یک میکرولیترا، ۱۰x PCR buffer (۲/۵ میکرولیترا)، Mix dNTP (۰/۵)

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن ۱۶srRNA *سالمونلا انتریتیدیس*

ژن	توالی پرایمر (۵' - ۳')	اندازه محصول (bp)	مرجع	دمای اتصال پرایمرها
16srRNA	S1: GCCGTACACGACCTTATAGA S4: ACCGTACACGACCTTATAGA	۲۵۰	۱۱	۵۸

جدول ۲: نتایج بدست آمده از کشت میکروبی و بررسی مولکولی نمونه‌ها

نوع نمونه	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت در کشت	تعداد نمونه‌های مثبت در PCR
مرغ	۵۰	۶ (۱۲ درصد)	۴ (۸ درصد) <i>سالمونلا انتریتیدیس</i> ، ۲ (۴ درصد) گونه‌های دیگر
بلدرچین	۵۰	۲ (۴ درصد)	۱ (۲ درصد) <i>سالمونلا انتریتیدیس</i> ، ۱ (۲ درصد) گونه‌های دیگر



نصویر شماره ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز چاهک شماره ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک شماره ۲ کنترل منفی و چاهک‌های شماره ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت *سالمونلا انتریتیدیس*

بحث

سالمونلا انتریتیدیس و در ۲۴ نمونه آلودگی به *سالمونلا تایفی* موریوم گزارش گردید. (۱۴) در مطالعه دیگر توسط یوسفی تعداد ۱۴۰ نمونه از مرغ‌های پرکنده و آماده فروش در شهر همدان جهت جداسازی انواع گونه‌های *سالمونلا* مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند که از این تعداد ۷۰ عدد را مرغ‌های منجمد و ۷۰ عدد دیگر را مرغ‌های تازه تشکیل می‌دادند. نمونه‌ها از پوست و ماهیچه برداشته ۱۲ مورد (۸/۶ درصد) از مرغ‌های آزمایش شده آلوده تشخیص داده شدند. میزان آلودگی در مرغ‌های تازه بیش از منجمد بود و شایع‌ترین گونه‌های جدا شده *سالمونلا تیفی* موریوم و *سالمونلا انتریتیدیس* بودند (۱۵).

در تایلند، میزان شیوع گونه‌های *سالمونلا* در لاشه‌ی مرغ معادل ۸/۳ درصد (۱۶) گزارش شده است و در مطالعه‌ی دیگری از ۱۲۱ نمونه بافت مرغ و ۴۰ نمونه تخم مرغ فرآوری شده، ۷ مورد *سالمونلا* جدا شد (۱۷). در مطالعه‌ای که در کشور مصر انجام گرفت، گونه‌های *سالمونلا* در ۵ مورد (۲۰ درصد) از گوشت گاو چرخ شده یخ زده، ۹ مورد (۳۶ درصد) از پای مرغ منجمد شده و ۱۳ مورد (۵۲ درصد) از نمونه‌های فیله منجمد جدا گردید (۱۸) مطالعات قبلی نشان دادند که *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی* موریوم شایع‌ترین سروتیپ‌های *سالمونلا* هستند که در انسان باعث بیماری می‌شوند (۱۹).

در سه استان شمالی ویتنام از ۲۶۸ گوشت طیور نمونه برداری انجام شده است که ۱۱۵ نمونه ۴۲/۹ درصد از نظر *سالمونلا*

باکتری *سالمونلا* یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های منتقله از راه مواد غذایی است که در انسان و حیوان ایجاد بیماری می‌نماید. محصولات گوشتی آلوده، منبع اصلی *سالمونلا* معرفی شده‌اند و به گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغ بر ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ ناشی از *سالمونلا* اتفاق می‌افتد. این مسئله به عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما مطرح می‌باشد. در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه گوشت شامل ۵۰ نمونه مرغ و ۵۰ نمونه بلدرچین مورد بررسی، ۵ مورد (۵ درصد) مربوط به *سالمونلا انتریتیدیس* شناسایی شد. در حالی که در تحقیق انجام شده توسط نصرتی و همکاران در ۲۰۱۲ به منظور بررسی شیوع سروتیپ‌های *سالمونلا تیفی* موریوم، *تیفی* و *انتریتیدیس* در مواد غذایی در مرکز درمانی بیمارستان مفید آلودگی گوشت گاو به *سالمونلا* ۸/۸ درصد گزارش گردید. (۱۲) در پژوهش انجام شده توسط سلطان دلال و همکاران که روی نمونه‌های گوشت مرغ و قرمز صورت گرفت، ۴۷/۸ درصد از نمونه‌های گوشت مرغ و ۲۸/۸ درصد از نمونه‌های گوشت قرمز به *سالمونلا* آلوده بودند. در این بررسی سروتیپ غالب مربوط به *سالمونلا تامپسون* (۵۴/۹ درصد) و *سالمونلا انتریتیدیس* (۹/۸ درصد) بوده است. (۱۳) در تحقیق انجام شده توسط چادهاری و همکاران که بر روی ۲۷۰ نمونه گوشت صورت گرفت، در ۳۷ نمونه (۱۳/۷ درصد) آلودگی به *سالمونلا* گزارش گردید که ۱۳ نمونه (۳۵/۱۳ درصد) به

مثبت

میکروبی مواد غذایی اهمیت خاصی دارد. سالمونلوز از بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام می‌باشد و افزایش شیوع آن بین انسان و حیوان، مخصوصاً در دهه‌های اخیر، اهمیت بیماری را دوچندان می‌نماید. برای جلوگیری از آلودگی سالمونلا، برنامه‌های نظارتی مورد نیاز است.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان مطالعه‌ی حاضر، از جناب آقای دکتر منوچهر مؤمنی شهرکی مسئول محترم مرکز تحقیقات تغذیه و غذاهای ارگانیک و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

بوده‌اند. شایع‌ترین سالمونلاهای جدا شده در این بررسی سرووارهای سالمونلا آناتوم، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا ردینگ و سالمونلا انتریتیدیس، به ترتیب ۱۵/۸ درصد، ۹/۱ درصد، ۷/۵ درصد، ۶/۲ درصد بوده‌اند. بیشترین مقاوت آنتی بیوتیکی نسبت به تتراسیکلین ۵۸/۵ درصد، سولفامیدها ۵۸/۱ درصد، استرپتومایسین ۴۷/۳ درصد، آمپی سیلین ۳۹/۸ درصد، کلرآمفینکل ۳۷/۳ درصد و نالیدیکسیک ۲۷/۸ درصد گزارش شده است. در این تحقیق هیچ کدام از جدایه‌ها نسبت به سفنازیدیم مقاومت نشان نداده‌اند. (۲۰)

نتیجه گیری

سالمونلا یکی از مهم‌ترین علت‌های شیوع بیماری‌های ناشی از غذا در جهان است. مهم‌ترین سروتیپ جدا شده از انسان سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس است. بنابراین، کنترل



منابع

- 1- Soltan dallal M, Vahedi S, Zeraati H, Bakhtiari R, Izadpoor F, Khalife gholi M, et al. Comparison of the prevalence of microbial contamination of red meat and poultry packaging and non-packaging of retail and chain stores in southern Tehran. *J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci.* 2007 spring;15(1): 35-43[Full text in Persian]
- 2- Ranjbar R, Naghouni A, Panahi Y, Izadi M. Antibiotic sensitivity of Salmonella strains isolated from clinical cases less than ten antibiotics used in the treatment of Salmonella infection. *Iran J Infect Dis Trop Med.*2009; 14: 41-46[Full text in Persian]
- 3- Niazi shahraki S, Rokni N, Razavilar V, Bahonar A, Akhondzadeh A. Quantitative and qualitative assess of ment of poultry carcasses contaminated with Salmonella in Tehran's industrial slaughterhouses. *J.Vet.Res.* 2008;62(6):385-389 [Full text in Persian]
۴. طباطبایی، عبدالمحمد حسنی و فیروزی، رؤیا (۱۳۸۰). بیماری‌های باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه 522
۵. سلطان دلال، محمدمهدی (۱۳۸۶). مقایسه میزان شیوع آلودگی میکروبی گوشت‌های قرمز و مرغ بسته بندی و غیر بسته بندی در خرده فروشی‌ها و فروشگاه‌های زنجیره‌ای جنوب تهران. *مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید صدوقی یزد، دوره‌ی. پانزدهم، شماره‌ی اول، صفحات ۴۳-۳۵*
۶. شاپوری، رضا؛ رهنما، مهدی و اقبالزاده، شبنم (۱۳۸۸). بررسی شیوع سروتیپ‌های سالمونلا در گوشت مرغ و تخم مرغ و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن در شهر زنجان. *فصلنامه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، شماره‌ی ۶، جلد ۲، صفحات ۷۱-۶۳*
7. Delshad R. Isolation and detection of serotype and antimicrobial resistance profile of salmonella spp from feces, heart, ovaries and liver of slaughtered poultry in industrial abattoir of Urmia. [Msc Thesis]. Islamic Azad university of Shabestar; 2013 [Full text in Persian]
8. Amirmozaffari N, Rahmani Z, Iesazadeh Kh. Evaluation of the level of contamination with salmonella spp. in red meat, chicken and domestic and industrial eggs produced in Talesh city and assessment of their antibiotic resistance pattern, Iran. *Qom univ med sci J.* 2013;7(5): 60-65. [Full text in Persian]
9. Shapoori R, Rahnama M, Eghbalzade Sh. Prevalence of Salmonella serotypes in poultry meat and eggs and determine antibiotic sensitivity in the Zanjan city. *jbsazu.* 2009 summer;6(2)3:63-71 [Full text in Persian]
10. Emadi C.S, Hasanzadeh M, Bozorg M.M, Mirzaei S. Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. 2009; 64 (2): 77-83. [In Persian].
11. Nayeibi N, Ghorashi S A, Harzandi N, Shamsara M, Tabarai B, Bakhtiari A. Diagnostic value of PCR method for detection of Salmonella enteritidis contamination in poultry products in Karaj. *Medical sciences.* 2011;21(1):32-37.
12. Nosrati S, Sabokbar A, Dezfolian M, Tabarra B. & Fallah F. Prevalence of Salmonella typhimurium, typhi and enteritidis in food in Mofid hospital. *Research in medicine.* 2011;36(1):43-48.
13. Soltan Dalal MM, Taremi M, Gachkar L, et al. Characterization of antibiotic resistant patterns of salmonella serotypes isolated from beef and chicken samples in tehran. *Jundishapur journal of microbiology.* 2009;2(4(S.N. 5)):124-131.
14. Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmhatt MN, Makwana PP. Virulence genes detection of Salmonella serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary world.* 2015;8(1):121.
۱۵. یوسفی مشعوف، رسول. (۱۳۷۹). بررسی شیوع آلودگی سالمونلایی در مرغ‌های عرضه شده برای مصرف در همدان.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان، سال هشتم، شماره ۳۳، صفحه ۵۱-۴۷.

16. Shanmugasamy, M., Velayutham, T., and Rajeswar, J. 2011. Inv A gene specific PCR for detection of Salmonella from broilers. *Vet World*. 4: 562-564.

17. Taddele Menghistu, H., Rathore, R., Dhama, K., and Kumar Agarwal, R. 2011. Isolation, Identification and Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of Salmonella Species from Field Materials of Poultry Origin. *Int J Microbiol Res.* 2: 135-142.

18. Hassanein, R., Hassan Ali, S.F., AbdEl-Malek, A.M., Mohamed, M.A., and Elsayh, K.I.

2011. Detection and identification of Salmonella species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. *Vet World* 4: 5-11.

19. Aktas, Z., Martin, D., Kayacan, C.B., Diren, S., and Threlfall, E.J. 2007. Molecular characterization of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Antimicrob Agent.* 30: 541-545

20. Thai, T.A.; Hirai, T.; Lun, N.T. and Yamauchi, R. (2012). Antibiotic resistance profiles of Salmonella serovars isolated from retail pork and chicken meat in Northern Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 15: 147-151.



Investigation of *Salmonella enteritidis* contamination in chicken and quail meat sold in Khuzestan province

Zahra Motaghi ¹, Hossein Khodabandeh Shahraki ², Mahla Elahinia^{2*}

1. Ph.D student of food hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. Nutrition and Organic Products Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

* Corresponding author Email: mahlaelahinia@gmail.com

Abstract

Salmonellosis is caused by *Salmonella* bacteria and is one of the most common food-borne diseases that is accompanied by diarrhea, mild fever, nausea, abdominal pain and even death. This study was conducted in order to isolate and identify common *Salmonella* serotypes in chicken and quail meat. For this purpose, 100 meat samples, including 50 chicken meat and 50 quail meat samples, were collected from distribution centers in Khuzestan province and after cultivation and isolation of salmonella and genome extraction, they were analyzed by polymerase chain reaction method. The results showed that 5 out of 100 samples were infected with *Salmonella enteritidis*. According to the results, it is very important to apply periodic microbial monitoring and tests and more measures from the officials of the provincial veterinary department in order to reduce the amount of microbial contamination.

Key words: *Salmonella enteritidis*, chicken meat, quail meat

بررسی آلودگی گونه‌های ویبریو در ماهیان عرضه شده در بازار شهرستان شهرکرد

مهران خلیلی دهکردی^۱، فرشته صالحیان دهکردی^{۲*}، مجید اسماعیلی^۳

۱. کارشناس ارشد صنایع غذایی، مسئول فنی کارخانه آب معدنی نوشین گوار دیمه کوه‌رنگ، شهرکرد، ایران

۲. کارشناس صنایع غذایی، هیات مدیره انجمن صنفی مسئولین فنی صنایع غذایی آرایشی و بهداشتی، شهرکرد، ایران

۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، کارشناس آزمایشگاه کنترل کیفیت معاونت غذا و دارو، شهرکرد، ایران

مکاتبه با نویسنده: Salehian_f67@yahoo.com

چکیده:

امروزه مصرف غذاهای دریایی در بین مصرف کنندگان جایگاه ویژه‌ای دارد. مصرف غذاهای دریایی می‌تواند منجر به انتقال عوامل بیماری‌زا باکتریایی با منشأ اولیه یا ثانویه باشد، از جمله مهمترین این باکتری‌ها گونه‌های ویبریو هستند که به طور طبیعی در محیط‌های آبی و در بدن موجودات آبی یافت می‌شوند. هر ساله موارد زیادی از مسمومیت‌های غذایی ناشی از گونه‌های ویبریو در ماهی‌های مورد مصرف گزارش می‌گردد. هدف از این تحقیق بررسی میزان آلودگی ماهی‌های خام به گونه‌های ویبریو عرضه شده در شهرستان شهرکرد می‌باشد. در این پژوهش تعداد ۵۰ نمونه ماهی از ۳۰ فروشگاه عرضه ماهی و آبزیان در شهرستان شهرکرد تهیه شد و سپس در مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت. از مهم‌ترین گونه‌های بررسی شده می‌توان به ویبریو پاره‌مولیتیکوس، ویبریو کلرا، ویبریو ولنیفیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو آلجینولیتیکوس اشاره نمود. سپس بر اساس وجود یا عدم وجود پرگنه‌های رشد کرده، ۴۰ درصد از گوشت نمونه‌های مطالعه شده (۲۰ قطعه) آلوده به ویبریو بودند. فراوانی بالای گونه‌های ویبریو در نمونه‌ها تأیید کننده عدم رعایت بهداشت در مراکز تهیه و توزیع ماهی و فرآورده‌های آن است. به نظر می‌رسد جایگاه‌های عمل‌آوری و نحوه حمل و نقل و توزیع ماهی از بهداشت مناسبی برخوردار نیست.

کلمات کلیدی: ویبریو، ماهی، بیماری مشترک، شهرستان شهرکرد

مقدمه:

از گذشته تا امروز گروه عوامل بیماری زای غذازاد (Foodborne pathogens) در جهت ایمنی و سلامت غذا موضوع تحقیقات زیادی بوده است. مصرف ماهیان و سایر آبزیان دریایی بعد از گوشت قرمز و طیور دومین منبع پروتئینی جانوری و جایگاه مناسبی در تغذیه مصرف کنندگان در جهان است. با این حال شیوع مسمومیت‌های غذایی یکی از مهم‌ترین مخاطرات و مسائل در مبحث سلامت غذایی در جهان به شمار می‌آید. مسمومیت‌های غذایی که از طریق مصرف ماهی یا سایر آبزیان به انسان منتقل می‌شود در طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشند. در مطالعات باکتری‌ها می‌توان به جنس‌های ویبریو، لیستریا، آئروموناس و کلستریدیوم اشاره کرد. شدت و نوع آلودگی‌ها ارتباط زیادی بین عادت غذایی مصرف کننده و گونه ماهیان یا آبزیان مورد مصرف غذایی دارد (۱). منشاء باکتری‌های منتقله می‌تواند عوامل بیماری‌زای اولیه یا ثانویه باشد که می‌توانند باکتری بیماری‌زای ماهی یا پاتوژنهای ثانویه باشند در برخی از کشورها مانند ژاپن، ماهی منبع اصلی پروتئین می‌باشد از جمله آلودگی‌های عمده آبزیان می‌توان به آلودگی با باکتری‌های جنس ویبریو اشاره کرد. خانواده ویبریوناسه شامل جنس‌های ویبریو، آئروموناس، پلیزوموناس و فتوباکتریوم است. جنس ویبریو باکتری‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک و خمیده شکل دارای یک تاژک قطبی هستند در محیط‌های آبی بخصوص نواحی ساحلی در آب‌های شور یافت می‌شوند. این باکتری‌ها در حضور ۲-۴ درصد نمک به خوبی رشد نموده و تا غلظت ۸ درصد نمک را نیز تحمل می‌کنند (۲). باکتری‌ها پس از ورود با عبور از سد دفاعی اسید معده، به بخش مخاطی دیواره روده چسبیده و با تکثیر باعث ایجاد عفونت روده‌ای با علائمی همچون اسهال، دفع مدفوع آبکی، استفراغ شدید و در برخی موارد فرورفتگی در ناحیه گونه و چشم می‌شوند. مبتلایان نیاز به درمان‌های

سریع با جایگزینی آب و الکترولیت از دست رفته، به همراه آنتی بیوتیک جهت کنترل بیماری دارند (۳). ویبریوها عمدتاً بطور طبیعی فلور آب یا موجودات آبی محسوب می‌شوند لذا انتقال به انسان می‌تواند بسادگی صورت پذیرد. جنس ویبریو خود شامل ۳۶ گونه می‌باشد که ۱۲ گونه از آنها دارای قابلیت بیماری زایی در انسان می‌باشد. از جمله گونه‌های معروف آن می‌توان به ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو ولینفیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو آجینولیتیکوس اشاره نمود. در سال ۲۰۱۱ آلودگی با این باکتری در آمریکا به ۸۰۰۰۰ بیماری منتج گردید که در مورد ۵۰۰ نفر به بستری و ۱۰۰ نفر به مرگ منجر گردید (۴).

هدف از این پژوهش بررسی میزان آلودگی ماهیان در مرحله توزیع (ماهیان خام) و معرفی روش‌های شناسایی سریع‌تر مولکولی می‌باشد.

مواد و روش کار:

جمع آوری نمونه‌ها به صورت خوشه‌ای تصادفی، در بازه زمانی زمستان ۱۴۰۲، از ۲۰ نوع ماهی خام عرضه شده در ۳۰ فروشگاه عرضه کننده ماهی خام در شهرستان شهرکرد صورت پذیرفت. در مورد همه نمونه‌ها، اطلاعاتی همچون تاریخ و زمان نمونه برداری، دمای نمونه، نوع ماهی و محل نمونه برداری ثبت و نمونه‌ها به سرعت و ظرف کمتر از سه ساعت به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌های ماهی از هر دو نوع آزاد و پرورشی عرضه شده تهیه گردید.

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، با رعایت اصول نمونه برداری استریل از محوطه بطنی نمونه‌ها برداشته و پس از همگن کردن نمونه‌ها، ۲۵ گرم از نمونه‌های همگن شده را توزین و در مرحله اول، در ۲۲۵ میلی لیتر از محلول ۳/۵ درصد نمک به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. در مرحله دوم، یک میلی لیتر از رقت 10^{-1} مرحله قبل برداشته و با تلقیح در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت آب پیتونه (مرک، آلمان) رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه و این لوله‌ها به مدت ۱۸

حرارتی، فرایند PCR انجام گردید. آزمون PCR در مورد تأیید جنس با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن‌های RNA ریپوزومی صورت پذیرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) سنتز گردیدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه تقریبی محصول به دست آمده در جدول ۱ آمده است (۶) برای استفاده از پرایمرها، ابتدا پرایمرهای مورد استفاده طبق دستور العمل شرکت سازنده رقیق و استفاده گردید. در نهایت جهت انجام فرایند PCR، از مسترهای تجاری (Master Mix) شرکت سیناژن استفاده گردید. مقدار $7/5 \mu\text{l}$ از این مسترها شامل (PCR، بافر، dNTP، $mgc12$ ، Taq polymerase و Loading buffer) می‌باشد (با $1 \mu\text{l}$ از F primer و $1 \mu\text{l}$ R primer، $3/5$ از D.W و $2 \mu\text{l}$ از DNA در یک تیوب مخلوط و سپس تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکر (اپندروف، آلمان) قرار داده شد. به جهت نداشتن کنترل مثبت در مورد گونه‌های میمیکوس و ولنیفیکوس، صرفاً از گونه پاراهمولیتیکوس (ATCC 17802) جهاد دانشگاهی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. کلیه مراحل فوق در مورد نمونه کنترل مثبت نیز انجام و در مورد نمونه کنترل منفی نیز از آب مقطر تزریقی بجای DNA استفاده گردید. چرخه‌های PCR در مورد جنس شامل مراحل دناتوراسیون اولیه (واسرشتگی) در 95°C درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه، و 30 چرخه شامل دناتوراسیون در 92°C درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه، اتصال پرایمرها در 60°C درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه و امتداد در 72°C درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در 72°C درجه سانتیگراد به مدت 7 دقیقه انجام گرفت (۴).

ساعت در انکوباتور 42°C درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. در مرحله آخر کشت میکروبی با استفاده از روش کشت سطحی، از سه رقت آخر در محیط کشت انتخابی TCBS (مرک، آلمان) استفاده و سپس پرگنه‌ها شمارش گردید. پرگنه‌های ویبریو در سطح این محیط به رنگ زرد تا خاکستری مشاهده می‌گردید. پرگنه‌های گونه پاراهمولیتیکوس سبز تا آبی رنگ می‌باشد. پرگنه‌های ایجاد شده پس از شمارش به محیط کشت آگار خوندار (مرک، آلمان) به جهت ماندگاری تا زمان فرایند PCR انتقال یافت (۵). باروری محیط‌های کشت میکروبی در مورد نمونه کنترل مثبت باکتری ویبریو (ATCC 17802) مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تأیید گردید.

استخراج DNA:

در این مرحله از همه باکتری‌های شناسایی شده در محیط جامد TCBS که در محیط ژلوز خون دار نگهداری می‌گردید، در محیط کشت Broth LB (مرک، آلمان) کشت می‌گردید. در این مرحله ابتدا با استفاده از کیت (سیناژن، ایران)، DNA استخراج گردید. برای استخراج DNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اقدام گردید. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000PqLab) مورد ارزیابی قرارگرفت. DNA های استخراج شده تا زمان مصرف در فریزر منفی 20°C درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایش Nested PCR:

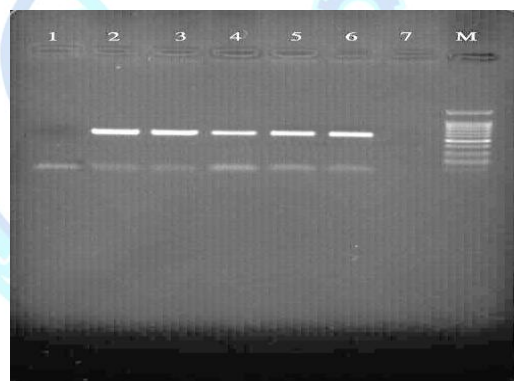
در این تحقیق دو مرحله از فرایند PCR، یک مرحله برای تعیین جنس باکتری‌ها و مرحله دوم با استفاده از محصول مرحله اول آزمایش پلیمرز آشیانه‌ای (Nested PCR) برای تعیین گونه‌ها انجام گردید. در این آزمایش در مرحله اول قطعات بزرگتری تولید و سپس این قطعات به عنوان الگو برای مرحله دوم بکار می‌رود. با انجام این روش حساسیت و اختصاصیت آزمایش به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. پس از آماده سازی پرایمرها و طراحی سیکل‌های

جدول ۱ توالی پرایمرهای جنس و گونه های ویبریو

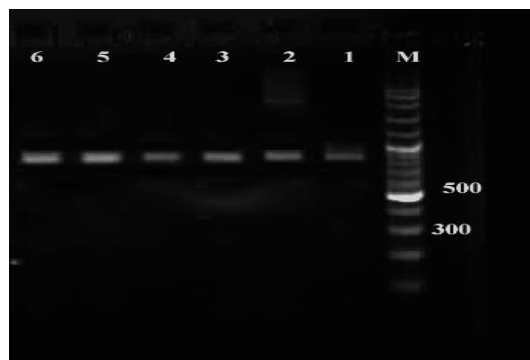
نام باکتری	ژن مربوطه	پهنای باند (bp)	توالی و جهت پرایمر
All Vibrio spp	V.16S	663	F - CGGTGAAATGCGTAGAGA- R -TTACTAGCGATTCCGAGTTC-
V. vulnificus	Vv.hsp	410	F -GTCTTAAAGCGGTTGCTGC- R-CGCTTCAAGTGCTGCTGTTAGAAG
V. parahaemolyticus	Vp.flasE	897	F- GCAGCTGATCAAAAACGTTGAGT- R- ATTATCGATCGTGCCACTCAC-
V. mimicus	Vm.sodB	121	F- CATTGCGTTCTTTGCTGAT- R-GAAGTGTTAGTGATTGCTAGAGAT
V. cholera	Vc.sodB	248	F- AAGACCTCAACTGGCGGTA R-GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT
V.alginolyticus	gyrB	337	F- GAGAACCCGACAGAAGCGAAG R- CCTAGTGCGGTGATCAGTGTG'

گردیدند. اندازه باندهای حاصل از تکثیر ژن های مختلف با استفاده از مارکرهای SM0241- 100bp (Fermentase, Germany) تعیین گردید. (تصویر شماره ۱ و ۲)

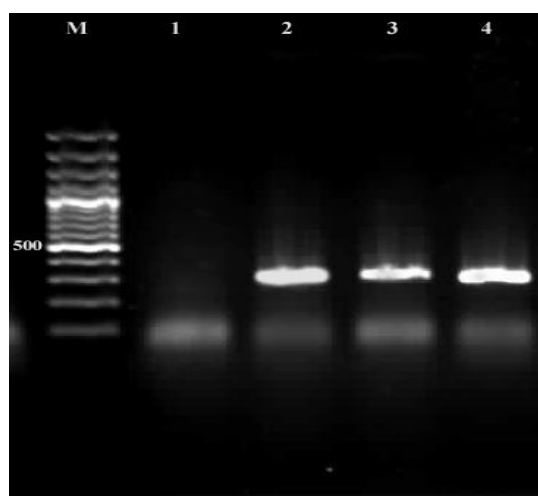
پس از انجام PCR، به منظور مشخص کردن اندازه محصولات تولید شده، از روش الکتروفورز استفاده شده و محصولات روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و به همراه مارکرهای DNA در ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز



تصویر شماره ۱: چاهک شماره M مربوط به مارکر 100bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه های مثبت ویبریو



تصویر شماره ۲: چاهک شماره M مربوط به مارکر 100bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه های مثبت ویبریو پاره مولیتیکوس



تصویر شماره ۲: چاهک M مربوط به مارکر bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی ۱۰۰، چاهک‌های ۲ تا ۴ نمونه‌های مثبت ویبریووالنیفیکوس

جدول ۲: تعداد و درصد نمونه‌های مثبت گونه‌های ویبریو

نمونه	ویبریو والنیفیکوس	ویبریو پاراهمولیتیکوس	ویبریو آلجینولیتیکوس	نمونه‌های منفی	تعداد کل نمونه
ماهی قزل آلا	۱ (۱۰٪)	۳ (۳۰٪)	۰	۶ (۶۰٪)	۱۰
ماهی قباد	۰	۱ (۳۳,۳٪)	۱ (۳۳,۳٪)	۲ (۶۶,۶٪)	۳
شیرنیزه دم سیاه	۰	۰	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۲
شاه ماهی	۱ (۲۰٪)	۳ (۶۰٪)	۱ (۲۰٪)	۲ (۴۰٪)	۵
شوریده	۰	۲ (۴۰٪)	۲ (۴۰٪)	۳ (۶۰٪)	۵
شانگ صورتی	۰	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۲
صارم یا صافی	۰	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۲
سکین	۰	۰	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۲
شیر	۰	۲ (۴۰٪)	۱ (۱۰٪)	۳ (۶۰٪)	۵
زبان	۰	۰	۱ (۲۵٪)	۳ (۷۵٪)	۴
سرخو چمن	۰	۱ (۳۳,۳٪)	۱ (۳۳,۳٪)	۲ (۶۶,۶٪)	۳
صبیتی	۱ (۵۰٪)	۱ (۵۰٪)	۰	۱ (۵۰٪)	۲
حلو سیاه	۰	۰	۱ (۱۰٪)	۴ (۸۰٪)	۵
جمع	۳ (۶٪)	۱۵ (۳۰٪)	۱۱ (۲۲٪)	۳۰	۵۰

بررسی دیگری در تایلند نیز نشان داد که میزان شیوع گونه‌های ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس در غذاهای دریایی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۰ درصد بوده است (۱۱). در خصوص فراوانی گونه‌ها نیز بر اساس بررسی مشابه فراوانی آلودگی، ۳۲ درصد ویبریوپاراهمولیتیکوس، ۷ درصد ویبریو آلجینولیتیکوس و ۳۹ درصد ولنیفیکوس در ماهی گزارش شده است (۱۲).

بحث و نتیجه گیری:

در تحقیق دیگر نیز در بین موارد ماهی آلوده، ۲۹/۲ درصد ویبریوپاراهمولیتیکوس، ۲۱/۹ درصد گونه هاروی و آلجینولیتیکوس، ۹/۷۵ درصد گونه انگوایلاریوم و ۱۷ درصد نمونه ناشناس گزارش گردید (۱۳). صفرپور نیز در تحقیق مشابهی از بین ۲۰۰ نمونه، فراوانی آلودگی به گونه‌ها ویبریو و گونه پاراهمولیتیکوس را به ترتیب ۵ و ۲۱ درصد و میزان آلودگی به جنس را ۳۴/۵ درصد گزارش نمود (۱۴).

هرچند که نسبتاً فراوانی آلودگی در مورد گونه‌ها نیز با نتایج سایر محققین همخوانی دارد ولی تفاوت فراوانی آلودگی در تحقیقات متفاوت می‌تواند دلایلی از جمله نوع نمونه، روش پرورش، گونه ویبریو، تعداد نمونه، روش انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی، فصل و نوع روش آزمایش کشت یا مولکولی باشد. از آنجا که در این تحقیق برای شناسایی گونه‌ها از روش مولکولی استفاده گردید، امکان مثبت شدن نمونه‌های غیرفعال دور از انتظار نبود که می‌تواند منجر به بالاتر بودن نتایج تحقیق حاضر نسبت به نتایج برخی از محققین باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از مسئول محترم مرکز تحقیقات تغذیه و غذاهای ارگانیک و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جناب آقای دکتر منوچهر مؤمنی شهرکی، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

بر اساس نتایجی که داخل کشور توسط کریمی علویچه و شریف زاده در سال ۱۳۹۹ انجام شده است از میان ویبریو های جدا شده میزان آلودگی به گونه نمونه‌های پاراهمولیتیکوس، کلرا، میمیکوس و ولنیفیکوس به ترتیب ۳۵،۲۰، ۱۵ و ۳۰ درصد تعیین گردید (۷). همچنین مطالعات مشابه دیگری نیز در این زمینه در کشور صورت گرفته از جمله نتیجه تحقیق جلالی در سال ۱۳۸۸ فراوانی آلودگی به گونه پاراهمولیتیکوس و سایر گونه‌ها را ب ترتیب ۱/۵ و ۲/۴ درصد گزارش نمود (۸).

بررسی‌ها حاکی از آن است که برخی گونه‌های ویبریو در مناطق خاصی به شکل اندمیک حضور داشته و قدرت تحمل بالای نمک در این باکتری سبب شده تا جزو فلور میکروبی آب‌های شور باشد (۹).

طبق بررسی دیگر جهت جلوگیری از افزایش جمعیت ویبریو پیش از برداشت رعایت شرایط بهداشتی مزرعه اهمیت خاصی دارد لذا اولین قدم در تولید محصول سالم رعایت مدیریت بهداشتی در پرورش یا صید است. همچنین استفاده از آب تمیز برای شستشو و نگهداری در دمای پایین در حین حمل و نقل نیز تأثیر بسیار زیادی بر بار میکروبی فرآورده دارد. براساس گزارشات موجود نگهداری در دمای ۴-۲ درجه منجر به کاهش بار میکروبی خواهد شد (۱۰).

منابع:

- 1) Hang L. 2012. Community compositions of *Vibrio* in freshwater products and pathogenic analysis. Dissertation for Master degree, Yangzhou: Yangzhou University, 19-35.
- 2) FAO/WHO. 2002. Joint FAO/WHO Activities on risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Preliminary Document. Hazard Identification, Exposure Assessment and Hazard Characterization of *vibrio* spp. in seafood. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/vibrio.pdf>
- 3) Ansari M., and Raissy M. 2010. In vitro susceptibility of commonly used antibiotics against *Vibrio* spp. isolated from Lobster (*Panulirus homarus*). Afr J. Microbiol Res. 4(23), 2629-2631.
- 4) Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerg Infect Dis, 17(1), 7-15.
- 5) Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. 2013. Clinical veterinary micro.
- 6) Maheshwari M., Krishnaiah N., Ramana DBV. 2011. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the detection of *Vibrio cholerae* in Contaminants. Ann Biol Res. 2(4), 212-217.
- 7) کریمی علویجه، شریف زاده ع. (۱۴۰۰). مطالعه فراوانی آلودگی گونه‌های ویبریو در ماهیان عرضه شده در شهر اصفهان. سال هشتم، شماره ۴.
- 8) مهدوی منیژه، جوادی عباسعلی، خوروش فرزین، عطایی بهروز، عابدی داریوش. (۱۳۸۸). آلودگی ویبریو پاراهمولیتیکوس در اغذیه دریایی شهر اصفهان. مجله
- بیماری‌های عفونی و گرمسیری ایران. جلد ۱۴، شماره ۴۶، صفحه ۳۷ - ۳۳.
- 9) Su YC., Liu C., 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24(6), 549- 558.
- 10) Thompson CC., Thompson FL., Vicente AC. 2008. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). Int J Syst Evol Microbiol. 58(3), 617-621.
- 11) Senachai P., Chomvarin C., Namwat W., Wongboot W., Wongwajana S., Tangkanakul W. 2013. Application of tetraplex PCR for detection of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. mimicus* in cockle. Southeast Asian J Trop Med Publ Health. 44(2), 249- 58.
- 12) Wey S., Zhao H., Xian Y., Ahossain M., Wu X. 2014. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control, Diag Microbiol Infect Dis. 79, 115-118.
- 13) Tarrc L., Pate JS., Puhr ND., Sowers EG., Bopp CA., Strockbine NA. 2007. Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and *rpoB* Sequence Determination. J Clin Microbiol. 45(1), 134-140.
- 14) Safarpour Dehkordi F., Hosseini S., Rahimi E., Momeni M., Yahaghi E., Khodaverdi E. 2014. Study the distribution of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish, lobster and crab caught from Persian Gulf. Iran J Med Microbiol. 8(2), 1-7.

Investigation of contamination of *Vibrio* species in fish sold in the market of Shahrekord city

Mehran Khalili Dehkordi¹, Fereshte Salehian Dehkordi^{2*}, Majid Esmaili³

1. Senior expert in food industry, technical manager of Noushin Gwar Dimeh Kohrang mineral water factory, Shahrekord, Iran
2. Food Industry Expert, Board of Directors of Anhman Sanfi Technical Officials of Food, Cosmetics and Health Industries, Shahrekord, Iran
3. Senior Microbiology Expert, Quality Control Laboratory Expert of Food and Drug Deputy, Shahrekord, Iran

Correspondence to the author: Salehian_f67@yahoo.com

Abstract:

Today, consumption of seafood has a special place among consumers. Consumption of seafood can lead to the transmission of bacterial pathogens of primary or secondary origin, among the most important of these bacteria are *Vibrio* species that are naturally found in aquatic environments and in the bodies of aquatic organisms. Every year, many cases of food poisoning caused by *Vibrio* species are reported in consumed fish. The purpose of this research is to investigate the level of *Vibrio* contamination of raw fish sold in Shahrekord city. In this research, 50 fish samples were prepared from 30 fish and aquatic supply stores in Shahrekord city and then analyzed at the Nutrition and Organic Products Research Center of Islamic Azad University, Shahrekord branch. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio alginolyticus* can be mentioned among the most important species investigated. Then, based on the presence or absence of grown spores, 40% of the meat of the studied samples (20 pieces) were infected with *Vibrio*. The high abundance of *Vibrio* species in the samples confirms the lack of hygiene in the fish and its products preparation and distribution centers. It seems that the processing stations and the method of transporting and distributing fish do not have proper hygiene.

Key words: *Vibrio*, Fish, Common disease, Shahrekord city

بررسی فراوانی ژن های *sul* در سویه های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد

مهناز شمعی^۱، مریم رئیسی^۲، حسین خدابنده شهرکی^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

چکیده

عفونت های ادراری یکی از شایع ترین بیماری های عفونی محسوب می گردد و *اشریشیا کلی* به عنوان مهم ترین عامل عفونت های ادراری مطرح می باشد. این تحقیق باهدف بررسی فراوانی ژن های *sul* در باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد عفونت های دستگاه ادراری در شهرکرد به صورت مقطعی - توصیفی در سال ۱۳۹۲ صورت گرفت. نمونه ها به صورت استریل تهیه شد و از لحاظ آزمایش های کامل ادرار، کشت و مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی حساسیت میکروبی با روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت. همچنین به منظور ردیابی ژن های *sul* واکنش PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل واقع شد. در این تحقیق از ۱۳۰ ایزوله *اشریشیا کلی* مورد بررسی در ۶۷ ایزوله (۵۱/۵۳ درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. فراوانی ژن های *sul1*، *sul2* و *sul3* به ترتیب ۲۰/۸۹ درصد، ۵۵/۲۲ درصد و ۴/۴۷ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای اسکوار بین مقاومت به سولفونامید و ژن های *sul* رابطه معنی دار آماری مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان می دهد که ایزوله های *اشریشیا کلی* نسبت به سولفونامیدها مقاومت بالایی دارند که علت آن می تواند مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ها باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، سولفونامیدها، عفونت های دستگاه ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری اگر چه یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که به‌راحتی قابل درمان است ولی یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که عمدتاً زنان، کودکان و افراد مسن را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۴-۱). مطالعات انجام شده در جوامع مختلف نشان می‌دهد که باسیل‌های گرم منفی به‌عنوان شایع‌ترین عوامل اتیولوژیک عفونت‌های مجاری ادراری بوده و در بین آن‌ها/شریشیالکی عامل اولیه ۹۰-۷۵ درصد موارد عفونت دستگاه ادراری است (۲،۵،۶). عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد شده توسط شریشیالکی شامل طیف وسیعی از اختلالات از جمله التهاب مثانه، التهاب و عفونت میزنای و عفونت کلیه هستند (۷،۸). کسب ژن‌های مقاومت توسط انتقال افقی، در حال حاضر نقش عمده‌ای را در گسترش سویه‌های مقاوم چندارویی بازی می‌کند چون بخش قابل توجهی از ژن‌های مقاومت در پلاسمیدهای کونژوگاتیو، ترانسپوزون‌ها، توالی‌های الحاقی و اینتگرون‌ها واقع شده‌اند. برای درمان عفونت دستگاه ادراری از تری متوپریم و سولفامتوکسازول به‌صورت ترکیبی استفاده می‌شود (۱۱-۹). سولفونامیدها به‌عنوان یک عامل بسیار مهم ضد میکروبی برای درمان عفونت به شریشیالکی طبقه‌بندی شده‌اند و وجود مقاومت به سولفونامیدها می‌تواند منجر به شکست در درمان عفونت دستگاه ادراری شود. در شریشیالکی مقاومت در برابر سولفونامیدها اغلب مربوط به ژن دی‌هیدروپتروات سنتتاز (DHPS) در اینتگرون است (۱۲-۱۴). در حال حاضر سه نوع مختلف از ژن DHPS (*sul1*، *sul2* و *sul3*) مسئول مقاومت در برابر سولفونامیدها شناخته شده است. ژن *sul1* به طور انحصاری در پلاسمیدهای بزرگ کونژوگاتیو و انتهای ۳ اینتگرون کلاس ۱ واقع شده است (۱۵،۱۶) در حالی که ژن *sul2* معمولاً در پلاسمیدهای متعلق به خانواده IncQ و یا در پلاسمیدهایی به نام پلاسمیدهای pBP1 واقع شده‌اند (۱۷). ساختمان پلاسمید حامل *sul3* هنوز به‌خوبی شناخته نشده است (۱۸). ژن‌های *sul1* و *sul2* شیوع بیشتری نسبت به ژن *sul3* دارند (۱۶،۱۹،۲۰). باتوجه‌به این که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌صورت

روزافزون در میان باکتری‌های مختلف، به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده بنابراین بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در باکتری/شریشیالکی جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در شهرستان شهرکرد حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی/شریشیالکی

۵ تا ۱۰ سی سی نمونه توسط بیمار و از طریق تکنیک ادرار وسط در ظروف استریل جمع آوری گردیده و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، نمونه‌های ادرار جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه ادرار میانی گرفته شده در بطری‌های استریل به‌محض رسیدن به آزمایشگاه کشت می‌شد. کشت کمی بوده و با استفاده از لوپ کالیبره ۰/۰۱ میلی لیتر، از نمونه ادرارسانتریفوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط مکانکی آگار کشت داده شد. پس از انجام کشت به روش خطی، محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. چنان چه در مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون رشدی در پلیت‌ها دیده نمی‌شد، ۲۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری و در صورت عدم رشد، به عنوان کشت منفی ثبت می‌شد. بعد از مدت انکوباسیون تعداد کل باکتری‌های رشد کرده در میلی لیتر ادرار را از ضرب کردن تعداد کلنی‌های ظاهر شده در محیط بلاد آگار در ۱۰۰ به دست آورده و باسیل‌های گرم منفی از نظر مورفولوژی در محیط EMB (مرک، آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند (۲۱).

پس از مشخص شدن نمونه‌های UTI مثبت، تعیین هویت باکتری/شریشیالکی توسط آزمون‌های بیوشیمیایی (نظیر تست IMVIC، اوره، لیزین دکربوکسیلاز) و آزمون PCR جهت تشخیص مولکولی صورت پذیرفت (۲۲).

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های *sul* مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی‌های

⁵ dihydropteroate synthase (DHPS)

تعیین گردید. نمونه DNAهایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از آزمون PCR بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* که در جدول ۱ نشان داده شده است، آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی/شریشیاکلی با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix (ساخت بیونیر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول ۲ نشان داده شده است (۲۳).

رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر (مرک، آلمان)، به عنوان منبع برای استخراج DNA، مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ میکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشد یافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود (هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل ۱ درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت‌سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های/شریشیاکلی

ژن	توالی پرایمر (۳-۵)	اندازه محصول (bp)
<i>16srRNA</i>	16S-F, GCGGACGGGTGAGTAATGT 16S-B, TCATCCTCTCAGACCAGCTA	200

درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۲۰۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست است (۲۳).

تکثیر ژن *16srRNA* با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲

جدول ۲. اجزای کیت Accupower PCR PreMix

Component	20 µl Reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCl (pH=9)	mM10
KCl	30 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Stabilizer and tracking	

میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. این آزمون بر روی ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی بیوتیک کوتریماکسازول مقاوم بودند صورت گرفت. تکثیر ژن‌های *16srRNA*، *16s* و *16l* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه

شناسایی ژن‌های *16s*، *16l* و *16r* در ایزوله‌های

شریشیاکلی

آزمایش PCR به منظور ردیابی ژن‌های *16s*، *16l* و *16r* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۳ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳

۷ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۴۳۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul1* باند ۲۹۳ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul2* و باند ۷۵۰ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *sul3* می‌باشد (۲۴،۲۳).

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن‌های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3*

ژن	توالی پرایمر (۵-۳)	Annealing temp (0C)	اندازه محصول (bp)	منبع
<i>Sul 1</i>	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	۶۵	۴۳۳	(۲۴)
<i>Sul 2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATAACCGGCACCCGT	۶۵	۲۹۳	(۲۴)
<i>Sul 3</i>	F: GCCTATGCATCTACACAATC R: TGAGAAATGGACAATGTCCG	۶۵	۷۵۰	(۲۳)

3 CLSI تا ۴ کلنی از باکتری موردنظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سوآپ استریل از باکتری برداشته و به صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های موردنظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس اندازه‌های ممانعت از رشد، بر اساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد (۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

به منظور شناسایی *اشریشیاکلی* از تست‌هایی بیوشیمیایی استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۴ نشان داده شده است.

بعد از انجام آزمایشات PCR، به منظور تأیید وجود قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویربردار از ژل (انگلستان، یووی تک) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش آنتی بیوگرام

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی - بائر برطبق دستورالعمل CLSI (شرکت پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد *اشریشیاکلی ATCC 25922* به عنوان کنترل مثبت کوتریموکسازول (تری متوپریم-سولفامتوکسازول) (SXT)، آمیکاسین (AM30)، سفتریاکسون (CRO30)، نیتروفورانئوئین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمی‌پنم (IPM10)، جنتامایسین (GM10) (پادتن طب، ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل

جدول ۴. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهر کرد

نوع تست						
نوع باکتری	تولید اندول	متیل رد	ووژس پروسکوئر	سیترات	H ₂ S	اوره
شریشیا کلی	+	+	-	-	-	-

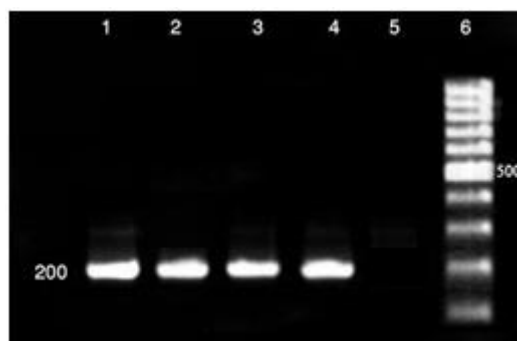
در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های /شریشیا کلی از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری در انسان استفاده شد که همان‌گونه که در جدول ۵ نشان داده شده است در هر دو جنس مرد و زن به ترتیب بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهر کرد در دو جنس زن و مرد ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهر کرد در دو جنس زن و مرد

p-value	جنسیت		آنتی‌بیوتیک	
	درصد	N= زن ۱۰۱	درصد	N= مرد ۲۹
۰/۳۸۴	درصد ۶۶/۳۳	۶۷	درصد ۷۵	۲۱
۰/۱۱۵	درصد ۵۲/۴۷	۵۳	درصد ۶۸/۹۶	۲۰
۰/۴۴	%۵۰/۴۹	۵۱	%۵۸/۶۲	۱۷
۰/۰۸۷	%۴۷/۵۲	۴۸	%۶۵/۵۱	۱۹
۰/۵۷۳	%۳۵/۶۴	۳۶	%۴۱/۳۷	۱۲
۰/۰۷	درصد ۳۳/۳	۳۵	۵۱/۷	۱۵
۰/۰۰۱	درصد ۳۳/۶۶	۳۴	درصد ۶۸/۹۶	۲۰
۰/۱۶۲	درصد ۲۴/۷۵	۲۵	درصد ۳۷/۹۳	۱۱
۰/۸۷۸	درصد ۲۲/۷۷	۲۳	درصد ۲۴/۱۳	۷
۰/۰۳۱	درصد ۱۸/۸۱	۱۹	درصد ۳۷/۹۳	۱۱
۰/۰۳۳	درصد ۱۳/۸۶	۱۴	درصد ۳۱/۰۳	۹
*۰/۰۴۸	درصد ۰	۰	درصد ۶/۸۹	۲

* آزمون دقیق فیشر

تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری /شریشیا کلی و حضور توالی ژن *16SrRNA*.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *I6srRNA*: ستون ۶: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۵: کنترل منفی، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ باند ۲۰۰ جفت بازی مربوط به نمونه‌های مثبت

همان‌طور که در جدول ۶ و شکل ۲ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی از ۶۷ ایزوله مقاوم به سولفونامید ژن‌های *sul1* در جدول ۶: فراوانی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در اشریشیا کلی مقاوم به سولفونامیدها

Strain Characteristic	No. of isolates with genes					
	<i>Sul 1</i>	<i>Sul 2</i>	<i>Sul 3</i>	<i>Sul 1</i>	<i>Sul 1</i>	<i>Sul 1</i>
				<i>Sul 2</i>	<i>Sul 3</i>	<i>Sul 3</i>
Sulfonamide Resistance	14	37	3	8	2	3
N=67	20.89%	55.22%	4.47%	11.94%	2.98%	4.47%

بحث

مطالعه حاضر باهدف بررسی فراوانی ژن‌های *sul* در باکتری اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری در شهرستان شهرکرد با دو روش آنتی بیوگرام و مولکولی (PCR) انجام گرفت. باتوجه به نقش ژن‌های *sul* در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها مطالعه حاضر برای اولین بار در شهرستان شهرکرد انجام گرفت. از ۱۳۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری در ۶۷ ایزوله (۵۱/۵۳ درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. از ۲۹ نفر مرد مورد بررسی در ۱۹ نفر (۶۵/۵۱ درصد) و از ۱۰۱ نفر زن مورد بررسی در ۴۸ نفر (۴۷/۵۲ درصد) مقاومت به کوتریموکسازول مشاهده گردید. به این ترتیب مشخص می‌گردد که نقش زنان در ایجاد عفونت‌های ادراری بیشتر از مردان می‌باشد.

در تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS شماره ۱۹ استفاده از آزمون کای مربع بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، سفالوتین، سفتریاکسون، آمیکاسین رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P\text{-value} > 0/05$). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های نورفلوکساسین، ایمی پنم، جنتامایسین رابطه آماری معنی دار مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$). هم چنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر نیز بین جنسیت و آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$). در این تحقیق در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای مربع بین مقاومت به سولفونامیدها و ژن‌های *sul* رابطه معنی دار مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$).

sul1 و *sul3* هم زمان در ۲ ایزوله (۲/۹۸ درصد) و ژنهای *sul1*، *sul2* و *sul3* هم زمان در ۳ ایزوله (۴/۴۷ درصد) گزارش گردیدند.

در مطالعه مشابهی Kern و همکاران در سال ۲۰۰۲ فراوانی ژن *sul1* را در ۱۰۷ ایزوله/شیریشیالکی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در دانمارک ۲۸/۳۰ درصد و فراوانی ژن *sul2* را ۵۰/۴۶ درصد برآورد کردند (۲۳). در این تحقیق فراوانی ژنهای *sul1* و *sul2* هم زمان در ۱۸/۶۹ درصد برآورد کردند که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد.

هم چنین Bean و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ای که بر روی ۳۹۱ ایزوله/شیریشیالکی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری در بیمارستان رویال لندن انجام دادند، مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵ درصد و فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های/شیریشیالکی مقاوم ۸۱ درصد گزارش کردند که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۳).

در تحقیق انجام شده توسط نوروزی و همکاران که به منظور ردیابی ژن *sul2* در باکتری‌های/شیریشیالکی جدا شده از موارد عفونت ادراری مراجعه‌کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی بر روی ۳۰۰ بیمار انجام گرفت، مقاومت به کوتریموکسازول ۷۱ درصد و فراوانی ژن *sul2*، ۸۰ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۴).

در مطالعه انجام شده توسط Hammerum و همکاران که بر روی ۱۹۹ ایزوله/شیریشیالکی مقاوم به سولفونامیدها انجام شد، فراوانی ژن *sul2* ۸۱ درصد گزارش گردید (۳۵). انجام به بررسی ۷۸ ایزوله/شیریشیالکی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداختند که میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۴۰ درصد گزارش کردند. در این تحقیق فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول ۴۰ درصد گزارش گردید (۳۶).

Al-Agamy میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول را در ۱۰۰ ایزوله/شیریشیالکی جدا شده از موارد عفونت ادراری را ۶۲ درصد گزارش کرد و فراوانی ژن *sul2* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول ۸۶/۳۶ درصد

در مطالعه محمدی و همکاران در خرم‌آباد، میزان مقاومت به آمپی‌سیلین ۹۸/۴ درصد گزارش شد (۲۶). در مطالعه انجام شده توسط صفار و همکاران در ساری، این میزان ۸۰-۱۰۰ درصد گزارش شده است (۲۷). در این مطالعه حساسیت/شیریشیالکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، جنتامایسین، نیتروفوران‌توئین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۴۸/۴۷ درصد، ۸۲/۳۱ درصد، ۹۸/۴۷ درصد و ۴۷/۷۰ درصد بود ولی در مطالعه‌ای که توسط براتی و همکاران انجام شد، حساسیت نسبت به کوتریموکسازول، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، نیتروفوران‌توئین و نالیدیکسیک اسید را به ترتیب ۴۸/۱ درصد، ۴۰/۳ درصد، ۸/۹ درصد، ۷۲/۵ درصد و ۵۵/۳ درصد گزارش نمودند (۲۸). در این مطالعه مقاومت/شیریشیالکی نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۳۶/۹۲ درصد در حالی که در بررسی که محمدی مهر و همکاران در تهران انجام دادند، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نیتروفوران‌توئین در باکتری/شیریشیالکی به ترتیب ۵۸/۳۳ درصد، ۲۷/۷۷ درصد و ۱۳/۸۸ گزارش شد (۲۹). در مطالعه‌ای که توسط شریفی یزدی و همکاران در شهر خوی صورت گرفت، میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۵۹/۶۲ درصد گزارش کردند (۳۰). در مطالعه حاضر میزان مقاومت/شیریشیالکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، تتراسایکلین، ایمی‌پنم، سفالوتین و سفتریاکسون به ترتیب ۶۷ درصد، ۵۶ درصد، ۲۳/۰۷ درصد، ۳۸/۴۶ درصد و ۲۷/۶۹ درصد برآورد گردید در حالی که میزان مقاومت/شیریشیالکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون در مطالعه مهاجری و همکاران ۷۱ درصد، آمیکاسین ۶۶/۴ درصد، تتراسایکلین ۹/۷ درصد گزارش شده است (۳۱). در مطالعه انجام گرفته توسط مدنی و همکاران میزان مقاومت/شیریشیالکی نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم ۸۸/۲ درصد برآورد گردید (۳۲).

در این تحقیق فراوانی ژنهای *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول به ترتیب ۲۰/۸۹ درصد و ۵۵/۲۲ درصد و ۴/۴۷ درصد گزارش گردید. ژنهای *sul1* و *sul2* به طور هم زمان در ۸ ایزوله (۱۱/۹۴ درصد)، ژنهای

۶درصد گزارش گردید (۳۹). Byrne-Bailey و همکاران مقاومت به سولفاکلروپیرادازین و فراوانی ژنهای *sul2*، *sul1* و *sul3* در خاک مزارع کشاورزی انگلستان را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق مشخص گردید که فراوانی این ژن‌ها به ترتیب ۲۳ درصد، ۱۸ درصد و ۹ درصد می‌باشد (۴۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام شده در ایران و جهان نشان می‌دهد که اکثر ایزوله‌های /شرشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های ادراری مقاوم هستند و چون بخش قابل توجهی از ژن‌های مقاومت در پلاسمیدهای کونژوگاتیو، ترانسپوزون‌ها، توالی‌های الحاقی و اینتگرون‌ها واقع شده‌اند لذا استفاده از روش مولکولی نظیر PCR جهت ردیابی سریع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها ضروری به نظر رسیده و نتایج حاصل از این کار می‌تواند در انتخاب دقیق آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان و جلوگیری از گسترش بیشتر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها کمک شایانی نماید.

گزارش گردید (۳۷). به این ترتیب مشخص می‌گردد که در تمامی تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف ژن *sul2* نسبت به ژن‌های *sul1* و *sul3* از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد.

در تحقیق انجام شده توسط Hoa و همکاران به منظور بررسی مقاومت باکتری‌های جدا شده از استخرهای مزارع کشاورزی نسبت به سولفونامیدها و بررسی فراوانی ژن‌های *sul2*، *sul1* و *sul3* مقاومت به سولفامتازین ۸۶٫۵ درصد گزارش گردید (۳۸). در این تحقیق در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul2*، *sul1* و *sul3* به ترتیب ۵۰ درصد، ۲۱/۱۷ درصد و ۴/۱۷ درصد گزارش گردید.

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و انتقال افقی آن در بین باکتری‌ها باعث افزایش مقاومت نسبت به سولفونامیدها در نمونه‌های محیطی گشته به طوری که نتایج حاصل از تحقیق Hoa و همکاران که به منظور بررسی فراوانی ژن‌های *sul2*، *sul1* و *sul3* در استخرهای پرورش ماهی و میگو صورت گرفت، فراوانی ژن *sul1* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۵۷ درصد و ۳۳ درصد گزارش گردید. فراوانی *sul2* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۵۱ درصد و ۱۹ درصد و فراوانی ژن *sul3* در استخرهای پرورش ماهی و میگو به ترتیب ۱۴ درصد و

منابع

1. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17: 227–248.
2. Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med.* 2001;135:41–50.
3. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003;5:449–456.
4. Tartof SY, Solberg OD, Riley LW. Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Med Microbiol.* 2007;56:1363–1369.
5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123–140.
6. Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infection. *Clin Microbiol Newsl.* 2002;24: 135–140.
7. Schaalger TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age. *Pediatric Drugs.* 2001;3(3):219-27.
8. Riccabona M. Urinary tract infections in children. *Current Opinions in Urology.* Jan 2003;13(1):59-62.
9. Chang CY, Lu PL, Lin CC, Lee TM, Tsai MY, Chang LL. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2011;60: 197–204.
10. Fierer J, Guiney D. Extended-spectrum β -lactamases: a plague of plasmids. *JAMA.* 1999;281: 563–564.
11. Moritz EM, Hergenrother PJ. The prevalence of plasmids and other mobile genetic elements in clinically important drug-resistant bacteria. p 35–64. In: Amabile-Cuevas, C. F., and Wymondham, UK. (ed.) , In *Antimicrobial Resistance in Bacteria.* Horizon Bioscience, 25-54.
12. Grape M, Sundstro, mL, Kronvall G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52:1022–1024.
13. Huovinen P, Sundstro ML, Swedberg G, Skold O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:279–289.
14. Skold O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat.* 2000; 3: 155–160.
15. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gramnegative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1998; 1:109–119.
16. Trobos M, Christensen H, Sunde M, Nordentoft S, Agerso Y, Simonsen GS, Hammerum AM, Olsen JE. Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. *Microbiology.* 2009; 155:831–836.
17. van Treeck U, Schmidt F, Wiedemann B. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (*pBPI*) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and

- integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;19: 371–380.
18. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet Scand.* 2010; 52:47.
19. Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 666–672.
20. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49:627–634.
21. Schaeffer AJ. Potential role of phase variation of type I pilli in urinary tract infection and bacterial prostatitis. *Infection Disease.* 2005; 3 (2): 144-149.
۲۲. ادیب فر پ. میکروبی شناسی پزشکی. چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۳: ۸۰-۶۰.
23. Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50 (3): 513–516.
24. Gundogdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. *J Med Microbiol.* 2011; 60 (5):1633–1642.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: 2003.
26. Mohammadi M, Ghasemi E, Mokhayeri H, Pournia Y, Boroun H. Antimicrobial resistance patterns of *E. coli* detected from hospitalized urine culture samples. *Asian J Biol Sci.* 2010; 3(4): 195-201.
27. Saffar MJ, Enayti AA, Abdolla IA, Razai MS, Saffar H. Antibacterial susceptibility of uropathogens in 3 hospitals, Sari, Islamic Republic of Iran, 2002-2003. *East Mediterr Health J.* 2008; 14(3): 556-563.
۲۸. براتی ل، قزلسفلی ف، آذرهوش ر، حیدری ف، نورا م. تعیین حساسیت باکتری/شریشیاکلی جدا شده از ادرار زنان باردار نسبت به آنتی بیوتیک ها در شهرستان کلاله. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ۱۳۸۷؛ دوره ۱۳، شماره ۳، صفحات ۱۰۱-۱۰۷.
۲۹. محمدیم، فیض آبادیم، بهادریم م، متشکرآرانی ع، خسرویم. بررسی فراوانی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های گرم منفی مسئول عفونت بیمارستانی بخش مراقبت ویژه بیمارستان بعثت تهران در سال ۱۳۸۶. مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران، ۱۳۸۸؛ سال سوم، شماره های ۲ و ۳، صفحات ۵۴-۴۷.
۳۰. شریفی یزدیم ک، آذر سا م، شیرازیم ح، رستگار لاری ع، اولیاء پ، فلاح مهرآبادی ج، ملأ آقا میرزایی ه، صباغی آ، شامکانی ف، مبصری گ، بختیاری ر، سلطان دلالم م. فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و گروه CTX-M-I در سویه های/شریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری بهبودی روش فنوتیپی و PCR در خوی، ایران. مجله دانشگاه علوم

- پزشکی زنجان، ۱۳۹۰؛ دوره ۱۹، شماره ۷۷، صفحات ۵۳-۶۱.
۳۱. مهاجری پ، ایزدی ب، نقاشی ن. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های /شریشیالکی جدا شده از عفونت‌های ادراری مراجعه کنندگان به آزمایشگاه مرکزی کرمانشاه. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۹۰؛ دوره ۱۵، شماره ۱، صفحات ۵۱-۵۶.
۳۲. مدنی ح، خزاعی ص، کنانی م، شاهیم. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شریشیالکی در نمونه‌های کشت ادرار بیمارستان امام رضا، کرمانشاه ۱۳۸۵. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۸۷؛ دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۲۸۷-۲۹۵.
33. Bean DC, Livmore D, Hall LM. *E.coli*: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 1088-1093.
۳۴. نوروزی ج، اخوان سپهی ع، بزاززاده ن. ردیابی ژن *sul2* در /شریشیالکی جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری مراجعه کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی. مجله دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ۱۳۹۲؛ دوره ۲۱، شماره ۸۸، صفحات ۷۶-۸۳.
35. Hammerum A, Sandvaye D, Andersen SR. Detection of *sul1*, *sul2*, *sul3*, in sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol.* 2006; 106: 235-239.
36. Koljalg S, Trusaluk K, Vainumae I, Stsepetova J, Mikelsaar M. Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotype and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J Clin microbial.* 2009; 47: 99-105.
37. Al-Agamy M. Molecular resistance mechanisms to older antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolates. *J African Microbiol.* 2012; 6: 106-111.
38. Hoa PT, Managaki S, Norihide N, Takada Hong D, Hung Viet P, Hien PT, Suzuki S. Abundance of sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in integrated quaculture-agriculture ponds, north vietnam. *Total Environ Sci.* 2010; 15-22.
39. Hoa PT, Nonaka L, Hung Viet P, Suzuki S. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north vietnam. *Sci Total Environ.* 2008; 405(1-3): 377-84.
40. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall AB, Hawkey PM, Wellington E.M. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the united kingdom. *Antimicrob agents and Chemother.* 2009; 53(2): 696-702.

Prevalence of *sul* genes in *E.coli* isolated from urinary tract infectious in Shahrekord

Mahnaz Shamaei¹, Maryam Reisi², Hossein Khodabandeh Shahraki^{3*}

1. M.Sc. Student of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. PhD Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

Abstract

Urinary tract infections is one of the most common infectious diseases and *E. coli* is one of urinary tract infection the most important factor. The purpose of this investigation is prevalence of *sul* genes in *E.coli* isolated from urinary tract infectious in Shahrekord to form cross-sectional in 2013. Samples was prepared as sterile and in terms of urine tests, cultures and was studied. Investigation antimicrobial susceptibility was performed by disk diffusion method. As well as, for tracing *Sul* gene PCR reaction was performed in the presence of specific primers and the results was analyzed. In this study of 130 *E. coli* isolates studied 67 isolates (53/51%) resistance to co-trimoxazol was observed. The frequency of genes *sul1*, *sul2* and *sul3* was respectively 20/89%, 55/22% and 4/47%. In statistical analysis with chi-square test between to resistance sulfonamides and *sul* genes significant correlation was observed. The results showed that *E. coli* isolates are high resistant to sulfonamides that may be the indiscriminate use of these antibiotics.

Keywords: Antibiotic resistance, *E. coli*, Sulfonamides, Urinary tract infection

بررسی ارتباط بین ژن های *sul* و ژن *int* تگرون کلاس I در سویه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به

سولفونامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد

مرضیه فارسی نژاد^۱، مریم رئیسی^۲، جمشید علی بابایی شهرکی^۳، حسین خدابنده شهرکی^۴*

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران.

۴. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

چکیده

مقاومت ضد میکروبی به یک مشکل عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است. کسب/ینتگرون یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در میکروارگانیسم های گرم منفی است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن های *sul* و *int* تگرون کلاس I در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفونامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد می باشد. در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۹۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد، به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی مقاومت به سولفونامیدها از آنتی بیوتیک کوتریموکسازول استفاده گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به ردیابی ژن های *sul1*، *sul2*، *sul3* و *int1* پرداخته شد. پس از انجام آزمون PCR از ۳۳ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول ژن *sul1* در ۱۵ ایزوله (۴۵/۴۵ درصد)، ژن *sul2* در ۲۰ ایزوله (۶۰/۶۰ درصد)، ژن *Sul3* در ۲ ایزوله (۶/۰۶ درصد) و ژن *int1* در ۲۷ ایزوله یافت شد. در تجزیه و تحلیل آماری بین ژن های *int1* و *sul1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهد که یک ارتباط قوی بین حمل/ینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس های مختلف آنتی بیوتیکی وجود دارد.

واژگان کلیدی: /ینتگرون، سولفونامیدها، کلبسیلا پنومونیه، مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی

مقدمه

۳۰ ژن *dfr* مختلف شناخته شده است که معمولاً در کاست ژنی اینتگرون ها یافت می‌شوند (۱۴،۱۳). در بین کلاس‌های اینتگرونی شناخته شده، اینتگرون کلاس I از اهمیت بالایی در انتقال ژن‌های مقاومت دارویی برخوردار است (۱۵). این اینتگرون در سمت ۵ خود دارای ژن کدکننده اینتگراز (*intI*) و توالی *attI* می‌باشد و در سمت ۳ خود دارای ژن‌های *qacEA* و *sulI* می‌باشد. باتوجه به این که بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به صورت روزافزون در میان باکتری‌های مختلف، به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده بنابراین مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و اینتگرون کلاس I در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفانامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی کلبسیلا پنومونیه در این مطالعه مقطعی-توصیفی از بین ۵۰۰۰ نمونه شامل ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی المهدی، الزهرا، پاستور، بیمارستان آیت اله کاشانی و هاجر، در سال ۱۳۹۲ تعداد ۹۰ ایزوله از باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا گردید. در هنگام تهیه نمونه، پرسشنامه‌ای که در آن سن، جنس و نوع عفونت را مشخص می‌کند، تهیه گردید. در این تحقیق از کلبسیلا پنومونیه PTCC1290 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به منظور شناسایی باکتری، نمونه مورد نظر بر روی محیط‌های بلاد آگار، سالمونلا شیگلا آگار و مک کانکی آگار کشت داده شد. کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI، مک کانکی، سالمونلا شیگلا آگار، دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لیزین در محیط لیزین آبیرون آگار (LIA)، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط MRVP broth، رشد در محیط سیمون سیترات و اوره آگار بررسی و در نهایت نتایج با استفاده از جداول استاندارد شناسایی گردیدند. در مواردی که مشکلاتی در تشخیص وجود داشت از کیت محیط‌های API (بیومریو، فرانسه) استفاده شد (۱۶).

آزمایشات مولکولی

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در بیمارستان گزارش شده است که اغلب با مرگ و میر قابل توجهی همراه است (۲۰۱). پاتوژن غالب عفونت‌های ادراری، *شریشیاکلی* است. با این حال، افزایش دیگر *انتروباکتریاسه* مانند *کلبسیلا پنومونیه* و گرم منفی‌های غیرمخمیری مانند *اسینتوباکتر* و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان علل عفونت ادراری گزارش شده است (۵،۴،۳). تری متوپریم-سولفامتوکسازول (TMP-SMX) برای چندین دهه به عنوان آنتی بیوتیک‌های کارآمد برای درمان عفونت ادراری استفاده شده است (۶). با این حال در بسیاری از کشورها وجود مقاومت در برابر TMP-SMX می‌تواند به شکست درمان در موارد عفونت ادراری منجر شود (۲).

به‌طور کلی مقاومت به سولفانامیدها در باسیل‌های گرم منفی ناشی از دستیابی به ژن دی هیدروپتروات سنتتاز (*DHPS*) در اینتگرون است که توسط داروها مهار نمی‌شود (۶). در حال حاضر سه نوع مختلف از ژن *DHPS* (*sul1*، *sul2* و *sul3*) مسئول مقاومت در برابر سولفانامیدها شناخته شده است. ژن *sul1* به طور انحصاری در پلاسمیدهای بزرگ کونژوگاتیو و انتهای ۳ اینتگرون کلاس ۱ واقع شده است (۸،۷). در حالی که ژن *sul2* معمولاً در پلاسمیدهای متعلق به خانواده IncQ و یا در پلاسمیدهایی به نام پلاسمیدهای pBP1 واقع شده‌اند (۹). ساختمان پلاسمید حامل *sul3* هنوز به خوبی شناخته نشده است (۱۰). ژن‌های *sul1* و *sul2* شیوع بیشتری نسبت به ژن *sul3* دارند (۱۲،۱۱،۷). تری متوپریم، سنتز اسید فولیک باکتریایی را توسط مهار دی هیدرو فولات ردوکتاز (*DHFR*)، تحت تأثیر قرار می‌دهد که باعث کاهش کاتالیز دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات می‌شود (۶). تری متوپریم دارای مکانیسم‌های مقاومتی متعددی از جمله: گسترش موانع نفوذپذیری، پمپ‌های افلوکس، به طور طبیعی وجود آنزیم‌های DHFR هدف غیرحساس، جهش و تغییرات تنظیمی در آنزیم‌های هدف و بدست آوردن آنزیم‌های هدف مقاوم در برابر دارو می‌باشد (۶). در میان آنها، به‌دست آوردن واریانت‌های DHFR کدگذاری شده توسط ژن‌های *dfr* شایع‌ترین مکانیسم مقاومت‌تری متوپریم است که منجر به مقاومت در سطح بالا برای باکتری‌های مختلف می‌شود (۱۳). در حال حاضر بیش از

استخراج DNA

به منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر (مرک، آلمان) به عنوان منبع برای استخراج DNA، مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ ماکرولیتتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشد یافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود (هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد. در این تحقیق از کلبسیلا پنومونیه به عنوان سوپه استاندارد استفاده شد.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از آزمون PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* که در جدول ۱ نشان داده شده است، آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی کلبسیلا پنومونیه با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix (بیونیر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول ۲ نشان داده شده است (۱۷).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن
۱۳۰	F ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	<i>16srRNA</i>

درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۱۳۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست است.

تکثیر ژن *16srRNA* با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲

جدول ۲. اجزای کیت Accupower PCR PreMix

Component	20 µl Reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCl (pH=9)	mM10
KCl	30 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Stabilizer and tracking	

کوتریموکسازول مقاوم بودند صورت گرفت. تکثیر ژن‌های *16srRNA*، *16srRNA* و *16srRNA* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۷ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باند ۴۳۳ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن *16srRNA*، باند ۲۹۳ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن *16srRNA* و باند ۷۵۰ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن *16srRNA* می‌باشد (۱۷، ۱۸).

شناسایی ژن‌های *16srRNA* و *16srRNA* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

آزمایش PCR به منظور ردیابی ژن‌های *16srRNA*، *16srRNA* و *16srRNA* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱/۵ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۳/۵ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت انجام گرفت. این آزمون بر روی ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی بیوتیک

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3*

Gene	Sequence (5'-3')	Annealing temp (OC)	Size of product (bp)	Reference
<i>Sul 1</i>	F: CGGCGTG GGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	65	433	2
<i>Sul 2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	65	293	2
<i>Sul 3</i>	F: GCCTATGCATCTACACAATC R: TGAGAAATGGACAATGTCCG	65	750	25
<i>Int1</i>	F: CAGTGGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	53	160	25

(SXT)، آموکسی سیلین (AMX)، سفتریاکسون (CRO30)، نیتروفرانتین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکسازین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمپنم (PM)، جنتامایسین (GM10)، کانامایسین (AN) و سیپروفلوکسازین (CP) (پادتن طب، ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل NCCLS ۳ تا ۴ کلنی از باکتری مورد نظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سوآپ استریل از باکتری برداشته و به صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک های مورد نظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، بر اساس اندازه هاله‌ی ممانعت از رشد، بر اساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3* و /انتگره های کلاس I با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و با نرم افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج به منظور شناسایی /شیرشیا کلی از تست هایی نظیر IMViC، H₂S، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۴ نشان داده شده است:

ردیابی ژن *int1* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

پس از شناسایی ایزوله های واجد ژن *sul* در حضور پرایمرهای اختصاصی ژن *int1* که در جدول ۳ نشان داده شده است، واکنش PCR برای تکثیر ژن *int1* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۱ میکرولیتر از پرایمرهای F، R و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. تکثیر ژن *int1* با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت و مشاهده باندها ۱۶۰ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن تست است. بعد از انجام آزمایشات PCR، به منظور تأیید وجود قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، بیوی تک) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش آنتی بیوگرام

برای تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها از روش کربی - بائر بر طبق دستورالعمل NCCLS (پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه PTCC1290 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (تری متوپریم - سولفامتوکسازول)

جدول ۴. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی

نوع باکتری	نوع تست					
	تولید اندول	متیل رد	وژس پروسکوئر	سیترات	H ₂ S	اوره
کلبسیلا پنومونیه	-	-	+	+	+	+

در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه از آنتی‌بیوتیک‌های معمول در درمان عفونت‌های انسانی استفاده شد که همان‌گونه که در جدول ۵ نشان داده شده است بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین

در آزمایش آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی گزارش شده است. مقاومت به کوتریموکسازول در ۳۳ ایزوله (۷۳/۳۶ درصد) گزارش گردید. از ۹۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی در این تحقیق در ۷۱ ایزوله مقاومت به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک مشاهده گردید.

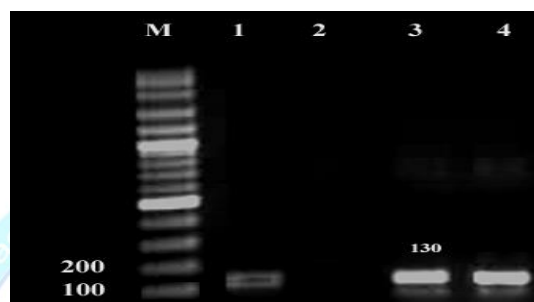
جدول ۵: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی	تعداد مقاومت چندگانه	ایزوله
IPM / FEP / CP/ CRO / AN / GM	۷	ایزوله ۲
FM , IPM , FEP, TE , SXT, CP , CRO , CF, NOR , AN , GM	۱۱	ایزوله ۳
AM , FEP, K , CRO , CF, AN , GM	۷	ایزوله ۴
AM , TE , SXT, CF,	۴	ایزوله ۵
FM , AM , FEP, K , CRO , CF, NOR , AN , GM	۹	ایزوله ۶
FM / AM/ CRO / CF / AN / GM	۶	ایزوله ۷
K / FEP / FM / AM / CRO / CF / AN / GM / NOR	۹	ایزوله ۸
NA , IPM , FEP, TE , SXT, CP , K , CRO , CF, NOR , AN , GM	۱	ایزوله ۹
FM / AM/ K /CRO /CF / GM / SXT	۷	ایزوله ۱۰
FM / AM / CF / TE / NOR	۵	ایزوله ۱۱
K / AM / CF / CRO / GM / FEP / AN	۷	ایزوله ۱۲
TE / AM / CF	۳	ایزوله ۱۳
FM , AM , FEP, TE , K , CRO , CF, NOR , AN , GM	۸	ایزوله ۱۴
FM , NA , IPM , FEP, SXT, CP , CRO , NOR , AN , GM	۲	ایزوله ۱۵
CF/K/AM/GM/CRO/FEP/AN	۷	ایزوله ۱۶
FM, AM , NA , IPM , FEP, TE , CP , K , CRO , CF, NOR , AN , GM	۱۳	ایزوله ۱۷
FM//CF/K/AM/GM/CRO/FEP/AN/TE/NA	۱۰	ایزوله ۱۸
AM/TE/NA/SXT	۴	ایزوله ۱۹
AM/FM/SXT	۳	ایزوله ۲۰
AM/K/SXT/TE/NA	۵	ایزوله ۲۱
FM/AM/SXT/TE/NA/NOR/CF/CRO	۸	ایزوله ۲۲
FEP/FM/AM/SXT/TE/NA/CF/CRO	۸	ایزوله ۲۳
K/FM/AM	۳	ایزوله ۲۴
K/AM/SXT/NA	۴	ایزوله ۲۵

K/AM/FEP/CF/CRO/GM/AN	۷	ایزوله ۲۶
AM/FEP/CF/CRO/FM/SXT/NA	۷	ایزوله ۲۷
AM/FEP/CF/CRO/FM/SXT/NA	۷	ایزوله ۲۸
AM/CF/SXT/TE	۴	ایزوله ۲۹
AM/CF/K/AN/FEP/CRO/GM/NOR	۸	ایزوله ۳۰
K/AM/FM/CF/AN/FEP/CRO/GM/SXT	۹	ایزوله ۳۱
K/AM/CF/AN/FEP/CRO/GM/SXT	۸	ایزوله ۳۲
K/AM/CF/AN/FEP/CRO/GM	۷	ایزوله ۳۳
K/AM/CF/AN/FEP/CRO/GM/TE/NOR	۹	ایزوله ۳۴
K/AM/CF/AN/FEP/CRO/GM/SXT	۸	ایزوله ۳۵
NA/K/TE/AM/CF/FEP/CRO/NOR/IPM/CP	۱۰	ایزوله ۳۶
NA/K/TE/AM/CF/CRO/NOR/CP/SXT	۹	ایزوله ۳۷
AM/NA/K/FM	۴	ایزوله ۳۸
AM/K/TE/SXT	۴	ایزوله ۳۹
AM/K/TE/FM	۴	ایزوله ۴۰
AM/FM/SXT/AN	۴	ایزوله ۴۱
TE/AM/FM	۳	ایزوله ۴۲
FM/K/AM/AN/CF/CRO/NOR/FEP/GM	۹	ایزوله ۴۳
AM/AN/TE/SXT	۴	ایزوله ۴۴
TE/CF/AM/AN/SXT/NA	۶	ایزوله ۴۵
FM/TE/AM	۳	ایزوله ۴۶
TE/AM/NA/SXT	۴	ایزوله ۴۷
TE/AM/SXT/K/FM/CRO/CF/FEP	۸	ایزوله ۴۸
AM/SXT/CF	۳	ایزوله ۴۹
TE/AM/FM/NA	۴	ایزوله ۵۰
K/CF/TE/AM/CRO/FEP/AN/GM	۸	ایزوله ۵۱
K/AM/AN/FM	۴	ایزوله ۵۲
K/AM/NA/CF/TE/CRO/FEP/SXT/IPM/CP/NOR	۱۱	ایزوله ۵۳
AN/K/AM/CF/TE/CRO/FEP/GM	۸	ایزوله ۵۴
FM/AM/TE/FEP/NA	۵	ایزوله ۵۵
CF/AM/NA/AN/CP/NOR	۶	ایزوله ۵۶
TE/AM/FM/SXT	۴	ایزوله ۵۷
K/CP/NOR/TE/AM/SXT/CF/NA/CRO/IPM	۱۰	ایزوله ۵۸
K/TE/FM/AM/SXT/NA	۶	ایزوله ۵۹
CF/K/TE/FM/AM/AN/FEP/CRO/GM	۹	ایزوله ۶۰
CF/TE/FM/AM/SXT	۵	ایزوله ۶۱
TE/AM/AN/K/CF/FEP/CRO/GM	۸	ایزوله ۶۲
AM/K/CF/FEP/CRO	۵	ایزوله ۶۳
AM/K/CF/CRO/SXT	۵	ایزوله ۶۴
K/AM/CF/CRO/FEP/AN/GM	۷	ایزوله ۶۵
AM/CF/CRO/TE/SXT	۵	ایزوله ۶۶
AM/TE/SXT	۳	ایزوله ۶۷

AM/FM/SXT	۳	ایزوله ۶۸
K/AM/CF/CRO/FEP/AN/GM	۷	ایزوله ۶۹
AM/CF/CRO/FEP/FM/SXT	۶	ایزوله ۷۰
AM/CF/SXT/TE	۴	ایزوله ۷۱

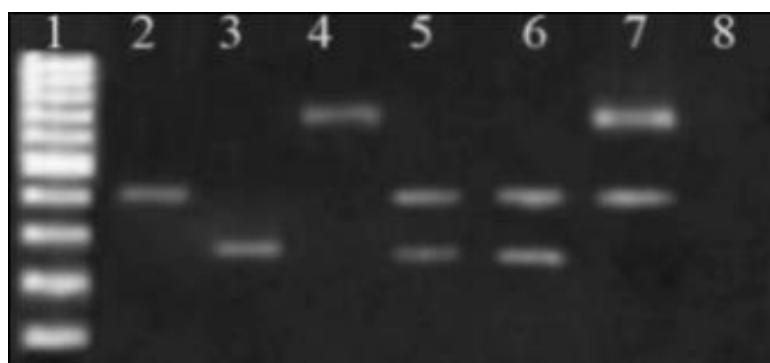
در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری کلبسیلا پنومونیه و حضور توالی ژن *J6SrRNA* تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۳۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* باکتری کلبسیلا پنومونیه: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، ستون‌های ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت

همان طور که در جدول ۶ و شکل ۲ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی از ۳۳ ایزوله مقاوم به سولفونامید، ژن‌های *sul1* در جدول ۶: فراوانی ژن‌های *sul 1* و *sul 3* در کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفونامیدها

Strain Characteristic	No. of isolates with genes					
	<i>Sul 1</i>	<i>Sul 2</i>	<i>Sul 3</i>	<i>Sul 1</i> <i>Sul 2</i>	<i>Sul 1</i> <i>Sul 3</i>	<i>Sul 1</i> <i>sul 2</i> <i>Sul 3</i>
Sulfonamide Resistance N=33	15 45.45%	20 60.60%	2 6.06%	2 6.06%	1 3.03%	- 0%



شکل ۲. ژل حاصل از الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های *sul 1, 2, 3*: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۲: باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *Sul1*، ستون ۳: باند ۲۹۳ جفت بازی مربوط به ژن *Sul2*، ستون ۴: باند ۷۵۰ جفت بازی مربوط به ژن *Sul 3*، ستون‌های ۵ و ۶: باندهای مربوط به ژن‌های *sul 1* و *sul 2*، ستون ۷: باندهای مربوط به ژن‌های *sul 1* و *sul 3*

همان طور که در جدول ۷ و شکل ۳ نشان داده شده است پس از انجام آزمون PCR از ۳۳ ایزوله مقاوم به کوتریموکسازول ژن *int1* در ۲۷ ایزوله مشاهده گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین وجود *int1*

و *sul1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید (pvalue<0.05).

در ایزوله‌های مقاوم به سولفونامیدها *int1* جدول ۷: فراوانی ژن

Strain Characteristic	No. of isolates with genes		
	<i>Sul 1</i> + <i>Int 1</i>	<i>Sul 2</i> + <i>Int 1</i>	<i>Sul 3</i> + <i>Int 1</i>
Sulfonamide Resistance N=33	22 66.66%	3 15.15%	2 6.06%



شکل ۳: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *int1* ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتار، ستون‌های ۲، ۳، ۴ باند ۱۶۰ جفت بازی ژن *int1* از موارد عفونت‌های بیمارستانی در کودکان شیراز صورت گرفت، شیوع/اینترگون کلاس I در (۶/۲۵ درصد) از ایزوله‌ها و شیوع/اینترگون کلاس II در (۱۰/۴۱ درصد) از ایزوله‌ها گزارش گردید (۲۱). در این مطالعه ارتباط معنی داری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و حضور/اینترگون کلاس I مشاهده گردید. در مطالعه انجام شده توسط اسلامی و همکاران شیوع/اینترگون در باکتری‌های/شریشیا کلی مقاوم به چند دارو، جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری کودکان ۲۰/۵ درصد گزارش گردید (۲۲). در این مطالعه ارتباط معنی داری بین/اینترگون و مقاومت به جنتامایسین، نورفلوکسازین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد.

در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران مقاومت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول ۷۰ درصد و فراوانی/اینترگون کلاس I، ۹۰ درصد برآورد گردید (۲۳). در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین حضور/اینترگون کلاس I و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفنازیدیم و آموکسی کلاو مشاهده گردید. در مطالعه Zhao و همکاران ۷۰ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا و ۴۹ درصد از ایزوله‌های/شریشیا کلی دارای/اینترگون کلاس I بودند (۲۴). در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین حضور/اینترگون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های

بحث

مطالعه حاضر باهدف فراوانی ژن‌های *sul* و بررسی ارتباط بین ژن‌های *sul* و اینترگون کلاس I در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفونامیدها جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان شهرکرد با دو روش آنتی‌بیوگرام و مولکولی (PCR) انجام گرفت. از ۵۰۰۰ نمونه شامل ادرار، ترشحات چرکی چشم، ترشحات زخم، ترشحات ریه و نمونه کشت خون بیماران مبتلا به عفونت‌های انسانی، مقاومت به کوتریموکسازول در ۳۳ ایزوله (۷/۳۶ درصد) گزارش گردید که از ۹۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی در این تحقیق در ۷۱ ایزوله مقاومت به بیش از ۲ آنتی‌بیوتیک مشاهده گردید که بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین (۹۷/۸ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به ایمپنم (۴/۴ درصد) گزارش شده است.

در این تحقیق فراوانی ژن‌های *sul1*، *sul2* و *sul3* در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول به ترتیب در (۴۵/۴۵ درصد) ۱۵ ایزوله، (۶۰/۶۰ درصد) ۲۰ ایزوله و (۶/۰۶ درصد) ۲ ایزوله مشاهده گردید. در مطالعه‌ای که توسط Sallen و همکاران صورت گرفت میزان شیوع/اینترگون‌ها در باکتری‌های خانواده/نتروباکتریاسه ۵۹ درصد برآورد گردید (۲۰). شیوع پائین/اینترگون‌های کلاس I و II در گزارش Farshad و همکاران قابل توجه می‌باشد، در این تحقیق که بر روی باکتری‌های/شریشیا کلی جدا شده

دارد. گزارشات حاکی از وجود اینتگرون‌ها در اغلب نقاط دنیا می‌باشد و باتوجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌گردد که یک ارتباط قوی بین حمل/اینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. باتوجه به این ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌های درمانی منتشر نمایند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دوچندان کرده و تعیین شیوع این ژن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و هم چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ممانعت از انتشار عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم را ضروری می‌نماید.

جنتامایسین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، سفنازیدیم و سفوتاکسیم گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

در نتیجه این مطالعه نشان داده است که در بررسی ارتباط بین ژن‌های *intI* و *sul* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفانامیدها جدا شده از موارد کلینیکی، فراوانی این ژن‌ها به ترتیب *intI+sul1* (۶۶/۶۶ درصد) ۲۲، *intI+sul2* (۱۵/۱۵ درصد) ۳ و *intI+sul3* (۶/۰۶ درصد) ۲ مشاهده شد که باتوجه به نتایج بدست آمده از آزمون PCR و همچنین بررسی‌های حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که بین *intI* و ژن‌های *sul* ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سولفانامیدها ارتباط معنی‌داری وجود



منابع

1. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in *Enterobacteriaceae*, Central African Republic (CAR) J Antimicrob Chemother. 2007; 59: 742-745.
 2. Gundogdu A, Long YB, Vollmerhausen TL, Katouli M. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated *intI* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. J Med Microbiol. 2011; 60: 1633-1642.
 3. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2010; 7: 653-660.
 4. Djordjevic Z, Folic MM, Zivic Z, Markovic V, Jankovic SM. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *acinetobacter* species: sensitivity to antibiotics and risk factors. Am J Infect Control. 2013; 41: 1182-1187.
 5. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. J Infect Public Health. 2009; 2: 101-111.
 6. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1608-1614.
 7. Trobos M, Christensen H., Sunde M, Nordentoft S, Agerso Y, Simonsen GS, Hammerum AM, Olsen JE. Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. Microbiology. 2009; 155:831-836.
 8. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gramnegative bacteria: the role of gene cassettes and *integrons*. Drug Resist Updat. 1998; 1:109-119.
 9. van Treeck U, Schmidt F, Wiedemann B. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). Antimicrob Agents Chemother. 1981; 19: 371-380.
 10. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. Acta Vet Scand. 2010; 52:47.
 11. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009; 49:627-634.
 12. Bean DC, Livemore D, Hall LM. *E.coli*: implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 1088-1093.
 13. Seputiene V, Povilonis J, Ruzauskas M, Pavilonis A, Suziedeliene E. Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. J Med Microbiol. 2010; 59: 315-322.
 14. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. *Integrons*. Annu Rev Genet. 2010; 44: 141-166.
 15. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and *integrons*: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995; 15 (4): 593-600.
 16. Walker TS. Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998, p. 202-217.
۱۷. ادیب فر پ. میکروبی شناسی پزشکی. چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۸۳؛ صفحات ۶۰-۸۰.
18. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz MA. Medical Microbiology. McGraw-Hill Medical, New York, NY, USA. 2010; 224-233.
 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: 2003.
 20. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of *integron*-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 1995; 1(3):195-202.
 21. Farshad Sh, Japoni A, Hosseini M. Low Distribution of *Integrons* among multidrug resistant *E. coli* strains isolate from children with community-acquired urinary tract infections in shirazTiran. polish J Microbiol. 2008; 57 (3):193-198.
- شده از عفونت ادراری در کودکان. مجله پژوهنده، ۱۳۸۹؛ دوره ۳۴، شماره ۱، صفحات ۶۱-۶۵.
۲۲. اسلامی ج، سید جوادی س، فلاح چ، گودرزی ف. شیوع اینتگرون های مقاوم به چند دارو در اشریشیاکلی و کلبسیلا جدا

۲۳. رنجبرانم، ذوالفقاریم ر، ژاپنی نژاد ع، عموزاده نوباوه ع، ابطحی ح، طبیب نژادم، غزنوی راد ا. بررسی مولکولی اینتگرون ها در اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت های ادراری. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۳۹۲؛ دوره ۲۳، شماره ۱۰۵، صفحات ۲۰-۲۷.

24. Zhao HX, Shan JZ, An XP, Fan HL, Cao JS, Li PF. Characterization of *integrons* in multiple

antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from bovine endometritis. *Res Vet Sci*. 2011; 91(3): 412-414.

25. Mazel D. *Integrons*: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4: 608-20.



Investigate the frequency of genes *sul* and investigate the relationship between genes *sul* and Class I integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to sulfonamides isolated from clinical cases in Shahrekord

Marziyeh Farsinejad¹, Maryam Reisi², Jamshid Ali Babaei Shahraki³, Hossein Khodabandeh Shahraki^{4*}

1. M.Sc. Student of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Master's degree student, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.
4. PhD Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

Abstract

Antimicrobial resistance is a common problem throughout the world. Acquire integrons is one of the main causes multi-resistance in gram-negative microorganisms. The purpose of this study, Investigate the frequency of genes *sul* and investigate the relationship between genes *sul* and Class I integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to sulfonamides isolated from clinical cases in Shahrekord. In this study, antibiotic resistance 90 isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical cases of Shahrekord, disk diffusion method was performed. In order to investigate resistance to sulfonamides of the antibiotic cotrimoxazole was used. Then using specific primers was performed tracing genes *sul1*, *sul2* and *sul3* and *intI*. After PCR reaction of 33 isolates resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole *sul1* gene in 15 isolates (45/45%), *sul2* gene in 20 isolates (60/60%), gene *Sul3* in 2 isolates (6/06%) and the gene *intI* 27 isolates was found. The statistical analysis between genes *sul1* and *IntI* significant relationship was observed. The results of this study show that is a strong correlation between carry integrons and increased resistance to a number of different classes of antibiotics.

Keywords: *Integron*, *Klebsiella pneumonia*, Multi-resistance antibiotics, Sulfonamides

Contents**Recombinant lactococcus, a new approach for oral vaccine**

Ali Sharifzadeh , Sara Arti*, Fatemeh Shayesteh

Investigation of *Salmonella enteritidis* contamination in chicken and quail meat sold in Khuzestan province

Zahra Motaghi , Hossein Khodabandeh Shahraki , Mahla Elahinia*

Investigation of contamination of *Vibrio* species in fish sold in the market of Shahrekord city

Mehran Khalili Dehkordi, Fereshte Salehian Dehkordi*, Majid Esmaili

Prevalence of *sul* genes in *E.coli* isolated from urinary tract infectious in Shahrekord

Mahnaz Shamaei ,Maryam Reisi ,Hossein Khodabandeh Shahraki

Investigate the frequency of genes *sul* and investigate the relationship between genes *sul* and Class I integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to sulfonamides isolated from clinical cases in ShahrekordMarziyeh Farsinejad , Maryam Reisi , Jamshid Ali Babaei Shahraki , Hossein Khodabandeh Shahraki
*