فهرست مقالات

بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در شیر و پنیر به روش Real Time PCR
فاطمه خداوردی پور، نازیلا ارباب سلیمانی *، یاسمن برون
مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی
شیما شنتیائی
بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جوزهندی علیه جدایه های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف
الهام نیکوئی، اشرف کریمی نیک*
بررسی شیوع ژن های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از نمونه های غذایی
محمدرضا صائبی، فهیمه نوربخش * ، حسین خدابنده
تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جداشده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد
امین روزبهی*، فاطمه خداوردی پور
سیانوباکتری ها منبعی غنی از داروهای ضد سرطانی
بهاره نوروزی*، سپیده زندیه
بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در نمونه خون های افراد سرولوژی مثبت بروسلا در شهرستان های شهرکرد و اصفهان به روش Real Time PCR
حسین خدابنده، نازیلا ارباب سلیمانی*

بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در شیر و پنیر به روش Real Time PCR

فاطمه خداوردی پور[1]، نازیلا ارباب سلیمانی[2*]، یاسمن برون[3]

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

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول**: *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

چکیده

*بروسلا*ها باکتری های کوچک غیر متحرک، گرم منفی، بدون کپسول و به فرم کوکوباسیل می‌باشند. بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است و باعث سقط جنین، اختلالات باروری، عفونت های تناسلی، کاهش شیر، اورتریت و اپیدیمیت در میزبان اصلی می‌شود و از این جهت باعث عوارض مزمن و تحمیل هزینه های درمانی فراوان به بیماران و ضررهای اقتصادی زیاد به دامداران می‌گردد. با وجود پیشرفت هایی که در تکنیک های کشت خون و تست های سرولوژیکی که برای کشف آنتی بادی های اختصاصی به دست آمد، هنوز مشکلات مهمی در تشخیص بروسلوزیس وجود دارد، بنابراین نیاز به آزمون های جدید آزمایشگاهی می‌باشد. یکی از جدید ترین روش های سنجش کمی که در حال حاضر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته روش تشخیص باکتری توسط Real Time PCR می‌باشد. هدف ما هم از این مطالعه شناسایی باکتری های جنس *بروسلا* در نمونه های شیر و پنیر توسط روش Real Time PCR می‌باشد. ۲۵ نمونه شیر گاو (محلی) و ۲۵ نمونه پنیر از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد تهیه شد و به منظور تشخیص مولکولی،استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) انجام و سپس واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه مدل Rotor-Gene ساخت شرکت Corbett استرالیا بر روی نمونه ها انجام شد. در این تحقیق از ۵۰ نمونه مورد بررسی تنها در ۲ نمونه شیر (۴٪) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در نمونه های پنیر آلودگی به *بروسلا* گزارش نگردید. این بررسی نشان می دهد روش های مولکولی مثل Real Time PCR باید به عنوان روش هایی مکمل جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بروسلا، تب مالت، شیر، پنیر، Real Time PCR

مقدمه

خواص، ارزش غذایی و نقش شیر و فرآورده های آن در تغذیه انسان از مدت ها قبل شناخته شده است، اما شیر به علت همین ویژگی ها و صفات ممتاز غذایی که دارد، به سرعت در معرض آلودگی های گوناگون قرار می‌گیرد و به سادگی باعث انتشار عده زیادی از عوامل بیماری زا می‌گردد(۱). بروسلوز بیماری عفونی است که توسط میکروب‌های جنس *بروسلا* در حیوانات و انسان ایجاد بیماری می‌نماید (۲). *بروسلاها* باکتری هایی گرم منفی کوچک، داخل سلولی اختیاری، شدیدا هوازی و سخت رشد هستند، این باکتری ها فاقد تحرک و کپسول بوده و اسپور تولید نمی‌کنند، رشد آن ها کند است ولی در محیط کشت بروسلا براث در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH=۷/۶ به نحو مطلوبی رشد می‌نمایند. گونه های *بروسلا* در محیط کشت جامد، معمولا به صورت کلنی های صاف، شفاف و آبی متمایل به سفید تا کهربائی رشد می‌کنند. البته رشد *بروسلا کنیس* و *بروسلا اوویس* به صورت کلنی های خشن و گاهی موکوئیدی می باشد (۳). بیماری در انسان معمولا از طریق انتقال از حیوانات اتفاق می افتد. این بیماری از بیماری های مهم مشترک بین انسان و حیوان است. بروسلوز در حیواناتی از قبیل گاو، گوسفند، بز و خوک ایجاد سقط جنین می‌کند و در انسان با علائم تب، عرق شدید، ضعف، کاهش وزن و درد و ناراحتی عمومی

همراه است، اسامی دیگر بروسلوز در حیوانات و انسان تب آبورتوس، سقط جنین واگیر، تب متناوب، بیماری یانگ و تب مالت می‌باشد(۴). بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری‌زایی به شش گونه طبقه بندی می‌شوند. بروسلا آبورتوس(*B.aburtus*) عامل تب مالت گاوی می‌باشد که در انسان ایجاد تب مواج (بروسلوز) می‌نماید، البته این بیماری توسط گونه های(*B.melitensis*) ، بروسلا سویس(*B.suis*) و بروسلا کانیس(*B.canis*) هم ایجاد می‌شود(۵). گونه-های بروسلا می‌توانند در گوشت یخ زده، به مدت سه هفته، در شیر خام به مدت ۱۰ روز، در پنیر تازه تا سه ماه و در بستنی و خامه نیز تا مدتی زنده بمانند. این میکروارگانیسم‌ها در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد یا در اثر مجاورت با فنول یک درصد در عرض ۱۵ دقیقه از بین می‌روند ولی در طبیعت تا مدت ها می‌توانند زنده بمانند(۶). به طور کلی می توان نتیجه گرفت که شیر خام، خامه، کره و پنیر های سفید تهیه شده از شیر غیر پاستوریزه و تخمیر نشده، از نظر آلودگی به باکتری *بروسلا* خطرناک ترین محصولات می‌باشند. برعکس، آن دسته از فرآورده های شیر که تهیه آن ها مستلزم ترش شدن و رسیدن طولانی است، نقش مهمی را در آلودگی انسان ندارند(۷و۸). تشخیص بیماری بروسلوز به لحاظ درگیری اندام های مختلف، اشکال بالینی متنوع و وجود علایم بالینی غیراختصاصی مشکل است و تشخیص دقیق آن به روش های پاراکلینیکی نیاز دارد کشت و سرولوژی از جمله روش های تشخیصی آن است. مطمئن ترین راه تشخیص بیماری جداسازی باکتری از نمونه های بالینی است(۹). با توجه به مشکلات تکنیکی کشت و نیاز به محیط کشت اختصاصی و طولانی بودن زمان مثبت شدن کشت، با وجود حساس بودن به عنوان روش تشخیصی مرسوم استفاده نمی شود، به همین دلیل آزمایشات سرولوژی در تشخیص بروسلوز نقش بسیار مهمی دارند. در حال حاضر، روش های سرولوژی آگلوتیناسیون و الایزا مهم ترین آزمایش های پاراکلینیکی هستند که از آن ها برای تشخیص بروسلوز استفاده میشود.آزمون های سرولوژی مرسوم، آگلوتیناسیون لوله ای استاندارد، تست رایت، آگلوتیناسیون لامی رزِبنگال،۲-مرکاپتو اتانول (2ME) و الایزا هستند(۱۰و۱۱). علی رغم توسعه فراوان و دسترسی آسان تست های سرولوژیک مشکل مهم این تست ها ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با آنتی ژن های سایر میکروارگانیسم ها مانند یرسینیا انتروکولیتا ، سالمونلا اورینتالیس، ویبروکلرا ، فرانسیلا تورانسیس، می‌باشد(۶). بنابر این ایمنی در مقابل اشریشیا کلی این عوامل باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می شود بعلاوه این روش ها قابلیت تشخیص بیماری در هفته های اول آلودگی را نداشته، بنابراین استفاده از روش های مولکولی به عنوان تست های تاییدی ضرورت یافته است. روش های مولکولی بسیاری، از جمله PCR و مشتقات آن، تکنیک های بر مبنای هیبریداسیون، مالتیپلکس PCR، SNP، NASBAبر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته اند (۹ مقاله). مفهوم Real time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرآیند می باشد. در این روش نمونه ای که میزان هدف مورد نظر اولیه بیشتری دارد نسبت به نمونه‌ای که میزان هدف اولیه‌ی کمتری دارد در سیکل‌های پایین تری باعث ایجاد فلورسنت قابل تشخیص می‌شود(۱۳).

مواد و روش کار

در این مطالعه ۲۵ نمونه شیر گاو و ۲۵ نمونه پنیر از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد تهیه و در شرایط استریل به مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، منتقل گردید.

استخراج DNA از سوش *Brucella.spp*

برای بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص بروسلا، DNA از سوش استاندارد این باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA(شرکت سیناژن) با توجه به پروتکل شرکت استخراج گردید.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از پنیر ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پروتئاز بافر به ۲۵ گرم از نمونه های مورد نظر اضافه و سپس ۵ میکرولیتر پروتئاز افزوده و در دمای ۵۵ درجه به مدت قرار داده شدند. جهت استخراج DNA از شیر ۵ میکرولیتر پروتئاز به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های

شیر اضافه می گردد و پس از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد نگه داری می شود. ۱۰۰میکرولیتر از نمونه مورد نظر را با ۴۰۰ میکرولیتر lysis solutionمخلوط کرده و ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس می‌کنیم. ۳۰۰ میکرولیتر precipitation solution را به مخلوط اضافه نموده و بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. محلول رویی را دور ریخته و ۱۰۰۰ میکرولیتر Wash buffer را به رسوب اضافه نموده و بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس در g ۱۲۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. بعد از خالی کردن محلول رویی، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه به صورت در باز قرار می‌دهیم. به رسوب باقی‌مانده ۵۰ میکرولیتر solvent buffer اضافه نموده و تکان داده و در ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم. ۳۰ ثانیه در g ۱۲۰۰۰سانتریفیوژ نموده محلول رویی حاوی DNA است. که تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر ۲۰- قرار می‌گیرد.

برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز[1]استفاده شده و مقدار ۵µl از آن را بر روی ژل آگارز ۱٪ ران می‌کنیم. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بوند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش Real time PCR انتخاب گردیدند.

آماده سازی واکنش Taq-Man Real Time PCR

به منظور انجام واکنش Taq-Man Real Time PCR پرایمر مورد استفاده برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* و هم چنین توالی پروب مورد استفاده جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan مطابق دستورالعمل کارخانه رقیق سازی گردید. توالی پرایمرهای و پروب‌های مورد استفاده در در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۴).

جدول ۱- توالی آغازگرها و پروب‌ها

توالی هدف	توالی پرایمر (′۳→′۵)	توالی پروب (′۳→′۵)
IS711	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT	**FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA**
BMEII0466	TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	**Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2**
BruAb2_0168	CACACTCACCTTCCACAACA / CCCCGTTCTGCACCAGACT	**FAM-GGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1**

انجام Real Time PCR جهت تشخیص جنس *بروسلا*

در این تحقیق نمونه واکسن *بروسلا* تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و کنترل منفی مورد استفاده آب مقطر می باشد.

برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه مدل Rotor-Gene ساخت شرکت Corbett استرالیا و پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan (نشاندار شده با FAM و Cy5) استفاده گردید. کنترل مثبت مورد استفاده

[1]. Agarose Gel Electerophoresis

برنامه زمانی گرمایی برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس*

برنامه زمانی- گرمایی با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene 6000 در ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه (Hot Start)، سپس ۴۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه دقیقه تنظیم گردید (جدول ۲). علاوه بر ۴۵ سیکل تکثیر، یک سیکل نیز در دامنه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت رسم منحنی ذوب، به وسیله قرائت رنگ فلورسانس TaqMan probe برای دستگاه تعریف شد.

واکنش Real Time PCR جهت تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (فرمنتاز)، ۰/۶۲۵ پرایمر F، ۰/۶۲۵ پرایمر R، ۰/۳ میکرولیتر پروب، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۴۳ میکرولیتر آب نوکلئاز Free ، به صورت جداگانه برای هر ژن صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه Light Cycler مخصوص Real Time PCR قرار داده شده اند.

جدول۲- برنامه دمایی جهت انجام واکنش **Real Time PCR**

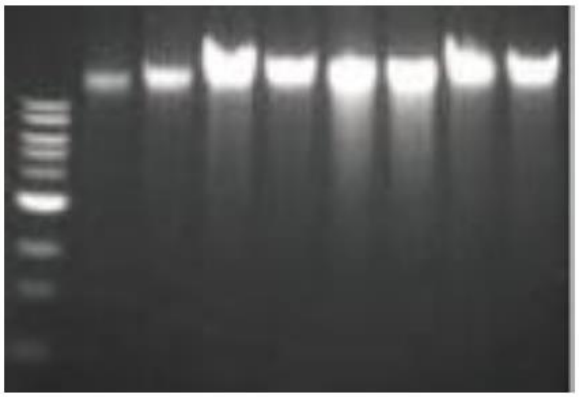
مراحل واکنش	زمان	دما(درجه سانتی‌گراد)	تکرار
واسرشت ابتدایی	۱۰ دقیقه	۹۵	۱
واسرشت	۲۰ ثانیه	۹۵	۴۵
دمای اتصال پرایمر	۲۰ ثانیه	۶۲	
گسترش	۲۰ ثانیه	۷۲	
ذوب انتهایی	۱۰دقیقه	از ۶۰ درجه تا ۹۵ درجه	۱

های کمتر از ۴۰ به عنوان مثبت گزارش می شود و در نهایت منحنی استاندارد با استفاده از استانداردهای مشخص در هر نمونه تعیین می‌گردد (۱۵).

نتایج

در آغاز انجام این تحقیق، استخراج DNA طبق روش شرکت سازنده کیت انجام شد و در شکل ۱ نتایج استخراج DNA نشان داده شده است. شماره‌های ۱ تا ۵ همگی نشان دهنده غلظت بالای DNA است.

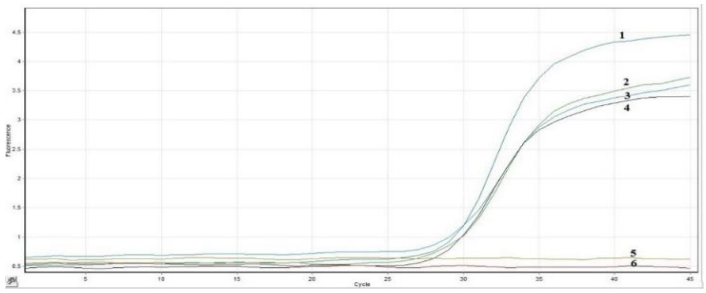
پس از پایان واکنش PCR، نمودار منحنی ذوب بر روی صفحه مانیتور کامپیوتر آشکار شده که قابل آنالیز و ذخیره سازی می‌باشد. پیک‌های مختلف به صورت اتوماتیک توسط نرم افزار آشکار ساز نوری محاسبه می-گردد. در صورت وجود *بروسلا*، در منحنی ذوب پیک-هایی در دمای Tm مورد نظر آشکار می‌شود. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده، مقادیر CT (چرخه ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می رود) محاسبه شد. نتایج به صورت کمی گزارش شده و CT



شکل۱- تصویر الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

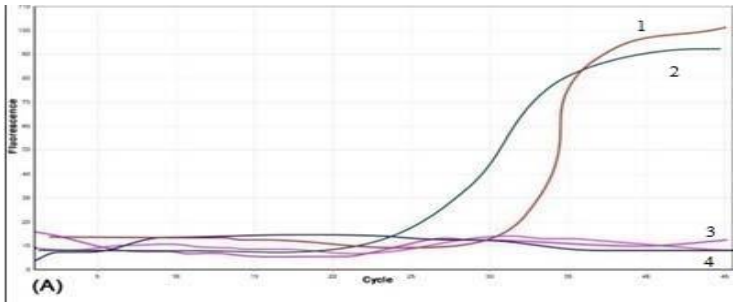
برد. در گراف های ۲ و ۳ مراحل پروفایل حرارتی برای جنس *بروسلا* و گونه های *بروسلا* در دستگاه Real Time PCR نشان داده شده است. CT کم تر از ۴۰ مثبت در نظر گرفته شد. در این تحقیق از ۵۰ نمونه مورد بررسی تنها در ۲ نمونه شیر (۴٪) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در نمونه های پنیر آلودگی به *بروسلا* گزارش نگردید.

در این بررسی تعداد ۲۵ نمونه شیر و ۲۵ نمونه پنیر محلی به منظور ردیابی ژنوم باکتری *بروسلا* مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله اول ابتدا از طریق روش Real Time PCR به تشخیص *بروسلا* پرداخته شد. در مرحله بعدی بر اساس آنالیز منحنی ذوب ایجاد شده از واکنش Real Time PCR می‌توان به تشخیص گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* پی



شکل ۲- آنالیزمنحنی ذوب برای جنس *بروسلا*

خط ۱: کنترل مثبت. خطوط ۲، ۳ و ۴: نمونه‌های مثبت جنس *بروسلا*. خط۵: کنترل منفی. خط۶: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل ۳- آنالیز منحنی ذوب برای گونه *بروسلا آبورتوس*.

خط ۱: کنترل مثبت. خط ۲: نمونه مثبت. خط۳: کنترل منفی. خط۴: نمونه منفی برای واکنش است.

بحث

شیر و فرآورده های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش به سزایی هستند. از سوی دیگر به علت دارا بودن اکثر عناصر و ترکیبات غذایی، محیط بسیار خوبی جهت رشد و فعالیت بسیاری از میکروارگانیسم های بیماری زا می باشند. بنابراین عدم رعایت اصول بهداشتی در تهیه و نگه داری فرآورده های لبنی، عوارض و خطرات بهداشتی عدیده ای را در مصرف کنندگان این قبیل مواد غذایی به همراه خواهد داشت. بروسلوز یکی از خطرناک ترین بیماری های عفونی است که از طریق مصرف شیر و فراورده های لبنی آلوده به انسان انتقال می یابد. پنیرهای تازه به دلیل آن که از شیر غیر پاستوریزه تهیه و نیز فرایند تخمیری در آن به طور کامل صورت نمی گیرد. در صورت آلوده بودن، به راحتی عامل تب مالت را در خود حفظ نموده و به مصرف کنندگان آن منتقل می نماید. از آن جایی که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) از طریق ترشحات شیر دام های آلوده دفع می گردد، مصرف فراورده های شیری غیر پاستوریزه در مناطق آلوده به بروسلوز یکی از عمده ترین راه های انتقال بیماری تب مالت به انسان محسوب می شود.(۱۶-۱۸) هم چنین مصرف فرآورده های حیوانی آلوده سبب بروز بیماری در انسان می شود مواد غذایی سنتی، نقش مهمی در انتقال بیماری دارند. با تحقیقات انجام شده توسط محققین، از ۷٪ پنیرهای تازه محلی عرضه شده در مغازه های مختلف مواد غذایی در ایران، باکتری نوع بزی جدا شده است. هم چنین امکان جدا سازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این

فرآورده وجود داشته است (۱۹).گسترش جهانی بروسلوز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی به شمار می آورد. اگرچه آمار انتشار یافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است، شیوع دقیق بروسلوز انسانی مشخص نیست، اما آمار انتشار یافته بین ۰/۰۱ تا ۲۰۰ مورد و در ایران ۱۳۲/۴ در ۱۰۰۰۰۰ جمعیت است. لذا کنترل بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۶).

در تحقیق حاضر ۲۵ نمونه شیر و ۲۵ نمونه پنیر از مراکز عرضه در شهرستان شهرکرد تهیه و به منظور بررسی آلودگی به *بروسلا* با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. آلودگی به *بروسلا آبورتوس* در ۲ نمونه شیر (۴٪) گزارش گردید. خوشبختانه در این تحقیق نمونه های پنیر به *بروسلا* آلودگی نداشتند. تحقیقات انجام شده نشان می دهد امکان جدا سازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این فرآورده وجود دارد که علت عدم آلودگی پنیر در تحقیق ما ممکن است به این دلیل باشد که پنیرهای مورد استفاده در تحقیق ما بیشتر از ۱۱ هفته از تولید آن ها می گذرد. تحقیقات متعدد در ایران حاکی از آن است که گونه غالب *بروسلا* در ایران *بروسلا آبورتوس* می باشد که در تحقیق حاضر نیز ۲ نمونه مثبت شده متعلق به گونه *بروسلا آبورتوس* بودند (۲۰).

در تحقیق انجام شده توسط ایزدی و مسلمی که بر روی ۲۰۸ نمونه از محصولات لبنی شامل: ۵۷ نمونه شیر خام گاو، ۳۴ نمونه شیر پاستوریزه، ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه، ۲۳ نمونه پنیر سنتی، ۳۳ نمونه شیر خام بز و ۳۳ نمونه شیر خام گوسفند در تهران به روش Nested PCR صورت گرفت، آلودگی به بروسلوز در شیر خام گاو، شیر پاستوریزه، پنیر پاستوریزه و شیر خام گوسفند به ترتیب در ۱۹ نمونه، ۱۰ نمونه، ۸ نمونه، ۱۴ نمونه، ۲۱ نمونه و ۱۹ نمونه تشخیص داده شد. وجود واکنش مثبت در پنیرهای پاستوریزه ممکن است به این دلیل باشد که فرایند پاستوریزاسیون پنیرها از کیفیت لازم برخوردار نبوده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد، تکنیک Nested PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. از این رو به نظر می رسد ضرورت استفاده از روش های مولکولی به عنوان یک روش تاییدی جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های متداول غربال‌گری امری ضروری می باشد (۶). در تحقیق انجام شده توسط موثق که بر روی ۵۰ نمونه شیر خام در منطقه ایلخچی صورت گرفت، آلودگی به بروسلا در ۱۱ نمونه (۲۲٪) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر می باشد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که درصد زیادی از نمونه های شیر خام در گاوداری ها به *بروسلا* آلوده هستند که این امر یک هشدار برای استفاده از روش های موثر جهت از بین بردن عوامل بیماری زا به حساب می آید (۲۱). تاکنون هیچ مطالعه ای در ایران با استفاده از روش Real Time PCR صورت نگرفته و از این جهت این بررسی دارای تازگی و نو آوری می‌باشد. می‌توان بیان کرد تکنیک Real Time PCR یک روش قابل اطمینان با حساسیت و دقت بالاست. خوشبختانه شیوع پایین آلودگی به *بروسلا* حاکی از سلامت دام های استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

نتیجه گیری کلی

از آنجا که شیر به عنوان یک میان وعده بسیار مغذی و مفید مورد استفاده عموم قرار می‌گیرد، با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و سایر پژوهش‌های صورت گرفته توسط سایر محققین در ایران و سایر کشورها، برای کنترل بروسلوز در هر کشوری با توجه به سویه و یا سویه های موجود *بروسلا* و مطابق با شرایط فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی جامعه، برنامه ریزی دقیق و متناسبی مورد نیاز است. هم‌چنین لازم است، روش های مولکولی باید به عنوان روش‌هایی مکمل جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند. لازم است که به جهت جلوگیری از بروسلوز و بیماری‌های گوارشی، از مصرف آن به صورت خام خودداری شده و فرآیند پاستوریزاسیون و یا جوشاندن شیر، جهت نابودی و غیر فعال شدن عوامل میکروبی آن انجام پذیرد.

منابع

1. Paktoja J, Reinemann D, Ruegg P. (2009). associations among milk quality indicators in raw bulk milk. Dairy Sci J. 92 :4978-4987.
2. Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. (1997). DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp*. evidence for a large deletion in *Brucella abortus* and other species-specific markers. Microbiology J. 143: 2913-2921.
3. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Mar´ın CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine J. 22: 2827-2835.
4. Pappas G, Solera J, Akritidis N, Tsianos E. (2005). New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis. Antimicrobial Agents J. 26: 101-105.
5. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. (2005). Brucellosis new aspects of an old disease. Appl Microbiol J. 98: 1270-1281.
۶. ایزدی الف، مسلمی الف. (۱۳۹۲). مطالعه و شناسایی مولکولی *Brucella spp* در محصولات لبنی توسط تکنیک Nested PCR. مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی. ۳ (۱۱): ۹۸-۹۱.
7. Junaidu A, Oboegbulem S, Salihu M. (2008). Seroprevalence of brucellosis in prison farm in Sokato, Nigeria. Asian Journal of Epidemiology. 1: 24-28.
8. Namanda AT, Kakai R, Otsyula M. (2009). The role of unpasteurized “hawked” milk in the transmission of brucellosis in Eldoret municipality, Kenya. Infect Developing Countries J. 3(4): 260-266.
9. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab J. 49(11-12): 577-589.
10. Morales-Garcia MR, Garcia-Méndez N, Regalado-Jacobo SD, Lopez-Merino A, Contreras-Rodriguez A. (2014). [Clinical, serological and polymerase chain reaction follow-up of a family with brucellosis]. Rev Chilena Infectol J. 31(4):425-433.
11. Hekmatimoghaddam S, Sadeh M, Khalili MB, Mollaabedin M, Sazmand A. (2013). Comparison of PCR, Wright agglutination test and blood culture for diagnosis of brucellosis in suspected patients. Pak J Biol Sci. 16(22): 1589-1592.
12. Gopaul KK, Kolass MS, Smith CJ, Whatmore AM. Rapid Identification of Brucella Isolates to the Species Level by Real Time PCR Based Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. BMC Microbiol, 2008; 8: 86.
13. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. All rights reserved (2006).
14. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya P.V, Frey J, Abril C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 75: 375-378.
15. Ali Sh, Akhter Sh, Neubauer H, Melzer F, Khan I, Ali Q, Irfan M. (2015). Serological, cultural, and molecular evidence of *Brucella* infection in small ruminants in Pakistan. J Infect Dev Ctries. 9(5):470-475.
16. Akbarmehr J. (2003). Survery on the Contamination of Fresh White Cheese Produced in Sarab and Rural Area with *Brucella Spp*. J Fac Vel Med Univ Tehran. 58(3):203-206.
17. Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M. (2008). Detection of *Brucella* by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases. Iranian J Publ Health. 37(4): 96-102.
18. Xavier M, Paixao T, B. den Hartigh A, Tsolis R, Santos R. (2010). Pathogenesis of *Brucella Spp*. Open Vet Sci J. 4: 109-118.
19. Akbarmehr J, KhandaghiJ. (2012). A Survey on the Prevalence of *Salmonella* and Coliforms in Unpasteurized Iranian Cheese Using Conventional Culture Method. Afr J Microbiol Res. 6(5): 968-971.

20. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. (2008). Isolation and identification of *brucella* organisms in iran. Iran J Clin Infect Diseases. 3: 185-188.

21.موثق م ح. (۱۳۹۱). تعیین آلودگی شیر خام گاو با باکتری *بروسلا آبورتوس* در منطقه ایلخچی به روش الایزا. مجله علوم غذایی و تغذیه. ۱۰ (۱): ۹۷-۱۰۱.

Contamination of brucellosis in milk and cheese by Real time PCR

Fatemeh Khodaverdipour[1],Nazila Arbab soleimani[2]*, Yasaman Boroun[3]

1. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.
2. Department of Microbiology, Department of Microbiology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan,Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Nazilaarbab@yahoo.co.uk ***Corresponding author:**

ABSTRACT

are small, immobile, gram-negative bacteria that are lacking capsules and formed *Brucella spp* like cocobacillus. Brucellosis is a zoonosis infection between humans and animals that can lead to miscarriages, fertility disorders, genital infections, reduction in milk production, urethritis, and epididymitis in the original host, resulting in many medical disorders in patients and unnecessary treatment expenses. Moreover, farmers would end up facing significant economic losses. Despite advances in blood culture techniques and serological tests to detect specific antibiotics, there are still significant difficulties in the diagnosis of brucellosis; therefore, a new laboratory test is needed for a better examination. One of the most recent quantitative methods that have already caught the attention of many researchers is the detection of bacteria by Real Time PCR method. The aim of this study is to identify bacteria of the genus Brucella, both in milk and cheese samples, by the method of Real Time PCR. 25 samples of cow's milk and twenty-five samples of cheese were collected from different parts of Shahrekord city. DNA extraction was performed using the DNA extraction kit (Cinnagen company) for the molecular diagnosis. Then, by the use of Real Time PCR reaction (Corbett Rotor-Gene Model, manufactured in Australia), samples were studied. In this study, fifty samples were examined, and only two samples (4%) were diagnosed with Brucella abortus, meanwhile, there were no reports on infections by Brucella in the cheese samples. ***Conclusion:*** This study shows that molecular techniques such as Real Time PCR can be used as a complementary method for the detection of Brucella, alongside all the other common methods.

Keywords*: Brucella,* Brucellosis, milk, cheese, Real Time PCR.

مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی

شیما شنتیائی[1]*

۱.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

***نویسنده مسئول**: *shantiaee.s@gmail.com*

چکیده

بیماری دیابت یک مشکل در حال پیشرفت جوامع مدرن امروزی است. برآورد تعداد کل افرادی که از این بیماری رنج می‌برند مشکل است. تقریباً ۲۰ درصد بیماران دیابتی در طول حیات خویش مبتلا به عفونت زخم پا می‌شوند که در صورت عدم درمان مؤثر می تواند کیفیت زندگی این افراد را مختل سازد. از طرف دیگر درمان این عارضه بسیار پر هزینه می‌باشد. عفونت های پا دیابتی DFIs یکی از مسائل مهم بهداشت عمومی است و شناسایی میکروارگانیسم هایی که باعث ایجاد عفونت های مضر چند میکروبی می‌شود برای یافتن درمان مناسب آنتی بیوتیک مفید است. در همین حال، گزارش های بسیاری نشان داده است که مقاومت آنتی بیوتیکی به طور چشمگیری در حال افزایش است. بنابراین تشخیص زود هنگام ضایعات و شروع سریع درمان ضد میکروبی مناسب برای کنترل عفونت و جلوگیری از عوارض و بهبود کیفیت زندگی ضروری است. آزمون حساسیت آنتی بیوتیک مورد نیاز برای مدیریت عفونت است که می‌تواند به انتخاب گزینه های درمانی بهتر کمک کند.

واژه های کلیدی: دیابت، زخم پای دیابتی، مقاومت آنتی بیوتیکی، درمان ضد میکروبی

مقدمه

دیابت قندی نوعی اختلال متابولیک شایع است که وقتی پانکراس(لوزالمعده) انسولین تولید نمی‌کند یا وقتی که بدن نمی‌تواند از انسولین تولید شده استفاده مؤثر کند، اتفاق می‌افتد (۱). بیماران دیابتی در طول حیات خویش مبتلا به زخم پای عفونی می‌شوند که علاوه بر تحمیل هزینه ی بالا احتمال بروز عوارضی نظیر قطع اندام تحتانی و متعاقباً مشکلات روحی و حرکتی فراوان و اختلال در کیفیت زندگی پیش می‌آید (۲). به طور عمده عفونت های پای دیابتی، عفونت باکتری های مخلوط شده می‌باشد و مدیریت مناسب این عفونت ها، بخش انتخاب مناسب آنتی بیوتیک را براساس نتایج آزمایش های کشت و نتایج حساسیت ضد میکروبی مطرح می‌کند. آگاهی از میکروب هایی که باعث عفونت می‌شوند در تعیین مناسب آنتی بیوتیک مفید است (۳). از این رو این مطالعه به منظور مروری بر بررسی های انجام شده بر روی مشخصات باکتریایی زخم پای دیابتی آلوده و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های باکتریال انجام شده است.

دیابت

دیابت یکی از بیماری های مزمن و بسیار با اهمیت و یک مشکل بزرگ بهداشتی است. طبق تعریف انجمن دیابت آمریکا، دیابت شیرین به گروهی از بیماری های متابولیک گفته می‌شود که ویژگی مشترک آن ها افزایش سطح قند خون به علت نقص در ترشح انسولین، یا نقص در عملکرد آن ها و یا هر دو می‌باشد. دیابت و عوارض ناشی از آن جمعیت زیادی را در سراسر دنیا مبتلا کرده است و به سرعت در حال گسترش می‌باشد. به گونه ای که تخمین زده می‌شود شیوع آن در تمامی گروه های سنی در سراسر دنیا از ۲/۸ درصد در سال۲۰۰۰ به ۴/۴ درصد در سال ۲۰۳۰ برسد (۴). به طوری که شیوع آن در سال ۱۹۸۵، ۳۰ میلیون نفر، در سال ۲۰۱۰، ۲۸۵ میلیون نفر بوده و در ۲۰۳۰ میلادی این آمار ۴۳۹ میلیون نفر افزایش خواهد یافت. با توجه به آمار تزاید بیماری دیابت در جهان، سازمان بهداشت جهانی(WHO) آن را به عنوان یک اپیدمی نهفته اعلام کرد. این بیماری پنجمین علت مرگ و میر و اولین علت نارسایی مزمن کلیه، قطع پای غیر تروماتیک و نابینایی در بسیاری از جوامع است (۵).

زخم پای دیابتی

زخم پا یک عارضه شایع در بیماران دیابتی است که شیوع آن بیش از ۲۵ درصد است سالانه بیش از ۱ میلیون نفر از افراد دیابتی پای خود را به علت این بیماری از دست می-دهند یعنی هر ۳۰ ثانیه یک قطع ناشی از دیابت اتفاق می-افتد (۶). بیش از ۷۰ درصد قطع پا در دنیا در افراد دیابتی دیده می‌شود. تعداد موارد سالانه بستری ناشی از پای دیابتی رو به افزایش بوده که در اکثر موارد ناشی از بیماری های عروقی محیطی است. ریسک فاکتورهای اصلی مستعد کننده زخم پای دیابتی عبارتند از: نوروپاتی، اسکلوپاتی و اختلال در سیستم ایمنی. اصطلاح پای دیابتی، شامل طیفی از ناهنجاری هاست که پای در معرض زخم(پای نوروپاتیک و پای دارای اختلال عروق محیطی) و پای زخم شده و پای شارکوت (Charcot) را شامل می‌شود. در کشورهای پیشرفته بیش از ۵ درصد افراد مبتلا به دیابت دچار مشکلات و عوارض پا هستند. تشکیل زخم های عفونی مهم ترین علت بستری شدن این بیماران در بیمارستان است. مهم ترین فاکتور مستعدکننده ابتلا به عفونت در بیماران دیابتی، زخم پا است که اغلب مرتبط با نوروپاتی محیطی است. بیماری عروقی محیطی و اختلالات ایمنی در درجه دوم اهمیت قرار دارند. بیماران مبتلا به ملیتوس به علت نوروپاتی، اختلال عروقی و کاهش عملکرد نوتروفیل ها در معرض عفونت های شدید می باشند. از میان این اختلالات فوق، نوروپاتی اهمیت زیادی دارد زیرا این بیماران ممکن است درجه حرارت و درد را حس نکنند و حتی اگر جسم خارجی به کف پای آن ها فرو رود متوجه نشوند. حتی می تواند باعث تغییر شکل انگشتان پا شود به علت اینکه بیماران متوجه فشار کفش بر روی انگشتان نمی‌شوند. در نهایت پای بیماران در ناحیه کف پا زخم شده که در صورت عدم تشخیص و درمان صحیح عمیق تر شده و می تواند تا استخوان هم پیشرفت کند (۴). اغلب زخم ها عفونی می-شوند و پیشرفت عفونت به سمت بافت نرم استخوان عمدتاً یک فاکتور مهم برای قطع اندام تحتانی است (۷). زخم پای دیابتی بیماران دیابتی می تواند خود را به شکل سلولیت، میوزیت، آبسه، فاشئیت نکروزان، آرتریت عفونی، تندینیت و استئومیلیت نشان دهد و سرانجام منجر به آمپوتاسیون اندام تحتانی می‌شود (۶). تقریباً ۲۰ درصد بیماران دیابتی در طول حیات خود مبتلا به عفونت زخم پا می‌شوند که در صورت عدم درمان مؤثر می‌تواند کیفیت زندگی را مختل سازد. از طرف دیگر درمان این عارضه بسیار پرهزینه می-باشد با توجه به افزایش میزان قطع عضو اندام تحتانی و از طرفی مشکلات روحی و حرکتی که در زندگی افراد بخاطر از دست دادن اندام ایجاد می‌شود انجام مطالعه ای دقیق، جهت پیشنهاد روش های پیشگیری و درمان قابل انجام و کم هزینه را لازم می‌نماید و در این راستا شناخت میکروارگانیسم های مسئول عفونت برای انتخاب مناسب ترین رژیم درمانی ضرورت دارد (۸). اولین قدم پیشگیری از زخم پا شامل کنترل دیابت، ورزش، اجتناب از سیگار کشیدن و حفظ بدن است. ضمناً معاینه پا از لحاظ بریدگی-ها، تاول ها، قرمزی، تورم، ناخن های سیاه شده‌ی عفونی، میخچه و هر گونه بریدگی لازم می‌باشد. در این بیماران عواملی نظیر جنسیت(مردها)، قطع قبلی عضو، زخم قبلی، وجود پینه، دفورمیت مفصلی ناشی از اختلال حرکتی و مشکل بینایی و حرکتی به عنوان عوامل خطر قطع عضو شناخته شده اند که بر روی هم اثرات تشدید کننده نیز دارند (۹). اکثریت محققین زخم‌های پای بیماران دیابتی را ناشی از عوارض نوروپاتی، تروما و دفورمیتی می‌دانند (۱۰). به طور کلی عفونت های تهدید کننده اندام را می توان به صورت سلولیت با گسترش بیش از ۲ سانتی متر از محیط زخم، آبسه عمقی، اسستئومیلیت یا ایسکمی تعریف کرد. در این عفونت ها مخلوطی از کوکسی های گرم مثبت هوازی، باسیل های گرم منفی هوازی و انواع ارگانیسم های بی هوازی دیده می‌شوند (۱۱). هنگامی که عفونت وجود داشته باشد باید کشت های هوازی بی هوازی درخواست گردد و پس از آن درمان مناسب با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف آغاز گردد. علاوه بر آنتی بیوتیک، برش و تخلیه، برداشت جراحی بافت نرم استخوان و مفصل و در نهایت در صورت لزوم قطع عضو انجام می‌گردد. در مورد عفونت عمقی، آبسه، سلولیت، کانگرن یا استئومیلیت، بستری نمودن بیمار و درناژ فوری جراحی لازم است. عفونت ممکن است با افزایش ترشحات اگزودایی یا درد موضعی مشخص شود عامل تسریع کننده گانگرن موضعی انگشت ها معمولا عفونت است. تشخیص بالینی سلولیت منتشر با آزمایش های

میکروبیولوژیک تکمیل می‌گردد و معمولا بیش از یک ارگانیسم در بروز آن نقش دارد (۲).

آنتی بیوتیک

آنتی‌بیوتیک که داروی ضدمیکروب هم نامیده می‌شود. دارویی است که با عفونت‌های باکتریایی مبارزه می‌کند. اولین آنتی‌بیوتیک یعنی پنی سلین را الکساندر فلمینگ کشف کرد. پس از استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در دهه ۱۹۴۰ ، بیماری‌ها و مرگ‌ومیر ناشی از عفونت‌ها به وضوح کاهش پیدا کرد.

مقاومت آنتی بیوتیکی

در مورد منشأ پیدایش مقاومت ابتدا به سال های ابتدایی قرن بیستم بازگردیم یعنی زمانی که آنتی بیوتیک ها کشف شدند و عوامل عفونت را از بین بردند و پس از آن در اواسط قرن بیستم، مصرف کلینیکی آنتی بیوتیک ها شروع شد. در همین حال دانشمندان سعی کردند آنتی بیوتیک های جدیدی را بوجود آورند. این مسأله منجر به شروع تولید آنتی بیوتیک های جدید و ظهور میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک ها شد و تا به امروز ادامه دارد (۱۲). باکتری ها موجودات هوشمند زنده ای هستند که وقتی مقابل ناسازگاری محیطی قرار می‌گیرند، عکس العمل نشان می-دهند. به بیان دیگر تغییرات ژنتیکی که در باکتری ها رخ می دهد منجر به مقاوم شدن آن ها و ظهور اشکال مقاوم به آنتی بیوتیک ها می‌شود. بیشتر باکتری ها به طور ذاتی حساسند. به عنوان مثال استافیلوکوک ها باکتری‌هایی هستند که ذاتا در ۵۰ سال قبل حتی به پنی سیلین جواب می‌دادند و لیکن الان *استافیلوکوکی* را که بتواند به پنی سیلین حساس باشد به ندرت پیدا می‌کنیم. به طور کلی مکانیسم های مقاومت مختلفی وجود دارد، وقتی باکتری در معرض آنتی بیوتیک قرار می‌گیرد امکان بروز جهش در آن وجود دارد یعنی تغییر در اطلاعات ژنتیکی باکتری، توانایی مقاومت به پنی سیلین را به باکتری می‌دهد. مقاومت میکروبی نوعی مقاومت دارویی است که در طی آن یک میکروارگانیسم علی رغم وجود آنتی بیوتیک در محیط می تواند زنده بماند. توانایی آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت، بستگی به قدرت آن ها در از بین بردن یا توقف رشد باکتری ها دارد. برخی باکتری ها نسبت به بعضی آنتی بیوتیک ها مقاومت طبیعی دارند، به این معنا که با توجه به طیف اثر آنتی بیوتیک ها، برخی آنتی بیوتیک ها روی یکسری از باکتری ها اثری ندارند. یک نوع دیگر از مقاومت میکروبی اکتسابی است که باکتری ها هنگامی که در مقابل ناسازگاری محیطی قرار می گیرند آن را کسب می‌کنند. باکتری ها موجودات زنده هوشمندی هستند که در مقابل ناسازگاری های محیطی مانند قرار گرفتن در معرض آنتی بیوتیک ها از خود عکس العمل نشان می‌دهند. به بیان دیگر تغییرات ژنتیکی از جمله جهش که در باکتری رخ می‌دهد منجر به مقاوم شدن آن ها و ظهور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها می‌شوند. در واقع مصرف بی رویه، نامناسب یا بیش ازحد آنتی بیوتیک ها سبب گسترش مقاومت میکروبی می‌شود. میکروب ها با ایجاد ژن مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها، این مقاومت را از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌کنند و حتی این ژن مقاومت می تواند از یک گونه ی میکروبی به گونه دیگر انتقال یابد. اینجاست که با وجود تجویز آنتی‌بیوتیک در مقادیر بالا نه تنها نتیجه ای حاصل نمی‌شود بلکه عوارض جانبی بیشتری به جای گذاشته و عفونت پایدار می‌ماند (۱۳). حال سوال مطرح شده این است که آنتی بیوتیک ها چگونه بر فعالیت میکروب ها جهت مقاومت زایی تأثیر می گذارند؟ چنانچه مصرف آنتی بیوتیک از میزان تجویز شده توسط پزشک کمتر باشد احتمال بروز مقاومت میکروبی افزایش می‌یابد چرا که غلظت های میکروبی زیر حد مؤثر سبب افزایش تعداد باکتری های مقاوم می‌شود. کامل نکردن دوره درمان نیز ممکن است در بروز مقاومت میکروبی مؤثر باشد (۱۲و ۱۴). یکی از مکانیسم هایی که منجر به مقاومت باکتری در برابر آنتی بیوتیک می شود، قابلیت تولید آنزیم است. ساده ترین مکانیسم آن تولید آنزیم پنیسیلیناز است که باعث هیدرولیز یا از بین بردن آنتی بیوتیک پنی سیلین می‌شود. باکتری هایی که دچار جهش ژنتیکی شده اند، به محض قرار گرفتن در برابر پنی سیلین تولید آنزیم می‌کنند. عوامل مختلفی به عنوان عوامل متانژا یا جهش وجود دارند (۱۵و ۱۶). مقاومت به آنتی بیوتیک، یعنی میکروب های بیماری زا که برای مبارزه با آنان آنتی بیوتیک استفاده می‌شود، با جهش ژنی نسبت به این داروها مقاومت پیدا کنند و نسل های جدیدی بوجود بیاید که نتوان با آن ها مبارزه کرد. از مهم ترین عوامل این مقاومت مصرف خودسرانه ی یا بیش از حد آنتی

بیوتیک ها است. مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها یکی از بزرگترین چالش هایی است که سلامت انسان عصر مدرن را تهدید می‌کند. در دهه های اخیر مصرف آنتی بیوتیک ها علاوه بر پزشکی در کشاورزی هم افزایش چشمگیری داشته و آنتی بیوتیک ها در دامداری، پرورش مرغ و طیور، پرورش ماهی و آبزیان، تولید محصولات کشاورزی و در باغ های میوه استفاده می‌شود، بنابراین مقاومت به آنتی بیوتیک، کشاورزی و محیط زیست را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد. توانایی میکروب ها در تغییر تنها به دلیل مقاومت به آنتی بیوتیک نیست. از سال ۱۹۸۷ هیچ رده آنتی بیوتیک تازه ای تولید نشده و در خط تولید شرکت های داروسازی بزرگ تقریباً هیچ آنتی بیوتیکی نیست. برای تولید آنتی بیوتیک جدید، انگیزه ی اقتصادی کافی وجود ندارد چرا که آنتی بیوتیک ها فقط در صورت لزوم برای یک یا دو هفته مصرف می‌شوند و به دلیل خطر مقاومت میکروب ها، مدت استفاده از آن ها محدود است، در حالیکه داروهایی مثل داروی فشار خون یا داروی کاهنده برای تمام عمر مصرف می‌شوند (۱۳).

تست های حساسیت آنتی بیوتیک

نمونه گیری در شرایط آسپتیک با برداشت یک سوآب از ترشحات چرک و عفونت قسمت زخم پا، به منظور غنی سازی از کشت بلاد آگار و مک کانکی کشت و برای خالص سازی از یک محیط کشت اختصاصی بر اساس نوع باکتریی جدا شده، استفاده می‌شود. و در صورت رشد میکروب ها و ایجاد کلنی اقدامات تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم و آزمایشات تشخیص افتراقی نوع باکتری(تست های بیوشیمیایی) انجام می‌گردد. همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین می‌شود و قطر هاله عدم رشد اطراف هر یک از دیسک ها بر اساس جدول استاندارد CSLI[2] و بروشور کیت پادتن طب تفسیر و نتایج به صورت مقاوم و حساس گزارش می‌شود. در این روش دیسک های ضد میکروبی که استفاده می‌شود عبارتند از: آمپی سیلین، آزرتونام، جنتامایسین، آمیکاسین، سفازولین، سلفورکسیم، تترازیدی، تری پیپراسیلین/تازوبکتام، مروپنم، پلی میکسین و کولیستین برای باسیل های گرم منفی. و پنی سیلین، آمپی سیلین، آزیترومایسین، سفاکسیتین، سفتازیدیم، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، اریترومایسین، وانکومایسین، تیکوپلاتین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، لاین زولید و تتراسایکلین برای مطالعه ی الگوی حساسیت کوکسی های گرم مثبت استفاده می‌شود (۱۷). آنتی بیوگرام از روش های معمول آزمایشگاهی و تشخیصی بوده که شامل سنجش میزان توانایی یک آنتی بیوتیک برای ممانعت از رشد باکتری ها در آزمایشگاه می‌باشد این توانایی را می توان با استفاده از روش های رقیق سازی در لوله و یا کشت میکروارگانیسم ها در پلیت اندازه گیری نمود. تداخل هاله های عدم رشد باکتری در اطراف دیسک های آنتی بیوتیکی، یکی از مشکلات روش های انتشار در آگار می‌باشد. امروزه از تعیین تایپ مولکولی Multiplex_PCR به منظور ردیابی همزمان ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود. این روش می تواند کاهش دهنده و جلوگیری کننده از حالت اپیدمیک عفونت های بیمارستانی بوده و در ردیابی منبع عفونت و یا شیوع آن کمک مهمی نماید. در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می‌شود. در میکروب شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطور همزمان وجود دارد و می‌توان عفونت های مخلوط را تشخیص داد (۱۸).

میکروارگانیسم های دخیل در عفونت زخم پای دیابتی

در عفونت پای دیابتی مخلوطی از کوکسی های گرم مثبت هوازی و باسیل های گرم منفی هوازی و انواع میکروارگانیسم های بی هوازی دیده می‌شوند (۲). از جمله میکروارگانیسم هایی که در عفونت پای دیابتی دخالت دارند می توان به *استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی، پروتئوس، کلبسیلا و انتروباکتر* و غیره اشاره کرد.

استافیلوکوکوس اورئوس این میکروارگانیسم کوکسی گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است و به شکل خوشه در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود. کاتالاز مثبت و کواگولاز منفی است. شایع ترین میکروارگانیسم جدا شده از عفونت پای دیابتی *استافیلوکوکوس اورئوس* است. مهم ترین گونه در جنس *استافیلوکوک* از نظر پزشکی محسوب می شود. گاهی

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute

اوقات به این باکتری *استافیلوکوک طلایی* می گویند. اورئوس در لاتین به معنای طلایی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یا *MSRA* سویه ی خاصی از این باکتری ها هستند که به بیشترین آنتی بیوتیک ها مقاوم می‌باشند. مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* به واسطه ی کروموزوم و پلاسمید کنترل می‌شود. مصرف بیش از حد و بدون نسخه آنتی بیوتیک ها با گذشت زمان افزایش مقاومت و کاهش میزان حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های مختلف را به دنبال دارد (۱۸).

همانطور که گفته شد امروزه از تعیین تایپ مولکولی Multiplex_PCR به منظور ردیابی همزمان ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود (۱۸). و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC می باشد. قبل از سال ۱۹۴۰ پنی سیلین به عنوان داروی خط اول در درمان عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* مطرح بود، اما به دلیل مصرف بی رویه آن، سویه های مقاوم به پنی سیلین به سرعت طی دو سال افزایش یافتند (۱۹). ژن مقاومت به آنتی بیوتیک پنی سیلین، ژن *blaz* می‌باشد که آنزیمی خارج سلولی به نام بتالاکتاماز را به منظور هیدرولیز حلقه بتالاکتام کد می-نماید. در سال ۱۹۵۹ متی سیلین به عنوان یک آنتی بیوتیک مطرح شد. ۲ سال بعد اولین *استافیلوکوکوس اورئورس* مقاوم به متی سیلین(*MRSA*) در بریتانیا گزارش گردید. ژن *mecA* بر روی یک قطعه ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن مجموعه کروموزومی *mec استافیلوکوکی* (*SCCmec*) می گویند (۱۸). مقاومت دارویی ایجاد شده در سویه های *MRSA* ناشی از این عناصر متحرک ژنتیکی می-باشد. ژن *mecA* دارای کدهایی برای تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین(PBPZa) بود که باعث ایجاد میل ترکیبی کمتر در اتصال به حلقه بتالاکتام می‌شود (۲۰و ۲۱). اولین مورد مقاومت به متی سیلین در بیمارستان مشاهده شد و همچنان در جامعه در حال افزایش می‌باشد بنابراین خطر جدی برای سلامت عمومی در سرتاسر جهان محسوب می گردد (۱۲). بیمارانی که با سویه *MRSA* عفونی شده اند بالاترین خطر برای گسترش عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* در جامعه را دارا می‌باشند. زیرا این سویه ها دارای ماهیتی چند مقاومتی بوده و باعث ایجاد مقاومت همزمان به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها می‌شوند. برای مثال آنتی بیوتیک ونکومایسین داروی انتخاب شده برای درمان عفونت های ناشی از *MRSA* بود اما در جولای ۲۰۰۲ مرکز کنترل بیماری ها(CDC) در ایالات متحده آمریکا اولین گزارش مقاومت نسبت به ونکومایسین را در سویه های *MRSA* منتشر نمود. کاهش حساسیت به ونکومایسین به علت ضخیم شدن دیواره سلولی در اثر وجود ژن *VanA* است که برای تغییر مکان هدف و عدم اتصال به ونکومایسین کد می‌شود (۱۸). آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به عنوان یک عامل مهارکننده رشد باکتریایی، با داشتن طیف اثر وسیع برای درمان عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود. سه مکانیسم ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مطرح شده است که عبارتند از: ۱) آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ۲) موتاسیون ریبوزومی ۳) فعالیت افلوکس باکتری. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری سویه های مقاوم به آمینوگلیکوزید ارتباط نزدیکی با سویه های *MSRA* دارند (۲۳و ۲۴). فلورکینولون ها در سال ۱۹۸۰ ابتدا برای درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی و سپس برای درمان عفونت های *پنوکوکی* و *استافیلوکوکوس* مورد استفاده قرار گرفتند اما مقاومت به آن ها در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بویژه سویه های *MSRA* برای اولین بار ایجاد شد این مقاومت به طور معمول در نتیجه موتاسیون خود به خودی کروموزومی در مکان های کلیدی DNA ژیراز و توپوایزومراز IV ایجاد می‌شود (۱۸).

در مطالعه ای که سید محمد علوی و همکاران در سال ۸۴-۱۳۸۳ در بیمارستان رازی اهواز با بررسی توصیفی مقطعی تمامی بیماران با زخم پای دیابتی پیشرفته که دارای بافت های تخریب شده با ترشحات فراوان بودند انجام دادند، ۴۶ درصد از موارد زخم دارای چند میکروارگانیسم بودند که به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس*،*اشرشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* شایع ترین میکروارگانیسم های جدا شده بودند که در ۶۵ درصد موارد به آنتی بیوتیک های رایج مقاومت نشان دادند (۲). در مطالعه ای sotto و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در کشور فرانسه پتانسیل

بیماری‌زایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زخم پای دیابتی را به منظور تشخیص زخم های عفونی از غیر عفونی بررسی کردند آن ها گزارش دادند، که از میان ژن های ویرولانس مناسب ترین ترکیب بدست آمده از رگرسیون لجستیک ترکیب ۵ ژن *sea*، *sei*، *LukED*، *hlgV*، *Cap8* است. این نشاگرها برای تشخیص زخم ها غیر عفونی درجه ۱ از زخم های عفونی درجه ۲ تا ۴ مفید بوده و وضعیت زخم ها را در مراحل پیگیری پیش بینی می-کردند. به طوری که از این ترکیب، ۴ ژن *hlgv*، *LukED*، *sei* و *sea* در زخم های عفونی با درجه ۲ تا ۴ واگنر در سویه های *MRSA* و ژن های cap8 در زخم های با درجه ۱ در سویه های *MRSA* شناسایی شدند (۲۵).

در مطالعه ای دیگر در ۲۰۱۰ که در کویت توسط Khalifa Al Benwan و همکاران انجام شد، مشخص شد عفونت پای دیابتی(DFI) در میان بیماران دیابتی در کویت رایج است، که علت پلی میکروبی در ۷۵ درصد موارد بررسی شده را نشان می‌دهد و اکثر جدایه ها مقاوم به چند دارو بودند. و در مجموع از ۷۷۷ جدایه ۱۴۴ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده که همگی به وانکومایسن حساس هستند (۲۶). ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ایران با مطالعه بر روی زخم های عفونی و عفونت پوستی، نشان دادند که از ۷۵ ایزوله ی *استافیلوکوکی* جدا شده، ۴۰/۸ درصد ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس آلفا و بتا همولیتیک* اند و از این تعداد ۱۲/۲۵ درصد گاما همولیزین (*hlg*) تولید می کردند. در مطالعه ای دیگر حسین آل فاطمی و همکاران میزان فراوانی *hla* را ۹۳/۱۵ درصد گزارش کردند (۲۷). در مطالعه ای Abdel-Halem و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مصر، فراوانی ژن های کدکننده ی لوکسیدین ها و ژن *mecA*، در ۷۵ ایزوله ی *بالینی استافیلوکوکوس اورئوس* را مورد بررسی قرار دادند که فراوانی ژن های کد کننده ی لوکسیدین ها به ترتیب۳۴/۷ درصد *lukS*، ۴۴ درصد *lukD*، ۶۴ درصد *lukE*، ۷۷/۳ درصد *lukF* ارزیابی و در ۵۵ ایزوله ژن *mesA*شناسایی شد (۲۸).

تمام مطالعات اخیر نشان دهنده ی این موضوع است که *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شایع ترین میکروارگانیسم گرم مثبت در ایجاد عفونت زخم پای دیابتی است. ارزیابی ۴ ژن ویرولانس نشان می دهد که جدایه مقاوم به متی سیلین، *استافیلوکوکوس اورئوس* که قادر به بیان این ۴ ژن بویژه *hlg* هستند، نسبت به سایر سویه ها، از بیماری‌زایی بیشتری برخوردار بوده و منجر به عفونت های شدید با درجات واگنر بالاتری می‌شوند. شناسایی این ۴ ژن در ایزوله های *استافلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، به عنوان مارکر ژنتیکی مناسب و قابل اعتماد در تشخیص درجه بندی مولکولی عفونت زخم پای بیماران دیابتی با اختصاصیت و ویژگی بالا است (۱۸).

پسودوموناس آئروژینوزا سودوموناس ها باسیل های گرم منفی، متحرک و هوازی هستند که به مقدار فراوانی در آب، خاک، گیاه و حیوانات وجود دارند. در نیمه دوم قرن اخیر *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن بیمارستانی مهم تلقی می‌شود. با توجه به اطلاعات مرکز کنترل بیماری های آمریکا *سودوموناس آئروژینوزا* پنجمین پاتوژن در میان میکروارگانیسم های بیمارستانی را شامل می شود (۲۹). برای درمان معمولاً یکی از انواع پنی سیلین های فعال علیه این باکتری نظیر تیکارسین یا پیپراسیلین به همراه سفالوسپورین های نسل جدید مثل سفتازیدم تجویز می-گردد (۳۰). در سال ۱۹۹۸ اولین مطالعه ی ملی شیوع *سودوموناس* در اسپانیا انجام شد، که ۱۳۶ بیمارستان با ۱۰۱۴ بیمار در آن شرکت کردند که به دلیل مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به عوامل آنتی میکروبیال درمان با مشکل رو به رو شد (۲۹). همچنین دومین مطالعه در این زمینه در اسپانیا در سال ۲۰۰۳ انجام گردید (۳۰).

مهمترین نگرانی این است که تعداد عوامل آنتی *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر که در درمان استفاده می‌شوند به دلیل مقاومت های ایجاد شده بوسیله ی چندین عامل با مکانیسم های گوناگون محدود شده است و احتمالا با افزایش مقاومت آنتی بیوتیک ها در ارتباط است. شیوع عفونت های بیمارستانی *سودوموناس آئروژینوزا* به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی شامل مقاومت به کارباپنم و MDR وابسته است. *سودوموناس* دارای غشاء خارجی با نفوذپذیری پایین، پمپ های خارج کننده ی چند دارویی، لاکتاماز و تنظیم کاهش پورین های غشاء خارجی می باشد که می-توانند دلیلی برای مقاومت این میکروارگانیسم باشد و در حین درمان، میکروارگانیسم می تواند مقاومت کسب کند (۲۹). متأسفانه پیشرفت های حاصل شده در زمینه تولید

آنتی بیوتیک های ضد *سودوموناس* مرگ و میر ناشی از این باکتری، قابل چشم پوشی نمی‌باشد (۳۱). این موضوع به عللی همچون، خصوصیات ذاتی خود باکتری در تولید آنزیم های مختلف پاتوژن، ایجاد مقاومت سریع نسبت به آنتی بیوتیک ها و استفاده ی بی رویه از آنتی بیوتیک های جدید بر می‌گردد (۲۹). تامیل سوی و همکاران در مطالعه خود که در سال ۲۰۱۱ انجام شد گزارش کردند که سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* به آمپی سیلین ۱۰۰ درصد و ۸۳/۳ درصد نیز به فلوکساسین مقاومت دارند. شانکر و همکاران گزارش کردند ۴۴ درصد از جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو هستند (۳۲).

اشریشیا کلی یک باسیل گرم منفی، بی هوازی اختیاری، تخمیرکننده و اکسیداز منفی از خانواده *انتروباکتریاسه* است(۳۲). در اغلب بیمارستان ها *اشریشیاکلی* شایع ترین عامل سپتی سمی در بین باکتری های گرم منفی بوده و در واقع شایع ترین ارگانیسمی است که از کشت خون به دست می‌آید (۳۳). به دلیل مصرف بیش از حد و خودسرانه ی آنتی بیوتیک ها مقاومت دارویی چندگانه در این ارگانیسم افزایش یافته و مشکل اصلی در درمان عفونت های ناشی از *اشریشیاکلی*، مقاوم بودن این باکتری نسبت به تعداد زیادی از آنتی بیوتیک های رایج می‌باشد (۳۴). از عفونت های شایع *اشریشیاکلی* مرتبط با بافت سطحی می‌توان عفونت پوست و بافت نرم، عفونت زخم در جراحی های مستعد آلودگی گانگرن فورنیر در بیماران مرد دیابتی و عفونت استخوان مزمن در بیماران دیابتی اشاره کرد (۳۲). عفونت زخم پای دیابتی بوسیله ی *اشریشیاکلی* مقاوم به چند دارو مکرراً در مطالعات مختلف گزارش شده است (۳۵). در سال های اخیر افزایش نرخ حضور ژن های دخیل در اعطای مقاومت از قبیل bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در سویه های بیماری زای *اشریشیاکلی* در مطالعات متعددی در ایران گزارش شده است (۳۶).

در مطالعات بسیاری که انجام شد گزارش گردید که در میان پاتوژن های جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی باکتری های گرم منفی شایعتر از باکتری های گرم مثبت بودند و شایعترین آن ها به ترتیب *سودوموناس* و پس از آن *اشریشیا کلی* بوده است (۳۲). زیبر و همکاران در مطالعه ای دیگر *اشریشیاکلی* را به عنوان جدایه غالب گرم منفی گزارش دادند (۳۲).

بحث

عصر آنتی بیوتیک ها با یک مقاله خلاصه با عنوان "پنی سیلین یک عامل شیمی درمانی" توسط Chain و همکارانش در سال ۱۹۰۴ آغاز شد. از آن زمان آنتی بیوتیک ها جان میلیون ها انسان را نجات دادند که بیشتر از هر داروی دیگری در تاریخ بشریت بوده است. به همین دلیل توسط بسیاری از افراد آنتی بیوتیک ها به عنوان داروی جادویی اسم برده می‌شوند (۳۲). با این حال شبکه ایمنی آنتی بیوتیک ها در مقابل عفونت باکتریایی به دلیل ظهور مقاومت بسیار شکننده شده است. همچنین تولید آنتی بیوتیک های جدید به طور کلی کاهش یافته است و فقط ۲ آنتی بیوتیک از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ توسط[3]FDA تایید شده است که مکانیسم عمل جدیدی داشته اند. داشتن مکانیسم جدید برای یک آنتی بیوتیک یک ملاحظه ی حیاتی در نبرد علیه مقاومت آنتی بیوتیکی است (۳۷). در قرن بیست و یکم مقاومت باکتری ها نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های در دسترس به عنوان مشکلی جدی در درمان عفونت های باکتریایی مبدل شده است. بازگشت به عصر قبل از آنتی بیوتیک ها و مرگ و میر ناشی از باکتری های پاتوژن عامل نگرانی های جدی است (۳۲). و از آنجایی که سالانه تعداد موارد بستری ناشی از پای دیابتی رو به افزایش بوده که در اکثر موارد ناشی از بیماری های عروق محیطی است. ریسک فاکتورهای اصلی مستعد کننده زخم پای دیابتی عبارتند از: نوروپاتی، واسکولوپاتی و اختلال در سیستم ایمنی. بیشتر عفونت های پای دیابتی پلی میکروبیال بوده و *استافیلوکوکوس اورئوس* شایعترین ارگانیسم عامل می باشد. دو نوع طبقه بندی برای عفونت پای دیابتی IDSA، WAGNER این تقسیم بندی همرا با ارزیابی نیاز به بستری بیماران، انجام تصویر برداری های اختصاصی، مداخله جراحی و یا آمپوتاسیون و به طور کلی پیامد بیماران را مشخص می‌نماید. درگیری های عمقی تر(فاشئیت، میوزیت و استئومیلیت) احتمال مداخله جراحی را افزایش داده و مدت درمان را طولانی تر می‌کند. استئومیلیت احتمال آمپوتاسیون را افزایش داده، همچنین

[3] Food and Drug Administration

بهبود زخم را به تأخیر انداخته و به عنوان کانونی برای عود عفونت عمل می‌نماید. و اسکولوپاتی در ۲۰ تا ۳۰ درصد بیماران دیابتی وجود داشته و بیش از ۴۰ درصد افراد با اسکولوپاتی دچار زخم پا هستند. استئومیلیت عامل اصلی آمپوتاسیون اندام تحتانی بوده و به همین دلیل نیاز به تشخیص زودرس و درمان مناسب مورد توجه می‌باشد. وجود علائم سیستمیک به عنوان فاکتورهای پیشگویی کننده وضعیت بد بیمار و پیامد بالینی نامطلوب وی می-باشد. بنابراین دانستن شیوع آن در هر منطقه و نیاز به پرداختن به پیشگیری و درمان به موقع آن حائز اهمیت است. به علت آنکه زخم های عفونی پای دیابتی شایع ترین علت بستری شدن بیماران دیابتی است و به طور شایع منجر به آمپوتاسیون می‌شود و درمان باید بر اساس کشت های بافتی والگوی مقاومت میکروبی باشد دانستن علل باکتریولوژیک ایجاد کننده آن نیز می تواند روند درمان بیماری و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب را تسهیل کند (۴). عوامل خطر ایجاد کننده زخم پای دیابتی را براساس قابلیت کنترل به دو گروه می توان تقسیم کرد: عوامل خارجی شامل ترومای کوچک و بزرگ حرارتی، مصرف سیگار و الکل، کنترل ناکافی قند خون، چاقی، عدم همکاری بیمار و کفش نامناسب، عوامل داخلی شامل جنسیت، نوروپاتی، اسکلوپاتی، ایمونوپاتی، سن، طول مدت دیابت، سابقه قبلی زخم و دفورمیتی که عوامل خارجی قابل کنترل بوده و با تمرکز بر روی آن ها می توان تا حدی از پیدایش زخم پا جلوگیری کرد. در مطالعه ای که توسط Mohamad Alsadig, Fatma Almaskari در سال ۲۰۰۷ جهت تعیین شیوع دیسک فاکتور های عوارض پای دیابتی بر روی ۵۱۳ بیمار با میانگین ۵۳ سال در بیمارستان العین انجام شد، به این نتیجه رسیدند که جنس، تحصیلات پایین، دیابت تیپ ۲ و وجود آلبومینوری و هایپرتنشن ریسک های مهم پای دیابتی‌اند (۳۸). بنابراین تشخیص زود هنگام ضایعات و شروع سریع درمان ضد میکروبی مناسب برای کنترل عفونت و جلوگیری از عوارض آن، برای بهبود زندگی ضروری است. آزمون حساسیت میکروبی نیز برای مدیریت عفونت مورد نیاز است که می‌تواند به انتخاب گزینه درمانی بهتر کمک کند (۱۷). در جهان زخم پای دیابتی یکی از مهم ترین مشکلات بهداشت عمومی است که منجر به تحمل مشکلات بهداشت اجتماعی و اقتصادی برای افراد مبتلا می شود. در حدود ۱۵ درصد از بیماران دیابتی زخم پا ایجاد می شود که در برخی از زمان های زندگی بسیار آسیب پذیر است. عفونت های زخم پا معمولاً به علت رشد چند میکروبی یا پلی میکروبی به طور عمده شامل ارگانیسم های هوازی گرم مثبت و گرم منفی ایجاد می شوند. در سال های اخیر، تعداد حوادث و عوارض ناشی از عفونت های زخم پای دیابتی به علت شیوع ارگانیسم های مقاوم به چندین دارو افزایش چشمگیری داشته است (۳۹). در اکثر مطالعات انجام شده مشخص گردید که در بین جدایه های میکروبی جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی، باکتری های گرم منفی شایع تر از کوکسی های گرم مثبت می باشد. که حساسیت آنتی بیوتیکی هر یک از جدایه ها با جدایه دیگر متفاوت می‌باشد.

Shankar و همکاران در سال ۲۰۰۵ در جنوب هند یک مطالعه توصیفی برای تجزیه و تحلیل جدایه های باکتری هوازی و بی هوازی همه ی بیماران بستری شده با عفونت زخم پای دیابتی که از زخم های درجه ۵-۲ واگنر گزارش شد، انجام دادند. باکتری های گرم منفی جدا شده بیشتر از گرم مثبت ها بود، که شایع ترین آن ها شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوک های* کواگولاز منفی و انتروباکتروئیدس بودند. و تعدادی از پسودو موناس آئروژینوزا به چندین دارو مقاومت نشان دادند (۴۰). در مطالعه ای دیگر اسمعیل قربانعلی نژاد که در سال ۱۳۹۶ در ایران(مازندران) انجام داد، از ترشحات چرک تعدادی بیمار مبتلا به عفونت پای دیابتی، *استافیلوکوکوس اورئوس* خالص سازی شد. از آنجایی که *استافیلوکوکوس اورئوس* علت شایع عفونت زخم پای دیابتی است و علت مقاومت این باکتری به متی سیلین حضور ژن های موجود در ناحیه ای از کروموزوم *mecA* در این سویه ها است. این مقاومت از سوی ترادفی از ژن های موجود در ناحیه ای از کروموزوم *استافیلوکوکوس اورئوس* به نام *SCCmec* کد می‌شود (۶).

نتیجه گیری کلی

مطالعات نشان داده که هر دو کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم منفی باعث عفونت زخم پای دیابتی شده و این در حالی است که مطالعات انجام شده، برتری باکتری های گرم منفی را در ایجاد این عارضه نشان می‌دهد. تغییر در علل

باکتریایی عفونت زخم پای دیابتی یا DFI براساس موقعیت جغرافیایی بود و همچنین آگاهی از الگوی حساسیت آنتی بیوتیک جدایه ها از عفونت پای دیابتی برای پیشگیری از درمان مناسب در این موارد، قبل از دریافت گزارش های حساس از آزمایشگاه بسیار مهم است.

منابع

1. Aghili R, Malek M, Baradaran H., Peyvandi AA, Ebrahim Valojerdi A, Khamseh ME., General Practitioners' Knowledge and Clinical Practice in Management of People with Type 2 Diabetes in Iran; The Impact of Continuous Medical Education Programs. Arch Iran Med 2015;18(9):582-5.
2. Alavi SM, Sadami A, Khosravi A, Dasht Bozorg A, Abbasi E, Latifi M. Bacteriology of foot ulcer in diabetic patients hospitalized in Ahvaz Razi hospital; Quarterly Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine, affiliated with the Association of Infectious Diseases Specialist 2006;12(36):67-70.
3. Shanmugam P, Jeya M, Linda Susan S. The Bacteriology of Diabetic Foot Ulcers, with a Special Reference to Multidrug Resistant Strains 2013;7(3):441-445.
4. bahramian S. Prevalence of osteomyelitis and bacteriological causes in diabetic foot ulcer patients referring to Imam Hossein Shahroud Hospital 2017.
5. Shaw J.E, Sicree P.Z. and P.Z Zimmet, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, Diabetes Res Clin Pract 2010;87(1):4-14.
6. Rasouli H, Ghorbanalinezhad A. Isolation and Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Based on hla, lukED, sei, and hlg Virulence Genes in Patients with Diabetic Foot Infection in Mazandaran Province. Iranian Journal of Medical Microbiology Iran J Med Microbiol 2017;11(6)191-202.
7. Lipsky B, Peters E, Senneville E, Berendt A, Embil J, Lavery L, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev 2012;28(S1):163-178.
8. Sarkar P, Balantyne S, Management of Diabetic leg Ulcer. Postgrad Med J, Novembar 2000;76(901)674-82.
9. Fahey T, Sadaty A, Jones W, Et AL. Diabetic Impairs the Late Inflammatory response to Wound healing. J Surg Res 1991;50(4)308-313.
10. S Pinzur M , Diabetic Foot . E Medicine Last updated 2004;25(8):545-9.
11. Mandell G, Bennet J, Dolin R . Cellulitis and soft tissue infection. Principles and Practice of infectious diseases. Sixth edition, Pennsylvania, Churchill living stone 2005;2(86)1046-47.
12. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front Microbiol 2013;4:47.
13. Nazer M, Darvishi M. Study on the prescription and use of antibiotics and its role in microbial resistance and its effects on resistance economy. Quarterly Journal of Research Lorestan University of Medical Sciences 2017;19(3).
14. Nazer E, A Akhavanesepahi, B Yakhchaly, Nazer MR. Degradation of toluene by highly efficient indigenous isolate. Advances in Environmental Biology 2014; 8(6):1830-1833.
15. Nazer MR, Obeidavi Z, Garmsiri M,. Darvishi M, Taherian P, Nouruzi S. The. Prevalece Rate of HIV co-Infection in HBV and HCV Positive Patients in Lorestan. Provience. Iioab j 2016 ;7(8): 221-225.
16. Mokhayeri H, Nazer MR, Nabavi M. Seroprevalence of Hepatitis B and C in Clinical Staffs (Doctor and Nurse) of the Hospitals in Khorramabad City, Western Iran .International Journal of Medical Research & Health Sciences 2016;11(5):68-72.
17. Avarinjad M, Pouladfar Gh, Bolandparvaz Sh, Satiary Z, Abbasi P and Mardaneh J. Isolation and Antibiotic Susceotbility from Diabetic Foot Infections in Namazee Hospital Southera IRAN. Journal of Pathogens 2015.
18. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance patern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtaines from patients hospitalised in iman reza hospital, kermanshah. Ournal of microbial world 2014;6(4):209-311.
19. Livermore DM. Antibiotic resistance in *staphylococci*. Int J Antimicrob Agents 2000;16(1):S3-10.
20. de Carvalho MJ, Pimenta FC, Hayashida M, Gir E, da Silva AM, Barbosa CP, Canini SR, Santiago S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. Clinics (Sao Paulo) 2009;64(4):295-302.

(2003). Rev Esp Quimioterap 2007;20(2):222-229.
31. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health careassociated infections caused by antibioticresistant Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:109-11.
32. Zare L, Shenagari M, Khan Mirzaei M, Mojtahed A. Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabtic ulcers Iran J Med Microbiol 2017;11(2):34-41.
33. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. Crit Care Med 2015;43(6):190–8.
34. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. Bacteriophage 2011;1(2):66-85.
35. Boykoe EJ, Lipsky BA. In: Diabetes in America. Harris MI, editor. Washington DC: National Institutes of Health. Infection and diabetes mellitus 1995;485–496.
36. Haghighatpanah M, Mozaffari Nejad AS, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extendedspectrum β-lactamase (ESBL) and plasmid-borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the northof Iran. J Glob Antimicrob Resist 2016; 7:110-3.
37. Sulakvelidze A, The challenges of bacteriophage therapy Eur Ind Pharm 2010;10:14-18.
38. Sshahrad bejestani H, Motabar A. Assessment of Diabetic Foot Ulcer's Predisposing Factors and its Outcomes in Patients with Diabetic Foot Syndrome Hospitalized in Hazrat Rasoul-e-Akram Hospital in Tehran During 1996-2001. Journal of Iran University of Medical Sciences 2004;11(9):77-84.
39. SM Sekhar, N Vyas,1 MK Unnikrishnan, GS Rodrigues,2 and C Mukhopadhyay. Antimicrobial Susceptibility Pattern in Diabetic Foot Ulcer: A Pilot Study 2014;4(5):742–745.
40. Shanker EM, Mohan V, Premalatha G, Srinivasan RS, Usha AR. Bacterial etiology of diabetic foot infection in south India. *Eur J Int Med* 2005;16:567-70.
21. Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2155-2161.
22. Goetghebeur M, Landry PA, Han D, Vicente C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. Can J Infect Dis Med Microbial 2007;18(1):27-34.
23. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside- resistance mechanisms in multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Curr Microbiol 2008;56(6):558-562.
24. Perez-Vazquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene ant (4')-Ia and the efflux pump genes *msrA/msrB*. J Antimicrob Chemother 2009;63(1):21-31.
25. Richard JL1, Sotto A, Jourdan N, Combescure C, Vannereau D, Rodier M, Lavigne JP. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers 2008;34(4):363-369.
26. Al Benwan K, Al Mulla A, Rotimi VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. J Infect Public Health 2012;5:1–8.
27. Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus (MRSA)* strains. Jundishapur J Microbiol 2014;7(6).
28. Abdel-hamed A-HA, Abdel-Rhman SH, El-Sokkary MA. Studies on leukocidins toxins and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical sources. Afr J Microbiol Res 2016;10(17):591-599.
29. kanani M, khadiri T, khazaei S, madani S H, malekianzadeh E. Study of *Psuedomomas aeroginosa* resistance to Ceftizidim and Imipenem in Kermanshah Imam reza hospital during 2006-2011. yafte 2014; 15(4):52-60.
30. Sanchez-Romero I,Cercenado E, Cuevas O, Garcia-Martinez J, Bouza E. Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in spain: second nationalstudy

Antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcers

Shima Shantiaei[1]*

1.Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

E-mail: *shantiaee.s@gmail.com* ***Corresponding author**

Abstract

Diabetes mellitus is a growing problem in today's modern societies. It is difficult to estimate the total number of people suffering from the disease. Approximately 20% of diabetic patients develop wound infections during their life Which in the absence of effective treatment can disrupt the quality of life of these people. On the other hand, treatment of this complication is very costly. DFIs diabetic foot infections are one of the most important public health issues and the identification of microorganisms that cause microbial infections An antibiotic is good for finding an appropriate treatment. Meanwhile, many reports have shown that antibiotic resistance is rising dramatically. Therefore, early diagnosis of lesions and the rapid onset of antimicrobial treatment are essential for controlling infection and preventing complications and improving the quality of life. An antibiotic susceptibility test is needed to manage infection, which can help in choosing the best treatment options.

Keywords: Diabetes, diabetic foot ulcers, antibiotic resistance, antimicrobial therapy

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جوزهندی علیه جدایه های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

الهام نیکوئی[1]، اشرف کریمی نیک[2]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان،کرمان، ایران

***نویسنده مسئول**: *a.kariminik@iauk.ac.ir*

چکیده

امروزه با توجه به اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومتی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا علیه آن‌ها کسب کرده اند تلاش برای جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی با منشأ گیاهی و با عوارض جانبی کمتر ضروری است. این تحقیق نوعی مطالعه آزمایشگاهی بوده که با هدف تعیین اثر ضدباکتریایی گیاه جوزهندی بر جدایه‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف انجام گرفت. در این تحقیق، عصاره متانولی گیاه به روش ماسراسیون تهیه و عصاره با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شد، سپس توسط سیستم تقطیر در خلا دوار تغلیظ و خشک گردید. غلظت‌های مختلف ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ از عصاره در حلال دی‌متیل سولفوکساید و متانول با حجم برابر تهیه شد. شناسایی جدایه‌های مولد بتالاکتاماز به روش فنوتیپی با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید صورت گرفت. فعالیت ضدباکتریایی بر علیه ۴۰ ایزوله از باکتری‌های مولد بتالاکتاماز، به روش انتشار چاهک بررسی شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان حساسیت باکتری‌ها، با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی از رشد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصله، از ۴۰ باکتری *Streptococcus pyogenes* ۵۰ درصد از جدایه‌ها مولد بتالاکتاماز بودند. ایزوله‌های *Streptococcus pyogenes* به عصاره گیاه جوزهندی حساسیت نشان دادند و میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد نسبت به استرپتوکوکوس مولد بتالاکتاماز، ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به بالا بودن اهمیت و خاصیت ضدمیکروبی گیاه جوزهندی و نتایج به دست آمده از این مطالعه ، می‌توان امیدوار بود که در آینده با انجام تحقیقات بیشتر بتوان از این گیاه استفاده بهتر و علمی تری جهت تولید فرآورده هایی با اثربخشی بیشتر و عوارض کمتر برای درمان عفونت های استرپتوکوکی کرد.

واژه های کلیدی: *Streptococcus pyogenes* ، بتالاکتاماز، جوز هندی، فعالیت ضدباکتریایی

مقدمه

استفاده بیش‌ازحد از آنتی‌بیوتیک‌ها عامل اصلی ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به آن‌ها شده است. شیوع این میکروارگانیسم‌های مقاوم یکی از جدی‌ترین تهدیدها برای درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های میکروبی است. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام گروه متنوعی از عوامل ضدمیکروبی هستند که برای مدیریت عفونت‌ها در انسان، جامعه و مراقبت‌های اکتسابی استفاده می‌شوند (۱). مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها یک پدیده هشداردهنده و رو به رشد و به نوبه خود یک چالش عمومی است.در جامعه امروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری از عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها، نگرانی‌هایی را در ارتباط با ظهور مقاومت میکروبی استرپتوکوکوس‌ها ایجاد نموده است (۲). *Streptococcus pyogenes* یک پاتوژن انسانی حاضر و مسئول بیش از نیم میلیون مرگ در سال در سراسر جهان است. درمان فعلی به آنتی بیوتیک‌های مرسوم و مدیریت علائم بستگی دارد. در حالی که آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام انتخابی برای درمان عفونت‌های خفیف به کار می‌روند، عفونت‌های شدید یا طولانی مدت نیاز به اقدامات اضافی دارد. این

موضوع نشان می‌دهد که نرخ جهانی مقاومت همچنان در حال افزایش است (۳).

با توجه به اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومتی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا علیه آن‌ها کسب کردند، در پزشکی استفاده از عصاره‌ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی متداول شده است و ترکیبات ضدمیکروبی آن‌ها نیز یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آید (۴). جوزهندی درختی همیشه‌سبز متعلق به خانواده میریستیکاسه ، خانواده‌ای از گیاهان گل‌دار بومی آسیا، آفریقا، جزایر اقیانوس آرام و آمریکا است که توسط اکثر طبقه‌شناسان شناخته شده است. عضو معروف آن، *Myristica fragrans* می باشد که از قسمت‌های مختلف این گیاه به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله: درمان اضطراب، حالت تهوع، اسهال، وبا، گرفتگی معده، انگل، فلج، روماتیسم و داروی تقویت‌کننده جنسی استفاده شده است. علاوه بر این، چندین گزارش علمی نشان می‌دهد که اسانس جوزهندی دارای فعالیت بالقوه آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدزخم و ضدسرطان است(۵). اسانس جوزهندی کاربرد بالقوه‌ای به‌عنوان ضدقارچ و ضدباکتریایی دارد. اثر ضدباکتریایی از این جهت جالب است که به نظر می‌رسد تنها بر روی باکتری‌های بیماری‌زا اثر کرده درحالی‌که فلور طبیعی بدن را بدون آسیب می‌گذارد.. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جوزهندی علیه سوش‌های استرپتوکوکی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بوده است.

مواد و روش کار

عصاره گیری

دانه گیاه جوزهندی از مناطق گرمسیری جمع‌آوری و برای انجام آزمایشات میکروبی خرد گردید . عصاره گیری با روش ماسراسیون (خیساندن) انجام شده و عصاره حاصله با فیلتر کاغذی شماره ۱ صاف ، سپس غلظت‌های متفاوت در حلال دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر تهیه گردید (Cakupewa et al.,2022) .

جداسازی و شناسایی ایزوله های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز

در این تحقیق، نمونه برداری به وسیله سوآپ استریل مرطوب از بینی و حلق (بخش فوقانی تنفسی) افراد پرسنل بیمارستانی به‌طور تصادفی انجام شد. نمونه‌ها پس از تهیه، در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل به آزمایشگاه منتقل و در طی ۲ ساعت پس از انتقال به آزمایشگاه و بر روی محیط کشت بلاد آگار(مرک آلمان) کشت داده شدند. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. از کلنی‌های رشد کرده، رنگ‌آمیزی گرم، تست های کاتالاز، همولیز و تست حساسیت باسیتراسین انجام شد. باکتری‌های استرپتوکوکوس شناسایی و جهت تست آنتی‌بیوگرام و سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند(Ahmed et al., 2019). از روش دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید برای شناسایی ایزوله‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف استفاده شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها غلظتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید و بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار(مرک آلمان) به صورت یکنواخت کشت داده شد . دیسک‌های سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک با فاصله ۲۰ میلی‌متر از یکدیگر روی محیط کشت قرار داده شد. ایزوله‌هایی‌که قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی ۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک داشته باشند، به عنوان باکتری واجد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا ESBL، در نظر گرفته شدند (۶).

بررسی عصاره متانولی جوز هندی بر جدایه‌های مولد بتالاکتاماز

دراین آزمایش، از روش انتشار چاهک استفاده شد (۸،۷). از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند، کشت به روش یکنواخت از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز انجام شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. از غلظت‌های ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ تهیه شده در حلال دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر میزان ۲۰ میکرولیتر در هر حفره ریخته شد و سپس کشت‌ها در دمای ۳۷

درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از دوره گرمخانه‌گذاری، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی متر اندازه‌گیری شد حداقل غلظت ممانعت از رشد، تعیین گردید. از محلول دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق، ۲۰ ایزوله *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف با مشخصه کوکسی‌های گرم‌مثبت، با آرایش تکی، دوتایی، زنجیره‌ای، کاتالاز منفی، همولیز کامل و تست باسی تراسین مثبت شناسایی شدند و بر اساس نتایج دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید شناسایی گردید. از ۴۰ جدایه استرپتوکوکی،۲۰ مورد (۵۰درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. تاثیر عصاره متانولی دانه جوزهندی در غلظت‌های مختلف نسبت به ۲۰ جدایه *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدول ۱ و نمودار۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی دانه گیاه جوزهندی بر***Streptococcus pyogenes*** مولد بتالاکتاماز به روش انتشار چاهک (اعداد جدول قطر هاله ممانعت از رشد را بر حسب میلی‌متر نشان می‌دهد)

غلظت(mg/ml)/ جدایه باکتری	۸۰	۴۰	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶
۱	۱۶	۱۵	۱۳	۱۰	–	–	–	–
۲	۱۵	۱۲	۱۱	۹	–	–	–	–
۳	۱۵	۱۴	۱۱	۹	–	–	–	–
۴	۱۴	۱۳	۱۱	۸	–	–	–	–
۵	۱۵	۱۴	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۱	–	–	–	–
۷	۱۶	۱۵	۱۳	۱۰	–	–	–	–
۸	۱۴	۱۳	۱۰	۸	–	–	–	–
۹	۱۴	۱۳	۱۳	۱۱	–	–	–	–
۱۰	۱۱	۱۰	۸	–	–	–	–	–
۱۱	۱۵	۱۴	۱۰	۸	–	–	–	–
۱۲	۱۳	۱۲	۱۰	–	–	–	–	–
۱۳	۱۴	۱۲	۱۱	۱۰	–	–	–	–
۱۴	۱۵	۱۴	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۱۵	۱۶	۱۴	۱۱	۱۰	–	–	–	–
۱۶	۱۶	۱۳	۱۱	۸	–	–	–	–
۱۷	۱۲	۱۰	۸	–	–	–	–	–
۱۸	۱۷	۱۵	۱۲	۱۰	–	–	–	–
۱۹	۱۳	۱۱	۱۰	–	–	–	–	–
۲۰	۱۵	۱۳	۱۱	۱۰	–	–	–	–

نمودار۱- پاسخ غلظت عصاره متانولی دانه جوزهندی نسبت به جدایه‌های *Streptococcus pyogenes* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

یافته‌ها نشان داد که ۵۰ درصد از جدایه‌های مورد بررسی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند و همچنین عصاره متانولی جوزهندی در غلظت‌های۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری‌های استرپتوکوکی مولد بتالاکتاماز مؤثر واقع شد. میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد، ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. با عنایت به نتایج حاصله می‌توان گفت عصاره متانولی گیاه جوزهندی در غلظت‌های اندک دارای تأثیرات ضدباکتریایی بسیار مطلوب بر علیه جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد بررسی بوده است. ازاین‌رو می‌توان این‌چنین نتیجه گرفت که با شناسایی ترکیبات مؤثر و خالص موجود در این گیاه می‌توان در جهت تهیه و تولید مواد ضدباکتریایی مناسب علیه برخی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بخصوص باکتری مورد مطالعه گام برداشت.

افزایش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدمیکروبی باعث بروز مشکلاتی در زمینه درمان عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های بیمارستانی شده است. به‌طور مثال بر اساس تحقیقات انجام شده، *Streptococcus pyogenes* به دلیل دارا بودن فاکتورهای متعددی که می‌توان در بیماری‌زایی باکتری دخالت داشته باشد، یکی از مهاجم‌ترین پاتوژن‌ها محسوب می‌شود. گزارشات بالینی اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام *Streptococcus pyogenes* را با جهش در پروتئین اتصال‌دهنده پنی‌سیلین (PBP) PBP2x مرتبط کرده است (۹). در راستای مطالعه حاضر، سه نوع عصاره اتانولی، استونی و آبی جوزهندی با سوسپانسیون استوک باکتریایی استاندارد، با محیط نوترینت آگار استریل مخلوط شد و پس از گذشتن دوره انکوباتور قطر هاله بازدارنده رشد اندازه گیری گردید. سه نوع عصاره (اتانول، استون، آبی) برای فعالیت ضد باکتریایی در برابر چهار گونه باکتری استاندارد با نام‌های *P.aeruginosa ,E.coli, S.aureus ,B.subtilis* مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره متانولی و استونی فعالیت ضدباکتریایی بالایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند و قطر منطقه بازدارنده در برابر *S.aureus* به ۲۵ میلی‌متر رسید اما عصاره آبی هیچ فعالیت باکتریایی علیه آن گونه‌های باکتریایی نشان نداد (۱۱). در تحقیقی دیگر، که با موضوع شاخص‌های قدرت عصاره کلروفرمی جوزهندی در برابر پاتوژن‌های غیر بالینی و بالینی در انسان صورت گرفت، مشخصات ضدمیکروبی عصاره جوزهندی ارزیابی کردند. عصاره حلال‌های مختلف برای فعالیت ضدمیکروبی در برابر سویه‌های بالینی و مرجع، با استفاده از روش انتشار دیسک و چاهک و تکنیک‌های میکرو رقیق‌سازی مورد آزمایش قرار دادند. عصاره کلروفرمی قدرت ضدمیکروبی را در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت با حداقل غلظت بازدارنده نشان داد (۱۲). همچنین محققی دیگر، پتانسیل شیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جوزهندی را بررسی کرد و چنین مشاهده شد که عصاره

استون بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را نشان داده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالا به علت یکی از ویژگی‌های آلفا-پینن، میرسن، ۸ و ۱-سینئول، کارواکرول، ترپینن-۴-ول، اورژنول و ایزویورژنول گزارش شد. این تحقیق به شدت از اهمیت قومی و دارویی جوزهندی پشتیبانی می‌کند و نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی جوزهندی می‌تواند در پیشگیری و کند کردن پیشرفت بیماری‌ها و عفونت‌های مختلف توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا فرصت‌طلب مفید باشد (۱۳).

نتیجه گیری کلی

ازآنجایی‌که همه‌گیری عفونت‌های استرپتوکوکی ممکن است در بخش‌های مختلف جامعه اعم از بیمارستانی و غیر بیمارستانی بروز نمایند بررسی شیوع این باکتری‌ها به‌خصوص بررسی و شناسایی ناقلین این باکتری‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است و نظر به اینکه عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها و افزایش مقاومت این عفونت‌ها منجر به افزایش عوارض ناشی از آن‌ها و نیز مرگ‌ومیر می‌شود، کنترل این عفونت اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت عصاره متانولی گیاه جوزهندی دارای تأثیرات ضدباکتریایی بسیار مطلوب بر علیه جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد بررسی بوده است. لذا پس از جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره مذکور، بررسی مکانیسم های اعمال اثر ضدباکتریایی برای درک بهتر اثربخشی گیاه جوزهندی و هدایت مطالعات بعدی جهت کاربردی شدن تحقیقات مورد نیاز می باشد.

منابع

1. Lyer, RN. 2022. 7.02- Beta lactam. Comprehensive pharmacology. 3-63.
2. Taghinejad, J. Barati, B. Sadeghi, A.2018. A study of the drug resistance pattern of Group B Sreptococcus isolated from urinary samples in the city of Salmas during the year 2015.NCMBJ. 8(30):79-84.
3. Johnson, AF. LaRock,Ch N.2021.Antibiotic treatment,mechanisms for failure,and adjunctive therapies for infection by group A Streptococcus.Frontiers.V:12.
4. Rojas, J. Ochoa, V. Ocampo, S. Munoz, J.2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombia folkloric medicin: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. BMC complementary and alternative medicine. 62.
5. Ashokkumar, K. Simal-Gandara, J. Murugan, M. Dhanya, MK. Pandian, A.2022. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities. Phytotherapy Research.36(7):2839-51.
6. Dhara, L. Tripathi, A.2020. The use of eugenol in combination with cefotaxime and ciprofloxacin to combat ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. Journal of Applied Microbiology. 129(6):1566-76.
7. Hassan, A. Ullah, H.2019, Antibacterial and antifungal activities of the medicinal plant veronica biloba. Journal of chemistry. 1-7.
8. Shahabinejad, S. Kariminik, A.2019. Antibacterial activity of methanol extract of Lawsonia inermis against uropathogenic bacteria. MicroMedicine. 7(2):31-6.
14.
9. Hayes, A. Lacey, JA. Morris, JM. Davies, MR. Tong, SYC.2020. Restricted Sequence Variation in *Streptococcus pyogenes* Penicillin binding proteins. Clinical Science and Epidemiology. 5(2):1-6.
10. Ibrahim, KM. Naem, RK. Abd-Sahib, AS.2013. Antibacterial activity of nutmeg (Myristica fragrans) seed extracts against
12.
antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). Journal of genetic engineering and biotechnology. 11(1):25-31.
.
12. Ahmed, SH. Tolba, S. Al Zawahry, YA.2019, Evaluation of the role of bla genes in beta lactam and methicillin resistant Staphylococcus aureus. Egyptian Journal of Botany. 59(1):29-38.
13. Gupta, AD. Bansal, VK. Babu, V. Maithil, N.2013. Chemistry antioxidant and

Investigating the antibacterial effects of methanolic extract of *Myristica fragrans* against broad-spectrum β-lactamase-producing *Streptococcus pyogenes* isolates

Elham Nikouie[1], Ashraf Kariminik[2*]

1. M.Sc.Graduate of Microbiology, Faculty of basic sciences, Islamic Azad University, kerman Branch, kerman, Iran
2. Department of Microbiology,Islamic Azad University, Kerman Branch, kerman, Iran

***Corresponding author Email:** *a.kariminik@iauk.ac.ir*

Abstract

The increasing development of antibiotic resistance of bacteria has provided the basis for replacing antimicrobial agents with plant origin and with less side effects. This research is a type of laboratory study that was conducted with the aim of determining the antibacterial effect of *Myristica fragrans* on Streptococcus isolates beta lactamase producing antibiotics. The methanol extract of the plant was prepared by maceration method. The extract was filtered with Whatman No.1 paper and concentrated by rotary evaporator system. Different concentrations of 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 of the extract were prepared in DMSO: Methanol (1:1v/v) solvent. Identification of beta-lactamase producing isolates was done by phenotypic method with cefotaxime antibiotic discs and cefotaxime / clavulanic acid combined disc. Antibacterial activity against 40 isolates of beta-lactamase-producing isolates was investigated by agar wells diffusion method. After incubation for 24 hours at 37°C, the sensitivity of bacteria was determined by measuring the diameter of the growth inhibition zone. Based on the results, out of 40 *Streptococcus pyogenes* bacteria, 50% of isolates were beta-lactamase producers, respectively. All isolates of *Streptococcus pyogenes* showed sensitivity to *Myristica fragrans* extract, and the average of minimum growth inhibition concentration to beta-lactamase-producing *Streptococcus pyogenes* was 10 mg/ml. Due to increasing antibiotic resistance, it seems that *Myristica fragrans* extract can be used against beta-lactam-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in controlling infections, and in this regard, isolation and identification of the effective substances of the plant extract it is suggested.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, Beta-lactamase, *Myristica fragrans*.

بررسی شیوع ژن های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از نمونه های غذایی

محمدرضا صائبی[1]، فهیمه نوربخش[2]*، حسین خدابنده[3]

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

۲. مرکز تحقیقات سم شناسی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

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

***نویسنده مسئول**: *Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com*

چکیده

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (*L.monocytogenes*) گونه‌ای از باکتری‌های بیماری‌زاست که موجب عفونت لیستریوزیس می‌گردد. این باکتری بی‌هوازی اختیاری است و قادر به زنده ماندن، در بود و نبود اکسیژن است و به عنوان عامل ایجاد کننده طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات است. مصرف لبنیات، گوشت و سبزیجات آلوده مهم ترین منبع انتقال آلودگی بحساب می آید. مطالعات محدودی از میزان مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* وجود دارد. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی فراوانی و میزان مقاومت در نمونه های مورد ارزیابی دارد. در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی (شامل شیر، پنیر و...) و ۵۰ نمونه سبزیجات (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بودند. سروتایپینگ سویه های جدا شده با استفاده از آنتی سرم های تجاری O و H لیستریا مونوسیتوژنز و مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده با روش آگلوتیناسیون لامی و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی انجام شد. از روش PCR استاندارد به منظور تشخیص ژن‌های *ermA, ermB, strA, tetS, tetA* و *ermC* در سویه ها استفاده شد. بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H لیستریا مونوسیتوژنز با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیش‌ترین مقاومت دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله‌های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. بیشترین ژن های مورد ارزیابی مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* به ترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود. شیوع سایر ژن های لیستریا مونوسیتوژنز در مورد ارزیابی در این مطالعه شامل *tetA* (۱۷درصد)، *tetS* (۲/۵درصد)، *ermB* (۱۰/۷درصد) و *ermC* (۲/۱درصد) بود.

واژه های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، مواد غذایی، واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون، لیستریوزیس، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

جنس لیستریا باکتری های گرم مثبت هوازی اختیاری می باشد که بعنوان یک انگل درون سلولی در پستانداران عمل می‌کند. تا سال ۱۹۹۲، ۱۰ گونه شناخته شده از لیستریا گزارش شده بود، که هر کدام شامل دو زیرگونه بود (۱, ۲). تا سال ۲۰۲۰، ۲۱ گونه شناسایی شدکه به طور گسترده ای در محیط پخش شده اند. این باکتری ها را می توان از مدفوع حیوانات خاک فاضلاب، پوشش گیاهی و آب جدا کرد. این جنس به افتخار پیشگام بریتانیایی جراحی استریل جوزف لیستر نامگذاری شده است(۳). گونه های لیستریا گرم مثبت، میله ای شکل و به صورت اختیاری بی هوازی هستند و اندوسپور تولید نمی‌کنند. نشان داده شده است که این باکتری ها در روده انسان و حیوانات نیز حضور دارند و در این میان تنها گونه های *لیستریا ایوانوئی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* (*L.monocytogenes*) برای انسان و حیوان بیماری زا هستند. پاتوژن اصلی انسان در جنس لیستریا، گونه ی *لیستریا مونوسیتوژنز*

است که می‌تواند عامل بیماری لیستریوزیس بعنوان یک بیماری کشنده برای گروه های حساس جامعه مانند خانم های باردار بحساب آید (۴). لیستریوزیس می تواند باعث بیماری جدی در زنان باردار، نوزادان، بزرگسالان با سیستم ایمنی ضعیف و افراد مسن شود و ممکن است باعث ایجاد گاستروانتریت در افراد دیگری شود که به شدت آلوده شده اند. لیستریوز یک بیماری جدی برای انسان است. شکل آشکار این بیماری دارای میزان مرگ و میر در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد است. دو تظاهرات بالینی اصلی سپسیس و مننژیت می باشند. دوره کمون می تواند از سه تا ۷۰ روز متغیر باشد(۵،۶). طیف وسیعی از علائم برای لیستریوزیس وجود دارد. بسته به شدت بیماری، علائم ممکن است از چند روز تا چند هفته طول بکشد. علائم خفیف ممکن است شامل تب، درد عضلانی، حالت تهوع، استفراغ و اسهال باشد (۶, ۷). اگر شکل شدیدتر لیستریوزیس ایجاد شود، علائم ممکن است شامل سردرد، سفتی گردن، گیجی، از دست دادن تعادل و تشنج باشد. افراد آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* ممکن است علائم را در چند ساعت یا تا دو تا سه روز پس از خوردن غذای آلوده مشاهده کنند. شکل‌های شدیدتر لیستریوز ممکن است بین سه روز تا سه ماه طول بکشد. با توجه به دامنه شدت بیماری، افراد در صورت مشکوک بودن به ایجاد علائمی شبیه به عفونت *لیستریا مونوسیتوژنز* باید با ارائه دهنده مراقبت های بهداشتی خود مشورت کنند (۸،۹). گاستروانتریت غیر تهاجمی می تواند در بزرگسالان دارای ایمنی مناسب ظاهر شود و معمولاً باعث مننژیت آتیپیک، سپتی سمی و گاستروانتریت تب دار می شود که با تب و اسهال آبکی به مدت ۲ تا ۳ روز که اغلب با سردرد و کمردرد همراه است مشخص می شود. این علائم معمولاً خود محدود شونده هستند و می توانند در مدت کوتاهی بدون مراجعه به پزشک برطرف شوند و متعاقباً منجر به عدم تشخیص و یا گزارش موردی خواهند شد(۱۰). نشان داده شده است که لیستریا را می توان در خاک یافت که می تواند منجر به آلودگی سبزیجات شود. حیوانات می توانند ناقل باشند. لیستریا در گوشت های نپخته، سبزیجات نپخته، میوه ها از جمله طالبی، سیب، شیر پاستوریزه یا غیرپاستوریزه، غذاهای تهیه شده از شیر، و غذاهای فرآوری شده یافت شده است. پاستوریزاسیون و پخت کافی، لیستریا را از بین می برد (۱۱،۱۲). با این حال، آلودگی ممکن است پس از پخت و پز و قبل از بسته بندی رخ دهد. به عنوان مثال، کارخانه های فرآوری گوشت که غذاهای آماده برای خوردن تولید می‌کنند، مانند هات داگ و گوشت های اغذیه فروشی، باید از سیاست ها و رویه های بهداشتی گسترده ای برای جلوگیری از آلودگی لیستریا پیروی کنند(۱۳،۱۴). *لیستریا مونوسیتوژنز* معمولا در خاک، آب رودخانه، فاضلاب، گیاهان و غذا یافت می شود. لیستریا عامل لیستریوزیس، یک بیماری نادر اما بالقوه کشنده است(۱۵). میزان مرگ و میر در افراد مبتلا به نوع شدید از عفونت لیستریوزیس، ممکن است به ۲۵درصد نزدیک شود که در مقایسه، میزان مرگ و میر سالمونلوزیس کمتر از ۱درصد تخمین زده شده است(۱۶, ۱۷). موارد لیستریوزیس انسانی و تعداد موارد شیوع بالا که منجر به مرگ و میر بسیاری شد در بسیاری از کشورها به طور قابل توجهی افزایش یافته است.این باکتری باعث ایجاد لیستریوزیس با پیامدهای بالینی شدید مانند مننژیت، سپتی سمی و سقط جنین همراه می باشد. این بیماری ممکن است به صورت مننژیت ظاهر شود یا به دلیل توانایی آن در نفوذ به لایه اندوتلیال جفت، نوزادان را مبتلا کند. بنابراین آلودگی مواد غذایی، خطر قابل توجهی برای سلامتی انسان دارد. اطلاعات کمی در مورد آلودگی فراورده های غذایی گونه های مختلف لیستریا در ایران وجود دارد. نشان داده شده است که گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* مقاوم بوده و می‌تواند در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (۳۹,۲ درجه فارنهایت) رشد کند (۱۸).

لیستریا مونوسیتوژنز یک پاتوژن مهم غذایی است که ممکن است در شیر و محصولات لبنی وجود داشته باشد. هر چه غذاهای آماده در یخچال آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* مدت بیشتری در یخچال نگهداری شوند، فرصت بیشتری برای رشد این پاتوژن ایجاد خواهد شد. برای کند کردن یا جلوگیری از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* یخچال را روی ۴۰ درجه فارنهایت (۴

درجه سانتیگراد) و فریزر را روی ۰ درجه فارنهایت (۱۸- درجه سانتیگراد) قرار دهید. کنترل رشد باکتری با روش‌های مختلف حاصل می‌شود. این روش‌ها شامل فرمول‌بندی جدید فرآورده‌ها به‌نحوی که یک یا بیشتر از عوامل موثر رشد باکتری (مانند pH : فعالیت آبی، وجود ترکیبات بازدارنده) تغییر داده شود به گونه‌ای که امکان رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* در مواد غذایی وجود نداشته باشد (۱۹). برای حصول اطمینان از اینکه پیش از مصرف فرآورده هیچگونه رشد قابل‌توجه وجود نداشته است، کنترل دقیق دما به‌گونه‌ای که دمای مواد غذایی آماده خوردن هرگز از ۶ درجه سانتی‌گراد بیشتر نشود (ترجیحاً ۴-۲ درجه) و یا کاهش مدت نگهداری مجاز در دمای یخچال و یا سردخانه ضروری است (۲۰،۲۱). تعداد زیادی از مواد غذایی آماده ی خوردنی که با لیستریوز ارتباط داده می‌شوند، در فرآیند تولید، دارای یک مرحله ازبین برنده لیستریا (*Listericidal*) هستند. اکثر باکتری های لیستریا قبل از اینکه قادر به ایجاد عفونت باشند توسط سیستم ایمنی مورد حمله قرار می گیرند. با این حال، آنهایی که از پاسخ اولیه سیستم ایمنی فرار می کنند، از طریق مکانیسم های درون سلولی پخش می شوند، که این مکانیسم ها باکتری را از عوامل ایمنی در گردش (AMI) محافظت می کند. لیستریا برای تهاجم، جذب فاگوسیتی ماکروفاژها را با بیان D-گالاکتوز در اسیدهای تیکوئیک خود که در نهایت به پلی ساکاریدهای ماکروفاژ متصل می شود، القا می‌کند (۲۴-۲۲). نشان داده شده است که *لیستریا مونوسیتوژنز* از پروتئین های مختلف میزبان از جمله برخی از اینترنالین ها برای چسبیدن و حمله به سلول های میزبان استفاده می کند. در میزبان های آلوده *لیستریا مونوسیتوژنز* توانایی القای ورود خود را به سلول های میزبان افزایش می دهد. هنگامی که این باکتری در واکوئل فاگوسیتیک داخل سلولی قرار گرفت، لیستریولیزین ها و فسفولیپازهای مختلفی ترشح می کند که به باکتری اجازه می دهد غشای واکوئولی را لیز کرده و از مرگ سلولی جلوگیری کند (۱۴). متعاقبا، سلول های مجاور از طریق برآمدگی های غشای پلاسمایی مورد تهاجم قرار گرفته اند و در نتیجه گسترش سلول به سلول رخ می دهد. از طریق این چرخه، *لیستریا مونوسیتوژنز* می تواند از یک سلول میزبان به سلول دیگر، بدون قرار گرفتن در محیط خارج سلولی حرکت کند. بنابراین به سیستم ایمنی سلول T انسان می‌گریزد (۸،۲۵). سلول های مورد حمله می-توانند از سد اپیتلیوم روده و همچنین سایر بافت ها و اندام ها مانند کبد عبور کنند (۲۶). اکثر باکتری ها می توانند در کبد به دام بیفتند و پس از آن برخی از باکتری ها به سرعت وارد سیستم خونی شده و می توانند به غدد لنفاوی مزانتریک حمله کنند. اگر عفونت در مرحله ای که باکتری در کبد است کنترل نشود، به عنوان مثال، به دلیل ضعف شدید سیستم ایمنی، یک باکتریمی ثانویه ایجاد می شود. اتصال دهنده های مهم دیگر، اینترنالین ها هستند. لیستریا از اینترنالین A و B برای اتصال به گیرنده های سلولی استفاده می کند. اینترنالین A به E-cadherin متصل می شود، در حالی که اینترنالین B به گیرنده های Met سلول متصل می شود. اگر هر دوی این گیرنده‌ها تمایل کافی به اینترنالین A و B لیستریا داشته و می‌توانند از طریق مکانیسم غیرمستقیم به سلول حمله کنند. لیستریا در خارج از بدن دارای تحرک به وسیله تاژک دار است که گاهی اوقات به عنوان "حرکت غلتشی" توصیف می شود، این در حالی است که دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رشد تاژک را متوقف می‌کند (۱۵،۲۷).

در دهه های گذشته چندین مورد شیوع لیستریوزیس از سراسر جهان چون ،کانادا، انگلستان ایالات متحده آمریکا، فرانسه و دیگر کشورها گزارش شده است. براساس مطالعات اخیر، راه انتقال اصلی *لیستریا مونوسیتوژنز* به انسان از طریق ناخالصی محیطی موجود در مواد غذایی آماده مصرف است. استفاده از داروهای ضد میکروبی درمان اصلی لیستریوزیس است در حال حاضر ترکیبی از آنتی بیوتیک های آمپی سیلین یا پنی سیلین G در کنار آمینوگلیکوزید به عنوان درمان لیستریوزیس توصیه می شود. به طور کلی اغلب آنتی بیوتیک ها به جز فسفومایسین و سفالوسپورین ها بر گونه های لیستریا موثر هستند (۲۸،۲۹). در حال حاضر ترکیبی از آنتی بیوتیک های آمپی سیلین یا پنی سیلین

G در کنار آمینوگلیکوزید به عنوان درمان بیماران مبتلا به لیستریوزیس توصیه می شود. درمان های خوراکی در موارد با شدت کمتر ممکن است شامل آموکسی سیلین یا اریترومایسین باشد. با این وجود مطالعات متعددی جهت ارزیابی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در *لیستریا مونوسیتوژنز* از محیط زیست و مواد غذایی گزارش شده است. نشان داده شده است که تجویز بیش از حد آنتی بیوتیک در خوراک دام می تواند به مقاومت ضد میکروبی این گونه باکتریایی کمک کند (۳۰،۳۱).

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های پس از جداسازی به محیط کشت غنی کننده TSB منتقل شدند. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی (شامل شیر، پنیر و...) و ۵۰ نمونه سبزیجات (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بودند. انتقال نمونه ها بدون آسیب به ظرف حاوی نمونه در اسرع وقت جهت اقدامات لازم جداسازی و ارزیابی نمونه لیستریا در آزمایشگاه میکروبیولوژی انجام شد.

غنی سازی، کشت و شناسایی مورفولوژیک

جداسازی و شناسایی گونه های لیستریا با استفاده از روش استاندارد شرح داده شده در BAM-FDA Food and Drug Administration-(Bacteriological Analytical Manual) انجام شد. در این روش ۲۵ گرم از هر نمونه غذایی به ۲۲۵ میلی لیتر از محیط براث غنی کننده (Buffered *Listeria* Enrichment Broth) BLEB اضافه شد. نمونه ها به مدت ۴ ساعت در محیط غنی کننده لیستریا در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گذاری شدند. عوامل انتخابی شامل (آمفوتریسین و نالیدیکسیک اسید به محیط های غنی کننده مد نظر اضافه شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مجددا انکوبه گردید. یک لوپ از نمونه مد نظر در محیط غنی BLEB در محیط های پالکام، آکسفورد و *Listeria* CHROMagar (ساخت Merck، آلمان) به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. کلنی های سبز متمایل به سیاه در محیط پالکام آگار به عنوان کلنی های مشکوک *لیستریا مونوسیتوژنز* در نظر گرفته شدند. کلنی های مشکوک با استفاده از تست ها ی بیوشیمیایی (رنگ آمیز ی گرم، آزمایش کاتالازو اکسیداز، آزمایش تحرک و تخمیر گلوکز، گزیلوز، رامنوز، مانیتول، آلفا-متیلD- مانوپیرانوزید، همولیز و CAMP تایید شدند.

سروتایپینگ جدایه های *لیستریا مونوسیتوژنز*

سروتایپینگ سویه های جدا شده با استفاده از آنتی سرم های تجار ی O و H لیستریا مونوسیتوژنز و مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده با روش آگلوتیناسیون لامی انجام شد. برای انجام تست سرولوژی ابتدا یک قطره از آنتی سرم برروی لام گذاشته شد و چند کلنی خالص شده از کشت ۱۸ ساعته باکتری لیستریا در آنتی سرم مخلوط شد. در صورت آگلوتینه شدن قطره آنتی سرم پس از یک دقیقه، سروتایپ باکتری مورد نظر مورد شناسایی قرار می‌گرفت.

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی

به منظور انجام این آزمایش از روش استاندارد Disk-diffusion (1966) Kirby-Bauer و طبق پروتوکل استاندارد CLSI(۲۰۱۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش تعداد ۳-۲ عدد کلنی از هر کشت خالص در ۲ میلی لیتر محیط مولرهینتون براث تلقیح شد و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. سپس کدورت آنها با لوله ۰،۵ مک فارلند مقایسه شد برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (µg ۱۰)، اریترومایسین (µg ۱۵)، پنی سیلین (µg ۱۰)، تتراسایکلین (µg ۳۰)، تری متوپریم (µg ۵)، سولفامتوکسازول (µg ۲۵)، سیپروفلوکساسین (µg ۵)، جنتامایسین (µg ۱۰)، کلرامفنیکل (µg ۳۰)، استرپتومایسین (µg ۱۰) و کوتریماکسازول (µg ۳۸SMX ۱۰ µg TMP) (UK ,Co MAST) مورد استفاده قرار گرفتند. پلیت ها در دمای ۳۵ درجه

سانتیگراد بـه مدت ۲۴ ساعت انکوبـه شـدند. از *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC۱۵۳۱۳ و *استافیلوکوکوس اورئـوس*ATCC۲۹۲۱۳ به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

شناسایی ژن های مقاومت از طریق PCR

از روش PCR استاندارد به منظور تشخیص ژنهای *ermA*, *ermB*, *strA*, *tetS*, *tetA* و *ermC* در سویه ها استفاده شد. از کیت استخراج Roche Co, New York, USA) DNA) برای استخراج محتوای ژنتیکی سویه ها استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از طریق NanoDrop ND-1000 اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE USA) مورد بررسی قرار گرفت. توالی و اندازه پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر در PCR در جدول ۱ آمده است.

در مراحل مختلف PCR مخلوط واکـنش (در حجـم کلـی ۲۵ µl) شامل ۱ µl DNA استخراج شده بـا غلظـت ۱۰ µg/ml، ۱۳,۳ µl آب مقطر استریل ۰,۷ µl هـر پرایمـر بـا غلظـت ۱۰ pmol/µL و ۱۰ µL مســترمیکس1x (Ampliqon Co Denmark) مــورد استفاده قرا گرفت.

پس از انجام واکنش، محصولات PCR در ژل آگاروز ۱,۵٪ با توان ۱۰۰V الکتروفورز شدند. محصولات حاصل از الکتروفورز با استفاده از دستگاه PCR products Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصولات PCR در مقایسه با مارکر لـدر 100 bp USA به عنوان مارکر رفرنس اندازه DNA مـورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده تشخیص ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیستریا مونوسیتوژنز

ژن	توالی پرایمر(5′→3′)	اندازه محصول) جفت بازا
ermA)	F: TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT R: CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	139
ermB	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R:AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639
strA	F:CTTGGTGATAACGGCAATTC R: CCAATCGCAGATAGAAGGC	572
tetS	F:TCCTTTGGGTAGTGGCATTC R: AAGCATTCGGAAATCTGCTG	420
tetA	F: GGCCTCAATTTCCTGACG R: AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	546
ermC	F: CAAAACATAATATAGAT R: CTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	641

نتایج

بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H لیستریا مونوسیتوژنز با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. تمام جدایه های با بالاترین مقاومت دارویی مربوط به سرواره های 1/2a و همه نمونه های جداسازی شده از گوشت متعلق به سروتیپ 1/2a بودند.

میزان مقاومت آنتی بیوتیکی

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش استاندارد Disk-diffusion(1966)Kirby-Bauer و طبق پروتوکل استاندارد CLSI و کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیشترین مقاومت

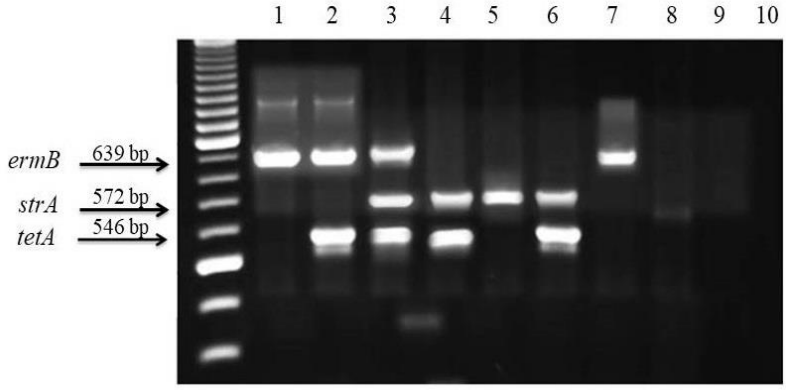
دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. نتایج آزمایشات میکروبی در آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که بیشترین میزان آلودگی و مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به نمونه های لبنی (۶۷درصد) و کمترین آن مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود. نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیتریا مونوسیتوژنز در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیستریا مونوسیتوژنز

آنتی بیوتیک	٪ مقاوم	٪ نیمه حساس	٪ حساس
استرپتومایسین	۸۹	۳	**۸**
کوتریماکسازول	۸۳	۱۱	**۶**
تتراسیکلین	۶۲	۴	**۳۴**
اریترومایسین	۴۵	۲	**۵۳**
پنی سیلین G	۲۳	۱۲	**۶۵**
آمپی سیلین	۱۴	۷	**۷۹**
تری متوپریم	۳۹	۱۵	**۴۶**
سولفامتوکسازول	۳۸	۱۶	**۴۶**
سیپروفلوکساسین	۲۶	۴۳	**۳۱**
جنتامایسین	۱۹	۳۵	**۴۶**
کلرامفنیکل	۱۳	۲۹	**۵۸**

نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون PCR

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین ژن های مورد ارزیابی مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* بترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود. شیوع سایر ژن های لیتریا مونوسیتوژنز در مورد ارزیابی در این مطالعه شامل *tetA* (۱۷درصد)، *tetS* (۲/۵درصد)، *ermB* (۱۰/۷درصد) و *ermC* (۲/۱ درصد) بود. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل۱- شیوع ژن های *ermB*، *strA*، *tetA* در بین سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز*

بحث

لیستریا به ویژه *لیستریا مونوسیتوژنز*، به عنوان یک باکتری بیماری زا از طریق غذا، به عنوان عامل اصلی و زمینه ساز بیماری های جدی در نظر گرفته می شود. لیستریوزیس در انسان و دام قابل تشخیص و جداسازی است که می‌تواند منجر به عفونت های تهدید کننده زندگی در شخص آلوده شود. تشخیص سریع و دقیق در شیر و محصولات لبنی، سبزیجات، گوشت، مرغ و محصولات غذاهای دریایی برای جلوگیری از انتشار آن از طریق زنجیره غذایی مورد نیاز است. در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های پس از جداسازی به محیط کشت غنی کننده TSB منتقل شدند. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی و ۵۰ نمونه سبزیجات بودند. انتقال نمونه ها بدون آسیب به ظرف حاوی نمونه در اسرع وقت جهت اقدامات لازم جداسازی و ارزیابی نمونه لیستریا در آزمایشگاه میکروبیولوژی انجام شد. بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H *لیستریا مونوسیتوژنز* با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. تمام جدایه های با بالاترین مقاومت دارویی مربوط به سرواره های 1/2a و همه نمونه های جداسازی شده از گوشت متعلق به سروتیپ 1/2a بودند. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیش‌ترین مقاومت دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. نتایج آزمایشات میکروبی در آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که بیشترین میزان آلودگی و مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به نمونه های لبنی (۶۷درصد) و کمترین آن مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود که بیشترین ژن های مورد ارزیابی مقاومت مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* بترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود.

با توجه به شیوع بالای نمونه های آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز، و اهمیت این باکتری مطالعات مختلفی به ارزیابی سویه های مقاوم به این باکتری پرداخته اند. ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی و الگوی ژن های مقاومت به کنترل آلودگی های ناشی از آن کمک می‌کند. در مطالعه مشابه توسط Tau و همکاران در سال ۲۰۱۴، جدایه ها به پنج سروتیپ تعلق داشتند که بیشترین فراوانی مربوط به سروتیپ 1/2a از لیستریامونوسیتوژنز بود. در این مطالعه نتایج، تنوع ژنتیکی پایینی را در بین جدایه ها، صرف نظر از منابع آنها، نشان داد که نشان می‌دهد کلون های غالب در محصولات غذایی مختلف گسترده هستند. در نتایج متفاوتی با مطالعه حاضر مقاومت به سفوتاکسیم (۳۰/۵درصد) و سیپروفلوکساسین (۱۳/۵درصد) غالب بود، در حالی که مقاومت به تتراسایکلین، تری متوپریم / سولفامتوکسازول و اریترومایسین کمتر مشاهده شد(۳۲). مطالعه مشابه دیگری به بررسی نمونه های آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز پرداخته است. در این مطالعه، لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از گوشت های آماده، مرغ خام و محصولات تازه با شناسایی سروگروه با استفاده از PCR ، ژنوتیپینگ با استفاده از الکتروفورز ژل میدان پالسی (PFGE) و تست حساسیت ضد میکروبی مشخص شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه پنج سروگروپ از لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شد. از ۱۶۷ جدایه، ۶۸ (۴۱درصد) به سروگروه 1/2b و 3b تعلق داشتند و ۵۳ نمونه (۳۲درصد) به سروگروه 4b و 4d متعلق بودند(۳۳). این درحالی است که بیشترین سروتایپ از نمونه های آلوده *لیستریا مونوسیتوژنز* مطالعه حاضر مربوط به سرواره های 1/2a بود. سروتایپینگ از بهترین روش های کلاسیک برای مطالعات اپیدمیلوژیک و گزارش های اسپورادیک به ویژه در نمونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* بحساب می آید. در مطالعه Mammina بیش‌ترین سروتایپ جدا شده از نمونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* مربوط به سروگروه 1/2a (۴۶/۳درصد) و کمترین میزان مربوط به سروتایپ 1/2b گزارش شده است. این میزان فراوانی با گزارش سروتایپ های مطالعه حاضر یکسان

است(۳۴). گزارش سروگروه های لیستریامونوسیتوژنز در مطالعه Guerini و همکاران با مطالعه حاضر متفاوت بوده و شایع ترین میزان سروتایپ را از گروه 1/2b گزارش کردند(۳۵). در مطالعه انجام شده توسط جلالی و همکاران در ایران، آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های گوشت یخ زده گزارش شده است. نتایج این مطالعه در راستای مطالعه حاضر در راستای احتمال آلودگی نمونه های گوشت به لیستریا مونوسیتوژنز است (۳۶). مطالعه مشابهی توسط Lambertz گزارشی از آلودگی ۴درصد نمونه های پنیر و ۱۲درصد نمونه های ماهی دارد که در مقایسه با نتایج حاصل از مقاله حاضر میزان کمتری از آلودگی را گزارش می کند (۳۷). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از ۵۰ نمونه جداسازی شده از سبزیجات کمترین میزان مقاومت مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود. که در راستای نتایج حاصل از مطالعه سلطان دلان و همکارن است که نشان دهنده افزایش آلودگی نمونه های سبزی خوردن، اسفناج و کلم بروکلی به *لیستریا مونوسیتوژنز* بخصوص در مناطق مختلف شمال تهران است. نتایج حاصل از این مطالعات بیانگر اهمیت گونه های مختلف باکتریایی به ویژه در فراورده های لبنی، گوشتی و سبزیجات است. از این رو رعایت بهداشت فردی و محیطی نقش موثری در کاهش آلودگی های اپیدمیولوژیکی ناشی از *لیستریا مونوسیتوژنز* دارد (۳۸). نتایج حاصل از پژوهش حاضر به مقاومت آنتی بیوتیکی حداقل در یک یا دو آنتی بیوتیک اشاره دارد. این میزان مقاومت به روش فنوتیپی با فراوانی ژن های حاصل از مقاومت به ویژه ژن *strA* و ژن *ermA* به روش PCR ارتباط مستقیمی دارد.

نتیجه گیری کلی

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به حضور سروگروه های مختل به ویژه سروتیپ 1/2a همخوانی دارد. وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های مختلف، گستردگی ژنی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع می تواند پتانسیل ایجاد خطر و شیوع لیستریوزیس را افزایش دهد. با توجه به مطالب گفته شده و میزان آلودگی به لیستریا، اجباری شدن استاندارد جستجوی لیستریا در مواد غذایی در ایران ضروری به نظر می رسد. همچنین تمهیدات لازم با دقت و حساسیت بالا جهت شناسایی و ارزیابی آلودگی *لیستریامونوسیتوژنز* به کار گرفته شود.

منابع

1. Kathariou, S., *Listeria monocytogenes virulence and pathogenicity, a food safety perspective*. Journal of food protection, 2002. 65(11): p. 1811-1829.

2. Jordan, K. and O. McAuliffe, *Listeria monocytogenes in foods.* Advances in food and nutrition research, 2018. 86: p. 181-213.

3. Gombas, D.E., et al., *Survey of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.* Journal of food protection, 2003. 66(4): p. 559-569.

4. Wiedmann, M., *Molecular subtyping methods for Listeria monocytogenes.* Journal of AOAC International, 2002. 85(2): p. 524-532.

5. Graves, L.M., B. Swaminathan, and S.B. Hunter, *Subtyping listeria monocytogenes*. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 2007. **161**: p. 283.

6. Ooi, S.T. and B. Lorber, *Gastroenteritis due to Listeria monocytogenes.* Clinical infectious diseases, 2005. 40(9): p. 1327-1332.

7. Pagliano, P., et al., *Listeria monocytogenes meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings.* Infez Med, 2016. **24**(2): p. 105-111.

8. Ramaswamy, V., et al ,*Listeria-review of epidemiology and pathogenesis.* Journal of Microbiology Immunology and Infection, 2007. 40(1): p. 4.

9. Siegman-Igra, Y., et al., *Listeria monocytogenes infection in Israel and review of cases worldwide.* Emerging infectious diseases, 20 :(۳)۸ .۰۲p. 305.

., تشخیص عفونت‌های باکتریایی؛ روش et al ۱۰.دره‌کردی, های سنتی و مولکولی: یک مرور سنتی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان, ۲۰۱۸. ۱۷(۹): p. 865-880.

11. Wing, E.J. and S.H. Gregory, *Listeria monocytogenes: clinical and experimental update.* The Journal of infectious diseases, 2002. 185(Supplement_1): p. S18-S24.

12. Fenlon, D., J. Wilson, and W. Donachie, *The incidence and level of Listeria monocytogenes contamination of food sources at primary production and initial processing.* Journal of Applied Microbiology, 1996. 81(6): p. 641-650.

13. Rouquette, C. and P. Berche, *The pathogenesis of infection by Listeria monocytogenes.* Microbiologia (Madrid, Spain), 1996. **12**(2): p. 245-258.

14. Letchumanan, V., et al., *A review on the characteristics, taxanomy and prevalence of Listeria monocytogenes.* Progress In Microbes & Molecular Biology, 2018. **1**(1.(

15. Low, J. and W. Donachie, *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis.* The Veterinary Journal, 1997. 153(1): p. 9-29.

۱۶.شیوایی, et al., بررسی شیوع ژن‌های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از نمونه‌های غذایی و بالینی. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران, ۲۰۱۹. ۲۹(۴): p. 322-328.

۱۷.آقاخانی, ش., et al., شیوع گونه‌های لیستریا در شیر خام عرضه شده در سطح شهر اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان, ۲۰۱۲. ۳۰(۲۰۴).

ج. احمد, لیستریوزیس (معرفی ۲ and۱۸.نسرین, ش.ف. مورد از بیمارستان حضرت رسول اکرم).

19. Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart, *Listeria monocytogenes: a multifaceted model.* Nature Reviews Microbiology, 2006. 4(6): p.۴۳۴-۴۲۳ .

20. Walsh, D., et al., *Antibiotic resistance among Listeria, including Listeria monocytogenes, in retail foods.* Journal of Applied Microbiology, 2001. 90(4): p. 517-522.

21. Yan, H., et al., *Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007.* International journal of food microbiology, 2010. 144(2): p. 310-316.

22. Drevets, D.A. and M.S. Bronze, *Listeria monocytogenes: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion.* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008. **53**(2): p. 151-165.

23. Sleator, R.D., C.G. Gahan, and C. Hill, *A postgenomic appraisal of osmotolerance in Listeria monocytogenes.* Applied and Environmental Microbiology, 2 ۰۰۳p. ۶۹(۱): 1-9.

24. Han, Y., Z. Sun, and W. Chen, *Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against Listeria monocytogenes.* Molecules, 2019. 25(1): p. 33.

25. Edelson, B.T. and E.R. Unanue, *Immunity to Listeria infection.* Current opinion in immunology, 2000. **12**(4): p. 425-431.

26. Pamer, E.G., *Immune responses to Listeria monocytogenes.* Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(10): p. 812-823.

27. Gasanov, U., D. Hughes, and P.M. Hansbro, *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review.* FEMS microbiology reviews, 2005. 29(5): p. 851-875.

28. Milillo, S.R., et al., *A review of the ecology, genomics, and stress response of Listeria innocua and Listeria monocytogenes.* Critical reviews in food science and nutrition, 2012. 52(8): p. 712-725.

29. Embarek, P.K.B., *Presence, detection and growth of Listeria monocytogenes in seafoods: a review.* International Journal of Food Microbiology, 1994. **23**(1): p. 17-34.

30. Nightingale, K., et al ,*Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment.* Applied and environmental microbiology, 2004. 70(8): p. 4458-4467.

31. Baquero, F., et al., *Ecogenetics of antibiotic resistance in Listeria monocytogenes* .Molecular microbiology, 2020. 113(3): p. 570-579.

32. Yu, T. and X. Jiang, *Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail food in Henan, China.* Food Control, 2014. **37**: p. 228-231.

33. Zhang, Y., et al., *Characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail foods.* International Journal of Food Microbiology, 2007. 113(1): p. 47-53.

34. Mammina, C., et al., *Characterization of Listeria monocytogenes isolates from human listeriosis cases in Italy.* Journal of Clinical Microbiology, 2009. 47(9): p. 2925-2930.

35. Guerini, M.N., et al., *Listeria prevalence and Listeria monocytogenes serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States.* Journal of Food Protection, 2007. **70**(11): p. 2578-2582.

36. Jalali, M. and D. Abedi, *Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran.* International journal of food microbiology, 2008. 122(3): p. 336-340.

37. Lambertz, S.T., et al., *Prevalence and level of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Sweden 2010.* International Journal of Food Microbiology, 2012. 160(1): p. 24-31.

38. Dallal, M., M. Zinjanab, and H. Rad, *Identification and frequency of Listeria monocytogenes in vegetables and ready to eat salads of Tehran, Iran.* Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2015. 20(2).

Investigating the prevalence of resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from food samples

[3] [2*], Hossein Khodabandeh [1], Fahimeh Nourbakhsh Mohammad Reza Saebi

1. PhD student of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. Research Center of toxicology, Vice Chancellor of Food and Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.

*** Corresponding author Email:** *Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com*

Abstract

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) is a type of pathogenic bacteria that causes listeriosis infection. This facultative anaerobic bacterium is able to survive in the presence and absence of oxygen and is the cause of a wide range of diseases in humans and animals. Consumption of contaminated dairy products, meat and vegetables is the most important source of contamination. There are limited studies of the antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* species. Therefore, this study aims to evaluate the frequency and level of resistance in the evaluated samples. In this descriptive cross-sectional study, 150 different samples were randomly collected from different regions of Isfahan province. The samples included 60 samples of meat, 40 samples of dairy products (including milk, cheese, etc.) and 50 samples of vegetables (including leek, watercress, radish and basil). The serotyping of the isolated strains was done using the commercial O and H antisera of *Listeria monocytogenes* and according to the manufacturer's instructions, using slide agglutination method and antibiotic resistance evaluation. Standard PCR method was used to detect *ermA*, *ermB*, *strA*, *tetS*, *tetA* and *ermC* genes in the strains. Based on the serological reaction, somatic antigens O and flagella H of *Listeria monocytogenes* with the corresponding antisera, most Listeria species (70%) belong to serotype 1.2a and the rest from serotype 1.2b (19%) and 4b (11 %) They were. The results of the microbial investigation showed that the highest drug resistance was related to streptomycin (89%) and the lowest drug resistance in the evaluated isolates was related to ampicillin (14%) and chloramphenicol (13%). The most evaluated genes were related to *strA* gene and *ermA* gene, with frequencies of 79.8% and 65.4%, respectively. The prevalence of other *Listeria monocytogenes* genes evaluated in this study included *tetA* (17%), *tetS* (2.5%), *ermB* (10.7%) and *ermC* (2.1%).

Key words: *Listeria monocytogenes*, food, polymerization chain reaction, listeriosis, antibiotic resistance.

تعیین الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن جداشده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد

امین روزبهی[1*]، فاطمه خداوردی پور[1]

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

[*] **نویسنده مسئول**: *amin.roozbehi.1370@gmail.com*

چکیده

جلوگیری از انتشار مقاومت‌های دارویی یکی از مسائل مهم در جامعه است. *اشریشیا کلی* یکی از شایع ترین عوامل باکتریایی جداشده از عفونت‌های ادراری و بیمارستانی می‌باشد. درمان عفونت‌های ناشی از آن بدلیل کسب ژن‌های مقاومت مشکل است. هدف از این مطالعه بررسی الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی اوروپاتوژنیک جداشده از بیماران دیابتی بود. در این مطالعه ۵۱ ایزوله بالینی *اشریشیا کلی* از بیماران دیابتی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی موردبررسی قرار گرفت. تایید ایزوله ها با استفاده از روشهای بیوشیمیایی و مولکولی بر اساس ردیابی ژن *16srRNA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیوژن و بررسی مولکولی ژن‌های مقاومت (*qnr*،*tet A*، *tet B, aac (3)IIa* و*sul1*) انجام شد. بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین (۶۶/۶۶ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین (۱/۹۶درصد) گزارش گردید. فراوانی ژن‌های *tet A*، *tet B*، *qnr*، *sul* 1 و *aac (3)IIa* به ترتیب ۶۸/۶۲ ، ۶۴/۷، ۲۹/۴۱، ۳۹/۲۱و ۲۹/۴۱ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و ژن‌های *tet A*، *tet B* ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید. تشخیص به موقع سویه‌های مقاوم در انتخاب درمان مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت، ضروری است. پیشنهاد می‌شود،بدلیل اهمیت درمان عفونت‌های ادراری، درمان با توجه به الگوی حساسیت و مقاومت منطقه صورت گیرد تا از ایجاد مقاومت دارویی و شکست‌های درمانی که منجر به عارضه دارشدن عفونت می‌گردد، جلوگیری شود.

واژه های کلیدی: اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک، الگوی فنوتیپی، بیماران دیابتی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری (UTIs) ، پس از عفونت‌های تنفسی، شایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی و دومین عفونت رایج در انسان و از عوامل اصلی مرگ‌ومیر می‌باشد(۱). در زنان شیوع بیشتری دارد و نیمی از زنان حداقل یک‌بار در طول زندگی خود این وضعیت را تجربه می‌کنند. اشریشیا کلی بیش از ۸۰-۹۰ درصد از مجاری ادراری اکتسابی در جامعه و ۳۰-۵۰ درصد از عفونت‌های رحمی اکتسابی در بیمارستان را تشکیل می‌دهد (۲). عفونت دستگاه ادراری شامل طیف وسیعی از اختلالات، ازجمله عفونت مثانه و عفونت کلیه است که به علت حضور میکروارگانیسم‌ها در دستگاه ادراری رخ می‌دهد. گونه‌های اشریشیا کلی که سبب ایجاد عفونت دستگاه ادراری می‌شوند، اشریشیا کلی اوروپاتوژنیک نامیده می‌شوند(۳). دیابت شیرین (DM) به دلیل عوارض و مرگ‌ومیر تبدیل به یک تهدید جدی برای بهداشت عمومی شده است. ارتباط بین دیابت شیرین و افزایش حساسیت به عفونت کاملاً مشهود است. ایمنی در بیماران مبتلابه دیابت به دلیل عملکرد لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر تغییر می‌کند، به‌ویژه در مواردی که اسیدوز، چسبندگی به لکوسیت ها ، کموتاکسی و فاگوسیتوز، عدم تعادل در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی درگیر در فعالیت باکتری‌کش نیز وجود داشته باشد(۶-۴). علاوه بر این ، سایر شرایط مانند اختلال عملکرد مثانه (تخلیه ناقص مثانه) ناشی از نوروپاتی دیابتی نیز ممکن است در افزایش خطر عفونت‌های ادراری نقش داشته باشد. شواهد نشان می‌دهد که عفونت دستگاه ادراری (UTI)شایع‌ترین عفونت باکتریایی در میان بیماران دیابتی است(۹-۷). در سال‌های اخیر، به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مانند بتالاکتام در برابر عفونت‌ها، سطح بالایی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک و باکتری‌های

تولیدکننده بتا لاکتاماز با طیف گسترده (ESBL) در حال شناسایی است(۱۰و۱۱). باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف قادر به هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم و آزترئونام می‌باشند(۱۲). ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری زا یکی از مشکلات درمانی جهانی است. در حال حاضر ، گزارش‌ها نشان می‌دهد که میزان مقاومت در باکتری‌های UPEC در حال افزایش است. اشریشیاکلی به دلیل وجود در طیف وسیعی از میزبان‌ها، شاخص مفیدی برای شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود که امکان ارزیابی و مقایسه مقاومت شیوع را در بین جمعیت‌های مختلف و ارزیابی انتقال حیوان به انسان را فراهم می‌کند (۱۳). UPEC با کمک ادهزین هایی مانند فیمبریای نوع ۱، A-fimbrial (afa)، ادهزین های p (pap) و ادهزین های S-fimbrial (sfa) به لایه سلول‌های اپیتلیال دستگاه ادراری متصل می‌شود. ژن‌هایی که فاکتورهای حدت را بیان می‌کنند، روی کروموزوم‌های باکتریایی، پلاسمیدها و حتی باکتریوفاژها قرار دارند و می‌توانند به‌صورت افقی یا عمودی بین باکتری‌ها منتقل شوند(۱۱). هدف از این مطالعه بررسی رابطه بین ژن‌های مقاومت و مشخصات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی UPEC جداشده از بیماران دیابتی در برخی از بیمارستان‌های شهرکرد بود.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر ۱۰۰ نمونه ادرار بیماران دیابتی مشکوک به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد جمع‌آوری گردید. مقدار۵ تا ۱۰ سی‌سی نمونه ادرار وسط توسط بیمار در ظروف استریل جمع‌آوری و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی و تشخیص نوع باکتری موردبررسی قرار گرفتند سپس جهت آزمایشات بیشتر به آزمایشگاه تحقیقات میکروب‌شناسی منتقل گردید.

به‌منظور جداسازی سویه‌های اشریشیا کلی، هرکدام از نمونه‌ها به‌طور مجزا بر روی محیط‌های افتراقی شامل ائوزین متیلن بلو و مک کانکی (مرک آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند، پرگنه‌های سبز متالیک با جلای فلزی رشد کرده در این محیط به‌عنوان باکتری *اشریشیا کلی* موردپذیرش قرار گرفتند. پلیت های دارای بیش از 10^5 CFU/ml به‌عنوان عفونت UTI در نظر گرفته شد همچنین از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی میکروبیولوژی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی نظیر TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده گردید. از سویه رفرنس اشریشیاکلی ATCC 25922 به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد (۱۴).

به‌منظور تشخیص قطعی پس از استخراج DNA ژنومی سویه‌ها از کشت ۲۴ ساعته در محیط لوریا برتانی براث (مرک آلمان) در ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد. استخراج طبق دستورالعمل کیت استخراج سیناژن (Cinna Pure DNAKIT-PR881613)(البرز، ایران) انجام گردید. و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. تعیین هویت قطعی با استفاده از ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* (۱۵) و همچنین برای تکثیر ژن‌های ، *tetA* و *tetB* (مقاومت به تتراسیکلین)، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac (3)IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفونامید ها) از توالی های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ تهیه‌شده از شرکت سینا ژن (تهران، ایران) و جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج‌شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید (جدول۱).

در نهایت برای انجام آزمایش PCR از حجم نهایی واکنش، یعنی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲۰۰ میکرومولار Mix dNTP (10mM)، ۱/۵ میلی مولار Mgcl2 (50mM)، ۱ میکرومول از هر پرایمرهای F و R، ۱/۲۵ واحد آنزیم Smar Taq DNA Polymerase سپس با آب مقطر ۲بار تقطیر شده استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمای PCR در جدول ۱ آورده شده است، با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف آلمان) برای ۳۰ سیکل انجام گرفت در نهایت جهت آشکار سازی، محصولات PCR در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شدند،

در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی باند های حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و یک کیلو جفت باز استفاده شد (۱۶).

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[4] طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارایه شده توسط شرکت پادتن طب) و سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای این منظور کدورت سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند (کدورتی معادل ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر) استاندارد گردید، با استفاده از سوآب پنبه ای استریل آغشته به سوسپانسیون به غلظت نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی انجام گردید و پس از ۱۵ دقیقه دیسک های آنتی‌بیوتیکی منتخب بر حسب CLSI شامل کوتریموکسازول (تری‌متوپریم+ سولفامتوکسازول)، آمیکایسین، سفتریاکسون، نیتروفورانتئین، سفالوتین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، تتراسایکلین، ایمی پنم، جنتامایسین (شرکت پادتن طب- ایران) با فاصله ۲ سانتی متر از یکدیگر بر روی سطح محیط قرار داده شد، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله های ممانعت از رشد توسط خط کش اندازه گیری شد. نتایج هرکدام از ایزوله ها برای دیسک های استفاده شده ثبت گردید (۱۷).

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده از آزمون مربع کای (Chi-Square test) و دقیق فیشر با نرم افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعات کاتالاز، اکسیداز، TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز بر روی نمونه‌های ادرار به دست آمده نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه ادرار جمع‌آوری شده، تعداد ۵۱ مورد (۵۱ درصد) اشریشیاکلی تشخیص داده شدند، از نظر دارا بودن ژن *16srRNA* مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. تمام جدایه های جداشده حامل این ژن بودند. از ۱۰۰ بیمار دیابتی مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ۷۰ نفر زن (۷۰درصد) و ۳۰ نفر مرد (۳۰درصد) بودند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین جنسیت و ابتلا به عفونت ادراری ارتباط معنی داری مشاهده گردید (p-value=0/012<0/05) نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر حسب جنسیت در جدول ۲ نشان داده شده است (جدول۲). مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت ادراری بیماران دیابتی در دو جنس در نمودار ۱ نشان داده شده است (نمودار۱).

آزمون Multiplex-PCR برای بررسی ژن‌های مقاومت ۵۱ جدایه اشریشیا کلی انجام گرفت. از ۵۱ ایزوله موردبررسی ژن *tet A* در ۳۵ ایزوله با فراوانی ۶۸/۶۲ درصد ، ژن *tet B* در ۳۳ ایزوله با فراوانی ۶۴/۷ درصد، ژن *qnr A* در ۱۵ ایزوله با فراوانی ۲۹/۴۱ درصد، ژن *sul* 1 در ۲۰ ایزوله با فراوانی ۵۰/۹۰ درصد و ژن *aac (3)IIa* در ۱۵ ایزوله با فراوانی۲۹/۴۱ درصدگزارش گردید. نتایج در جدول ۳ و نمودار۲ نشان داده شده است.

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین مقاومت آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و ژن‌های *tet A* و *tet B* ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید.

[4] Kirby Bauer

جدول۱- پرایمر های مورداستفاده جهت تکثیر ژن *16srRNA* و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی

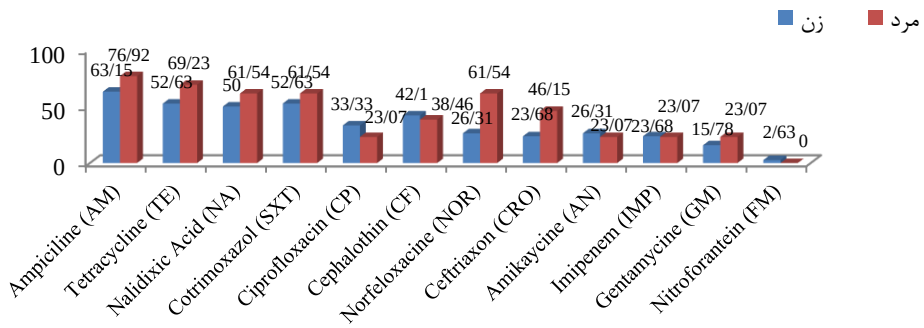
آنتی‌بیوتیک	ژن هدف	توالی پرایمر	طول محصول(bp)	دمای تکثیر	زمان	منبع
Tetracycline	*tetA*	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	۸۸۸	۵۵	۶۰S	۱۸
Tetracycline	*tetB*	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	۷۷۴	۵۵	۶۰S	۱۸
Fluoroquinolone	*qnrA*	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۱۶	۵۵	۶۰S	۱۹
Gentamicin	*aac (3)IIa*	CGGAAGGCAATAACGGAG TCGAACAGGTAGCACTGAG	۷۴۰	۵۵	۶۰S	۱۸
Sulfonamide	*Sul1*	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	۴۳۳	۶۵	۶۰S	۱۵
-	*16srRNA*	16S-F, GCGGACGGGTGAGTAATGT 16S-R, TCATCCTCTCAGACCAGCTA	۲۰۰	۵۵	۶۰S	۱۵

جدول ۲- تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلابه عفونت ادراری بر اساس جنسیت

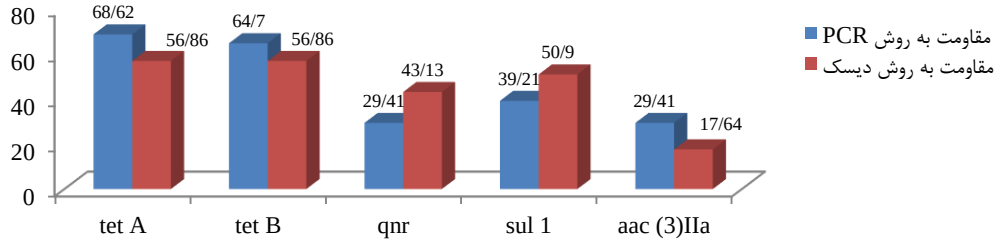
جنسیت	بیماران دیابتی مبتلابه UTI		بیماران دیابتی عدم مبتلا به UTI		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
زن	۷۰	۷۰	۱۱۰	۵۵	۰/۰۱۲
مرد	۳۰	۳۰	۹۰	۴۵	

جدول ۳- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

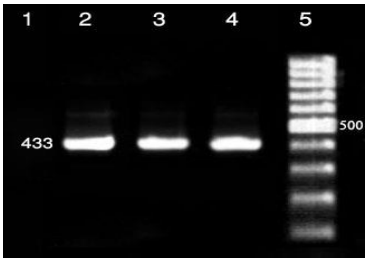
نوع ژن	آنتی‌بیوتیک	مقاومت به روش PCR	مقاومت به روش دیسک	p-value
tet A	تتراسایکلین	۳۵ (٪ ۶۲/۶۸)	۲۹(۸۶/۵۶ ٪)	۰/۰۰۰
tet B	تتراسایکلین	۳۳(٪ ۷/۶۴)	۲۹(٪۸۶/۵۶)	۰/۰۰۰
qnr	کینولون ها	۱۵(٪ ۴۱/۲۹)	۲۲(٪۱۳/۴۳)	۰/۳۵۶
sul 1	سولفونامیدها	۲۰(٪ ۲۱/۳۹)	۲۶(٪۹۰/۵۶)	۰/۳۵۶
aac (3)IIa	جنتامایسین	۱۵(٪ ۴۱/۲۹)	۹(٪۶۴/۱۷)	۰/۳۵۶



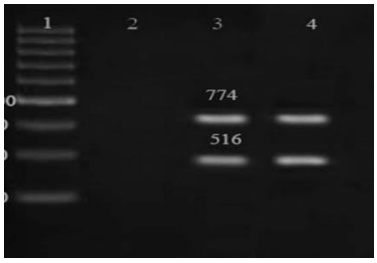
نمودار ۱- مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت ادراری بیماران دیابتی در شهرکرد در دو جنس زن و مرد



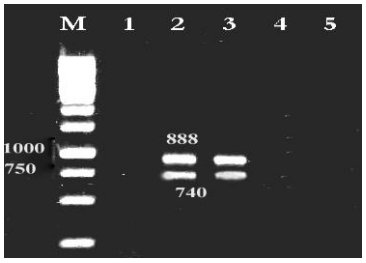
نمودار۲- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی*



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR. ستون ۵: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون های ۲ ، ۳ و ۴ باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *sul1*. ستون ۱: کنترل منفی



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۲: کنترل منفی، ستون های ۳ و ۴ باند ۷۷۴ جفت بازی مربوط به ژن *tetB*. و باند ۵۱۶ جفت بازی مربوط به ژن *qnr*



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR. به ترتیب از چپ، ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. ستون ۱: کنترل منفی ستون های ۲ و ۳ باند ۸۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *tetA* و باند ۷۴۰ جفت بازی مربوط به ژن *aac (3)IIa*. ستون های ۴ و ۵: نمونه‌های منفی

بحث

اشریشیا کلی عامل بیش از ۸۰ درصد از موارد UTI می باشد. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ما بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین (۶۶/۶۶ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین (۱/۹۶ درصد) بود در این تحقیق مقاومت به تتراسیکلین ۵۶/۸۶ درصد، کوتریموکسازول ۵۴/۹۰ درصد، نالیدیکسیک اسید ۵۲/۹۴ درصد، کوتریموکسازول ۵۴/۹۰ درصد، سیپروفلوکساسین ۳۹/۲۱ درصد، سفالوتین ۴۱/۱۷ درصد، نورفلوکساسین ۳۵/۲۹درصد، سفتریکسون ۲۳/۵۲درصد، آمیکایسین ۲۵/۴۹درصد، ایمی پنم ۲۳/۵۲درصد، مقاومت به جنتامایسین ۱۷/۶۴درصد بر آورد گردید. در تحقیق انجام شده توسط عبدالهی خیرآبادی و همکاران که بر روی ۲۳۴ ایزوله *اشریشیاکلی* جداشده از بیماران سرپایی و بستری شده شهرستان فسا صورت گرفت، بیشترین میزان مقاومت به آموکسی‌سیلین (۸۰/۸درصد) و آمپی سیلین (۷۰/۵درصد) و بیشترین میزان حساسیت به ترتیب، آمیکاسین (۹۸درصد)، توبرامایسین و سفوکسیتین (۹۰/۲درصد)، ایمی پنم (۸۶/۹ درصد)، کانامایسین (۸۷/۶ درصد)، جنتامایسین (۸۷/۲ درصد)، سفتازیدیم (۸۶/۳ درصد) و سیپروفلوکساسین (۷۷/۳ درصد) گزارش گردید(۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۰ توسط مهاجری و همکارانش در کرمانشاه منتشر شد، از ۲۰۰ سویه *اشریشیاکلی* مورد بررسی، ۲۷درصد نمونه‌ها به سفوتاکسیم، ۲۲/۵درصد نمونه‌ها به سفتازیدیم و ۲۶درصد نمونه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. مقاومت نمونه‌ها به کوتریموکسازول ۶۲/۵ درصد و در مورد جنتامایسین ۱۵ درصد بود و تمامی آن‌ها به ایمی پنم و آمیکاسین حساس بودند (۲۱). در مطالعه‌ی دیگری که توسط فرشاد و همکارانش به‌منظور ارائه‌ی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیاکلی*‌های جداشده از عفونت ادراری صورت گرفت، مقاومت نمونه-ها به کوتریموکسازول ۷۶درصد، تتراسایکلین ۷۰/۸

درصد، جنتامایسین ۱۵/۶درصد، آمیکاسین ۳درصد و سیپروفلوکساسین ۸/۳ درصدگزارش شد و مقاومتی نسبت به ایمی پنم مشاهده نشد که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می‌باشد (۲۲). مباشر کارجدی و همکارانش در تبریز، مقاومت ایزوله‌ها به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به استثنای ایمی پنم (۱۰۰درصد حساس) را بیش از بررسی حاضر گزارش دادند (۲۳). در تحقیق انجام شده توسط نخعی مقدم و همکاران که بر روی ۱۰۹ ایزوله *اشریشیا کلی* عفونت ادراری انجام شد، مقاومت ایزوله‌ها نسبت به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پلی میکسین و نیتروفورانتوئین به ترتیب ۵۵/۰۵، ۳۴/۸۶، ۲۱/۱۰، ۱۲/۸۴، ۴/۷۵ و ۱/۸۳ درصد گزارش گردید. در این تحقیق بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و کمترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم گزارش گردید (۲۴). در تحقیق ما مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین به ترتیب ۵۲/۹۴، ۳۹/۲۱ و ۳۵/۲۹ درصد برآورد گردید در حالی که نخجوانی و همکاران در ۲۰۰۷ میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۴۹/۳درصد و ۴۰/۲ درصد گزارش کردند. که با نتایج حاصل از تحقیق ما از مغایرت دارد که دلیل این تضادها می‌تواند در سال و محل اخذ نمونه‌گیری باشد (۲۴). در مطالعه‌ای که در آمریکا توسط سانچز و همکارانش به‌منظور بررسی میزان مقاومت ضد میکروبی *اشریشیاکلی* طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۱۰ انجام شد، مشخص گردید که میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین از ۳درصد به ۱۷/۱درصد افزایش یافته است و مقاومت به کوتریموکسازول از ۱۷/۹ به ۲۴/۲درصد صعود داشته است (۲۵).

منشا این تفاوت‌ها در نقاط مختلف را می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها و تفاوت در زمینه‌های دیگر دانست که با توجه به این امر، الگوهای درمانی مورد استفاده در نقاط مختلف، متفاوت و براساس ویژگی‌های خاص هر منطقه تعریف می‌شود. بنابراین بایستی تحقیقات منظم و دنباله داری در نقاط مختلف جهان انجام شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گیری کرد که حساسیت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل عواملی ازجمله تجویز مکرر و غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها، جهش‌های آنزیماتیک و هم چنین انتقال مقاومت از طریق پلاسمیدها کاهش یافته است. با توجه به بررسی نتایج این مطالعه و دیگر تحقیقات و با توجه به افزایش روز افزون مقاوم تنها به انواع مواد ضد میکروبی ازجمله سیپروفلوکساسین و ایمی پنم که ازجمله شاخص‌های درمانی برای عفونت‌های *اشریشیا کلی* هستند، لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه و هم چنین کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک و تجویز منطقی آن‌ها توسط پزشکان ضروری به نظر می‌رسد (۲۷ و ۲۶).

امروزه به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی به داروهای خط اول، کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها داروهای انتخابی درمان عفونت‌های ادراری ناشی از این باکتری را تشکیل می‌دهند. ژن‌های *qnr* جزء عوامل مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) هستند که به دلیل قرار گیری بر روی اینتگرون‌های مختلف باعث گسترش بسیار سریع مقاومت در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه می‌شوند. کینولون‌ها خانوادهای از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف صناعی هستند. این عوامل به عنوان داروی انتخابی اول در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از باکتری‌های گرم منفی هوازی ازجمله *اشریشیا کلی* مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما به دلیل استفاده بی رویه از این داروها روز به روز میزان مقاومت نسبت به این داروها در حال افزایش می‌باشد به‌طوری که طی سال‌های اخیر مقاومت سطح بالا به داروهای با اهمیت فوق که در ارتباط با ژن‌های وابسته به پلاسمید *qnr* می‌باشند، بروز نموده و درمان*های* عفونت‌های ذکر شده را بسیار پیچیده نموده است مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) به دلیل گسترش سریع در بین انتروباکتریاسه‌ها نقش بسیار مهمی در مقاومت به این داروها دارد(۲۹و۲۸). در تحقیق انجام شده توسط سلیمانی اصل و همکاران که بر روی ۱۴۰ ایزوله *اشریشیا کلی* عامل عفونت ادراری در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۸۲/۸ درصد و ۴۳ درصد

گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از مقاومت بالاتری برخوردار می‌باشند. در این تحقیق مشخص گردید ۱۲/۱درصد از ایزوله‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۱۴/۳درصد از ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrA* می‌باشند (۱۹). ازجمله آنتی بیویک‌های کینولونی مورد استفاده در این تحقیق نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین بودند که میزان مقاومت به آن‌ها به ترتیب ۵۲/۹۴، ۳۹/۲۱ و ۳۵/۲۹درصد برآورد گردید. در این تحقیق در ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک هلی کینولونی ژن *qnr* در ۱۵ نمونه (۲۹/۴۱درصد) گزارش گردید. نتایج حاصل از فراوانی ژن *qnr* در تحقیق ما با نتایج سلیمانی اصل و همکاران تقریبا تطابق دارد. در مطالعه انجام شده در پاکستان در سال ۲۰۱۱ مقاومت در ایزوله‌های ادراری *اشریشیا کلی* نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۳۶/۴۵ و ۸۴/۱۶ درصدگزارش گردید (۳۰). مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه و بدون نظارت داروهای فوق باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۶ در آمریکا مقاومت نسبت به کینولون‌ها ۲۱ درصد و مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها ۱۲درصد گزارش شده است (۳۱). اختلاف نتایج مطالعه انجام شده در آمریکا با مطالعه حاضر از نظر میزان مقاومت مشاهده شده میتواند به دلیل وجود برنامه‌های نظارتی دقیق تر در آن کشور و در دسترس نبودن داروهای با در جدایه‌های اهمیت فوق باشد.. مطالعات حاکی از آن است که یک ارتباط مستقیم بین میزان مصرف کینولون‌ها و درصد مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد (۱۸). آمریکا و کانادا اکثریت جدایه‌های بالینی *اشریشیا کلی* به فلوروکینولون‌ها حساس اند، با این حال جدایه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش اند (۲۷). افزایش مقاومت به سیپروفلوکساسین در انتروباکتریاسه با افزایش شیوع ژن‌های PMQR مرتبط است و این تغییر در مقاومت شامل افزایش در تنوع ژن‌های PMQR و شیوع جهش در ژنهای *par*C و gyrA یا هر دو در سویه‌های PMQR مثبت است.

Okten وهمکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه ۳۴ ایزوله *اشریشیا کلی* ESBL مثبت را موردبررسی قر ار دادند در این تحقیق ۴۷/۴درصد ایزوله نسبت به نالیدیکسیک اسید حساس بودند و ۷۶/۸درصد ایزوله‌ها هم زمان به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید حساسیت داشتند. در این تحقیق ۶/۳درصد ایزوله حامل ژن *qnr* بودند که نسبت به تحقیق ما از فراوانی کمتری برخوردار بود (۲۹). Periera و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی ۱۴۴ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت ادراری مقاوم به سیپروفلوکساسین تنها در یک مورد ژن *qnr* گزارش کردند (۳۲). از آن جا که دو مطالعه اخیر از نظر زمانی حدود یک دهه با مطالعه حاضر تفاوت زمانی دارند، نتایج این مطالعات تایید کننده روند رو به افزایش گسترش ژن‌های *qnr* می‌باشد. آمینوگلیکوزیدها طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مفید علیه سویه‌های بیماریزای ادراری *اشریشیا کلی* می‌باشند مهم ترین سازوکار مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها ناشی از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها مانند آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازهاست (ACs). آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها یکی از چهار گروه آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی را استیله می‌کنند. این آنزیم‌ها را در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌توان ردیابی کرد. این خانواده از چهار رده بزرگ، بر اساس مکان اختصاصی انتقال گروه استیل بر روی آمینوگلیکوزید، تشکیل شده است که شامل: AAC(6)، AAC(2) ، AAC(1)و AAC(3) می‌باشند. در این میان، استیل ترانسفرازهای AAC(3) ، شایع ترین آنزیم در خانواده انتروباکتریاسه به شمار می‌آیند. سوبسترای آنزیم AAC(3)-II جنتامیسین و توبرامایسین می‌باشد و سه ژن *aac(3)-IIa* و *aac(3)-IIb* و *aac(3)-IIc* کد کننده آنزیم‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۳۳). در تحقیق ما از ۵۱ ایزوله مورد بررسی مقاومت نسبت به جنتامایسین در ۹ مورد (۱۷/۶۵درصد) مشاهده گردید. این درحالی است که مومنی مفرد و همکاران در تحقیقی که بر روی ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت‌های ادراری در شهرستان

دلفان لرستان انجام دادند، مقاومت به جنتامایسین را ۲۹درصد گزارش کردند. در این تحقیق فراوانی ژن *aac(3)-IIa* در ایزوله‌های مقاوم به جنتامایسین۹۲/۳درصد گزارش گردید. در مطالعه ای توسط Kong و همکاران در چین که بر روی فنوتیپ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ژنوتایپینگ استیل ترانسفرازها بر روی ۴۴ ایزوله بالینی *اشریشیا کلی* انجام گرفت، درصد مقاومت به جنتامیسین، توبرامایسین وآمیکاسین به ترتیب ۵۶/۸۲، ۶۱/۳۶ و ۱۸/۱۸درصد گزارش گردید. هم چنین ژن *aac(3)-II* به عنوان شایع ترین ژنوتیپ (۵۲/۲۷درصد) در ارتباط با فنوتیپ مقاومت به جنتامیسن و توبرامایسین گزارش گردید (۳۴).

ازجمله دلایل تفاوت در فراوانی مقاومت به برخی از آمینوگلیکوزیدها در مطالعات فوق نسبت به مطالعه ما می‌تواند تفاوت در نوع ایزوله‌ها ادراری، بالینی، توزیع متنوع ژن‌های مقاومت در نواحی مختلف جغرافیایی و الگوی تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باشد به‌طور کلی توزیع فراوانی مقاومت به این داروهای کارآمد و ارزان از منطقه ای به منطقه دیگر متفاوت بوده و این امر لزوم انجام تست‌های حساسیت میکروبی قبل از شروع درمان را گوش زد می‌کند. علت مقاومت بالای مشاهده شده در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* نسبت به سولفونامیدها می‌تواند به علت مصرف بی رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول (ترکیب تری متوپریم و سولفونامید) در موارد عفونت‌های انسانی و انتقال ژن مقاومتی به باکتری‌های دیگر باشد به‌طوری که موفقیت درمان با این آنتی‌بیوتیک در بیماران (مبتلابه عفونت‌های مجاری ادراری) رو به کاهش است. به این ترتیب انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های موجود در محیط می‌تواند باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جداشده از محیط گردد. مقاومت نسبت به سولفونامیدها به واسطه پلاسمید بوده و با تغییر دی هیدروپتروات سنتتاز صورت می‌گیرد. پلاسمیدها عوامل ژنتیکی می‌باشند که در خارج از کروموزم میزبان قرار دارند و به‌صورت مستقل از کروموزم میزبان قادر به تکثیر می‌باشند و حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. از خصوصیات ویژه پلاسمیدها انتقال ساده آن‌ها بین سلول‌ها می‌باشد (۳۵-۳۷).

سه ژن کد شونده به نام‌های *sul 1*، *sul 2* و *sul 3* شناخته شده است که باعث ایجاد مقاومت نسبت به سولفونامیدها در باکتری‌های پاتوژن می‌گردد. ژن *sul 1* به‌طور عمده همراه با اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد در حالی که *sul 2* بیشتر روی پلاسمیدهای ناسازگار متعلق به گروه incQ یا پلاسمیدهای کوچک که پلاسمیدهای pBP1 نامیده می‌شوند قرار می‌گیرد. ممکن است این پلاسمیدها علاوه بر این ژن‌ها حامل ژن‌های مقاومت به دیگر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی باشند. این پلاسمیدها به سهولت بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف از پاتوژن‌های روده ای منتقل می‌شوند (۳۷).

با توجه به نقش ژن‌های *sul* در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها مطالعه حاضر بر روی ۵۱ ایزوله *اشریشیا کلی* عامل عفونت ادراری در بیماران دیابتی انجام گرفت. در این تحقیق فراوانی ژن *sul 1* ۳۹/۲۱ درصدگزارش گردید.

Bean و همکاران در مطالعه ای که بر روی ۳۹۱ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت‌های ادراری در بیمارستان رویال لندن انجام دادند، مقاومت به سولفونامیدها را ۴۵/۵ درصد گزارش کردند و فراوانی ژن *sul 2* در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* مقاوم ۸۱ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۷). در تحقیق انجام شده توسط Norouzi و همکاران که به‌منظور ردیابی ژن *sul 2* در باکتری‌های *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت ادراری مراجعه‌کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی بر روی ۳۰۰ بیمار انجام گرفت، مقاومت به کوتریموکسازول ۷۱ درصد و فراوانی ژن *sul 2* ۸۰ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد (۳۸). کولجالگ و همکارانش به بررسی ۷۸ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری پرداختند که میزان مقاومت به کوتریموکسازول را ۴۰ درصدگزارش کردند. در این تحقیق فراوانی ژن *sul 2* در ایزوله‌های مقاوم به

کوتریموکسازول ۴۰ درصد گزارش گردید (۳۹). Al-Agamy میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول را در ۱۰۰ ایزوله *اشریشیا کلی* جداشده از موارد عفونت ادراری را ۶۲ درصد گزارش کرد و فراوانی ژن *sul* 2 در ایزوله‌های مقاوم به کوتریموکسازول ۸۶/۳۶ درصدگزارش گردید (۳۸). به این ترتیب مشخص می‌گردد که در تمامی تحقیقات انجام شده توسط محقیقین مختلف ژن *sul* 2 نسبت به ژن‌های *sul* 1 و *sul* 3 از فراوانی بالاتری برخوردار می‌باشد.

نتیجه گیری کلی

جلوگیری از انتشار مقاومت‌های دارویی یکی از مسائل مهم درمان عفونت‌ها در جامعه محسوب می‌شود .با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت، امری ضروری به نظر می‌رسد. هم چنین پیشنهاد می‌شود، درمان عفونت‌های ادراری که از اهمیت خاصی برخوردار است، با توجه به الگوی حساسیت و مقاومت منطقه صورت گیرد تا از ایجاد پدیده مقاومت دارویی و شکست‌های درمانی که منجر به عارضه دارشدن عفونت می‌گردد، جلوگیری شود.

منابع

1. Demirci M, Ünlü Ö, Tosun Aİ. Detection of O25b-ST131 clone, CTX-M-1 and CTX-M-15 genes via real-time PCR in Escherichia coli strains in patients with UTIs obtained from a university hospital in Istanbul. J Infect Public Health 2019; 12(5):640–644.
2. Xia P, Zou Y, Wang Y, Song Y, Liu W, Francis DH, Zhu G. Receptor for the F4 mbriae of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99:4953–9.
3. Hassan Mumtaz. Fatemeh Reisi 2, Zahra Bamzadeh. Molecular typing of uropathogenic Escherichia coli strains (UPEC) in the province Isfahan and Genetic classification of O25 serogroup isolates by ERIC-PCR method. Journal of Applied Biology. 2019; 9(1).31-42.
4. Maiese K, New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015; 2015: 1-17
5. AsmatU, Abad K, Ismail K, Diabetes mellitus and oxidative stress -A concise review. Saudi Pharm J., 2016; 24(5): 547-553.
6. Szablewski L, Sulima A, The structural and functionalchanges of blood cells and molecular components indiabetes mellitus. Biol Chem., 2017; 398(4): 411-423.
7. Fünfstück R, Nicolle LE, Hanefeld M, Naber KG, Urinary tract infection in patients with diabetes mellitus. Clin Nephrol., 2012; 77(1): 40-48.
8. Wang MC, Tseng CC, Wu AB, Lin WH, Teng CH, Yan JJ, Wu JJ, Bacterial characteristics and glycemiccontrol in diabetic patients with Escherichia coliurinary tract infection. J Microbiol Immunol Infect., 2013; 46(1): 24-29.
9. Zaha DC, Jurca CM, Daina LG, Vesa CM, Popa AR, Jurca AD. Muresan M. Micle O. Prevalence of urinary tract infection and antimicrobial susceptibily among diabetic patients farmacia; 2020, Vol. 68, 2. 20-255.
10. Erb A, Sturmer T, Marre R, Brenner H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26: 83–90.
11. Erfaneh Jafari, Mana Oloomi and Saeid Bouzari. Characterization of antimicrobial susceptibility, extended-spectrum β-lactamase genes and phylogenetic groups of Shigatoxin producing *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea in Iran. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials; 2021: 20:24. .
12. Golnar Rahimzadeh1, Mohammad Sadegh Rezai2, Elaheh Ahmad. Lytic Activity of Isolated Phage from Milk Against Extended-Spectrum Beta-LactamaseEscherichia col. Journal of Mazandaran *University* of *Medical Sciences* JMUMS; 2021: 192. 139-144 (In persion)

13. Alonso, C.A.; Zarazaga, M.; Ben Sallem, R.; Jouini, A.; Ben Slama, K.; Torres, C. Antibiotic resistance inEscherichia coliinhusbandry animals: The African perspective.Lett. Appl. Microbiol; 2017: 64, 318–334.
14. Yusser Mahmoud Ragheb, Ali Hazim Abdulkarim. Phenotypic and Genotypic Detection Ampc β-Lactmase Producing *E.coli* Isolated from UTI in Anbar Governate. Annals of R.S.C.B; 2021: 25 (4): 1181 – 1192
15. Kerrn 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, 513–51.
16. Mohammadi J, Amini K. Detection of Virulence Genes in Uropathogenic *E. coli* (UPEC) Strains byMultiplex-PCR Method. Journal of Fasa University of Medical Sciences; 2017: 7(1). 128-133.
17. 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.
18. Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extra intestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol.; 2004: 42 (12):5444-52.
19. Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during. 2011-2012; Feyz. 17(5): 488-495.
20. Akbari-Nakhjavani F, Mirsalehi A, Hamidian M, Kazemi B, Mirafshar M, Jabal Ameli F. Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections to fluoroquinolones and detection of *gyrA* mutations in resistant strains. Daru; 2007: 15(2): 94-9.
21. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing Escherichia coli Isolated from urinary tract infections and its antibiotic resistance pattern in Kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci; 2011: 11(1):86-94.
22. Farshad Sh Ranjbar R, Anvarinejad M, Shahidi M, Hosseini M. Emergence of Multi Drug Resistant Strains of *Eschetichia coli* isolated from Urinary Tract Infection. The Open Conference Proceedings Journal; 2010: 1(4): 192-196
23. Mobasher Kare Jeddi AR, Nahaei MR, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHV type) in Esherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz. Iranian J Med Microbiol; 2008: 2(3):9-17.
24. Nakhai Moghaddam M, Musharraf Sh. Determining the pattern of antibiotic resistance of Escherichia coli urinary isolates and the prevalence of broad-spectrum beta-lactamases among them. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences and Health Services; 2009; 4, 223-228. (In persion).
25. Sanchez GV, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM. In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. Antimicrob Agents Chemother; 2012: 56(4):2181-2183.
26. Kausar J, Afia Z, Rumina H. Frequency and sensitivity pattern of extended spectrum beta lactamases – producing isolates in a tertiary care hospital laboratory of Pakistan. Pub Med Assoe; 2005: 55(10):436-439.
27. . Poole K. Resistanc to β– lactam antibiotic, cell Mol life; 2004: 61(17):2200 –2223.
28. Nazik H, Bektore B, Ongen B, Ozuyrt M, Baylan O, Haznedaroglu T. Co-expression of plasmid-mediated quinolone resistance-qnrA1 and blaVEB1 gene in Providensia staturii strain. New Microbiol; 2011: 34(2): 225-228.
29. Okten CA, Gales AC, Tognim MC, Munerato P, Dalla Costa LM. Quinolone-resistant clinical *Escherchia coli*. Braz J Infect Dis.; 2008: 12(1): 5-9.
30. Muhammad I, Uzma M, Yasmin B, Mehmood Q, Habib B. Prevalence of

antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. Braz J Microbiol.; 2011: 42(3): 462-466.
31. . Karlowsky JA, Hoban DJ, Decorby MR, Laing M L, Zhanel GG. Flouroquinolone resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatient are frequently multidrug resistant: result from the North American urinary tract infection collaborative alliance-quinolone resistance study. Antimicrob Agents Chemother; 2006: 50(6): 2251-2254.
32. Pereira AS, Andrare SS, Montero J, Sader HS, Pignatary ACC, Gales AC. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and present of qnr genes in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. Braz J Infect Dis.;2007: 11(1): 40-43.
33. Momeni Mofrad S, Goodarzi Gh, Shakib P, Nowruzi c. Frequency of aac (3) - IIa gene in clinical isolates of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infections in Delfan city of Lorestan in 2010. Iranian Journal of Medical Microbiology; 2013: 7 (2): 26-20. (In persion)
34. Japoni A, Goudarzi M, Farshad Sh, Basiri E, Ziyaeyan M, *et al*. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in southern Iran. Jpn J Infect Dis; 2008: 61(1):85-8.
35. Carattioli A. Resistance plasmide families in *Enterobacteriaceae.* J Antimicrob Chemother. 2009: 53: 2227-2238.
36. Mulvey M, Simor A. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? CMAJ; 2009: 180: 408-415.
37. Bean DC, Livemore D, Hall LM. *E.coli* implications for Plasmids imparting sulfonamide resistance in persistence. Antimicrob Agents Chemother*;* 2009: 53 (5): 1088-1093
38. Al-Agamy M. Molecular resistance mechanisms to older antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolates. J African Microbiol; 2012: 6: 106-111.
39. 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 (4): 235-239.

Determination of phenotypic and genotypic pattern of antibiotic resistance in Escherichia coli isolates isolated from diabetic patients in Shahrekord

Fatemeh Khodaverdipour[1] ,*Amin Roozbehi[1]

1.Ph.D Student,Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

amin.roozbehi.1370@gmail.com ***Corresponding author**:*

Abstract

Preventing the spread of drug resistance is one of the most important issues in society. Escherichia coli is one of the most common bacterial agents isolated from the urinary tract and nosocomial infections. Treatment of infections due to it is difficult due to the acquisition of resistance genes. This study aimed to investigate the phenotypic and genotypic pattern of antibiotic resistance in clinical uropathogenic strains isolated from diabetic patients.A total of 51 *E. coli* isolates from urinary tract infection in diabetic patients obtained from clinical, were used in this study. Isolates were confirmed by chemical tests and molecular techniques based on tracking of the *16srRNA* gene. Antimicrobial resistance assessment of isolates was done using molecular methods base on *(qnrA, tet A, tet B, aac (3)IIa, sul*1) and disk diffusion. Most resistance r to ampicillin (66.66%) and the lowest resistance to Nitrofurantoin (1.96%) were reported. The frequency of *tet A, tet B, qnr A, sul 1 and aac (3) IIa* genes reported 68.62%, 64.7%, 29.41%, 39.21%, and 29.41% respectively. The statistical analysis shows a significant relationship between resistance to the antibiotic tetracycline and the gene *tet A, tet B* statistically.Early detection of resistant strains to select the most appropriate treatment options is essential to prevent the spread of resistance. It is suggested, as treatment for urinary tract infections is important, so to prevent drug resistance and treatment failure, it should be done according to the resistance pattern in the region.

Keywords: Antibiotic resistance, Diabetic patients, Uropathogenic *E. coli*

سیانوباکتری ها منبعی غنی از داروهای ضد سرطانی

بهاره نوروزی[1*]، سپیده زندیه [2]

۱.گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،

***نویسنده مسئول:** *bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir*

چکیده

افزایش میزان مرگ و میر سرطان در نتیجه استفاده بیش از حد از داروهای شیمیایی، آن را به یکی از مرگبارترین بیماری ها در سراسر جهان تبدیل کرده است. به همین دلیل امروزه بیشترین تحقیقات امروزه روی محصولات دارویی طبیعی متمرکز است. در نتیجه هدف از این مقاله، مروری بر خواص ضد سرطانی سیانوباکتری ها در صنعت دارو و درمان است. برای نگارش این مقاله، هم از تجربیات و مقالات نویسندگان مقاله و هم از جدیدترین مقالات موجود در پایگاه های اطلاعاتی Web of Science، Pub Med، Google Scholar، Scopus و ScienceDirect استفاده گردیده است. فرآورده های طبیعی، منبع مهمی از ترکیب های جدید دارویی که نه تنها خود دارای ارزش دارویی هستند، بلکه به عنوان مدل های ساختمانی برای ایجاد آنالوگ های سنتتیک نیز به کار می روند. در این میان، متابولیت های دریایی ثانویه مستخرج از سیانوباکتری ها به عنوان منبع مطلوبی از ترکیبات فعال دارویی بالقوه جدید، دارای تنوع ساختاری و فعالیت های بیولوژیکی متنوع از قبیل خاصیت ضد التهاب، ضد ویروس، ضد میکروب و ویژگی‌های ضد توموری هستند. این مقاله مروری، پتانسیل ترکیبات و متابولیت‌های سیانوباکتری ها را به عنوان داروهای ضد سرطان بررسی کرده و ساختار شیمیایی و مکانیسم‌های عمل آن ها را بررسی می‌کند.

واژه های کلیدی: سرطان، سیانوباکتری ها، ریز جلبکها، متابولیتهای ثانویه، ترکیبات بیواکتیو

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، تا سال ۲۰۳۰، ۲۱ میلیون مورد جدید سرطان و ۱۳ میلیون مرگ ناشی از این بیماری وجود خواهد داشت. در حال حاضر، ۱۳ درصد از کل مرگ و میرها در سراسر جهان ناشی از سرطان است، و تخمین زده می شود که می‌توان از ۳۰ درصد این مرگ و میرها، با اصلاح یا پیش‌گیری از عوامل خطر سازی مانند سیگار کشیدن، قرار گرفتن در معرض اشعه، الکل و عفونت ها اجتناب کرد. تقریباً تمام داروهای ضد سرطانی که در حال حاضر در بازار وجود دارند، دارای عوارض جانبی جدی هستند و بنابراین، جستجو برای داروهای ضد سرطان جدیدتر و ایمن‌تر، همواره احساس می‌شود (۱).

اگرچه در سال های اخیر علاقه صنعت داروسازی به محصولات طبیعی کاهش یافته است، اما آنها هنوز بهترین بستر برای ارائه ساختارهای شیمیایی جدید، مؤثر و منحصر به فرد هستند که ممکن است پتانسیل قابل توجهی برای درمان یا پیشگیری از سرطان داشته باشند یا به عنوان داربستی برای ساخت داروهای ضد سرطان موثر در نظر گرفته شوند. از سال ۱۹۸۱ تا ۲۰۱۰، تقریباً ۱۳۵۵ دارو برای کاربردهای درمانی تأیید شدند و از این میان، ۱۲۸ مورد داروی ضد سرطان بودند که تقریباً ۳۵ درصد آنها از بین محصولات طبیعی یا ترکیبات استخراج شده از محصولات طبیعی بودند. در واقع در حال حاضر، داروهای در دسترس، در مقابل تنها یک سوم بیماری ها موثرند و این به دلیل افزایش مقاومت به آنتی بیوتک ها است. بنابر این شناسایی ترکیبات جدید بیولوژیکی جدید به اجبار برای تولید داروهای جدید، ضروری است. به همین دلیل کشف منابع میکروبی جدید مانند پروتئوباکتری ها، باکتریوئیدها و سیانوباکتری ها، به عنوان منابع دارویی و درمانی جدید، بسیار مهم است(۲). رایج ترین ترکیبات زیست فعال مستخرج از ریزجلبک ها که دارای فعالیت ضد سرطانی هستند عبارتند از: آلکالوئیدها (staurosporine، ambigols، amycolactam و marinoquinoline A)، پلی کتیدها (کرومون،

، pestalpolyol I ، engyodontiumones H ، ترپن ها (hytidchromone A, B, C, E)، پپتیدها (meroterpenes, rpene, scopararane I)، پلی میکسین B و سایر پپتیدهای غیر ریبوزومی (beauvericin)، نوکلئوزیدها (cytarabine، gemcitabin و سایر آنالوگ های نوکلئوزیدی) و کربوهیدرات ها (لامینارین، اسید آلژینیک و سایر پلی ساکاریدهای سولفاته (۳).

مواد و روش‌ها

برای نگارش این مقاله مروری از پایگاه‌های داده‌های معتبر مانند PubMed، ScienceDirect، Web of Science، SpringerLink، Scopus و Google Scholar با ا ستفاده از کلمات کلیدی سرطان، تومور، تکثیر، سمیت سلولی، آپوپتوز، دریایی، میکروب‌ها، ریزجلبک‌ها، سیانوباکتری‌ها، پیشگیری، درمان و آزمایش‌های بالینی استفاده گردید. در زیر به مهمترین ترکیبات ضد سرطانی مشتق از سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌ها اشاره می‌گردد.

آلکالوئیدها

آلکالوئیدها ترکیبات آلی طبیعی/سنتتیکی هستند که برای توصیف گروه‌های متنوع ترکیبات هتروسیکلیک با خواص شبه قلیایی و داشتن حداقل یک اتم نیتروژن منفرد در ساختار خود استفاده می‌شوند. در حال حاضر، این اتم‌های نیتروژن حاوی ترکیبات هتروسیکلیک را می‌توان بر اساس شباهت اسکلت کربن موجود در پیش‌سازهای بیوشیمیایی مانند اورنیتین، لیزین، تیروزین و تریپتوفان طبقه‌بندی کرد که دارای بخش‌های ایندول و ایزوکوئینولین یا پیریدین هستند. آلکالوئیدهای ریز جلبکها همچنین می توانند به ایندول ها، ایندول های هالوژنه و فنیل اتیل آمین ها گروه بندی شوند.

Marinoquinoline A یک آلکالوئید ضد سرطان است که توسط *Catalinimonas alkaloidigena*، یک باکتری دریایی به همراه ۱۳ متابولیت آلکالوئید دیگر تولید می شود. *Pseudoalteromonas tunicata* و *P. citrea* دو باکتری دریایی هستند که یک آلکالوئید با رنگدانه زرد ترشح می کنند که متعلق به گروهی به نام tambjamines است و این گروه فعالیت ضد توموری همراه با فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد مالاریا نشان دادند. Calothrixins A & B آلکالوئیدهایی هستند که حاوی یک گروه مولکولی فنانتریدین هستند که از *Calothrix sp* جدا شده اند. هر دو آلکالوئید سمیت سلولی قابل توجهی را برای سلول های سرطان دهانه رحم انسان (HeLa) نشان دادند. محققان به طور جامع انواع متابولیت های زیست فعال سیانوباکتری ها، مانند *Hapalosiphon fontinalis*، *Fischerella musicola*، *F. ambigua*، *H. welwitschii* و *Westiella intricate*، را بررسی کرده اند، که در میان آنها آلکالوئید شبه hapalindole و ambigols دارای فعالیت سمیت سلولی بالقوه هستند(۱).

پلی کتیدها

پلی‌کتیدها گروه وسیعی از ترکیبات هستند که از پیش‌سازهایی که حاوی گروه‌های کربونیل و گروه های متیلن (-CO-CH2-) هستند، بیوسنتز می‌شوند. سپس این ترکیبات تحت واکنش های دکربوکسیلاتیو و اصلاح زنجیره های پروپیونات، دهیدراسیون، حلقوی شدن و واکنش‌های آروماتیک سازی قرار می‌گیرد. *Streptomyces koyangensis*، یک باکتری دریایی است که دو abyssomicin تولید می کند که دارای فعالیت ضد توموری هستند. علاوه بر آن، عصاره‌های سیانوباکتری‌های دریایی مانند *Nostoc spongiaeforme* و *N. linckia* حاوی پلی‌کتیدی به نام borophycin بودند که اثر ضد سرطانی قوی بر روی رده‌های سلولی سرطان کولون انسانی (LoVo) نشان میدهد(۴).

ترپن ها

ترپن ها ترکیبات هیدروکربنی هستند که از واحدهای ایزوپرن ۵ کربنی تشکیل شده اند که برای تولید طیف وسیعی از اسکلت های ساختاری انباشته می‌شوند که توسط آنزیم های مختلف برای ترکیب عملکرد و تغییر اکسیداسیون استفاده می شود(۱). این مولکول های حلقوی را می توان بر اساس واحدهای ایزوپرن موجود در آن ها به عنوان مونوترپن ها، دی ترپن ها، تری ترپن

ها (استروئیدها)، تتراترپن ها (کاروتنوئیدها)، سزکوئی ترپن ها و سسترترپن ها طبقه بندی کرد. در حال حاضر پذیرفته شده‌است که میکرو فلور دریایی منبع عالی این ترپن‌ها است و در میان آن‌ها تعداد کمی از ترپن‌ها فعالیت ضد سرطانی خود را به طور مجزا از سایر خواص بیولوژیکی نشان می‌دهند(۳)

پپتیدها

پپتیدها معمولاً در زنجیره اصلی پروتئین ها بی اثر هستند و ممکن است چندین فعالیت فیزیولوژیکی را در هنگام پروتئولیز از خود نشان دهند. هیدرولیز آنزیمی نقش مهمی در سنتز ترکیبات پپتیدی در گونه های دریایی ایفا می کند. گزارشات زیادی در مورد استفاده از پپتیدهای دریایی برای پیشرفت‌های دارویی، از جمله خواص ضد توموری، ارائه شده است (۳).پپتیدهای حلقوی و خطی به عنوان عوامل سیتوتوکسیک بالقوه موثر شناخته شده اند. این پپتیدها دارای فعالیت‌های سیتوتوکسیک، ضد میکروبی، مسدودکننده کانال های یونی اختصاصی و سایر فعالیت‌های دارویی با ساختارهای شیمیایی جدید هستند که با نحوه عملکردشان وابستگی دارد (۳).

پپتید polydiscamide A و آنالوگ های آن دارای فعالیت ضد توموری هستند. تعداد معینی از پپتیدهای دریایی از طریق تحقیقات بالینی با موفقیت مورد ارزیابی قرار گرفتند و اکنون به عنوان داروهای فرموله شده در بازار با نام های تجاری مختلف در دسترس هستند(۴).یک دپسی پپتید حلقوی معروف به Apratoxin A با ایجاد توقف در چرخه سلولی، پتانسیل سیتوتوکسیک موثری را در برابر سلول های سرطان دهانه رحم انسانی (HeLa) نشان داد. پپتیدهای استخراج شده از *Lyngbya sp* و *Nostoc sp*، به عنوان ترکیباتی که دارای فعالیت ضد سرطانی امیدوارکننده‌ای از طریق ایجاد اختلال در میکروفیلامنت ها، مهار مسیرهای ترشحی و تأثیرگذاری بر سایر مسیرهای درون سلولی هستند نیز گزارش شده‌اند(۵).

نوکلئوزیدها

نوکلئوزیدها به دسته ای از ترکیبات آلی تعلق دارند و معمولاً به عنوان گلیکوزیدهای نیتروژن، پورین ها و پیریمیدین ها شناخته می شوند که همراه با استرهای فسفات، آنها را نوکلئوتید می نامند. نوکلئوزیدهای دریایی، پتانسیل‌های بیواکتیو متعددی از جمله فعالیت‌های ضد سرطانی، ضد ویروسی(۶)، شل‌کننده عضلات، افزایش فشار خون و فعالیت‌های گشادکننده عروق را از خود نشان داده‌اند(۲, ۷).

کربوهیدرات ها

کربوهیدرات ها جزء اصلی تشکیل دهنده موجودات آبزی و جلبک ها محسوب می شوند. این ترکیبات از نظر ساختار مولکولی بسیار متنوع هستند و شامل مجموعه ای از پلی ساکاریدهای سولفاته هستند که گوگرد و کربن را توسط ارگانیسم های فتوسنتزی تثبیت می کنند (۸).کربوهیدرات ها بر اساس منبع در سه گروه طبقه بندی می شوند: پلی ساکاریدهای گیاهی، پلی ساکاریدهای حیوانی و پلی ساکاریدهای میکروبی که شامل ساکاریدهای خنثی و دارای بار منفی با اندازه های مختلف هستند. به عنوان مثال می توان به الیگوساکاریدهای پیوندی با نیتروژن یا اکسیژن در گلیکوپروتئین ها، گلیکوزآمینوگلیکان در پروتئوگلیکان ها، گلیکولیپیدها، فیوکان های سولفاته و گالاکتان های سولفاته اشاره کرد. ضمنا، ترکیبات و آرایش شیمیایی آنها ماهیت پیچیده و متنوعی دارند(۹).کربوهیدرات های دریایی توسط فرآیند هیدرولیز آنزیمی خاص از پلی ساکاریدها تولید می شوند. تجزیه آنزیمی پلی ساکاریدهای سولفاته شامل مجموعه ای از آنزیم ها است که می توانند پیوند گلیکوزیدی را بشکنند و گروه های سولفات را از زیرساخت کربوهیدرات حذف کنند. این کربوهیدرات های مشتق شده از موجودات دریازی مانند اسید آلژینیک، آگار، کاراگینان، کیتین، سلولز، کیتوسان، فیوکان، گلوکان، گلوکوزامین گلیکان و لامینارین دارای خواص بیواکتیو قابل توجه زیادی از جمله پتانسیل ضد سرطانی هستند. Fucoidan یک پلی ساکارید سولفاته است که در دیواره سلولی جلبک قهوه ای وجود دارد که با فعال سازی کاسپاز-۳، کاهش

فعالیت کیناز و تصلب شرایین، متاستاز را در رده سلولی لنفوم انسانی (HS-Sultan) مهار می کند (۵).

نتایج

متابولیت های ثانویه سیانوباکتری ها در مراحل مختلف تحقیقات بالینی

ترکیبات بیواکتیو حاصل از سیانوباکتری ها، نقش مهمی در کشف داروهای ضد سرطان ایفا می کنند(۱۰) و به عنوان عوامل ضد مهاجرت، ضد متاستاتیک، ضد تهاجم، عوامل ضد توبولین و مهارکننده های رشد، القاء کننده آپوپتوز و اتوفاژی طبقه بندی می شوند(۶). برخی از ترکیبات ضد سرطانی از سیانوباکتری‌های دریایی و ریزجلبک‌ها در حال حاضر تحت آزمایش‌های بالینی هستند.(۱۱).این ترکیبات بیواکتیو طبیعی با تنظیم بیان ماکرومولکول های القایی در سلول های سرطانی از طریق مسیرهای انتقال سیگنال تومورزایی فعالیت ضد سرطانی نشان دادند(۱۲). کمتر از ۱۰ درصد از ترکیبات فعال دارویی دریایی در برابر انواع مختلف سرطان آزمایش شده اند (۱۱). به عنوان مثال، ترکیبات dolastatin 10, ET-743 و bryostatin 1 در طی تحقیقات بالینی آزمایش و آنالیز شده‌اند(۱۳). انواعی از dolastatin ها و مولکول‌های مرتبط از سیانوباکتری‌های ریسه ای از جنس های *Symploca* و *Lyngbya* استخراج شدند(۱۴).

Dolastatin 10 یک پپتید خطی است، در حالی که dolastatin 15 یک عامل دپسی پپتیدی هفت واحدی است، با این حال هر دو پپتید، عوامل سیتوتوکسیک قوی هستند که تقسیم سلولی را متوقف می کنند. در واقع dolastatin 10، در موقعیت گوانوزین تری فسفات به توبولین متصل می شوند و منجر به اختلال در عملکرد طبیعی آن و شروع توقف چرخه سلولی متافاز می شود(۱۵).

Dolastatin 10 در دهه ۱۹۹۰ به فاز I تحقیقات بالینی رسید و تا فاز II تحقیقات بالینی پیش رفت. با این حال، چون بیش از ۴۰ درصد بیماران دچار نوروپاتی محیطی شدند، مصرف آن متوقف شد. با این حال، این مبنایی برای به دست آوردن مشتقات کارآمدتر شد. مشتقات مختلف دیگر به عنوان ترکیبات آنتی بادی-دارو (Polatuzumab vedotin، Depatuxizumab vedotin) تحت فاز III تحقیقات بالینی هستند(۱۶). Enfortumab vedotin، Glembatumab vedotin، Tisotumab vedotin، و دیگران تحت فاز II آزمایشات بالینی هستند، در حالی که ABBV-085، ASG-15ME، و AGS-67E تحت فاز I تحقیقات بالینی برای انواع مختلف سرطان هستند. Soblidotin (TZT-1027) ، یک آنالوگ مصنوعی از dolastatin 10 است که نسبت به ترکیب اصلی آن و سایر داروهای ضد سرطان شناخته شده مانند podophyllotoxin و vincristine در برابر سرطان قوی تر است(۱۱).

Soblidotin (TZT-1027) ، علاوه بر مهار عملکرد توبولین، یک عامل گسستگی عروق است که باعث متلاشی شدن عروق تومور و مرگ سلولی می شود. Synthadotin (ILX-651) یک مشتق پنتا پپتیدی مصنوعی از dolastatin 15 است، که یک عامل ضد تومور قوی در بیماران مبتلا به ملانومای متاستاتیک در مرحله پیشرفته است و از هسته زایی میکروتوبول ها جلوگیری می کند. سایر dolastatin ها سمیت قلبی عروقی را نشان دادند، اما ILX-651 چنین سمیتی را نشان نداده است(۱۷). این دارو هر دو فاز I و فاز II تحقیقات بالینی را با موفقیت به پایان رساند و مشخص شد که به خوبی قابل تحمل و کاملاً ایمن است. ترکیب دیگر، bryostatin 1, فاز دوم تحقیقات بالینی را برای درمان ملانوم، لنفوم غیر هوچکین، سرطان کلیه و سرطان روده بزرگ با موفقیت به پایان رسانده است (۱۶).

متابولیت های جدا شده از سیانوباکتری ها با خاصیت ضد سرطانی

سیانوباکتری‌ها به دلیل تنوع فوق‌العاده‌شان، توجه زیادی را در اکوسیستم های مختلف به خود جلب کرده‌اند(۱۸). در جدول ۱ برخی از عوامل ضد سرطانی سیانوباکتری ها نشان داده شده است(۱۶).

جدول ۱. اثرات ضد سرطانی و مکانیسم های عمل متابولیت های ثانویه مختلف سیانوباکتری ها. نمادهای مختلف (↑، ↓ و ⊥) به ترتیب نشان دهنده افزایش، کاهش و بازداری در متغیرهای به دست آمده است.(۱۷).

رده	متابولیت ثانویه	منبع بیولوژیکی	لاین سلولی	اثرات و مکانیسم ها	IC50 Values
آنتراسیکلین ها	Komodoquinone A e	*Streptomyces sp. KS3*	سلول های نوروبلاستوم عصبی 2A	فعالیت نوروژنیک، ↑تمایز سلولی	1 µg/mL
Phenoxazin-3-one	Chandrananimycins A, B, C	*Actinomadura sp.*	سرطان کلون، ملانوما، سرطان ریه، سرطان سینه، سلول های تومور کلیه	فعالیت ضد توموری	~1.4 µg/mL
پلی کتید گلیکوزیله	Ankaraholide A	*Geitlerinema sp*	NCI-H460; Neuro-2a; رده سلولی MDAMB-435	⊥تکثیر، ↑سمیت سلولی	119; 262; 8.9 nM
پلی کتاید	Swinholide A	*Symploca cf. sp*	چندین رده سلولی سرطانی	فعالیت ضد توموری، ⊥تکثیر، ↑سمیت سلولی، اختلال در اسکلت سلولی اکتینی	۰,۳۷ nM–1.0 µM
پنتا پپتید	Symplostatin 1	*Symploca hydnoides*	(سلول سرطان پستان) (سلول سرطان تخمدان) (سلول سرطان تخمدان- مقاوم به چند دارو) (سلول های ماهیچه صاف، اندوتلیال ورید ناف انسانی) (سلول های سرطانی کولون- 38 موش و سلول های کارسینومای C/۱۶ موش)	فعالیت ضد تومور، ↑فسفوریلاسیون Bcl-2، ↑تشکیل ریزهسته، ↑کاسپاز ۳، ↑آپوپتوز، توقف چرخه سلولی در فاز G2/M، ⊥تجمع توبولین	0.37 nM–1.0 µM

Ankaraholide A یک ترکیب swinholide گلیکوزیله است که از *Geitlerinema sp* جدا می شود. این ماده تکثیر سلول های NCI-H460، Neuro-2a و MDAMB-435 را مهار می کند. Swinholide A ابتدا از اسفنج دریایی *Theonella swinhoei* به دست آمدکه موجب فعالیت ضد توموری می شود(۱۶).

پپتیدها

Symplostatin 1، آنالوگ dolastatin 10 است که از باکتری *Symploca hydnoides*، جدا شده است. فعالیت ضدمیتوتیک symplostatin در برابر گروهی از رده های سلولی سرطانی مانند MDA-MB-435، SK-OV-3، NCI/ADR، A-10، و HUVEC نشان داده شده است. همچنین فعالیت ضد توموری زیادی را در برابر سلول های سرطانی کولون ۳۸ و پستان C/۱۶ موش نشان داد. این متابولیت باعث فسفوریلاسیون Bcl-2، تشکیل

آنتراسایکلین ها

Komodoquinone A که توسط *Streptomyces sp. KS3* تولید شده یک آنتراسایکلین جدید است که باعث ایجاد نوروتوژنز در رده سلول های نوروبلاستوما عصبی 2A شد.

ترکیبات Phenoxazin-3-One

chandrananimycins A و B و C، از *Actinomadura sp* جدا شدند و با مهار تکثیر رده سلول های سرطانی مانند CCL HT29 (سلول‌های سرطان کولون)، MEXF 514L (سلول‌های ملانوما)، LXFA 526L، LXFL 529L (سلول‌های سرطان ریه)، CNCL SF268، LCL H460 -۷ (سلول های سرطان پستان)، و PRCL PC3M، RXF 631L (تومور کلیه) فعالیت ضد سرطانی از خود نشان دادند(۲).

پلی کتیدها

سیتوتوکسیک قابل توجهی را در رده‌های سلولی تومور انسانی، مانند سلول‌های LoVo و سلول‌های سرطانی kB اپیدرمی نشان داد. Apratoxin A با حمله اختصاصی به زیرواحد مرکزی گیرنده انتقال پروتئین، Sec61α، انتقال پروتئین ها را مهار کرد(۱۹). Apratoxin B، از *Lyngbya sp*، استخراج شده و دارای سمیت سلولی بالایی در برابر سلول های سرطانی اپیدرموئید دهانی kB و سلول های سرطانی روده بزرگ LoVo است. Apratoxin D و C، مستخرج از *Lyngbya majuscule* و *Lyngbya sordid*، سمیت سلولی قابل توجهی را در برابر رده سلولی سرطان ریه H-460 نشان داد(۲۰). Apratoxin Eاستخراج شده از *Lyngbya bouilloni* دارای خاصیت ضد تکثیری قوی دربرابر رده های سلولی سرطانی مختلف، مانند استئوسارکوما U2OS، آدنوکارسینوما کولون HT29، و کارسینوما اپیتلیال HeLaاست. Apratoxin F و G، حاوی N-متیل آلانین در ترکیب خود است و از *Lyngbya bouilloni* جدا می شود و دارای سمیت سلولی قوی علیه سرطان ریه H-460 و رده های سلولی کولورکتال HCT-116 است(۲۱). دپسی پپتید حلقوی Aurilide B و C جدا شده از *Lyngbya majusculus*، در رده سلولی تومور ریه انسان NCIH460 و سلول های نوروبلاستوما موش neuro-2a سمیت سلولی قابل ملاحظه ای نشان می دهد. Coibamade A، یک دپسی پپتید حلقوی است که از سیانوباکتری دریایی *Leptolyngbya sp* استخراج شده است و فعالیت سیتوتوکسیک قوی را در برابر یک رده سلولی سرطان پستان سه‌گانه-منفی (MDA-MB-231) نشان داد. فعالیت ضد تکثیری این متابولیت فعال با توقف چرخه سلولی در فاز G1 همراه است. (۲۲).

دپسی پپتید حلقوی Depsipeptideshoiamide A و B از *Lyngbya majuscule* و *Phormidium gracile*، جدا شده و سمیت سلولی قوی از خود نشان داد. Hoiamide A سمیت سلولی متوسطی را در برابر سلول‌های نوروبلاستوما موش (neuro-2a) و سلول‌های آدنوکارسینوما ریه انسانی (H460) نشان داد، در حالی که hoiamide B سمیت سلولی ضعیفی در برابر H460 و عدم مهار را در برابر سلول‌های neuro-2a نشان داد.

میکرونوکلئوس، فعال سازی کاسپاز-۳ و القای آپوپتوز می شود که در نهایت منجر به توقف چرخه سلولی در فاز G2/M می شود. همچنین از تجمع توبولین ها جلوگیری می کند(۱۶).

Grassypeptolideis یک دپسی پپتید ماکروسیکلیک است که توسط *Lyngbya confervoides* تشکیل می شود و فعالیت ضد تکثیری، سیتوتوکسیک در برابر رده های سلولی مختلف، مانند استئوسارکوم انسانی (U2OS) ، کارسینوما دهانه رحم (HeLa)، آدنوکارسینوما کولورکتال (HT29) و نوروبلاستوما (IMR-32) نشان می دهد. B و C ، Grassypeptolide A، به طور قابل توجهی از تکثیر رده های سلولی آدنوکارسینوما کولورکتال (HT29) و رده های سلولی سرطان دهانه رحم (HeLa) به روشی وابسته به غلظت با القای توقف چرخه سلولی در فاز G1 یا فاز G2/M جلوگیری می کند(۱۹). Curacin A، یک کمپلکس هیبرید کتوپپتید خطی است، اولین کوراسین بود که از عصاره سیانوباکتریوم *Lyngbya majuscule* جدا شد. پس از Curacin A، سایر ترکیبات Curacin، یعنی Curacin B، C و D نیز به عنوان ترکیبات .L majuscule شناسایی شدند. در این میان، Curacin A فعال‌ترین ترکیب ضد سرطانی بود که با تحریک آپوپتوز و ایجاد توقف چرخه سلولی در فاز G2-M، از تکثیر سلول‌های سرطانی غیرکوچک ریه (A549) جلوگیری کرد. این دارو با اتصال به توبولین در محل اتصال کلشی سین، به عنوان یک آنتاگونیست رقابتی و بازدارنده پلیمریزاسیون توبولین عمل می کند(۲۰).

Tasiamide B، یک پپتید خطی استخراج شده از سیانوباکتری *Symploca sp* است که سمیت قوی علیه کارسینوما نازوفارنکس انسان (kB) و سرطان LoVo نشان داد. Apratoxin ها، دپسی پپتیدهای حلقوی سیتوتوکسیک هستند که دارای ساختار پلی کتیدی و پپتیدی تکه تکه شده جدید هستند. Apratoxin Aدر یک سیانوباکتری آبزی *Lyngbya majuscula* یافت شد. مسیر ترشحی سلول های استئوسارکوم U2S را مختل کرد و حتی در کارسینوما دهانه رحم HeLa باعث توقف چرخه سلولی در فاز G1 شد. همچنین رفتار

Palau'amide ، یک دپسی پپتید حلقوی جدا شده از سیانوباکتری دریایی *Lyngbya sp* است که سمیت سلولی قابل توجهی را برای سلول های kB نشان داده است. palmyramide A به سمیت سلولی در سلول‌های neuro-2a احتمالاً از طریق مسدود کردن کانال سدیم وابسته به ولتاژ کمک می‌کند. پالمیرامید palmyramide A روی رده سلولی ریه H-460 انسان سیتوتوکسیک متوسطی نشان داده است. Pitipeptolide های Aو B دپسی پپتیدهای حلقوی جدا شده از سیانوباکتری دریایی *Lyngbya majuscule*، گزارش شده علیه سلول های سرطانی آدنوکارسینوم کولون HT29 دارای اثر سیتوتوکسیک هستند جدا از آن در برابر سلول های LoVo نیز سمیت سلولی را در نشان می دهند. Pitiprolamide یک دپسی پپتید حلقوی که از *Lyngbya majuscule* به دست آمده و در برابر آدنوکارسینوما پستان MCF7 و رده های سلولی سرطان کولورکتال HCT116 سمیت سلولی نشان داد(۲۳).

Tasipeptin های A و B، دپسی پپتیدهای حلقوی مشتق شده از *Symploca sp*، در برابر سلول های سرطانی دهانی، سمیت سلولی نشان دادند. Ulongapeptin، یک دپسی پپتید حلقوی که از *Lyngbya sp* به دست آمده و در برابر سلول های سرطانی دهانی دارای سمیت سلولی است(۲۳). Veraguamides A-G، هگزادپسی پپتید حلقوی است که از *Symploca cf. hydnoide* جدا شده است. این متابولیت ها در برابر آدنوکارسینوم کولون HT29 و سلول های سرطان دهانه رحم HeLa خاصیت سیتوتوکسیک نشان دادند(۲۴)) .علاوه بر این، دارای سمیت سلولی قوی علیه رده سلولی سرطان ریه انسان H-460 است. Wewakpeptins A-D دپسی پپتیدهای به دست آمده از *Lyngbya semiplena* هستند که با مهار تکثیر سلول های سرطانی ریه H-460 فعالیت ضد سرطانی از خود نشان داده اند. پپتید Nostocyclo A1 و A2 ، هپتاپپتیدهای حلقوی جدا شده از *Nostoc sp* هستند که در برابر سرطان اپیدرمید دهانی kB و سلول‌های سرطان روده LoVo سمیت سلولی نشان Homodolastatin 16، یک دپسی پپتید حلقوی دریایی جدا شده از *Lyngbya majuscule* است و به نظر می‌رسد که اثر سیتوتوکسیک متوسطی بر رده‌های سلولی مری (WHCO1 و WHCO6) و رده سلولی دهانه رحم (ME180) دارد. Largazole، یک سیکلودپسی پپتید جدا شده از *Symploca sp*، است که مانع قابل توجهی در توسعه سلول های اپیتلیال پستان انسان (MDA-MB-231) به روشی وابسته به غلظت نشان داده است. رشد سلول های HT29 کولون و نوروبلاستوما IMR-32 نیز به طور قابل توجهی مهار شده است و باعث توقف چرخه سلولی رده سلولی سرطان روده بزرگ HT29 در فاز G2/M می شود(۱۷).

Lyngbyabellin Aو B، دپسی پپتیدهای حلقوی استخراج شده از *Lyngbya majusculus* هستند که دارای مکانیسم پلیمریزاسیون اکتین قوی با سمیت سلولی قابل توجه در برابر سلول های kB و LoVo هستند. Lyngbyabellin E-I، سمیت سلولی برای تومور ریه انسان NCI-H460 و سلول های نوروبلاستوما موش neuro-2a نشان داد. Lyngbyabellin N، استخراج شده از *Moorea bouillonii* سمیت سلولی را در سرطان ریه انسان (H-460) و رده های سلولی سرطان روده بزرگ (HCT116) نشان داد(۲۱).

Majusculamide C و desmethoxymajusculamide C، دپسی پپتیدهای حلقوی هستند که از *Lyngbya majuscule*، یک سیانوباکتری دریایی، مشتق شده اند. Majusculamide C به عنوان سیتوتوکسیک شناخته شد و فعالیت قوی در برابر چندین رده سلولی سرطانی، مانند سرطان تخمدان (OVCAR-3) ، سرطان کلیه (A498) ، سرطان ریه (NCI-H460) ، سرطان کولورکتال (KM20L2) و رده سللولی گلیوبلاستوما SF- 295 نشان داد. desmethoxymajusculamide C پس از غربالگری در برابر سلول های سرطان روده بزرگ انسانی HCT-116، اثر ضد توموری خوب و انتخابی دارد.

Obyanamide، یک دپسی پپتید حلقوی جدا شده از *lyngbya confervoides*، سمیت سلولی قابل توجهی را برای سلول های kB و LoVo نشان داده است(۲۲).

سلولی را در برابر برخی از رده های سلولی سرطانی نشان داده اند.Malyngamide C، در برابر رده های سلولی سرطانی NCI-H460، neuro-2a و HCT-116 و Malyngamide J , K در برابر رده های سلولی NCI-H460 و neuro-2a سمیت سلولی نشان دادند.(۱۷).

Malevamide D، یک استر پپتیدی است که از *Symploca hydnoides* جدا شده و در برابر گروهی از رده های سلولی سرطانی، مانند P-388، سرطان ریه انسان (A-549) ، کارسینوما کولون انسانی (HT-۲۹) و سلول های ملانوما انسانی (MEL-28) سمیت سلولی قوی نشان داد. دایمر Malyngolide ، یک سیکلودپسی پپتید و از *Lyngbya majuscule* به دست آمده است که در برابر رده سلولی ریه انسان H-460 مورد ارزیابی قرار گرفت. (۲۵).

Cryptophycin 1 و cryptophycin 52، دپسی پپتیدهای ماکرولیدی و مولکول های سیتوتوکسیک قوی هستند. این ترکیبات مهارکننده های میکروتوبولی هستند که مکانیسم اثر مشابهی با آلکالوئیدهای Vinca دارند. Cryptophycin 1 از *Nostoc sp*، جدا شده و در برابر سلول های لوسمی موش L1210 فعالیت ضد سرطانی نشان دادند (۲۶)و باعث ایجاد اختلال در مونتاژ میکروتوبول با اتصال به توبولین می شود و با القای آپوپتوز، در برابر سلول های KB و رده های سلولی LoVo عملکرد سیتوتوکسیک نشان میدهند (۲۷) و همچنین با ایجاد توقف چرخه سلولی در فاز G2/M فعالیت ضد تکثیری در برابر آدنوکارسینوم پستانی MDA-MB-435 و رده‌های سلولی سرطان تخمدان SKOV3 نشان داد.(۲۵). cryptophycin 52 یک مشتق مصنوعی جدا شده از *cryptophycin* است. جالب است که حتی با وجود رسیدن به فاز دوم آزمایشات بالینی، توسعه آن به دلیل عوارض جانبی شدید متوقف شده است. Lagunamide A، یک دپسی پپتیدهای حلقوی است که از سیانوباکتری دریایی *Lyngbya majuscule* استخراج شده. هر دو متابولیت در برابر P388 (یک رده سلولی لوسمی موشی) سمیت سلولی قوی نشان دادند(۲۸). Lagunamide C در برابر رده های سلول می‌دهند(۹). Symplocamide A، جدا شده از *Symploca sp*.، یک سیکلوپپتید است که سمیت سلولی قوی را برای سلول‌های سرطانی سلول غیرکوچک ریه H-460 و سلول‌های نوروبلاستوما neuro-2a نشان داد.

Tasiamide یک سیکلوپپتید جدا شده از سیانوباکتریوم *Symploca sp* است که در برابر سرطان نازوفارنکس انسانی (kB) و سلول های LoVo سمیت سلولی قوی نشان داد(۲۴).

Belamide A به عنوان یک تتراپپتید خطی با شباهت های ساختاری به dolastatin 10 و dolastatin 15 طبقه بندی می شود که از سیانوباکتری *Symploca sp* جدا شده است و سمیت سلولی خوبی را در برابر رده سلولی سرطان کولون HCT-116 نشان داد که ناشی از بی‌ثبات کردن توبولین در سلول‌های ماهیچه صاف عروق (A10) برای القای عمل ضدمیتوتیک است(۹).

Bisebromoamide، یک پپتید سمی دریایی جدا شده از *Lyngbya sp* است که در سلول‌های اپیتلیال کلیه موش‌های صحرایی نرمال (NRK) تحریک شده توسط فاکتور رشد مشتق از پلاکت مهار فسفوریلاسیون کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی (ERK) نشان داد. Dragonamide و pseudodysidenin، لیپوپپتید های جدا شده از *Lyngbya majuscule* هستند و هر دو در برابر سلول های سرطانی P-388، A-549، HT-29 و MEL-28 سمیت سلولی نشان دادند(۱۷). . Kalkitoxin ، لیپوپپتید دیگری که از *Lyngbya majuscule* جدا شده و نشان داده شد که بقای سلول های سرطانی کولون HCT116 را کاهش می دهد. Somocystinamide A، لیپوپپتید دیگری که از همان سیانوباکتری به دست آمده و علیه Jurkat (لوسمی سلول T) ، لوسمی CEM، سرطان ریه A549، لوسمی Molt4T، ملانوما M21 و سلول های میلوما U266 فعالیت ضد تکثیری از طریق فعال شدن کاسپاز ۸ که باعث آپوپتوز شد نشان داد(۲۳). Malyngamide 2، از *Lyngbya majuscule* و *Lyngbya sordi*d جدا شده و در برابر سلول‌های سرطان ریه انسان H-460 سمیت سلولی نشان داد. Malyngamide C، J و K، متابولیتهای *Lyngbya majuscule* هستند که سمیت

Okeania sp جدا شده و بر روی سلول های سرطان ریه انسان (H-460) اثر سیتوتوکسیک نشان داد(۲۹).

لاکتون ها

Tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methyl-scytophycin B) ، یک ماکرولید جدا شده از سلول های لیوفیلیزه *Seytonema ocellaturn* است که موجب مهار رشد سلول ها در گروهی از سلول های پستانداران می شود.

Scytophycin A-E که از *Seytonema pseudohofmanni* جدا شده است، گزارش شده است که در برابر سرطان انسانی سلول نازوفارنکس (سلول های kB) اثر سیتوتوکسیک نشان می دهد(۳۱).

Caylobolide A، یک ماکرولاکتون به دست آمده از سیانوباکتری *Lyngbya majuscula* است که در شرایط آزمایشگاهی در برابر سلول های تومور روده بزرگ انسانی HCT 116 سمیت سلولی نشان داده است.

Caylobolide B که از *Phormidium sp* به دست می آید، و در برابر آدنوکارسینومای کولورکتال HT29 و سلول های سرطان دهانه رحم HeLa فعالیت سیتوتوکسیک نشان داده است.(۸).

آمین های اسید چرب

Isomalyngamide A، متعلق به رده آمین های اسید چرب است که از سیانوباکتری *Lyngbya majuscule* جدا شده و از تکثیر سلول های سرطان سینه MCF-7 و MDA-MB-231 جلوگیری می کند.

Isomalyngamide A-1که از سیانوباکتری های *Lyngbya majuscule* و *Lyngbya sordida* استخراج می شود و نشان داده شده است که از تکثیر سلول های MDA-MB-231 جلوگیری می کند. Jamaicaamides A، B و C، آمین های اسید چرب استخراج شده از *Lyngbya majuscule* و *Lyngbya sordida* هستند که سمیت سلولی را برای هر دو لاین سلولی ریه H-460 انسان و نوروبلاستوما neuro-2a موش نشان دادند(۳۲).

رنگدانه

Scytonemin، یک رنگدانه زرد-سبز است که از گونه *Stigonema* جلبک سبز آبی (سیانوباکتری) بدست می آید و فعالیت ضد تکثیری را علیه سلول‌های Jurkat T با القای آپوپتوز نشان داد. همچنین تشکیل دوک های سرطانی، مانند P388، A549، PC3، HCT8 و SK-OV3 سمیت سلولی نشان داد.(۲۹).

ماکرولیدها

Biselyngbyaside از *Lyngbya sp* به دست آمده و یک گلیکوزید ماکرولید ترشحی است و در برابر سلول های HeLa S3، SNB-78 (سرطان سیستم عصبی مرکزی) و NCI H522 (سرطان ریه) سمیت سلولی نشان می دهد. Biselyngbyasid B از *Lyngbya sp* به دست آمده و در برابر سلول های HeLa S3 و سلول های HL60 سمیت سلولی نشان داد. Biselyngbyaside E و F، علیه سلول های HeLa و HL60 فعالیت سیتوتوکسیک نشان دادند.Lyngbyaloside B ، یک گلیکوزید ماکرولید است که از *Lyngbya sp* جدا شده که تأثیر سیتوتوکسیک روی سلول‌های kB دارد و تأثیر کمی بر سلول‌های LoVo دارد(۱۷).

علاوه بر این، epi-lyngbyalosid (83)-۲، یک گلیکوزید ماکرولید استخراج شده از *Lyngbya bouillonii* است، که در برابر آدنوکارسینوم کولورکتال HT29 و سلول های HeLa خواص سیتوتوکسیک نشان داد. بعلاوه، 18E-lyngbyaloside C و 18Z-lyngbyaloside C نیز در برابر آدنوکارسینوم کولورکتال HT29 و سلول های HeLa خاصیت سیتوتوکسیک قوی نشان دادند. Biselyngbyolide A و B، متابولیت های ماکرولیدی هستند که از سیانوباکتری دریایی *Lyngbya sp* جدا شده اند و علیه سلول های HeLa S3 و سلول های HL60 سمیت سلولی قوی نشان داده اند(۳۰).

Koshikalide، یک ماکرولید جدا شده از *Lyngbya sp* است که در برابر سلول های HeLa S3 فعالیت سیتوتوکسیک نشان داد. Didehydroacutiphycin، ماکرولید جدا شده از *Oscillatoria acutissima* است که علیه سلول های kB و سلول های NIH/3T3 فعالیت سیتوتوکسیک نشان دادند. Lyngbouilloside، یک گلیکوزید ماکرولید است که از سیانوباکتری *Lyngbya bouillonii* جدا شده و در برابر سلول های نوروبلاستوما اثر سیتوتوکسیک نشان داد. Polycavernoside D، ماکرولید گلیکوزیدی دیگری است که از سیانوباکتری

پلی ساکاریدهای ریزجلبک فعالیت محرک زیستی از خود نشان داده اند که برای برخی کاربردهای صنعتی موثر است، اگرچه تنها چند مطالعه پتانسیل عمل آن ها را به عنوان یک عامل ضد سرطان نشان داده. پتانسیل پلی ساکاریدها با تغییرات وزن مولکولی و تغییر محتوای سولفات قابل تغییر است(۳۳).

پلی ساکارید کریسول‌آمینارین

کریسول‌آمینارین، پلی ساکاریدی است که از دیاتومه *Synedra acus* استخراج شده است. خانواده کریسول‌آمینارین با مهار تکثیر سلول های سرطانی، فعالیت ضد توموری را بر روی رده های سلولی سرطان کولون انسانی HTC-116 و DLD-1 نشان دادند(۳۴).

پلی ساکارید سولفاته

پلی ساکارید سولفاته به عنوان جزء مهمی از جلبک های دریایی قهوه ای *Undaria pinnatifida* و *Saccharina japonica* هستند. این گروه عملکرد ضد توموری دارد و از تکثیر رده های سلولی سرطان سینه انسان (T-47D) و ملانوما (SK-MEL-28) و توسعه کلنی جلوگیری می کند. فوکوئیدان، پلی ساکاریدهای سولفاته جدا شده از جلبک های دریایی قهوه ای *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, and *Costaria costata* هستند و فعالیت ضد توموری را علیه رده سلولی ملانوما پوست انسان (SK-MEL-28) و رده سلولی سرطان روده بزرگ انسانی (DLD-1) نشان دادند. همچنین fucoidans که جزء فعال Fucus evanescens (یک جلبک قهوه‌ای دریای *Okhotsk*) است، در موش‌های C57Bl/6، یک مدل حیوانی پیش بالینی، فعالیت ضد توموری و ضد متاستاتیک نشان داده است. فوکوئیدان با وزن مولکولی کم، آپوپتوز را از طریق تغییر پتانسیل غشای میتوکندری با آزادسازی سیتوکروم c و مهار پروتئین های ضد آپوپتوز Bcl-2، Bcl-xl، Mcl-1 و همچنین عوامل القا کننده آپوپتوز فعال، کاسپاز-۳، کاسپاز-۷ کاسپاز-۹، در سلول های MDA-MB-231 القا کرد(۳۵).

اسید آلژینیک

اسید آلژینیک، که معمولاً به عنوان آلژین شناخته می شود، یک پلی ساکارید غیریونی است که از دیواره سلولی جلبک قهوه ای یا جلبک دریایی *Sargassum* میتوزی و فعالیت پروتئین سرین/ترئونین کیناز توسط Scytonemin مهار شد(۱۵).

متابولیت حاوی بور

Borophycin، متابولیت حاوی بور است که از *Nostoc spongiaeforme* و *N. linckia* مشتق شده است و به طور موثر در برابر رده های سلولی سرطانی انسان، یعنی آدنوکارسینوم کولورکتال κB و کارسینوم اپیدرموئید LoVohuman فعالیت ضد سرطانی نشان داد(۸).

آلکالوئیدهای فنانتریدین

Calothrixin های A و B، آلکالوئیدهای فنانتریدینی هستند که از سیانوباکتریوم دریایی *Calothrix sp* جدا شده و دارای سمیت سلولی قابل توجهی بودند و از تکثیر رده سلولی سرطان انسانی (HeLa) جلوگیری کردند. همچنین با القای توقف چرخه سلولی در فازهای G1 و G2/M، از تکثیر سلول‌های لوسمی CEM (سلول‌های لوسمی سلول T انسانی) جلوگیری کردند.(۱۵).

بحث

متابولیت های ضد سرطانی مستخرج از ریزجلبک ها ترکیبات زیر از گونه های مختلف ریزجلبک ها که خواص ضد سرطانی نشان داده اند گزارش شده است.

آلدئیدهای غیراشباع چندگانه (PUAs)

آلدئیدهای غیراشباع چندگانه (PUAs) از دیاتومه های دریایی *Thalassiosira rotula* استخراج می شوند. این ترکیبات بر روی سرطان آدنوکارسینوما کولون انسانی رده Caco-2 فعالیت ضد تکثیری و سیتوتوکسیک قوی نشان دادند. این متابولیت ها همچنین آپوپتوز را القا کردند که از تراکم کروماتین، از دست دادن یکپارچگی غشاء و تکه تکه شدن هسته قابل مشاهده است((۳۲). PUA ها باعث توقف چرخه سلولی تمام رده های سلولی سرطان در فاز G1 یا S وابسته به تنظیم مثبت کاسپاز-۳ و عامل القا کننده آپوپتوز ۱ (AIFM1) می شوند. هیچ یک از PUA ها هیچ گونه سمیتی روی رده سلولی اپیتلیال ریه غیر توموزا BEAS-2B نشان ندادند(۳۳).

پلی ساکارید

است. این متابولیت در رده سلولی سرطانی MCF-7 آپوپتوز وابسته به تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی را القا کرد، اما به تکه تکه شدن DNA کمکی نکرد. (۳۷).

Neoxanthin

Neoxanthinیک کاروتنوئید زانتوفیل است که دارای فعالیت سیتوتوکسیک روی سلول های سرطانی HeLa و A549 است. حتی سمیت سلولی بیشتری نسبت به Violaxanthin دارد(۳۷).

Fucoxanthin

Fucoxanthinیک رنگدانه متعلق به خانواده زانتوفیل ها است و در جلبک قهوه ای *Undaria pinnatifida* به عنوان یک کاروتنوئید اصلی یافت می شود. با القای آپوپتوز فعالیت ضد تکثیری را علیه رده سلولی لوسمی انسانی (HL-60) نشان می دهد. مطالعات مختلف ماهیت ضد سرطانی این ماده را نشان داد که در آن با القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 یا فاز G2/M از طریق مولکول‌ها و مسیرهای مختلف شامل پروتئین های Bcl-2، MAPK، NF-kB، کاسپاز-۳، تکثیر را مهار می‌کند. همچنین سطوح بیان کاسپاز-۸، کاسپاز-۹ و GADD45 توسط Fucoxanthin تنظیم می شد. در بین کاروتنوئیدهای مختلف، Fucoxanthin به‌عنوان یک عامل ضد سرطان به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و فعالیت ضدسرطانی قابل‌توجهی دارد(۳۸).

Siphonaxanthin

Siphonaxanthinیک keto-کاروتنوئید است که به عنوان یک متابولیت فعال در جلبک های سبز *Codium fragile*، *Caulerpa lentillifera* و *Umbraulva japonica* وجود دارد. Siphonaxanthin اثر ضد سرطانی را بر روی رده سلول های لوسمی انسانی (HL-60) با القای آپوپتوز و افزایش تراکم کروماتین، وابسته به کاهش سطح بیان Bcl-2 و افزایش فعال سازی کاسپاز ۳، اثر ضد سرطانی نشان داد(۳۹).

Zeaxanthin و Lutein

Zeaxanthin یک الکل کاروتنوئیدی است که در بسیاری از ریزجلبک ها وجود دارد، مانند Porphyridium cruentum، Isochrysis galbana، Phaeodactylum tricornutum، Tetraselmis suecica

wightii استخراج میشود. نانوذرات حاوی اسید آلژینیک اثر ضد توموری تحریک‌کننده‌ای را بر روی موش‌های حامل تومور H22 ارائه کردند. این پلی ساکارید همچنین به مواد سمی و فلزات سنگینی که باعث ایجاد سرطان در روده می شود، متصل می شود و فعالیت خود را با تبدیل این مواد سمی به مواد غیر سمی اعمال می کند(۳۴).

لامینارین

لامینارین، یک پلی ساکارید به دست آمده از جلبک قهوه ای *Eisenia bicyclis* است. این دارو با مهار تکثیر و القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز subG1 در سلول‌های کارسینومای شفاف تخمدان (ES2) و رده‌های سلولی آدنوکارسینوما پاپیلاری سروز (OV90) فعالیت ضد سرطانی خود را نشان داد. همچنین لامینارین و آنالوگ سولفاته آن فعالیت ضد سرطانی در شرایط آزمایشگاهی را علیه سلول‌های JB6 Cl41 (سلول‌های اپیدرم طبیعی موش) و سلول‌های SK-MEL-28 (ملانوم بدخیم انسانی) نشان دادند.

به همین نحو همچنین از تشکیل کلونی رده های سلولی سرطان روده بزرگ انسانی مانند HCT-116، HT-29 و DLD-1 جلوگیری کرد و سمیت سلولی را در برابر رده های سلولی مختلف سرطان نشان داد (۳۶).

کاروتنوئیدها

کاروتنوئیدها تترا ترپنوئیدهایی هستند که به عنوان رنگدانه های تشکیل شده توسط گیاهان، جلبک ها، باکتری ها و قارچ ها طبقه بندی می شوند. بیش از ۱۱۰۰ کاروتنوئید تاکنون شناسایی شده است. پیکربندی کلی کاروتنوئیدها، یک زنجیره پلی‌ان متشکل از ۹ تا ۱۱ پیوند دوگانه است. کاروتنوئیدها با ویژگی های دارویی متعددی از جمله رفتار ضد سرطانی مرتبط هستند. کاروتنوئیدهای زانتوفیل های مختلفی مانند violaxanthin, siphonaxanthin, fucoxanthin, lactucaxanthin ,neoxanthin, zeaxanthin, lutein، شناسایی شدند که اجزای اصلی تشکیل دهنده ریزجلبک ها هستند(۳۵).

Violaxanthin

Violaxanthin متابولیت فعال گزارش شده در عصاره دی کلرومتان جلبک سبز *Dunaliella tertiolecta*

Dinochrome

Dinochrome A و B، کاروتنوئیدهای اپیمریک جدا شده از *Peridinium bipes* هستند. این متابولیت ها دارای فعالیت ضد سرطانی قوی با مهار تکثیر سلول های GOTO (سلول های نوروبلاستوما)، OST (سلول های استئوسارکوم) و سلول های HeLa هستند (۴۰).

Phaeophytins

phaeophytin ها مولکول های هتروسیکلیک آلی حاوی پورفیرین هستند که از جلبک سبز دریایی *Cladophora fascicularis* جدا شدند. فعالیت ضد تکثیری این ماده با مهار فعال NF-kB در HeLa و مهار انتقال NF-kB از سیتوپلاسم به هسته ناشی از TNF-a مشخص شد(۲۹).

Nigricanosides

این مواد گلیکولیپیدهایی هستند که از جلبک سبز *Avrainvillea nigricans* استخراج شده اند. این متابولیت‌ها از تکثیر سلول‌های MCF-7 سرطان سینه انسان و سلول‌های HCT-116 سرطان کولون انسانی جلوگیری می‌کنند و همچنین دارای فعالیت ضدمیتوتیک هستند که باعث پلیمریزاسیون توبولین درون سلول ها می‌شود(۱۴).

نتیجه گیری کلی

این مقاله مروری، جدیدترین مولکول‌های مستخرج یا تولید شده از سیانوباکترها و ریزجلبک‌ها را برای درمان سرطان شرح می‌دهد. سیانوباکتری ها

بیشتری برای درک اهداف اساسی و مسیرهای پشت سمیت سلولی این ترکیبات در سلول های سرطانی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر مطالعه مروری بر ترکیبات ضد سرطانی سیانوباکتری ها است که به صورت مستقل و بدون حمایت مالی هیچ نهادی به انجام رسیده است. کمال قدردانی را نسبت به همه افرادی که در ویرایش مقاله نقش داشتند، اعلام می‌داریم. تعارض منافع برای نویسندگان جهت چاپ این مقاله وجود ندارد.

و Nannochloropsis gaditana. این ماده در برابر رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی (HT-29) سمیت سلولی قوی نشان داد، اما در برابر رده سلولی اپیتلیال کولون طبیعی انسان (CCD 841 CoTr) هیچ گونه سمیت سلولی القا نکرد. Lutein یک کاروتنوئید زانتوفیل است که مشخصات ضد سرطانی مشابه Zeaxanthin از خود نشان داد(۳۷).

Stigmasterol

Stigmasterolیک استرول است که از ریزجلبک دیاتومه *Navicula incerta* استخراج می شود. فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی را با مهار تکثیر رده سلولی سرطان کبد انسان (HepG2) از طریق القای آپوپتوز از طریق اختلال در پتانسیل غشای میتوکندری و ایجاد تغییرات مورفولوژیکی و آسیب DNA نشان داد. همچنین نتایج نشان داد به دلیل نقص اجزای سلولی توقف چرخه سلولی در فازهای G0/G1 و G2/M صورت می‌گیرد(۴۰).

Nonyl 8-acetoxy-6-methyloctanoate

Nonyl 8-acetoxy-6-methyloctanoateیک استر الکل چرب است که از دیاتوم دریایی *Phaeodactylum tricornutum* استخراج شده است. این متابولیت ثانویه بر روی رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی (HL-60)، رده سلولی سرطان ریه انسانی (A549)، و رده سلولی ملانوما موش (B16F10) فعالیت ضد سرطانی نشان داد. باعث آسیب به DNA و افزایش فعالیت آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز sub G1 شد(۲۹).

، تنوع بیوشیمیایی با ارزش و کشف نشده ای از ترکیبات بیواکتیو را به عوامل ضد سرطانی جدید نشان می‌دهند. با اینکه انواع مختلفی از ترکیبات برای سرکوب رشد سلولی در طیف وسیعی از انواع سلول های سرطانی شناسایی شده است، مکانیسم عمل بسیاری از آن ها هنوز نامشخص است و تاکنون تعداد اندکی از مولکول های بیواکتیو با مهار تکثیر سلولی، رفتار ضدمیتوتیک (تأثیر ضد توبولین)، آپوپتوز القایی، پتانسیل متاستاتیک سلول های سرطانی و اثرات سیتوتوکسیک در مقابل سلول های سرطانی شناخته شدند. با همه اینها، با این که سیانوباکتری ها و ریزجلبک ها منبع موثری از داروهای ضد سرطان هستند. با این وجود، مطالعات

منابع

1. Mondal A, Bose S, Banerjee S, Patra JK, Malik J, Mandal SK, et al. Marine cyanobacteria and microalgae metabolites—A rich source of potential anticancer drugs. Marine drugs. 2020;18(9):476.

2. Qamar H, Hussain K, Soni A, Khan A, Hussain T, Chénais B. Cyanobacteria as natural therapeutics and pharmaceutical potential: Role in antitumor activity and as nanovectors. Molecules. 2021;26(1):247.

3. Khalifa SA, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegazy M-EF, et al. Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. Marine drugs. 2019;17(9):491.

4. Barreca M, Spanò V, Montalbano A, Cueto M, Díaz Marrero AR, Deniz I, et al. Marine anticancer agents: An overview with a particular focus on their chemical classes. Marine drugs. 2020;18(12):619.

5. Nigam M, Suleria HAR, Farzaei MH, Mishra AP. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019;27:491-515.

6. Jafari Porzani S, Konur O, Nowruzi B. Cyanobacterial natural products as sources for antiviral drug discovery against COVID-19. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2022;40(16):7629-44.

7. Anvar S, Nowruzi B, Tala M. Bioactive products of cyanobacteria and microalgae as valuable dietary and medicinal supplements. Food Hygiene. 2021;11(1 (41)):99-118.

8. Lefranc F, Koutsaviti A, Ioannou E, Kornienko A, Roussis V, Kiss R, et al. Algae metabolites: From in vitro growth inhibitory effects to promising anticancer activity. Natural product reports. 2019;36(5):810-41.

9. Matulja D, Wittine K, Malatesti N, Laclef S, Turks M, Markovic MK, et al. Marine natural products with high anticancer activities. Current Medicinal Chemistry. 2020;27(8):1243-307.

10. Eghtedari M, Porzani SJ, Nowruzi B. Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. Phytochemistry Letters. 2021;42:87-103.

11. Wali AF, Majid S, Rasool S, Shehada SB, Abdulkareem SK, Firdous A, et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. Saudi pharmaceutical journal. 2019;27(6):767-77.

12. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. Applications of cyanobacteria in biomedicine. Handbook of Algal Science, Technology and Medicine: Elsevier; 2020. p. 441-53.

13. Anvar A, Nowruzi B. Bioactive properties of spirulina: A review. Microb Bioact. 2021;4:134-42.

14. Yun CW, Kim HJ, Lee SH. Therapeutic application of diverse marine-derived natural products in cancer therapy. Anticancer Research. 2019;39(10):5261-84.

15. Wang E, Sorolla MA, Gopal Krishnan PD, Sorolla A. From seabed to bedside: A review on promising marine anticancer compounds. Biomolecules. 2020;10(2):248.

16. Shishido TK, Popin RV, Jokela J, Wahlsten M, Fiore MF, Fewer DP, et al. Dereplication of natural products with antimicrobial and anticancer activity from Brazilian cyanobacteria. Toxins. 2019;12(1):12.

17. Dayanidhi DL, Thomas BC, Osterberg JS, Vuong M, Vargas G, Kwartler SK, et al. Exploring the diversity of the marine environment for new anti-cancer compounds. Frontiers in Marine Science. 2021;7:614766.

18. Safavi M, Nowruzi B, Estalaki S, Shokri M. Biological activity of methanol extract from Nostoc sp. N42 and Fischerella sp. S29 isolated from aquatic and terrestrial ecosystems. International Journal on Algae. 2019.(۴)۲۱;

19. Senousy HH, Abd Ellatif S, Ali S. Assessment of the antioxidant and anticancer potential of different isolated strains of cyanobacteria and microalgae from soil and agriculture drain water. Environmental Science and Pollution Research. 2020;27:۷۴-۱۸۴۶۳.

Jabri H, et al. Algae-derived bioactive compounds with anti-lung cancer potential. Marine drugs. 2020;18(4):197.

30. Alves C, Silva J, Pinteus S, Gaspar H, Alpoim MC, Botana LM, et al. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. Frontiers in pharmacology. 2018;9:777.

31. Yao W, Qiu H-M, Cheong K-L, Zhong S. Advances in anti-cancer effects and underlying mechanisms of marine algae polysaccharides .International Journal of Biological Macromolecules. 2022.

32. Zuo W, Kwok HF. Development of marine-derived compounds for cancer therapy. Marine drugs. 2021;19(6):342.

33. Pradhan B, Nayak R, Patra S, Jit BP, Ragusa A, Jena M. Bioactive metabolites from marine algae as potent pharmacophores against oxidative stress-associated human diseases: A comprehensive review. Molecules. 2020;26(1):37.

34. Gopeechund A, Bhagooli R, Neergheen VS, Bolton JJ, Bahorun T. Anticancer activities of marine macroalgae: Status and future perspectives. Biodiversity and Biomedicine. 2020:257-75.

35. Alves C, Diederich M. Marine natural products as anticancer agents. Marine Drugs. 2021;19(8):447.

36. Dyshlovoy SA, Honecker F. Marine compounds and cancer: Updates 2020. MDPI; 2020 .p. 643.

37. Pereira RB, Evdokimov NM, Lefranc F, Valentão P, Kornienko A, Pereira DM, et al. Marine-derived anticancer agents: Clinical benefits, innovative mechanisms, and new targets. Marine drugs. 2019;17(6):329.

38. Ahirwar A, Kesharwani K, Deka R, Muthukumar S, Khan MJ, Rai A, et al. Microalgal drugs: A promising therapeutic reserve for the future. Journal of Biotechnology. 2022;349:32-46.

39. Hussein HA, Abdullah MA. Anticancer compounds derived from marine diatoms. Marine Drugs. 2020;18(7):356.

20. Bratchkova A, Kroumov AD. Microalgae as producers of biologically active compounds with antibacterial, antiviral, antifungal, antialgal, antiprotozoal, antiparasitic and anticancer activity. Acta Microbiol Bulg. 2020;36(3):79-89.

21. Bajpai VK, Shukla S, Kang S-M, Hwang SK, Song X, Huh YS, et al. Developments of cyanobacteria for nano-marine drugs: Relevance of nanoformulations in cancer therapies. Marine Drugs. 2018;16(6):179.

22. Dyshlovoy SA, Honecker F. Marine compounds and cancer: The first two decades of XXI century. MDPI; 2019. p. 20.

23. Martínez Andrade KA, Lauritano C, Romano G, Ianora A. Marine microalgae with anti-cancer properties. Marine drugs. 2018;16(5):165.

24. Ruiz-Torres V, Encinar JA, Herranz-López M, Pérez-Sánchez A, Galiano V, Barrajón-Catalán E, et al. An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. Molecules. 2017;22(7):1037.

25. Abd El-Hack ME, Abdelnour S, Alagawany M, Abdo M, Sakr MA ,Khafaga AF, et al. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019;111:42-50.

26. Nowruzi B, Haghighat S, Fahimi H, Mohammadi E. Nostoc cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. Journal of Pharmaceutical Health Services Research. 2018;9(1):5-12.

27. Ahari H, Nowruzi B, Anvar AA, Porzani SJ. The toxicity testing of cyanobacterial toxins In vivo and In vitro by mouse bioassay: A review. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2022;22(8):1131-51.

28. Porzani SJ, Lima ST, Metcalf JS, Nowruzi B. In Vivo and In Vitro toxicity testing of cyanobacterial toxins: a mini-review. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 258. 2021:109-50.

29. Saadaoui I, Rasheed R, Abdulrahman N, Bounnit T, Cherif M, Al

40. Dewi IC, Falaise C, Hellio C, Bourgougnon N, Mouget J-L. Anticancer, antiviral, antibacterial, and antifungal properties in microalgae. Microalgae in health and disease prevention: Elsevier; 2018. p. 235-61.

Cyanobacteria are a rich source of anticancer drugs

Bahareh Nowruzi[1],Sepideh Zandieh[2]

1. Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Sience .Research Branch ,Islamic Azad University, Tehran, Iran. and

2. MSc student, Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir ***Corresponding author:**

ABSTRACT

The increase in cancer mortality as a result of excessive use of chemical drugs has made it one of the deadliest diseases worldwide. For this reason, most of the research today is focused on natural medicinal products. As a result, the aim of this article is to review the anticancer properties of cyanobacteria in the pharmaceutical and medical industry.To write this article, both the experiences and articles of the authors of the article and the latest articles available in the Web of Science, Pub Med, Google Scholar, Scopus and ScienceDirect databases have been used. Natural products are an important source of new medicinal compounds that not only have medicinal value, but are also used as building models for creating synthetic analogs. In the meantime, secondary marine metabolites extracted from cyanobacteria as a desirable source of potential new medicinal active compounds have structural diversity and diverse biological activities such as anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial and anti-tumor properties.This review article examines the potential of compounds and metabolites of cyanobacteria as anticancer drugs and examines their chemical structure and mechanisms of actionof action.

Key words: Cancer, cyanobacteria, microalgae, secondary metabolites, bioactive compounds

بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در نمونه خون های افراد سرولوژی مثبت *بروسلا* در Real Time PCR شهرستان های شهرکرد و اصفهان به روش

حسین خدابنده[1]، نازیلا ارباب سلیمانی[2*]

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

نویسنده مسئول*: *nazilaarbab@yahoo.co.uk*

چکیده

بیماری بروسلوز جزء شایع ترین بیماری های باکتریایی مشترک انسان و دام است که در انسان ایجاد تب مالت نموده و خسارات اقتصادی بالایی را در حیوانات اهلی به بار می آورد. در این تحقیق با استفاده از روش Real Time PCR به بررسی فراوانی گونه های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* در سرم افراد سرولوژی مثبت پرداختیم. نمونه های سرمی ۳۰ نفر از افرادی که تست رایت آن ها مثبت شده بود (بالای ۱/۱۶۰)، از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان های شهرکرد و اصفهان جمع آوری و DNA نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن استخراج شد. به منظور تشخیص جنس و گونه های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* واکنش Real Time PCR بر روی نمونه ها انجام شد.در این بررسی تمام ۳۰ نمونه مورد بررسی با روش Real time PCR تأیید شدند. در شهر های اصفهان و شهرکرد در تمامی موارد *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در جنس مونث پس از انجام آزمون Real Time PCR فقط باکتری *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد در حالی که در جنس مذکر ۲۲ مورد (۷۳/۳۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۳ مورد (۱۰درصد) *بروسلا ملی تنسیس* شناسایی گردید. از ۷ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی زیر ۳۰ سال، ۶ مورد (۸۵/۷درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ مورد (۱۴/۳درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در صورتی که از ۲۳ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال، ۲۱ مورد (۹۱/۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۲ مورد (۸/۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در سال های اخیر روش های مولکولی زیادی برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار گرفته اند. روش Real Time PCR از این نظر که نیازمند صرف زمان کم و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می باشد، در تشخیص این بیماری بسیار مفید می باشد.

واژه های کلیدی: *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس*، سرولوژی، Real Time PCR

مقدمه

بروسلوز یکی از پنج بیماری مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری های جنس *بروسلا* به وجود می آید(۱). بعضی از انواع *بروسلا* مثل *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا سوئیس* دارای میزبان های ویژه می‌باشند، *بروسلا*ها باکتری های کوکوباسیل گرم منفی، کوچک، باریک و کوتاهی هستند، که گاهی به شکل باسیل و یا کوکسی نیز مشاهده می‌شوند طول متغیری حدود ۱/۵-۰/۶ میکرومتر و عرض ۰/۷-۰/۵ دارد. غیر متحرک بوده و

اسپور تولید نمی کند. از منابع طبیعی شکل L-Form باکتری نیز جداسازی شده است. مقاومت در برابر رنگ بری بوسیله محلول های رقیق اسیدی و قلیای امکان به کارگیری رنگ آمیزی های متفاوت و غیر اختصاصی را در بافت های آلوده، از قبیل زیل نیلسون اصلاح شده، ماشیاولو و روش کوستر فراهم کرده است (۲،۳).

بروسلوز در تمام مناطق دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورها محسوب می گردد. به طور تقریبی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* مسئول تمامی موارد بروسلوز در انسان و دام کشور ما هستند. در ایران بروسلوز یک بیماری اندمیک در تمام قسمت های کشور می باشد (۴). علائم بالینی بروسلوز بسیار غیر اختصاصی است. این بیماری به اشکال مختلف نمایان می گردد. علائم این بیماری شامل: تب، تعریق، لرز، سردرد، درد عضلانی، خستگی، بی اشتهائی، درد مفاصل، کمر درد، کاهش وزن، یبوست، درد گلو، سرفه خشک، علائم شبیه سرماخوردگی، التهاب مفاصل، بزرگ شدن غدد لنفاوی، افسردگی (درگیری عصبی مرکزی)، درگیری قرنیه چشم و ضایعات پوستی، کاهش وزن، درد شکم، اختلال خواب، بزرگ شدن کبد و طحال، رنگ پریدگی و درد ستون فقرات می‌باشد. البته گاهی بیماری بروسلوز مزمن می شود که در این حالت علائم خفیف تر ولی مداوم و یا مکرر شده و این افراد مثلاً با تب مکرر ولی خفیف، درد مفاصل و یا خستگی مراجعه می‌کنند. گاهی نیز در عفونت های شدید، دستگاه عصبی مرکزی و یا گاهی لایه داخلی قلب گرفتار می‌شود که در این موارد، بیماری عوارض خطرناکی می تواند داشته باشد(۵). سالانه ۵۰۰ هزار مورد جدید درگیری با بروسلوز در جهان گزارش می-شود که طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت این تعداد در برابر شیوع واقعی آن ناچیز می‌باشد، زیرا این بیماری علائم بالینی متفاوتی دارد. تنوع، غیراختصاصی و غیر تیپیک بودن علائم بالینی بروسلوز ضرورت تشخیص بر اساس یافته های آزمایشگاهی را روشن می‌سازد(۶). به طور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بروسلوز نیازمند شناخت سریع و صحیح فراوانی و توزیع مکانی و زمانی آن است. کشت های باکتریولوژیکی و آزمایش های سرولوژیکی متکی بر آگلوتیناسیون شایع ترین آزمون‌های مورد استفاده در تشخیص عفونت های انسانی و حیوانی بروسلوز هستند(۷). در سال های اخیر روش های مولکولی زیادی برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. روش Real Time PCR از این نظر که نیازمند صرف زمان کم و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشد، در تشخیص این بیماری بسیار مفید می‌باشد(۸).

این روش تلفیقی از تکنیک PCR و تکنیک کاربرد پروب های فلورسنس است که هر دو در یک واکنش جمع گردیده اند به طور کلی در این روش نوین واکنش PCR و شناسایی قطعه تکثیر یافته در یک ساعت یا کمتر انجام می‌شود که این امر باعث افزایش سرعت و صرفه جویی در زمان نسبت به سیستم های رایج PCR گردیده است. مزیت دیگر این تکنیک نسبت به PCR این است که مراحل Post PCR که شامل ژل الکتروفورز، رنگ آمیزی با ماده سرطان زای اتیدیوم بروماید و تفسیر ژل با نور ماورای بنفش می باشد، حذف گردیده و آلودگی محیط آزمایشگاه به اتیدیوم بروماید و قطعات DNA تکثیر یافته به روش PCR نیز به حداقل می‌رسد. کار با تجهیزات و دستگاه های به کار گرفته شده در Real Time PCR به طور قابل ملاحظه ای نسبت به PCR ساده تر بوده و مجموعه مزایایی نظیر ترکیب حساسیت و ویژگی بالا، خطر آلودگی پایین، ساده بودن کارکرد و سرعت بالا، باعث شده است تا فناوری Real Time PCR جذاب‌تر از روش‌های رایج بر پایه کشت یا تست های ایمونولوژیکی در آزمایشگاه

میکروبیولوژی بالینی برای تشخیص عوامل عفونی گردد(۹).

با توجه به قرار گرفتن ایران در منطقه شایع بروسلوز و هم چنین عوارض و خطرات بالقوه بروسلوز و هزینه‌هایی که بر اقتصاد تحمیل می‌کند، اهمیت لزوم تحقیق در مورد میزان شیوع واقعی و هم چنین استفاده از بهترین، دقیق‌ترین و به صرفه‌ترین روش برای تشخیص این شیوع لازم به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی روش Real Time PCR برای تشخیص بروسلوزیس در نمونه سرم های مثبت *بروسلا* به عنوان ابزار تشخیصی کارآمد در تشخیص افراد آلوده حقیقی و بررسی گونه های درگیر کننده *بروسلا* در این افراد است.

مواد و روش کار

نمونه گیری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه های سرمی مربوط به ۳۰ نفر از افرادی که تست رایت آن ها مثبت شده بود، از آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان های شهرکرد و اصفهان جمع آوری و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند.

استخراج DNA

به منظور تشخیص مولکولی، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) مطابق روش کار کیت انجام شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شده و مقدار ۵µl از آن را بر روی ژل آگارز ۱درصد ران می‌کنیم. ژل را درون تانک الکتروفورز گذاشته و از هر نمونه DNA تخلیص شده به میزان ۵ µl با رنگ برموفنل بلو (Loading Buffer) مخلوط کرده و توسط سمپلر درون چاهک‌ها ریخته شد. در یکی از چاهک‌ها مارکر ریخته شد و پس از نیم ساعت ران شدن با ولتاژ ۸۰، ژل را برداشته و با رنگ DNA Self Saine رنگ آمیزی می‌کنیم. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا درون یک ظرف مقداری آب دیونیزه ریخته شد و شیشه‌ها به آرامی از روی ژل برداشته شد (نباید ژل پاره شود). سپس ژل را درون ظرف آب قرار داده و ۱۵ میکرولیتر رنگ مورد نظر به آن اضافه گردید و پس از حدود ۱۵ دقیقه توسط دستگاه ژل داک (UV) از ژل فوق عکس گرفته شد و کیفیت DNA استخراج شده را ارزیابی می‌کنیم. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید.

واکنش Taq-Man Real Time PCR

به منظور انجام واکنش Taq-Man Real Time PCR پرایمر مورد استفاده برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* و هم چنین توالی پروب مورد استفاده جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan مطابق دستورالعمل کارخانه رقیق سازی گردید. توالی پرایمرهای و پروب‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۱) نشان داده شده است (۱۰). جهت رقیق سازی پروب مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در تاریکی و تحت شرایط استریل ۱۰۰۰میکرولیتر آب Nuclease free بدون عمل پیپتینگ به ویال حاوی پروب افزوده و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. سپس ۵۰ میکرولیتر از پروب را برداشتیم و با ۲۰۰ میکرولیتر آب Nuclease free مخلوط نمودیم. واکنش Real Time PCR جهت تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۶۲۵ پرایمر F، ۰/۶۲۵ پرایمرهای R،

۰/۳ میکرولیتر پروب، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۴۳ میکرولیتر آب مقطر، به صورت جداگانه برای هر ژن صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه Light Cycler مخصوص Real Time PCR قرار داده شده اند. برنامه زمانی- گرمایی با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene 6000 در ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه (Hot Start)، سپس ۴۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه دقیقه تنظیم گردید . علاوه بر ۴۵ سیکل تکثیر، یک سیکل نیز در دامنه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت رسم منحنی ذوب، به وسیله قرائت رنگ فلورسانس TaqMan probe برای دستگاه تعریف شد.

جدول ۱- توالی آغازگرها و پروب‌ها

توالی هدف	توالی پرایمر (′۳→′۵)	توالی پروب (′۳→′۵)
IS711	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT	FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA
BMEII0466	TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2
BruAb2_0168	GCACACTCACCTTCCACAACA A/ CCCCGTTCTGCACCAGACT	FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1

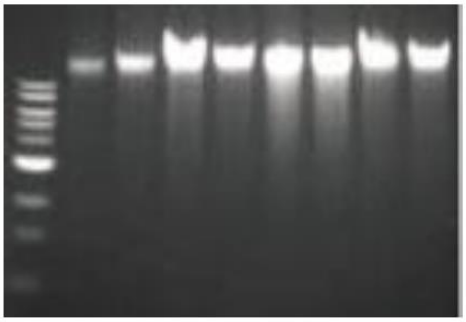
آنالیز آماری

در نهایت ارتباط آماری (جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها) حاصل از نتایج به دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت. در نتیجه به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آمار استنباطی (آزمون های دقیق فیشر و مربع کای) با استفاده از نرم افزار SPSS20 استفاده گردید و ارتباط آماری حاصل از نتایج به دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت و در این بررسی $P < 0.05$ به‌عنوان معنی دار، معرفی شد.

نتایج

نتایج کیفی مربوط به استخراج DNA

استخراج DNA طبق روش شرکت سازنده کیت انجام شد و در شکل ۱ نتایج استخراج DNA نشان داده شده است. شماره‌های ۱ تا ۵ همگی نشان دهنده غلظت بالای DNA است.



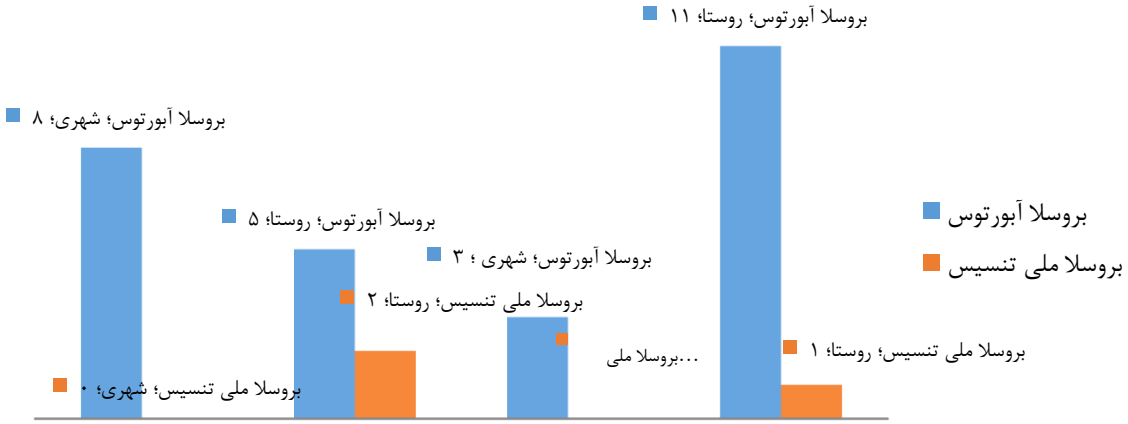
شکل ۱- تصویر الکتروفورDNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه سرم مثبت به منظور ردیابی ژنوم باکتری *بروسلا*، مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار ۱). که ۱۵ مورد (۵۰ درصد) مربوط به شهرستان اصفهان و ۱۵ مورد (۵۰درصد) مربوط به

شهرستان شهرکرد بودند. از ۱۵ نمونه مورد بررسی در شهرستان اصفهان، ۸ مورد در شهرها (۵۳/۳درصد) و ۷ مورد (۴۶/۷درصد) در روستاها اقامت داشتند (جدول ۲). بیش‌ترین میزان ابتلا در شهر اصفهان مربوط به ساکنین شهرها (۵۳/۳درصد) می باشد در حالی که ۷ مورد از روستاییان اصفهان (۴۶/۷درصد) به بروسلوز مبتلا بودند. از ۸ مورد آلودگی به *بروسلا* در شهرستان اصفهان ۸ مورد (۱۰۰درصد) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شدند و *بروسلا ملی تنسیس* در هیچ نمونه ایی یافت نشد. در صورتی که از ۷ نمونه آلوده به *بروسلا* در روستاهای اصفهان ۵ نمونه (۷۱/۴۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۲ نمونه (۲۸/۵۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند.

فراوانی را در مناطق روستایی شهرکرد دارد(نمودار ۱).

از ۱۵ نمونه مورد بررسی در شهرستان شهرکرد ۱۱ مورد در شهرها (۷۳/۳درصد) و ۴ مورد (۲۶/۷درصد) در روستاها اقامت داشتند. بیشترین میزان ابتلا در شهرستان شهرکرد، مربوط به ساکنین شهرها می‌باشد. از ۱۱ مورد آلودگی به *بروسلا* در شهرستان شهرکرد، ۱۱ مورد (۱۰۰درصد) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شدند و *بروسلا ملی تنسیس* در هیچ نمونه ای یافت نشد. در صورتی که از ۴ نمونه آلوده به *بروسلا* در روستاهای شهرکرد، ۳ نمونه (۷۵درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ نمونه (۲۵درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. که نشان می‌دهد که *بروسلا آبورتوس* بیش‌ترین فراوانی را در مناطق روستایی شهرکرد دارد(نمودار ۱).

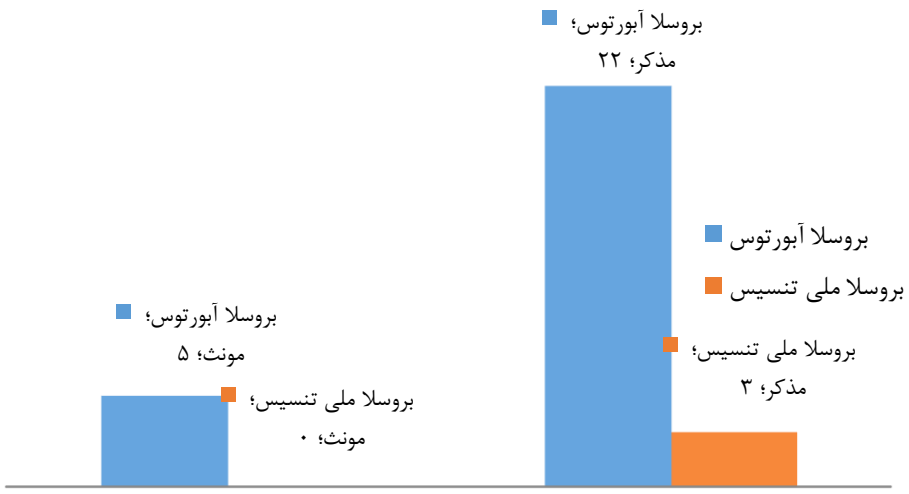


نمودار ۱- فراوانی *بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس* در شهرستان های اصفهان و شهرکرد

جدول ۲- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در شهرها و روستاهای اصفهان و شهرکرد

شهر و محل سکونت	اصفهان (۱۵)				شهرکرد (۱۵)				p-value
	شهر (۸) ۵۳/۷ درصد		روستا (۷) ۴۶/۷ درصد		شهر (۱۱) ۷۳/۳ درصد		روستا (۴) ۲۶/۷ درصد		
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۸	۱۰۰	۷	۱۰۰	۱۱	۱۰۰	۴	۱۰۰	۰/۲۵۱
بروسلا آبورتوس	۸	۱۰۰	۵	۷۱/۴۳	۱۱	۱۰۰	۳	۷۵	
بروسلا ملی تنسیس	۰	۰	۲	۲۸،۵۷	۰	۰	۱	۲۵	

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین منطقه (شهر و روستا) و آلودگی *بروسلا* ارتباط معنی داری مشاهده نگردید (p-value>0/05). از ۳۰ نمونه مورد بررسی ۲۵ مورد (۸۳/۳درصد) مربوط به جنس مذکر و ۵ مورد (۱۶/۷درصد) مربوط به جنس مونث بودند. که در جنس مونث پس از انجام آزمون Real Time PCR فقط باکتری *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد در حالی که در جنس مذکر ۲۲ مورد (۷۳/۳۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۳ مورد (۱۰درصد) *بروسلا ملی تنسیس* شناسایی گردید (جدول ۳).

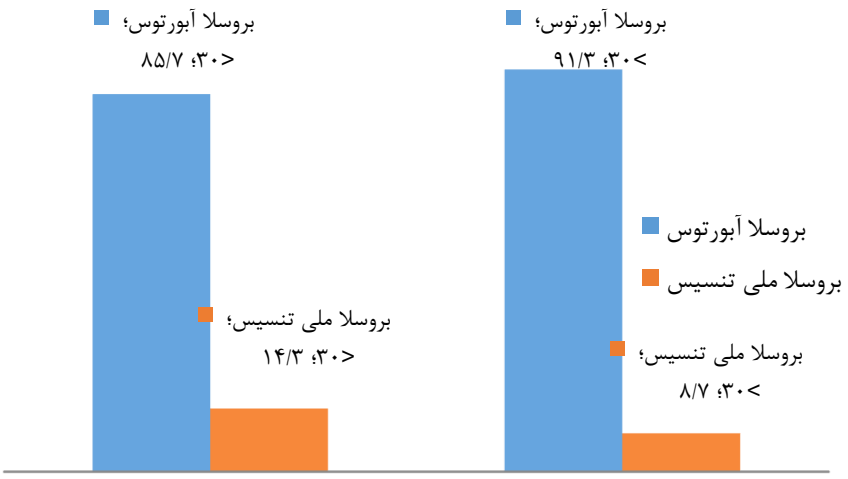


نمودار ۲- فراوانی *بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس* در دو جنس مذکر و مونث

جدول ۳- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در جنس مونث و مذکر

جنسیت	مونث (۵)		مذکر (۲۵)		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۵	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱/۰۰
بروسلا آبورتوس	۵	۱۰۰	۲۲	۸۸	
بروسلا ملی تنسیس	۰	۰	۳	۱۲	

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آلودگی به *بروسلا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-Value=1/00>0/05). از نظر گروه های سنی، افراد مورد مطالعه به دو گروه زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال طبقه بندی شدند. ۷ مورد (۲۳/۳۳درصد) مربوط به افراد زیر ۳۰ سال و ۲۳ مورد (۷۶/۶۷درصد) مربوط به افراد بالای ۳۰ سال می باشد (نمودار ۴). از ۷ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی زیر ۳۰ سال، ۶ مورد (۸۵/۷درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ مورد (۱۴/۳درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در صورتی که از ۲۳ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال، ۲۱ مورد (۹۱/۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۲ مورد (۸/۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند (جدول ۵).



نمودار۴- درصد آلودگی به در گروه های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال

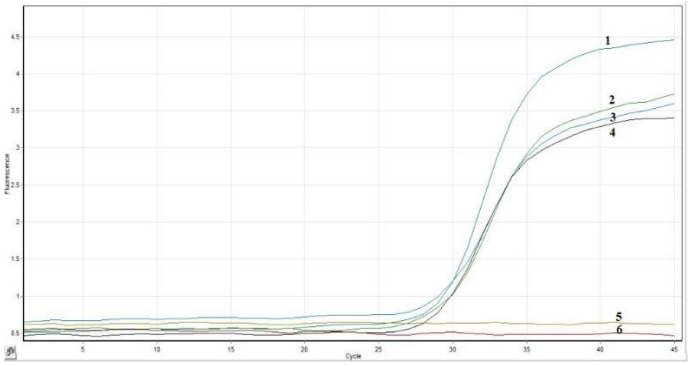
جدول ۵- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در گروه های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال

سن	<۳۰ (۷)		>۳۰ (۲۳)		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۷	۱۰۰	۲۳	۱۰۰	
بروسلا آبورتوس	۶	۸۵/۷	۲۱	۹۱/۳	۱/۰۰
بروسلا ملی تنسیس	۱	۱۴/۳	۲	۸/۷	

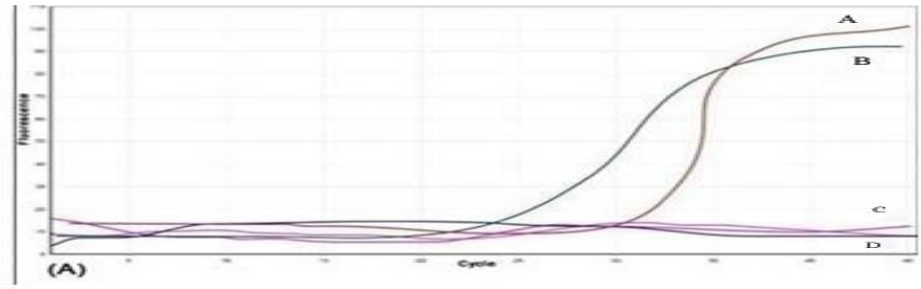
در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین گروه سنی و آلودگی به *بروسلا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value=1/00>0/05).

نتایج Real Time PCR

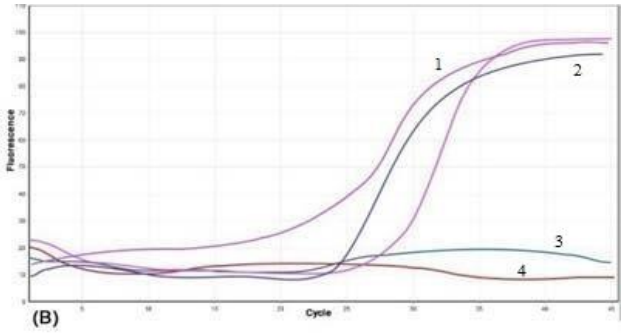
در مرحله اول ابتدا از طریق روش Real Time PCR به تشخیص *بروسلا* پرداخته شد. در مرحله بعدی بر اساس آنالیز منحنی ذوب ایجاد شده از واکنش Real Time PCR می‌توان به تشخیص گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* پی برد. در شکل های ۱، ۲ و ۳ مراحل پروفایل حرارتی برای جنس *بروسلا* و گونه های *بروسلا* در دستگاه Real Time PCR نشان داده شده است. CT کم تر از ۴۰ مثبت در نظر گرفته شد.



شکل۲- آنالیز منحنی ذوب برای جنس *بروسلا*: خط ۱: کنترل مثبت. خطوط ۲، ۳ و ۴: نمونه‌های مثبت جنس *بروسلا*. خط ۵: کنترل منفی. خط ۶: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل۳- آنالیزمنحنی ذوب برای گونه *بروسلاآبورتوس*. خط A: کنترل مثبت.خط B: نمونه مثبت. خط C: کنترل منفی.خط D: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل۴- آنالیزمنحنی ذوب برای گونه *بروسلاملی تنسیس*. خط ۱: کنترل مثبت.خط ۲: نمونه مثبت. خط۳: کنترل منفی. خط۴: نمونه منفی برای واکنش است.

بحث

طبق آخرین گزارش های وزارت بهداشت و کتاب راهنمای کشوری مبارزه با بروسلوز (تب مالت) پراکندگی بیماری در ایران در استان چهار محال و بختیاری نسبت به استان اصفهان بیشتر است که بر این اساس استان چهار محال و بختیاری جز استان های با آلودگی متوسط (میزان بروز ۲۰-۱۱ درصد) است و استان اصفهان جز استان های با آلودگی پایین (میزان بروز ۱۰-۰ درصد) است. در تحقیق ما آلودگی به *بروسلا* در ساکنین شهرها نسبت به روستاها بیشتر می‌باشد که می تواند به علت عواملی از قبیل توزیع لبنیات غیر پاستوریزه (خامه و پنیر محلی) و ارتباط تنگاتنگ ساکنین شهرها با روستاها باشد. بیماری در تمامی سنین وجود دارد ولی وفور آن در سن ۳۰-۲۰ سالگی است، یعنی نیروی فعال و کارآمد کشور در معرض خطر این بیماری هستند. در مطالعه حاضر بیماری بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال شیوع بیشتری دارد در حالی که در تحقیق انجام شده توسط زینلی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۳۰-۲۰ سال و در تحقیق قاسمی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۱۹-۱۵ برآورد گردید (۱۱،۱۲). با توجه به شیوع بالاتر بیماری بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال در تحقیق ما می‌توان نتیجه گیری کرد که آگاهی این گروه نسبت به راه های انتقال بیماری به اندازه کافی نیست و جا دارد که با آموزش بیشتر و تأکید بر راه های انتقال بیماری میزان آگاهی را نسبت به این بیماری بالا برد. بیماری در هر دو جنس دیده می‌شود تحقیقات متعدد انجام شده حاکی از آن است که میزان آلودگی به بروسلوز در جنسیت مرد نسبت به جنسیت زن بیشتر می باشد که در تحقیق ما نیز چنین نتیجه ای به دست آمد. بیماری را انحصاراً نمی‌توان یک بیماری شغلی محسوب نمود ولی شغل به عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری مطرح است به خصوص نزد خانم های خانه دار (خانم های خانه دار عمدتاً به عنوان دامدار و کشاورز دوشادوش همسرانشان در مناطق روستایی به فعالیت می‌پردازند)، دامداران، کشاورزان. بیماری در تمام فصول وجود دارد ولی در فصل بهار و تابستان هم زمان با فصل زایش و شیردهی دام ها بیش تر دیده می‌شود.در تحقیق حاضر تمامی نمونه های سرم مثبت در آزمون Real Time PCR مثبت تشخیص داده شدند که یکی از دلایل اختلاف با تحقیق دل بیشه می-تواند متفاوت بودن تیتر واکنش رایت لوله ای باشد. در تحقیق دیگری که توسط سهرابی و همکاران درسال

۲۰۱۱ بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ نمونه سرم مثبت و ۲۵ نمونه سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به *بروسلا* تشخیص داده نشد ولی آلودگی *بروسلا* در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده و هم چنین نمونه های سرم مثبت را مورد تأیید قرار داد(۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری *بروسلا آبورتوس* بر روی سویه استاندارد و واکسن *بروسلا آبورتوس، ملی تنسیس، سوئیس، نئوتومه* و ۱۵ ایزوله *بروسلا آبورتوس* جداشده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملا اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری *بروسلا* گونه *آبورتوس* به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد(۱۳). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران درسال ۱۳۹۰ که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیتر برابر و بالای ۱۶۰ داشتند، جهت گونه *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد *بروسلا ملی تنسیس* گزارش گردید (۱۴). در صورتی که در تحقیق ما *بروسلا آبورتوس* از فراوانی بالاتری برخوردار می باشد. در تحقیق انجام شده توسط دل بیشه و همکاران که درسال ۱۳۹۱ که بر روی ۴۵ نمونه ی مثبت خون گوسفند از نظر تست های سرولوژیکی در چندین شهرستان استان مازندران صورت گرفت، تنها ۲۰ نمونه از نظر حضور باکتری های جنس *بروسلا* با استفاده از روش Real Time PCR TaqMan مثبت تشخیص داده شدند(۱۵). Newby و همکاران در سال ۲۰۰۳ تشخیص *بروسلا آبورتوس* به روش Real Time PCR انجام گرفت که مقایسه ای را بین سه تکنیک SYBR Green، ۱ و ۵ اگزونوکلئازی و پروب های هیبرید شونده انجام دادند. در این سه روش از همان پرایمر تقویت شده برای تولید یک قطعه ی یکسان استفاده شده است این قطعه محدوده های یک منطقه از ژنوم *بروسلا آبورتوس* که شامل بخش هایی از ژن *Alk B* و عنصر IS711 الحاق شده است هر سه روش دارای حساسیت قابل ملاحظه ای بوده است با این حال بیش‌ترین ویژگی را با استفاده از روش پروب هیبریداسیون به‌دست آوردند(۱۶). در مطالعه انجام شده توسط Jolie و همکاران درسال ۲۰۰۷ تعیین سریع جدایه های در مرحله تشخیص گونه با روش Multiplex- PCR بر پایه SNP صورت گرفت که در آن سه ژن *omp25*، *glk* و *trpE* هدف بودند (۱۷). در ایران توسط مالک نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۷ برای تعیین گونه های *بروسلا* در مناطق مرکزی کشور با تکنیک PCR-RLFP روی ژن های *Omp2b* و *Omp2a* پروتئین های غشای خارجی مطالعه شد که اختلاف بین انواع *بروسلا*های بیماری زا و برخی بیوتایپ های آن را مشخص کرد(۱۸). در سال ۲۰۰۹ Hinic و همکاران روش Real Time PCR مبتنی بر پایه ی IS711 به توصیف ارزیابی روش بر پایه سکوئنس درج شده روی *بروسلا آبورتوس* با نمونه های خون ۱۹۹ گراز نر و نمونه ی بافت ۵۳ گراز نر وحشی جمع آوری شده از *سوئیس* پرداختند *بروسلا* در ۱۱/۱ درصد از نمونه ی خون ۱۹۹ نر وحشی با روش IS711 Real Time PCR که تست سرولوژی آن ها منفی بود تشخیص داده شد(۱۹). در سال ۲۰۱۰ توسط Bertu و همکاران روی نمونه های شیر از گله های فاقد واکسیناسیون و گاوهای بدون علایم آبسه ی غده ی پستانی مطالعه شد. در این بررسی آنتی بادی های ضد *بروسلا*به عنوان ملاک

تشخیصی به کار گرفته شد(۲۰). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران درسال ۱۳۹۰که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیتر برابر و بالای۱۶۰ داشتند، جهت گونه *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد *بروسلا ملی تنسیس* گزارش گردید (۱۴). در تحقیق انجام شده توسط سهرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ سرم مثبت و ۲۵ سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به *بروسلا* تشخیص داده نشد ولی آلودگی *بروسلا* در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده مورد تأیید قرار گرفت (۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری *بروسلا آبورتوس* بر روی سویه استاندارد و واکسن *بروسلا آبورتوس*، *ملی تنسیس*، *سوئیس*، *نئوتومه* و ۱۵ ایزوله *بروسلا آبورتوس* جداشده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملاً اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری *بروسلا* گونه *آبورتوس* به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد (۱۳).

نتیجه گیری کلی

با توجه به محدودیت های کشت های باکتریولوژیکی و آزمایش های سرولوژیک و فقدان حساسیت لازم چنین تست هایی در بیمارانی که به بروسلوز مزمن مبتلا هستند، از طرف دیگر وجود واکنش متقاطع با دیگر باکتری های گرم منفی که منجر به نتایج مثبت کاذب می گردد، به منظور تسهیل در این مشکلات و با وجود درجه ی بالایی از شباهت ژنتیکی بین گونه های *بروسلا* روش های مولکولی از قبیل PCR و Real time PCR که آسان تر، سریع تر، امن تر، راحت تر و دقیق تر از روش های سنتی هستند مناسب به نظر می رسند.

منابع

1. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. (2007). Human brucellosis. Lancet infect dis. 7(12): 775-786.

۲. جاوتز ا، ملنیک ج، آدلبرگ ا. (۱۳۷۸)، *هموفیلوس*، *بوردتلا*، *بروسلا*، میکروبیولوژی جاوتز، نوروزی ج، چاپ اول، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی حیان، تهران، ۳۰۰-۳۰۳.

3. Ko J, Splitter GA. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.Clin Microbiol Rev. 16(1): 65-78.

4. Pakzad I, Rezaee A, Emaneini M, Hosseini AZ, Tabbaraee B, Taherikalani M. (2009). Expression of Human Serum Albumin - L 7/L 12 (*Brucella abortus* Ribosomal Protein) Fusion Protein in Saccharomyces cerevisiae. Pol J Microbiol. 58(2): 99-104.

5. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Grave MH. (2003). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella spp*, *B. abortus*, and *B. melitensiss*. J Cn Microbiol. 42(3): 1290-1293.

۶. ناصری ز، یوسف علیخانی م، هاشمی ح، عربستانی م. (۱۳۹۳). تعیین گونه های *بروسلا* ایزوله شده از نمونه های خون بیماران مشکوک به بروسلوزیس با روش PCR.مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۱۷(۵): ۵۲-۵۹.

۷. جعفرپور م، کترا ابراهیمی ن، ناظمی ع، آسمار م، خاتمی نژاد م. (۱۳۸۹). مقایسه آزمایش های

سرولوژیک (رزبنگال، رایت لوله های و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز گوسفند و بز. پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی پژوهشی. ۷(۴):۳۳۷-۳۴۲.

8. Sohrabi M, Mohabati Mobarez A, Behmanesh M, Khoramabadi N, Hosseini Dous R. (2011). Evaluation of a new set of Real-Time PCR for *Brucella* detection within human and animal samples. J Pharma Health Sci. 1(2): 14-17.

۹. دوستی ع، کارگر م، قربانی دالینی ص، سرشار م. (۱۳۹۱). مبانی Real Time PCR و تکنیک FRET در تشخیص بیماری های عفونی. دنیای میکروب ها. ۴ (۱۴): ۴۱-۴۵.

10. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya PV, Frey J, Abril C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and Real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 75(2): 375–378.

۱۱. زینلی م، شیرزادی م ر. (۱۳۸۷). عوامل مؤثر در افزایش و کاهش بروز بروسلوز (تب مالت) در انسان در کشور از سال ۶۵ لغایت ۸۵، پانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، جامعه دامپزشکان ایران. سال۱۳۸۷، ۲۰۰-۲۰۱

12. Ghasemi B, Mohammadian B, Majidpour M. (2004). Epidemiology of human and animal brucellosis in Kurdistan province in 1997-2001. Kurdistan Uni Med Sci. 8 (30)): 23-32.

۱۳. زهرایی صالحی ت، آقایی پور خ ، عالمیان س، اکبری الف ، اسماعیل زاد م، نیری فسایی ب، صفویه ص ، اعتمادی الف. (۱۳۹۲). پنجمین کنگره ی بروسلوزیز بین المللی ایرانیان. سال۱۳۹۲، ۳۱-۲۹.

۱۴. محمد زاده ر، یوسف زاده ر. (۱۳۹۰). تشخیص *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR. اولین کنگره بین المللی باکتریولوژی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز. سال ۱۳۹۰، ۲۴۵۹.

۱۵. دل بیشه م، ناظمی ع، جعفر پور م. (۱۳۹۱). راه اندازی روش حساس و اختصاصیReal-Time PCR به منظور تشخیص گونه های *بروسلا*. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. ۴ (۱): ۱۱۰.

16. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. (2003). Real-Time PCR Detection of *Brucella abortus*: a Comparative Study of SYBR Green I, Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. Appl Environ Microbiol. 69(8): 4753-4759.

17. Jolie CS, Mark SK, Michael RS, Adrian MW. (2007). Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *brucella* isolates at the species level. Appl Environ Microbiol. 73(22): 7331–7337.

۱۸. مالک نژاد پ، پیری دوگاهه ه، امیر زرگر ع، جعفری س، فتح اله زاده ب. (۱۳۸۷). تشخیص بروسلوز با استفاده از محیط کشت خون BACTEC و تائید آن با PCR. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۲(۴): ۸۳-۸۶.

19. Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. (2009). IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella spp.* in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. Bio Med Central. 5(22): 1-8.

20. Bertu WJ, Dapar M, Gusi AM, Ngulukun SS, Leo S, Jwander LD. (2010). Prevalence of *brucella* antibodies in marketed milk in Jos and environs. Afr J Food Sci. 4(2): 62-64.

Contamination of brucellosis in blood samples of seropositive patients for *Brucella* in the Shahr-e Kord and Isfahan city by Real Time PCR method

Hossein Khodabandeh[1], Nazila Arbab Soleimani[2*]

1. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran[1].
2. Department of Microbiology, Department of Microbiology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan,Iran[2*].

***Corresponding author:** *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

Abstract

Brucellosis is one of the most common bacterial diseases in both humans and animals.It causes human to suffer from Malta fever and has highly economic losses in livestock. Bacteriological culture and serological tests for the diagnosis of chronic cases are insensitive. Therefore, the use of Real Time PCR is a great help to evaluate the frequency of types of *brucella abortus* and *brucella melitensis* in serum of people with positive serology.Serum samples of 30 cases with right positive test (over 1/160) were collected from DNA clinical laboratories in the cities of Shahrekord and Esfahan and they were extracted with the use of signagen DNA extraction kit. In order to identify the genus and the types of *brucella abortus* and *brucella melitensis* Real Time PCR reaction was carried out on the samples.In this study, all 30 samples were confirmed with the use of Real Time PCR. *Brucella abortus* was detected in all samples in the cities of Esfahan and Shahrekord. After Real Time PCR test was run on females, *brucella abortus* was just detected, While in males, 22 (%73/33) cases suffered from *brucella abortus* and 3 (%10) suffered from *brucella melitensis*. From the total of 7 cases with brucellosis infection in the age group below 30 years old, 6 (%85/7) cases suffered from *brucella abortus* and 1 (%14/3) suffered from *brucella melitensis*, While from the 23 cases with brucellosis in the age group over 30 years old, 21 (% 91/3) had *brucella abortus* and 2 (%8/7) had *brucella melitensis*. In recent years many molecular methods have been used for the detection of this bacteria. Real Time PCR method in the sense that it requires less time and has high sensitivity and specificity is very useful in the diagnosis of the disease.

Keywords*:* *brucella abortus*, *brucella melitensis*, serology, Real Time PCR

Contamination of brucellosis in milk and cheese by Real time PCR
Fatemeh Khodaverdipour , Nazila Arbab soleimani *, Yasaman Boroun

Antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcers
Shima Shantiaei *

Investigating the antibacterial effects of methanolic extract of *Myristica fragrans* against broad-spectrum β-lactamase-producing *Streptococcus pyogenes* isolates
Elham Nikouie , Ashraf Kariminik*

Investigating the prevalence of resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from food samples
*** Hossein Khodabandeh, Mohammad Reza Saebi, Fahimeh Nourbakhsh**

Determination of phenotypic and genotypic pattern of antibiotic resistance in Escherichia coli isolates isolated from diabetic patients in Shahrekord
Fatemeh Khodaverdipour ,*Amin Roozbehi

Cyanobacteria are a rich source of anticancer drugs
Bahareh Nowruzi*, Sepideh Zandieh

Contamination of brucellosis in blood samples of seropositive patients for *Brucella* in the Shahr-e Kord and Isfahan city by Real Time PCR method

Hossein Khodabandeh, Nazila Arbab Soleimani *