

## فہرست مقالات

- تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز  
زیبا شانکی باورصاد\*، مریم رئیسی، مرضیہ سلیمانیان  
مروری بر پروبیوتیک‌ها بر روند سلامت و بیماری‌ها تاثیر پروبیوتیک بر بیماری گوارشی  
سہیلا فدایی\*
- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در جدایہ‌های اش‌ریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شہرکرد عنوان مکرر: مقاومت آنتی بیوتیکی جدایہ‌های بالینی اش‌ریشیا کلی در شہرکرد  
مرضیہ سلیمانیان، ساناز خاکسار حقانی، نازیلا ارباب سلیمانی\*  
چاپرون‌ها، مولکول‌های حیاتی در میکروب‌ها  
کیمیا گلستان‌فر\*
- بررسی آلودگی مواد غذایی نیمه آماده و فست فودها نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در استان چهارمحال و بختیاری  
منوچہر مؤمنی شہرکی، فاطمہ شیرازی باصری، یاس محمدی\*، حسین خدابندہ شہرکی  
بررسی و شناسایی آلودگی ماهی و میگوهای پرورشی به ویبریو در استان خوزستان  
رضا سلطانی، زہرا متقی\*، حسین خدابندہ شہرکی

## تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز

زیبا شانکی باور صاد<sup>۱\*</sup>، مریم رئیسی<sup>۱</sup>، مرضیه سلیمانیان<sup>۲</sup>

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

۲-۱ دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

نویسنده مسئول: zibashanaki91@gmail.com

### چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های کسب شده از بیمارستان‌ها و اجتماع می‌باشد. ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ مترشح‌ه از این باکتری، از دسته فاکتورهای ویروانس بسیار مهم و جزء سوپر آنتی‌ژن‌های توکسین پیروژنیک می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز می‌باشد. در این تحقیق ۱۳۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بیمارستانی به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن *tssI-1* مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA تشخیص قطعی باکتری انجام شد سپس فراوانی ژن *tssI-1* در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار تعیین شد. پس از انجام آزمون PCR و تشخیص قطعی باکتری، از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی توالی ژن *tssI-1* در ۶ ایزوله مشاهده گردید. در تست آنتی‌بیوگرام بیشترین مقاومت نسبت به سفازولین (۸۳/۳٪) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتین و وانکومایسین (۰٪) مشاهده گردید. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و اهمیت بالینی ژن *tssI-1* شناسایی به موقع و به کارگیری راه کارهای مناسب درمانی در کنترل عفونت امری ضروری به نظر می‌رسد.

**کلید واژه‌ها:** استافیلوکوکوس اورئوس، توکسین سندرم شوک توکسیک-۱، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

### مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (CA-MRSA) در سراسر دنیا گسترش یافت. اگرچه استافیلوکوکوس اورئوس یکی از اعضاء فلور نرمال بینی و روده در ۵۰-۳۰٪ از جمعیت جامعه می‌باشد، اما این ارگانیسم در ۹۰٪ از کارکنان بالینی بیمارستان‌ها حمل می‌شود. این باکتری به طور غیرمعمول نسبت به خشکی مقاوم است، به طوری که سریعاً و به آسانی از طریق دست‌های پرسنل درمانی و از طریق وسایلی مثل لباس‌ها، ملحفه‌ها و دستگاه‌ها به بیماران انتقال پیدا

استافیلوکوکوس اورئوس به طور مداوم یکی از چهار عامل عفونت‌های بیمارستانی (همراه با شریشیا کلی، انتروکوکوس فکالیس و پسودوموناس آئروژینوزا) می‌باشد. تاکنون استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) محدود به بیمارستان بوده ولی به واسطه افزایش عفونت‌های پوست و بافت‌های نرم و پنومونی نکروز دهنده در بیماران جوانتر، استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین در جامعه

همچنین منجر به نشت وسیع مویرگها می شود که منجر به کاهش حجم خون شده و مستقیماً برای میوکاردا، کلیه ها، کبد، ریه ها، بافت های لنفوئیدی، CNS و اعصاب محیطی توکسیک می باشد (۱). این سم با اتصال هم زمان به ناحیه  $V\beta$  در پذیرنده آنتی ژنی لنفوسیت های T و مولکول های MHC کلاس II فعالیت خود را انجام می دهد و منجر به فعال شدن ۳۰-۵٪ همه لنفوسیت های T یاریگر بیان کننده CD4 می شود (۵). فاکتورهای مناسب برای رشد/استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده TSST-1 عبارتند از وجود اکسیژن، pH خنثی، میزان پروتئین بالا، گلوکز کم، منیزیم پایین تا نرمال و دی کسید کربن زیاد در محیط های آزمایشگاهی، این شرایط به طور قابل توجهی موجب افزایش تولید TSST-1 و پروتئاز می شود (۶). این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت.

## ۲. آزمایش آنتی بیوگرام

ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کربی-بائر (دیسک دیفیوژن آگار) بر اساس رهنمودهای CLSI (پادتن طب) انجام شد. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه شامل آمیکاسین ( $30 \mu\text{g}$ )، سفازولین ( $30 \mu\text{g}$ )، سفکسیم ( $5 \mu\text{g}$ )، سفوکسیتین ( $30 \mu\text{g}$ ) (شرکت ROSCO، دانمارک)، سفتریاکسون ( $30 \mu\text{g}$ )، سیپروفلوکساسین ( $5 \mu\text{g}$ )، کلیندامایسین ( $2 \mu\text{g}$ )، اریترومایسین ( $15 \mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10 \mu\text{g}$ )، ایمی پنم ( $10 \mu\text{g}$ )، نالیدیکسیک اسید ( $30 \mu\text{g}$ )، نیتروفورانتین ( $300 \mu\text{g}$ )، تتراسایکلین ( $30 \mu\text{g}$ )، کوتریموکسازول ( $25 \mu\text{g}$ )، وانکومایسین ( $30 \mu\text{g}$ ) (پادتن طب، ایران) بود (۷، ۸).

## ۳. آزمایشات مولکولی

به منظور تأیید قطعی وجود استافیلوکوکوس اورئوس در دیپای ژن *aroA* در ایزوله ها، از واکنش زنجیره ای

می کنند. گونه های استافیلوکوکوس اورئوس به طور تیبیک نسبت به تعداد زیادی از داروها مقاومند و قادرند از مرگ به وسیله اکثر ضد عفونی کننده ها فرار نمایند. لذا این باکتری ها قادر به پایداری و رشد مناسب در محیط بیمارستان هستند و در نتیجه می توانند به اشخاصی که حساسیت بالایی به عفونت های استافیلوکوکی دارند مانند نوزادان تازه به دنیا آمده، بیماری دارای ضعف ایمنی، سوختگی ها و بیماران دارای وسایلی مثل کاتتر منتقل شوند (۱، ۲). استافیلوکوکوس اورئوس دارای فاکتورهای ویروانس متعددی از جمله ژن *tsst-1* است که منجر به کلونیزاسیون و بیماری زایی باکتری می شود (۳، ۴). این توکسین یک پروتئین ۲۴ کیلودالتونی است که اساساً به وسیله استافیلوکوکوس هایی تولید می شود که نسبت به یک یا دو باکتریوفاژ اختصاصی (باکتریوفاژهای ۵۲ و ۲۹ و یا هر دو) حساس هستند و دارای مقاومت کروموزومی نسبت به کادمیوم، آرسنات و پنی سیلین G را نشان می دهند. *TSST-1* یک سوپر آنتی ژن است که باعث بیان انتخابی رده هایی از سلول های T همراه با ازدیاد ترشح سایتوکین ها، مونوکاین ها و اوتاکوئیدها می گردند. این توکسین

## مواد و روش ها

### ۱. نمونه گیری و جداسازی باکتری استافیلوکوکوس

#### اورئوس

در این مطالعه به منظور تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس تعداد ۱۳۳ نمونه کلینیکی از قبیل مایع شکمی (آسیت) (۳ نمونه)، آبسه (۷ نمونه)، خون (۲۷ نمونه)، کاتتر (۴ نمونه)، مایع دیالیز (۱ نمونه)، چشم (ملتحمه، قرنیه، جسم خارجی مانند لنز) (۸ نمونه)، مایع مفصل (۴ نمونه)، بینی (۲ نمونه)، مایع پریکاردا (۱ نمونه)، مایع پلور (۲ نمونه)، زخم بستر (۱ نمونه)، ترشح چرکی (۱ نمونه)، مایع نخاع (۱ نمونه)، پوست (۴۸ نمونه)، زخم جراحی (۱۶ نمونه)، تراشه (۱ نمونه)، ادرار (۵ نمونه) و زخم استرنال (عمل قلب) (۱ نمونه) مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمان شهرستان اهواز صورت گرفت.

۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادینت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت. در مرحله دوم به منظور شناسایی ژن *tsst-1* در *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به شرح زیر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه.

پلیمرز استفاده شد (۹). در این تحقیق از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری‌های رشد یافته در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران)، استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت: در مرحله اول حضور قطعی *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایزوله‌ها با ردیابی ژن *aroA* با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن های *aroA* و *tsst1* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

اندازه (جفت باز)	توالی پرایمر	نام ژن
۱۱۵۳ bp	FA1AGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC RA2 CACAAGCAACTGCAAGCAT	<i>aroA</i>
۳۵۰ bp	TSST-1 ATGGCAGCATCAGCTTGATA TSST-2 TTTCCAATAACCACCCGTTT	<i>tsst1</i>

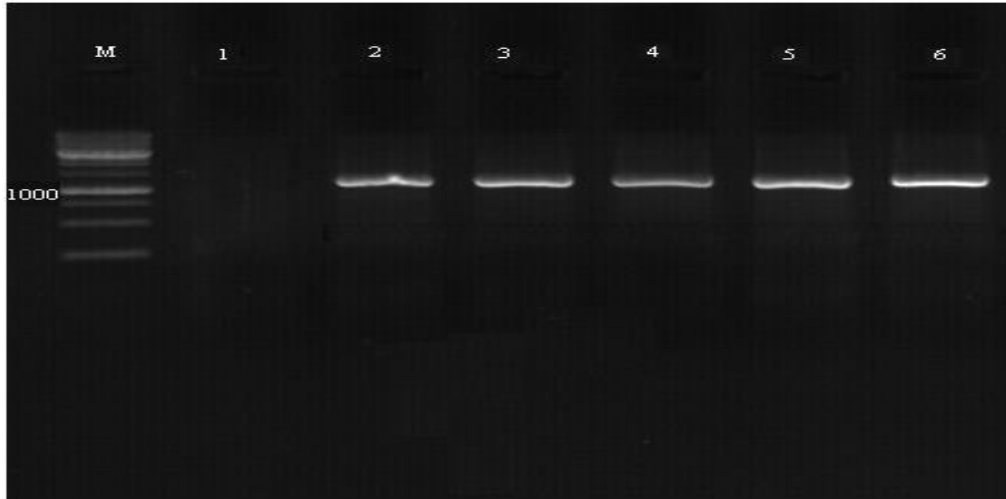
### نتایج

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و حضور توالی ژن *aroA* تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۱۵۳ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.

بعد از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۱٪ آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، Uviteck) مورد بررسی قرار گرفت.

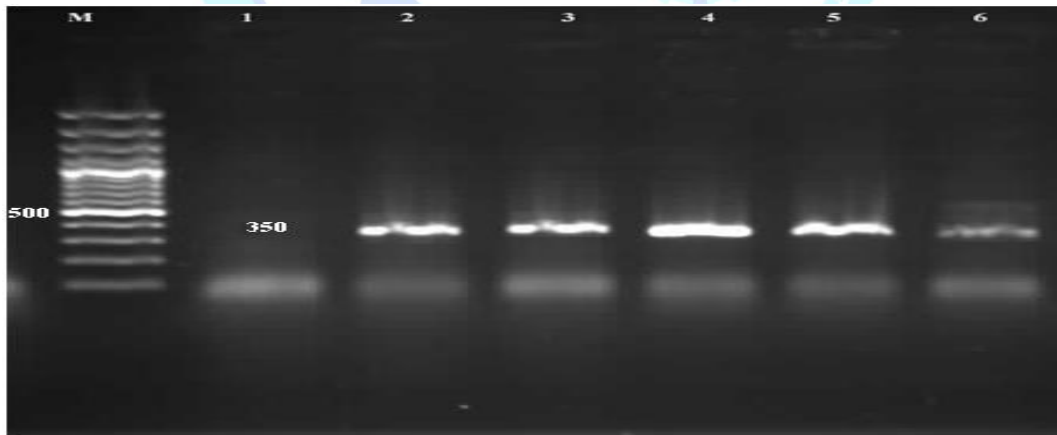
### ۴. آنالیز آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و نرم افزار آماری SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفتند.



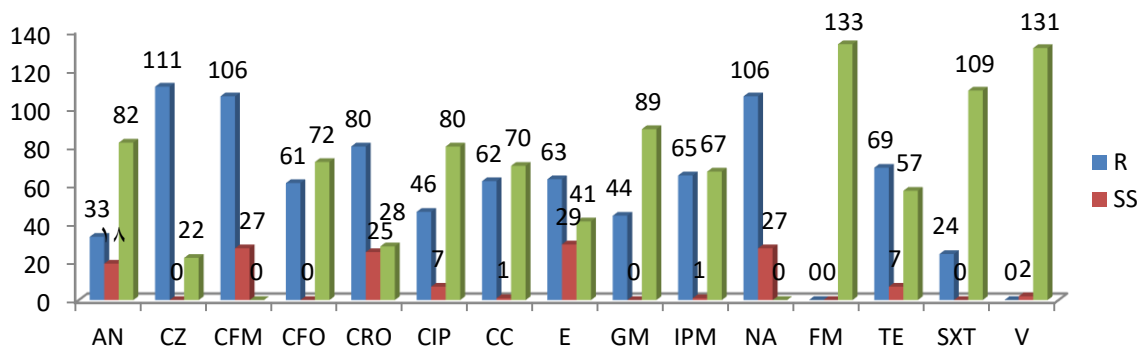
تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *aroA*/ستافیلوکوکوس اورئوس. ستون M: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون های ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه های مثبت واجد باند ۱۱۵۳ جفت بازی

با انجام آزمون PCR به منظور ردیابی ژن *tsst-1* از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی در ۶ ایزوله توالی ژن *tsst-1* مشاهده گردید. مشاهده باند ۳۵۰ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می باشد. نتایج در شکل (۲) نشان داده شده است.



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *tsst-1*/ستافیلوکوکوس اورئوس. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون های ۲، ۳، ۴، ۵ نمونه های مثبت

پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی، بیشترین مقاومت باکتری‌های ایزوله شده نسبت به سفتریاکسون (۶۰/۱۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به وانکومايسين و نیتروفورانتین (۰٪) مشاهده شد. نتایج در نمودار (۱) نشان داده شده است.



نمودار ۱: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک‌های مختلف

در این تحقیق از ۱۳۳ نمونه مورد بررسی ۷۶ نمونه مرد (۴۳٪) می‌باشد. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی بر متعلق به جنس زن (۵۷٪) و ۵۷ نمونه متعلق به جنس حسب جنسیت در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول ۲: میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب جنسیت

آنتی بیوتیک	جنسیت						p-value
	زن ۷۶n=			مرد ۵۷n=			
	R	I	S	R	I	S	
آمی‌کاسین (AN)	(.۳۲/۸)۲۵	(.۱۰/۹)۸	(.۵۶/۲)۴۳	(.۱۳/۲)۷	(.۸/۶)۹	(.۷۱/۲)۴۱	*.۰۲۲
سفازولین (CZ)	(.۵۰)۳۸	.	(.۵۰)۳۸	(.۱۰۰)۵۷	.	.	*.۰۸۷۶
سفاکسیم (CFM)	(.۷۵)۵۷	(.۲۵)۱۹	.	(.۱۰۰)۵۷	.	.	*.۰۰۰
سفاکسیتین = متی سلین (CFO)	(.۵۲/۴)۴۰	.	(.۴۷/۶)۳۶	(.۳۵/۸)۲۰	.	(.۶۴/۲)۳۷	*.۰۴۴
سفتزیاکسون (CRO)	(.۶۵/۲)۵۰	(.۱۲/۱)۹	(.۲۲/۷)۱۷	(.۵۳/۸)۳۱	(.۲۶/۹)۱۵	(.۱۹/۲)۱۱	*.۰۹۹
سیپروفلوکساسین (CP)	(.۳۷/۹)۲۹	(.۴/۵)۳	(.۵۷/۶)۴۴	(.۲۷/۸)۱۶	(.۷/۴)۴	(.۶۴/۸)۳۷	*.۰۴۱۲
کلیندامایسین (CC)	(.۵۰/۸)۳۹	.	(.۴۹/۲)۳۷	(.۳۹/۶)۲۳	(.۱/۹)۱	(.۵۸/۵)۳۳	*.۰۲۹۲
اریترومایسین (E)	(.۴۷/۷)۳۶	(.۲۱/۵)۱۶	(.۳۰/۸)۲۴	(.۴۳/۴)۲۵	(.۲۴/۵)۱۴	(.۳۲/۱)۱۸	*.۰۸۷۶
جنتامایسین (GM)	(.۲۰)۱۵	.	(.۸۰)۶۱	(.۱۰۰)۵۷	.	.	*.۰۰۰
ایمی پنم (IPM)	(.۵۴/۷)۴۲	.	(.۴۵/۳)۳۴	(.۳۸/۹)۲۲	(.۱/۹)۱	(.۵۹/۳)۳۴	*.۰۰۸۹
نالیدیکسیک اسید (NA)	(.۷۵)۵۷	(.۲۵)۱۹	.	(.۱۰۰)۵۷	.	.	*.۰۰۰
نیتروفوران‌تین (FM)	.	.	(.۱۰۰)۷۶	.	.	(.۱۰۰)۵۷	-
تتراسیکلین (TE)	(.۵۰)۳۸	.	(.۵۰)۳۸	(.۵۳/۶)۳۱	(.۱۰/۷)۶	(.۳۵/۷)۲۰	*.۰۰۸۶
کو‌تریموکسازول (SXT)	(.۲۱/۷)۱۶	.	(.۷۸/۳)۶۰	(.۱۵/۴)۹	.	(.۸۴/۶)۴۸	*.۰۴۴۲
ونکومایسین (V)	.	(.۱/۵)۱	(.۹۸/۵)۷۵	.	(.۱/۹)۱	(.۹۸/۱)۵۶	**۱/۰۰

در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو، بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های سفازولین، اریترومایسین، ایمی پنم، تتراسیکلین و کو‌تریموکسازول، سفتزیاکسون، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین،



القایی کلیندامایسین). نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. این پدیده به این صورت اتفاق می افتد که اگر در شرایط آزمایشگاهی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به کلیندامایسین حساس باشد ولی نسبت به اریترومايسن مقاوم باشد و این مقاومت را به کلیندامایسین القا کند به طوری که هاله عدم رشد به شکل حرف D مشخص شود، این پدیده را D می گویند و به صورت کلیندامایسین مقاوم و اریترومايسن مقاوم گزارش می شود (۱۰).

رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (  $P\text{-value} > 0/05$ ). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک‌های آمیکایسین، سفکسیم، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید (  $P\text{-value} < 0/05$ ). همچنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آنتی بیوتیک وانکومايسن رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (  $P\text{-value} > 0/05$ ). در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۰ ایزوله (۷/۵۱٪) DTest مثبت دیده شد (مقاومت



شکل ۳: پدیده D در استافیلوکوکوس اورئوس

در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس گزارش گردید. نتایج به تفکیک در جدول ۳-۴ و شکل مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (۴/۵۱٪) ژن *tss-I* ۳-۵ نشان داده شده است.

جدول ۳: فراوانی ژن *tss-I* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب جنسیت، نوع نمونه و مقاومت

آنتی بیوتیکی				
ردیف	جنسیت	سن	نوع نمونه	مقاومت آنتی بیوتیکی
۱	مرد	۵۴	ضایعات پوست	TE, CC, E
۲	مرد	۲۶	ضایعات پوست	CFO, CC, CRO, E, IMP, AN, CP
۳	مرد	۳۶	خون	TE
۴	زن	۱۷	خون	CFO
۵	زن	۴۷	ضایعات پوست	TE
۶	زن	۱۳	مایع مفصل	-

در جنسیت زن ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از خون، ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از ضایعات پوست و ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از مایع مفصل جدا شده بود.

از ۶ ایزوله واجد ژن *tss-I*، ۳ ایزوله مربوط به جنسیت زن (۵۰٪) و ۳ ایزوله مربوط به جنسیت مرد (۵۰٪) بود که در جنسیت مرد ۲ ایزوله (۶۶/۶۶٪) از ضایعات پوست و ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از خون جدا شده بود. در صورتی که

از ۶ ایزوله واجد ژن *tss1* مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۳ ایزوله (۵۰٪)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین و متی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳٪) و مقاومت نسبت به ایمی پنم، سفتریاسکون، اریترومایسین و آمیکایسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶٪) مشاهده گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و ژن *tss1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $p\text{-value} > 0/05$ ).

### بحث و نتیجه گیری

افزایش مقاومت دارویی معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی رویه آنتی بیوتیکها می باشد. مطالعات نشان می دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی بیوتیکها، ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی می توانند در ایجاد مقاومت باکتریها به آنتی بیوتیکها نقش داشته باشند (۱۱). برای نخستین بار در سال ۱۹۶۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد (۱۲-۱۴). مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف براساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ما بیشترین مقاومت نسبت به سفتریاسکون (۶۰٪) و کمترین مقاومت نسبت به نیترو فورانتین و وانکومایسین (۰٪) گزارش گردید است.

در مطالعه انجام شده توسط رئیسی و همکاران که بر روی ۶۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت های فوقانی دستگاه تنفسی در سال ۱۳۹۳ در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، مقاومت نسبت به اریترومایسین ۵٪ و مقاومت نسبت به وانکومایسین ۰/۵٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می باشد. در مطالعه دیگر که توسط رشیدیان و همکاران در بیمارستان بعثت سنندج انجام شد حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده را به اریترومایسین ۵۹٪ و در مطالعه انجام شده توسط قاسمیان و همکاران حساسیت ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به وانکومایسین ۴۴/۴۴٪ برآورد گردید (۲، ۱۵، ۱۶). اختلافات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها می تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه،

روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و غیره... باشد (۲).

در قسمت دیگر از این تحقیق به فراوانی ژن *tss1-I* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته شد عامل اصلی ایجاد سندرم شوک توکسیک، ترشح توکسین *TSST-1* ترشح شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. بروز این سندرم در ایالات متحده، در حدود ۰/۵ در صد هزار است. اغلب سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران مبتلا به شوک سمی جدا شده اند، سم ایجاد کننده شوک سمی (*TSST-1*) را تولید می کنند که این توکسین موجب تب، کاهش فشار خون، علائم گرفتاری اندام های مختلف و بثورات پوستی می شود. در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (۴/۵۱٪) ژن *tss1-I* گزارش گردید. مطالعات محققان دیگر تفاوت ها و تشابهاتی را با تحقیق ما نشان می دهد که در زیر به پاره ایی از تحقیقات انجام شده اشاره می کنیم.

با توجه به اهمیت بررسی وجود ژن *tss1*، جوهانسون در سال ۱۹۹۱ نشان داد که استفاده از روش *PCR* برای شناسایی این ژن نسبت به سایر روشها مثل روش های ایمونولوژیک، روشی مناسب، حساس سریع و ارزان می باشد (۱۷). تا کنون روش های متعددی برای شناسایی توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده است. روشهایی که براساس واکنش های ایمونولوژی مانند الایزا طراحی شده اند، زمان بر و غیر اختصاصی بوده و اغلب با واکنش متقاطع نیز همراه می باشد. اما در روش *PCR* که اساس آن شناسایی ژن های تولید کننده توکسین است از سرعت، حساسیت و ویژگی قابل توجهی نسبت به سایر روشها برخوردار است. لذا اخیرا محققین از این روش جهت شناسایی ژن های کد کننده توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می کنند (۱۸، ۱۹). در تحقیق انجام شده توسط درنبرگ و همکاران در ۲۰۰۵ که بر روی ۱۰۳ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز فراوانی ژن *tss1-I* در سویه های جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز به ترتیب ۲۳/۵۲٪، ۱۳/۸۸٪ و



به طوری که در مطالعه ای که در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ با هدف تعیین تیترا آنتی بادی سرمی ضد توکسین TSST-1 در کودکان ژاپنی انجام شد، ۱۱۹ بیمار بستری در بخش جراحی پلاستیک و ترمیمی، تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گروه سنی ۷ ماهه تا دو ساله، دارای کمترین تیترا آنتی بادی بودند، به نحوی که میزان تیترا آنتی بادی در دو گروه ۷ تا ۱۲ ماهه و ۱۲ تا ۲۴ ماهه ۳۰/۸٪ و ۳۳/۳٪ گزارش شد. این دو گروه سنی دارای بیشترین موارد بستری به دلیل علائم بالینی بودند که این امر استعداد بالای ابتلا به سندرم شوک توکسیک را در این کودکان نشان می‌دهد. ۷۸/۶٪ کودکان با سن کمتر از شش ماه دارای تیترا مثبت آنتی بادی TSST-1 بودند که بالاترین میزان تیترا مثبت بود. این امر به دلیل دریافت سطح آنتی بادی ضد TSST-1 از مادر است. تیترا آنتی بادی بعد از سن سه سالگی، بالا رفته و تا سن شش سالگی، ۵۴/۵٪ کودکان دارای تیترا مثبت آنتی بادی بودند (۲۷). در مطالعات متعددی نقش توکسین‌های استافیلوکوکی در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه در کودکان مطرح شده است. توکسین TSST-1 می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد نماید. بر پایه پژوهش‌ها، بیش از نیمی از کودکان حتی در نوزادی، دارای آنتی بادی ضد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس و به ویژه TSST-1 می‌باشند. اثر حفاظتی آنتی بادی ضد توکسین TSST-1، با افزایش سن بالا می‌رود و تا سن ۱۰ سالگی که آنتی بادی در مقادیر لازم برای مقابله با عفونت کسب می‌شود، استعداد ابتلا به عفونت ادامه دارد. ۹۵٪ بالغین تا سن ۳۰ سالگی دارای آنتی بادی می‌شوند (۲۸). در مطالعه ای که جوادی نیا و همکاران در سال ۹۲ بر روی زخم سوختگی ۹۰ کودک بستری در بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران در دو گروه ۴۵ نفره تب دار (گروه مورد) و بدون تب (گروه کنترل) مورد بررسی قرار دادند، نشان دادند که بین دو گروه تب دار و بدون تب از لحاظ بروز توکسین TSST-1 تفاوت معنادار وجود داشت. به طوری که در گروه مورد (تب دار)، ۱۷ مورد از ۴۵ مورد (۳۷/۷۷) دارای توکسین TSST-1 بودند در حالی که در گروه کنترل (بدون تب)، فقط ۵ مورد از ۴۵

۱۴٪ گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار زیادتر می‌باشد (۲۰). در سال ۲۰۰۷، اسلام و همکاران، از ۳۰ استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت، یک سویه (۳/۳٪) واجد ژن *tsst-I* را شناسایی کردند که فراوانی این ژن نسبت به تحقیق ما کمتر می‌باشد (۲۱). در مطالعه پارسون و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۵۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند. ۱۴ سویه (۸/۸٪) از نظر ژن *tsst-I* مثبت گزارش شدند. که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بیشتری برخوردار می‌باشد (۲۲). در مطالعه ای که تیهو و همکاران در ۱۳۹۰-۱۳۸۹ بر روی ۱۴۵۴ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان انجام دادند ۲۰ ایزوله (۱/۳۷٪) از نظر ژن *tsst-I* مثبت گزارش شدند که ۱۵ ایزوله (۷۵٪) دارای مقاومت نسبت به متی سیلین بودند. در مطالعه حاضر از ۶ ایزوله واجد ژن مورد نظر مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۴ ایزوله (۶/۶۶٪)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین و سفوکسیتین- متی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳٪) و مقاومت نسبت به ایمین پنم، سفتریاکسون، اریترومایسین و آمیکایسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶٪) مشاهده گردید (۴). در تحقیق انجام شده توسط نوروزی و همکاران که با عنوان شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن انتروتوکسین A-E و *TSST-I* توسط روش PCR، فراوانی ژن *tsst-I* ۲۶/۴۱٪ گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر می‌باشد. در این تحقیق ۷۵/۴۷٪ ایزوله‌ها ژن‌های انتروتوکسین به همراه ژن *tsst-I* گزارش گردیدند (۲۳). در صورتی که در مطالعه بکر و همکاران در سال ۱۹۹۸ از ۵۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس تنها در ۱ ایزوله (۲٪) به طور مشترک ژن‌های *tsst-I* و *entC* گزارش گردید (۲۴). عموم افراد دارای آنتی بادی ضد توکسین TSST-1 می‌باشند و به نظر می‌رسد این افراد نسبت به سایرین، خطر کمتری برای ابتلا به سندرم شوک توکسیک دارند. کودکان و افراد جوان به دلیل عدم مواجهه قبلی با توکسین و پایین بودن سطح آنتی بادی، خطر بالاتری برای ابتلا به این سندرم را دارند (۲۷-۲۵).

از نقاط دیگر دنیا نمی‌تواند به طور مؤثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان روشن کند و بدون شک جهت نیل به این اهداف نیاز مبرمی به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و شناخت سویه‌های غالب با تکنیک‌های حساس تایپینگ ژنوتیپی و فنوتیپی در کشور ما احساس می‌شود. باتوجه به اهمیت بالینی و پتانسیل بالای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد توکسین از نظر ایجاد بیماری‌های مهمی از جمله سندرم شوک سمی، شناسایی و لزوم توجه بیشتر به با به کارگیری راهکارهای مناسب درمانی و ابزارهای مناسب کنترل عفونت ضروری است. با مطالعات انجام شده مشخص گردید که روش واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تشخیص وجود توکسین سندروم شوک توکسیک در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* روشی مناسب می‌باشد.

مورد (۱۱/۱۱٪) دارای توکسین TSST-1 بودند. اما در میانگین سنی و جنس کودکان ارتباط معناداری وجود نداشت (۲۹). گردش این ایزوله‌ها در اجتماع به ویژه برای افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی‌دهند دارای اهمیت است. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰-۵۰٪ در ناحیه فارنکس و ۳۰-۵٪ در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی ۲۰-۱۰٪ می‌رسد، اهمیت بیشتری می‌یابد. مانیتورینگ این ایزوله‌ها در بیمارست می‌تواند در کنترل موارد خطرناک در افراد در معرض خطر مؤثر باشد. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره‌اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش‌های گذشته و حال خود آگاهی دارند. بدین ترتیب نتایج به دست آمده

## منابع

1. Stuart Walker T. 1998. Microbiology walkers. Michigan: W.B. Saunders Company..
2. Reisi M., Tajbakhsh E. and Momtaz H. 2014. Isolation and identification of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolates from respiratory system infections in Shahrekord, Iran. Biol J Micro. 10: 97-106.
3. El-Ghodban A., Ghenghesh K.S., M.rialigeti K., Esahli H. and Tawil A.2006. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. J. Med. Microbiol. 55(2):179-82.
4. Tihoo M., Mobin H., Mozafari N.A., Moadab R., Sedigh bayan K.H. and Mones rast S.H. 2011. frequently distribution toxic shock syndrome-1 (TSST-1) in *S. aureus* strains isolated from hospitals in Tabriz Shohada. Lab .Sci .J. 1: 39-44.
5. Nakagava S., Kushiya K., Uchiyama T. and Yamamoto T.2005. Specific inhibitory action of anisodamine against a *staphylococcal* superantigenic toxin, toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1), leading to down-regulation of cytokine production and blocking of TSST-1 toxicity in mice. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 399-408.
6. Bacha EA., Sheridan RL, Donohue GA. and Tompkins RG. 1994. *Staphylococcal* toxic shock syndrome in pediatric burn unit. Burns. 20: 499-502.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard-Ninth Edition (M2-A9). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2006.
8. Erajian G.H., Boromand M.A., Rashedi marandi F., Rahbar M., Shahcheraghi F. and Sharifi M. 2012. Standard performance tests to determine the antimicrobial susceptibility disk diffusion method. Tehran: Voi. Pub. Cen.
9. Farahmand A, Ahmadi S, Dastmalchi Saei M, Anassori H. Identification of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. Archives of Razi Institute 2013; 68:17-22
10. Somily AM, Babay HA. Superiority of Dzonetesting method over standard method to detect Rnducible resistance in gram positive bacteria: a Prospective surveillance from a teaching hospital in Saudi Arabia. Int. J. Health .Sci. 2: 8-16.
11. Byrne-Bailey K.G., Gaze W.H., Kay P., Boxall A.B.A., Hawkey PM. and Wellington E.M.H. 2009. Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 53(2): 696-702.
12. Barber M. and Rozwadowska- Dowzenko M. 1984. Infection by penicillin- resistant *Staphylococci*. Lancet. 2: 6530: 641-644.
13. Kirby WM. 1994. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. Science. 99 (2579): 452- 453.
14. Ramdani- Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the panton-valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (3): 1083- 1085.
15. Rashidiyan M, Taherpour A, Godarzi S. The frequency of nasal carriers of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical staff in Besat hospital and resistance to antibiotics of strains isolated. Kurdistan Univ Med J 2002; 6 (21): 2- 6.
16. Ghassemian R, Najafi N, Shojaeifar A. The prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriers and pattern Antibiotic resistance in the Employee Training Center – Razi GhaemShahr City in fall 2004. Mazandaran Univ Med J 2004; 14 (44): 79- 86.
17. Gohnson W, Tyler M, Ewan S, Ashton E, Pollard F, Rozee KR. Detection of Genes for Entrotoxins, Exfoliative Toxins and Toxin Shok Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. J of Clinica Microbiology 1991; 29(3): 426- 430.
18. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection *Staphylococcal* ektrotoxins(SEs) N, O, P, Q, R, U and survey of SE types in

- Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int Food Microbiol 2008; 121: 66-73.
19. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol 2000; 38: 1032-1038.
20. Deurenberg H, Nieuwenhuis F, Driessen C, London N, Frank R, Ellen E. The *tsst* prevalence of the *Staphylococcus aureus* gene among community and hospital acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. FEMS Microbiology Letters. 1: 185-189.
21. Islam M.J., Uddin M.S., Nasrin M.S., Nazir K.H.M., Rahman M.T. and Alam MM. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 producing coagulase positive *Staphylococcus aureus* in human and their characterization. Bangl J Vet Med 2007; 5(1&2): 115-119.
22. Parsonnet J., Goering R., Hansmann M., Jones M., Ohtagaki K., Davis C. and Tutsuka K. 2008. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) Producing strains of *Staphylococcus aureus* and Antibody to TSST-I among Healthy Japanese Women. J. Clin. Microbiol. 48: 2731- 2738.
23. Kaufmann S.H.E. and Steward M.W. 2005. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10<sup>th</sup> edition, Hodder Arnold Ltd, London pp.577-632.
24. Becker K Roth R. and Peters G. 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of *staphylococcal* enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J. Clin. Microbiol. 36: 2548-2553.
25. Bacha E.A., Sheridan R.L., Donohue G.A. and Tompkins R.G. 1994. *Staphylococcal* toxic shock syndrome in pediatric burn unit. Burns: 20: 499-502.
26. Childs C., Edwards Jones V., Heathcote D.M., Dawson M. and Davenport P.J. 1994. Patterns of *Staphylococcus aureus* colonization, toxin production, immunity and illness in burned children. Burns 20:514-521.
27. Quan L., Morita R. and Kawakami S. 2010. Toxic shock syndrome toxin. 1. Japan. child. Burns 36: 716-721.
28. White M.C., Thornton K. and Young A.E, 2005. Early diagnosis and treatment of toxic shock syndrome in paediatric burns. Burns. 20: 193-197.
29. Javadi niya S.H., Asqarian pour R., Noorbakhsh S., Soboti B., Shokrollahi M. and Tabatabaeei A. 2014. Comparison Level Toxin TSST-1 in children with fever and without fever burn wounds. Tehran. Med. Univ. J. 72 : 113-120.



## Determine the antibiotic resistance patterns and *tsst-1* gene frequency in *staphylococcus aureus* strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz

Ziba Shanaki Bavarsad<sup>1</sup>, Maryam Reisi<sup>1</sup>, Marzeyeh Soleymanian<sup>2</sup>

MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran.

phD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran

zibashanaki91@gmail.com \*Corresponding author:

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is a major cause of hospital acquired infections and community. Toxic shock syndrome toxin -1 gene secreted by the bacteria from the categories are important virulence factors and is component super antigens toxins pyrogenic (PTSAGs). The purpose of this study is determine the antibiotic resistance patterns and *tsst-1* gene frequency in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz.

In this study, 133 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different samples to determine antibiotic resistance and frequency *tsst-1* gene were studied. After genomic DNA extraction using DNA extraction kit was performed the definitive diagnosis of bacteria, Then the gene *tsst-1* frequency done in the presence of specific primers and antibiotic resistance was determined by agar disk diffusion method. After PCR amplification and detection of the bacterium, Of 133 isolates sequence *tsst-1* gene was observed in 6 strains. In antibiogram test the greatest resistance to cefazolin (3/83%) and the lowest resistance to nitrofurantoin and vancomycin (0%) was observed.

Due to the increasing prevalence of resistance to antibiotics of clinical importance *tsst-1* gene timely identification and implementation of appropriate therapeutic strategies for controlling infection seems necessary.

**Keywords:** Antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, Toxic shock syndrome toxin -1 gene



## مروری بر پروبیوتیک‌ها بر روند سلامت و بیماری‌ها تأثیر پروبیوتیک بر بیماری گوارشی

سهیلا فدایی\*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران  
نویسنده ی مسئول: soheilafadaei7957@gmail.com

### چکیده:

پروبیوتیک‌ها گروهی از میکرو-اورگانیزم‌های مفید مستقر در روده هستند که در صورت مصرف تأثیر مثبتی به سلامت یا فیزیولوژی میزبان دارند آنها می‌توانند فیزیولوژی روده را به طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق تعدیل اکوسیستم درونی تحت تأثیر قرار دهند نتایجی برای استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان درمان اختلالات گوارشی نشان داده شده است عبارتند از (۱) استفاده از ساکارومایسس بولاردی و انتروکوک فاسیوم برای جلوگیری یا کوتاه کردن مدت اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک (۲) جلوگیری از ساکارومایسس بولاردی که از اسهال مرتبط با کلستریدیوم دیفیسل جلوگیری می‌کند. (۳) استفاده از شیرهای تخمیر شده حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس در نوزادان مبتلا به آنتریت روتا ویروس. (۴) جلوگیری از ساکارومایسس بولاردی که از اسهال مرتبط با کلستریدیوم دیفیسل جلوگیری می‌کند. (۳) استفاده از شیرهای تخمیر شده حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس در نوزادان مبتلا به آنتریت روتا ویروس. بنابراین نظر پژوهشگران، مصرف پروبیوتیک، موجب تعادل مجدد ترکیب میکروبی روده و تعدیل بیماری‌های التهاب روده، گاستروانتریت، عدم تحمل لاکتوز و اسهال مربوط به مصرف آنتی‌بیوتیک می‌شود از این رو مواد زیستی به عنوان راهکاری موثر در پیشگیری درمان بیماری شناخته می‌شود.  
واژگان کلیدی: پروبیوتیک، میکرو-اورگانیزم، روتا ویروس، عدم تحمل لاکتوز

### مقدمه

زنده تعریف می‌شوند که وقتی به میزبان (انسان یا حیوان) داده می‌شوند، سودمندی‌های بهداشتی را ایجاد یا تقویت می‌کنند. پروبیوتیک‌ها معمولاً با افزایش تعادل میکروبیوم روده، بهبود سیستم ایمنی، کاهش عوارض ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها و بهبود عملکرد گوارشی مرتبط هستند. برای تعریف یک میکرو-اورگانیزم به عنوان پروبیوتیک، باید شرایط زیر را مورد توجه قرار داد: باید به صورت زنده و در تعداد کافی وارد میزبان شوند. باید میزبان را به‌طور موثر تحت تأثیر خود قرار دهند و از آن بهره‌مندی ایجاد کنند. باید برای میزبان بدون

طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی<sup>۱</sup> و سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup>، پروبیوتیک‌ها به عنوان میکرو-اورگانیزم‌های زنده تعریف می‌شوند که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند برای میزبان مفید هستند (۱). این تعریف از پروبیوتیک‌ها توسط انجمن علمی بین‌المللی پروبیوتیک‌ها<sup>۳</sup> نیز پذیرفته شده است و در اکثر نشریات علمی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲) مفهوم تعریف پروبیوتیک‌ها توسط هیل<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ ارائه شده است. طبق این تعریف، پروبیوتیک‌ها به عنوان میکرواورگانیزم‌های

<sup>3</sup> PPASI

<sup>4</sup> Hill

<sup>1</sup> FAO

<sup>2</sup> WHO

می‌کنند که به آنها امکان چسبیدن به بافت‌های میزبان را می‌دهد. این مکانیسم چسبندگی توانایی پروبیوتیک‌ها در تعامل با لایه روده را تقویت می‌کند و باعث تنظیم پاسخ ایمنی میزبان و تأثیر بر ترکیب میکروبیوتای روده می‌شود. با این حال تنها چند سویه پروبیوتیک در آزمایشات بالینی موثر بودند از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک<sup>۲</sup> و بیفیدو باکتری‌ها<sup>۳</sup> پر مصرف ترین جنس پروبیوتیک‌ها هستند و گونه‌هایی از جنس‌های دیگر، مانند باسیلوس و ساکارومایسس نیز به عنوان پروبیوتیک‌ها اشاره میشوند(۶).

بهبود هضم لاکتوز و سایر اثرات انزیمی مستقیم: سوئ هضم لاکتوز در بزرگسالان(سوئ هضم لاکتوز اولیه) و در افراد مبتلا به برداشتن روده یا انتریت (سوئ هضم لاکتوز ثانویه) است. در افراد مبتلا به سوئ هضم لاکتوز درمات، هضم و تحمل بهتری نسبت به لاکتوز موجود در شیر دارند (۷) مکانیسم‌های درگیر به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته اند اهمیت زنده ماندن باکتری‌های اسید لاکتیک در پاستوریزاسیون اهمیت زیادی دارد دو مکانیسم برای حذف نشدن باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد هضم لاکتوز در روده توسط لاکتاز موجود در باکتری‌های پروبیوتیکی در ماست ( هنگامی که توسط اسیدهای صفراوی لیز میشوند) (۷). هضم ساکاروز توسط نوزادان مبتلا به کمبود ساکاراز که توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه (مخمري حاوی انزیم ساکاراز)، نمونه‌ی دیگر اثر مستقیم یک پروبیوتیک است (۸). لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس با تولید لاکتاز می‌تواند علائم مرتبط با عدم تحمل لاکتوزی را کاهش دهد و به این افراد، این امکان را می‌دهد تا از محصولات لبنی با کمترین ناراحتی، لذت ببرند (۷).

اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک اسهال<sup>۳</sup> AAD: در ۲۰ درصد بیماران که آنتی بیوتیک دریافت میکنند رخ میدهد ADD ناشی از عدم تعادل میکروبی است که منجر به کاهش فلور طبیعی میشود. تلاش‌های متعددی برای اینکه آیا تجویز پروبیوتیک‌ها می‌تواند از

هرگونه خطر مشکلات بهداشتی یا بیماری باشند. این تعریف نقطه تمایز پروبیوتیک‌ها را از دیگر گروه‌های میکروبیال مثل پاتوژن‌ها یا پری‌باپتوتیک‌ها روشن می‌کند. پروبیوتیک‌ها نه تنها نباید به میزبان آسیب برسانند، بلکه باید سودمندی‌های بهداشتی را به آن ارائه دهند (۳) به طور کلی پروبیوتیک‌ها را می‌توان به‌عنوان میکرو-اورگانیسم‌های غیر بیماری‌زا تعریف کرد که در صورت بلعیدن تأثیر مثبتی بر سلامت یا فیزیولوژی میزبان دارند (۴).

آن‌ها از مخمرها یا باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک تشکیل شده اند سرنوشت آن‌ها در دستگاه گوارش و اثرات آن‌ها در بین سویه‌ها متفاوت است(۵). پروبیوتیک‌ها شامل مجموعه‌ای متنوع از میکرو-اورگانیسم هستند، که متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند. این باکتری‌های مفید ویژگی‌های ساختاری منحصر به فردی دارند که به عملکرد آنها کمک می‌کند. سویه‌های پروبیوتیک عموماً گرم مثبت، غیرفرم‌دهنده دیمی و مقاومت در برابر اسید معده و نمک‌های صفر را دارا هستند، که به آنها امکان تحمل عبور از دستگاه گوارش را می‌دهد. اجزای ساختاری پروبیوتیک‌ها عبارتند از:

الف) دیوار سلول: باکتری‌های پروبیوتیک دیواری سلولی دارند که از پپتیدوگلیکان تشکیل شده است؛ یک ساختار پلی‌ساکاریدی منحصر به فرد که استحکام و سفتی را فراهم می‌کند. این ویژگی به حفاظت از باکتری‌ها در برابر تنش‌های محیطی کمک می‌کند و به چسبندگی آنها به غشای روده کمک می‌کند.

ب) پروتئین‌های لایه سطحی: بسیاری از سویه‌های پروبیوتیک پروتئین‌های لایه سطحی<sup>۱</sup> را بیان می‌کنند که در چسبندگی سلولی به غشای روده دخالت دارند. این پروتئین‌ها از کشت و کار باکتری‌های مفید تسهیل می‌کنند و رشد میکرو-اورگانیسم‌های مخرب را مهار می‌کنند.

ج) پیلوس و فیمبریا: برخی از باکتری‌های پروبیوتیک ساختارهایی شبیه مو به نام پیلوس یا فیمبری‌ها تولید

<sup>3</sup> Antibiotic-Associated Diarrhea

<sup>1</sup> SLPs

<sup>2</sup> LAB

است (۹، ۱۰) سه مطالعه کنترل شده از طریق تجویز خوراکی ساکارومایسس بولاردی می‌تواند خطر ADD را کاهش دهد (جدول ۱). مطالعه دیگری نشان داد که ساکارومایسس بولاردی به‌طور قابل توجهی طول مدت ADD را کاهش داد.

این امر جلوگیری کند، انجام شده است. علائم روده ای، آزمایشات بالینی و کنترل شده ای که اثر درمانی قابل توجهی، از پروبیوتیک‌ها را نشان دادند، در جدول (۱) نشان داده شده است اثرات پروبیوتیک بر روی کلبسیلا اکسی توکا<sup>۱</sup>، کلسترییدیوم دیفیسل نیز نشان داده شده

جدول ۱. اثر درمانی پروبیوتیک‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها در پیشگیری از علائم روده ایی (عمدتا اسهال)

منابع	مطالعه کور	اثر درمانی	پروبیوتیک	آنتی بیوتیک
10=(n=98)	بله	۸۳٪ مقایسه با ۰/۲۱٪	لاکتوباسیلوس پولگاریکوس+لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	آمپی سیلین
11=(n=39)	خیر	۲۰٪ مقایسه با ۴۲٪	لاکتوباسیلوس پولگاریکوس+لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	نومایسین
12=(n=27)	خیر	دو برابر شدن تاثیر مثبت	لاکتوباسیلوس پولگاریکوس+لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	آموکسی سیلین - کلاوانت
13=(n=200)	خیر	۵٪ مقایسه با ۱۸٪	انتروکوکوس فاسیوم گونه ۶۸	آنتی توپر کلوز
14=(n=45)	بله	۸۷٪ مقایسه با ۲۷/۲٪	انتروکوکوس فاسیوم گونه ۶۸	میلانتوس
15=(n=10)	بله	دو برابر شدن تاثیر مثبت	بیفیدوباکتریوم لانگوم	اریترومایسین
16=(n=16)	خیر	دو برابر شدن تاثیر مثبت	لاکتوباسیلوس رامنسوس GG	اریترومایسین
17=(n=188)	خیر	۱۷٪ مقایسه با ۴۸٪	لاکتوباسیلوس رامنسوس GG	میلانتوس
18=(n=188)	بله	دو برابر شدن تاثیر مثبت	بیفیدوباکتریوم لانگوم+لاکتوباسیلوس ساکارومایسس بولاردی	کلیندامایسین
19=(n=188)	بله	۴/۵٪ مقایسه با ۱۷/۵٪	ساکارومایسس بولاردی	بتا لاکتومینس یا تتراسایکلین
20=(n=188)	بله	۹/۵٪ مقایسه با ۲۱/۸٪	ساکارومایسس بولاردی	میلانتوس
21=(n=188)	بله	۷/۲٪ مقایسه با ۱۴/۶٪	ساکارومایسس بولاردی	یتاباکتومینس

عفونت روتا ویروسی است استفاده از محلولهای آبرسان خوراکی (ORS)، درمان اصلی است اما طول مدت اسهال را کوتاه نمی‌کند.

#### درمان اثر بخش:

چندین آزمایشات بالینی کنترل شده، اثر مفید پروبیوتیک و محصولات لبنی تخمیری را در گاستروانتریت نوزادان نشان داد (۱۲، ۱۳) علائم بیماری با استفاده مکرر از پروکاریوت لاکتوباسیلوس رامنسوس ، GG(LGG) به نصف کاهش یافت جدول (۲) (۱۴، ۱۵).

گواندلینی و همکاران<sup>۲</sup>، اخیرا نتایج یک‌آزمایش را در ۲۸۷ کودک، یک تا ۳۶ ماهه مبتلا به اسهال حاد را ثبت کردند آنها<sup>۲</sup>ORS همراه با لاکتوباسیلوس رامنسوس (250CFU) دریافت کردند اسهال به طور قابل توجهی کاهش یافت، تجویز پروبیوتیک طول مدت بستری

#### اثر بخش درمانی:

مخلوطی از لاکتو باسیل خشک شده، منجمد شده به‌طور قابل توجهی از اسهال در مطالعه شماره ۱ جلوگیری کرد اما در مطالعه شماره ۳، ۲ تاثیر نداشت و این تفاوت در آماده سازی پروبیوتیک‌ها را توضیح می‌دهد. اثر بخشی پروبیوتیک‌ها به ویژه ساکارومایسس بولاردی ، لاکتوباسیلوس رامنسوس در جلوگیری و درمان ADD از طریق باز گرداندن تعادل میکروبی، مهار رشد عوامل مضر و کاهش شدت و مدت زمان حملات اسهال نشان داده شده است (۱۱).

#### گاستروانتریت:

عامل اصلی اسهال حاد است و یک اختلال مکرر است که معمولا طی چندروز خودبخود بهبود می‌یابد گاستروانتریت می‌تواند به دلیل چندین پاتوژن ویروسی، باکتریایی یا انگلی باشد شایعترین علت در کودکان

<sup>3</sup>Oral Rehydration Salt

<sup>1</sup> K. oxytocare

<sup>2</sup> Guandalini and et al

گروه مصرف شیر از ۶۵ ساعت به ۴۴ ساعت در گروه مصرف ماست کاهش یافت هر دو گروه از نظر محتوای لاکتوز، pH، طعم و بافت قابل مقایسه بودند نتیجه بعد از ۴۸ ساعت، ۳۵ درصد از کودکان درمان با شیر و ۶۴ درصد درمان با ماست انجام شد (۱۸).

پیشگیری:

ساودرا<sup>۲</sup> و همکاران طبق جدول ۲ نشان دادند که تغذیه نوزادان بستری شده با بیفیدوباکتریوم / اینفنتیس، / استرپتوکوکوس ترموفیلوس<sup>۳</sup> در بیمارستان بطور قابل توجهی خطر اسهال و دفع روتاویروس را کاهش داد (۱۹).

واسهال مرتبط را کوتاه کرده است. نتایج یک مطالعه نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوسوس غیر فعال شده با گرما به اندازه لاکتوباسیلوس رامنوسوس زنده در کاهش مدت زمان اسهال موثر است (۱۶).

با این حال اثر پروبیوتیک زنده بر پاسخ ایمنوگلوبولین A اختصاصی روتا ویروس بیشتر مشهود بود و هم‌چنین طبق (جدول ۲) نشان داد که مدت زمان اسهال در ۴ آزمایشات بالینی (۲ مورد در کودکان و ۲ مورد در بزرگسالان) بطور قابل توجهی کاهش یافت. توسط بوردا<sup>۱</sup> و همکاران، مطالعه بالینی در مورد ماست، در مقایسه با شیر در ۱۱۲ کودک و جوان‌الجزایری که مبتلا به اسهال حاد بودند انجام شد میانگین مدت اسهال در

جدول ۲. تاثیر پروبیوتیک‌ها در آزمایشات تصادفی بر کوتاه کردن طول درمان بیماری گاستروانتریت

درمان	پروبیوتیک	جمعیت مطالعه	منابع
اسهال مرتبط با روتاویروس	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	29=(n=71)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	30=(n=39)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	31=(n=49)
گاستروانتریت	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	32=(n=42)
	لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا	کودکان	33=(n=32)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	34=(n=32)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	35=(n=26)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	36=(n=100)
	لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG	کودکان	37=(n=123)
	انتروکوکوس فاسیوم گونه ۶۸	کودکان	38=(n=287)
جلوگیری اسهال حاد یا روتاویروس	انتروکوکوس فاسیوم گونه ۶۸	بزرگسالان	39=(n=104)
	انتروکوکوس فاسیوم گونه ۶۸	بزرگسالان	40=(n=56)
	ماست	بزرگسالان	14=(n=78)
	ساکارومایسس بولاردی	کودکان	41=(n=211)
	لاکتوباسیوس روتری	کودکان	=(n=112)
		کودکان	42=(n=38)
	کودکان	43=(n=66)	
		44=(n=55)	

ای همراه است پروبیوتیک‌ها نشان داده اند که در مدیریت علائم روده تحریک پذیر با تنظیم حرکت روده، کاهش التهاب و تعادل مجدد فلور روده موثر هستند پروبیوتیک‌های خاصی مانند بیفیدوباکتریوم

سندرم روده تحریک پذیر<sup>۴</sup> در شرایط مختلف همراه با اسهال:

بیماری روده تحریک پذیر یک اختلال شایع در سیستم گوارش است که با درد و تورم شکم و تغییر در عادات روده

<sup>3</sup> Streptococcus thermophilus

<sup>4</sup> IBS

<sup>1</sup> Bourdaa

<sup>2</sup> Saavedra and et al

اینفنتیس،<sup>۱</sup> لاکتوباسیل پلانتاروم<sup>۲</sup> نشان داده اند که در کاهش علائم روده تحریک پذیر و بهبود کیفیت زندگی موثر هستند. برخی از محصولات پروبیوتیکی از جمله شیر اسیدوفیلوسی یا شیر بیفیدوسی گزارش شده است که مدت زمان یبوست را در بیماران کاهش می دهد (۵). در یک مطالعه بالینی کنترل شده توسط مائوپاس و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰) در ۳۴ بیمار مشاهده کردند که ساکارومایسس بولاردی موجب کاهش اسهال شد اما بر سایر علائم روده تحریک پذیر تاثیر نمی گذارد. هالپرن و همکاران<sup>۴</sup> (۲۱) مشاهده کردند که تجویز لاکتو باسیل-های کشته شده به وسیله ی گرما به مدت ۶ هفته در تسکین علائم سندروم روده ی تحریک پذیر موثر بودند. هنتشل و همکاران<sup>۵</sup> (۲۲) در اوایل قرن ۲۰ دانشمند روسی بنام مچینکف (که در انستیتو پاستور پاریس کار میکرد) اعلام کرد که فلور میکروبی روده اصلاح میشود و جایزه نوبل را گرفت او تاثیر به سزایی در امر پروبیوتیک‌ها داشت (۲۳). او معتقد بود زمانی که تولیدات پروبیوتیکی مصرف میشوند به طور موثری بر روی میکروفلورهای کلون توسط کاهش تاثیر سمی میکروفلورهای کلون تاثیر میگذارند. درمان با پروبیوتیک ها درصد اسهال را ۱۸/۹ درصد به ۱۴/۲ درصد کاهش داد(اثر بخشی لاکتو باسیل ها در برابر رشد بیش از حد باکتری های روده کوچک) (۲۵).

درمان با پروبیوتیک ها درصد اسهال را ۱۸/۹ درصد به ۱۴/۲ درصد کاهش داد( اثر بخشی لاکتو باسیل ها در برابر رشد بیش از حد باکتری های روده کوچک) (۲۵). یک مطالعه کنترل شده بالینی توسط سالمین<sup>۶</sup> و همکاران، کاهش قابل توجهی در بیماران دریافت کننده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NDCO 1748 را نشان

داد و همچنین اثر بخشی کشت باکتریهای اسید لاکتیک خشک و انجماد شده را پیشنهاد کردند و لازم است برای کشف اثرات درمانی بالقوه و جالب، با دقت بیشتری مطالعات انجام گیرد (۲۶). المر و همکاران گزارش کردند که دوزهای بالای ساکارومایسس بولاردی در افراد مبتلا با اسهال مرمین مرتبط با ایدز<sup>۷</sup> مرتبط است (۲۷). در یک مطالعه کنترل شده ۶۶ بزرگسال سالم و مقاوم به لاکتوز در سه گروه، ۱۲۵ گرم از یک غذای تخمیری مصرف کردند در عرض یک هفته استفاده از شیر با دو سویه لاکتوباسیلوس ثبت شده، سلامتی را بهبود بخشید و علائم گوارشی را کاهش داد.

### اسهال مسافرتی:

اسهال یکی از بیماری‌های عفونی شایع است که به صورت مدفوع شل و آبکی از بدن خارج میشود برای درمان اسهال حاد استفاده از پرو بیوتیک طبق جدول ۳ نتایج مثبت گزارش شده است.

سیاه و همکاران<sup>۸</sup> در گردشگر دانمارکی در یک سفر دو هفته ای، ۹۴ مسافر را با مخلوطی از پروبیوتیک ها استرپتوکوک ترموفیلوس<sup>۹</sup> بیفیدوباکتر<sup>۱</sup> لاکتوباسیلوس بولگاریکوس<sup>۱</sup> لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس<sup>۲</sup> فراوانی اسهال مسافرتی را از ۷۱ درصد به ۴۲ درصد کاهش داد(۳۶). در یک مطالعه تصادفی کولاریچ و همکاران<sup>۳۷</sup>، افراد در حال سفر به ترکیه، درمان اسهال با لاکتوباسیلوس رامنوسوس<sup>۱</sup> درمان شد. درمان اسهال با پروبیوتیک ها از ۷/۴ درصد به ۳/۹ درصد رسید.

<sup>8</sup> Black and et al

<sup>9</sup> S. thermophilus

<sup>1</sup> bifidobacteria 0

<sup>1</sup> lactobacilus boulgaris 1

<sup>1</sup> Lactobacilus asidofilus 2

<sup>1</sup> Kollarritsch and et al 3

<sup>1</sup> Bifidobacterium infatis

<sup>2</sup> Lactobacilus plantrum

<sup>3</sup> Maupas and et al

<sup>4</sup> Halpern and et al

<sup>5</sup> Hentschel and et al

<sup>6</sup> Salminen

<sup>7</sup> HIV



جدول ۳. آزمایشات تصادفی و کنترل شده از پروبیوتیک‌ها و درمان آنها بر روی اسهال سازی

منابع	اثر درمانی	پروبیوتیک
64=(n=50)	۳۵٪ مقایسه با ۲۹٪	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس+لاکتوباسیلوس بولگاریکوس
65=(n=212)	۵۵٪ مقایسه با ۵۱٪	لاکتوباسیلی
66=(n=282)	۲۳/۸٪ مقایسه با ۲۳/۸٪	سویه ای از لاکتوباسیلوس فرمانتوم
66=(n=282)	۲۵/۷٪ مقایسه با ۲۳/۸٪	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(سویه مشخص نشده)
67=(n=81)	۴۳٪ مقایسه با ۷۱٪	لاکتوباسیلی+بیفیدو باکتریا+استریتوکوکسی
68=(n=1016)	۲۸/۷٪ مقایسه با ۳۹/۱٪	کاکارومایسس بولاردی
69=(n=756)	۴۱٪ مقایسه با ۴۶/۵٪	لاکتوباسیلوس رامنسوس سویه GG
70=(n=245)	۳/۹٪ مقایسه با ۷/۴٪	لاکتوباسیلوس رامنسوس سویه GG

اثر مهاری مرتبط با اسیدهای آلی تولید شده ناشی از متابولیسم تخمیری در pH می باشد در یک مطالعه بروی ۳۰ فرد بزرگسال، نشان داد که بیماری ۶۰ درصد از بیماران درمان شده با امپرازول با لاکتوباسیلوس آدیپه نشده است در صورتی که درمان شده با امپرازول + پلاسبو ریشه کنی نشده است.

در مطالعه لیونتی و همکاران نیز کاهش علائم روده - معده با مصرف مکمل لاکتوباسیلوس در طول وبعد از درمان ریشه کن کردن در یک گروه از کودکان مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مشاهده شده است. هم چنین مطالعاتی که به صورت آزمایشگاهی برون تنی انجام گرفته ثابت شده است که باکتری‌های لاکتوباسیلوس *سالیواریوس*<sup>۴</sup>، *لاکتوباسیلوس جانسون*<sup>۵</sup>، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*<sup>۶</sup> سه سلول‌های روده HT\_29 و یا سلول‌های معده MKN45 را مهار می‌کند. مکانیسم‌های ایمونولوژیکی را این گونه می توان توضیح داد که پروبیوتیک‌ها به وسیله ی برهم کنش با سلول‌های اپیتلیال و تعدیل ترشح سایتو کاین التهابی می توانند سبب متعادل ساختن پاسخ ایمونولوژیک میزبان شوند که نتیجه ان کاهش فعالیت و التهاب معده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* می تواند ترشح IL8 ناشی از اتصال هلیکوباکتر پیلوری توسط سلول‌های اپیتلیال معده را مهار کند (۴۱).

#### خصوصیات پروبیوتیک‌ها:

۱- از میزبان منشا گرفته باشد

#### بررسی تاثیر پروبیوتیک بر عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری!

عفونت از هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی بیماری زخم پپتیک (۹۰-۷۰ درصد موارد)، لنفم و در یک درصد بروز مبتلا، موجب توسعه سرطان معده که مرگ و میر زیادی را بدنبال دارد می باشد که ۵۰ درصد از جمعیت جهان را شامل میشود.

عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بزرگسال عوامل مختلفی مانند میزان عفونت، تولید سموم A و B، میزان التهاب، تراکم استقرار و تیپ و شدت بیماری‌های هلیکوباکتر پیلوری بستگی دارد بنابراین جلوگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری علاقه ی بسیاری را به خود جلب کرده است مکانیسم های کلی ایمونولوژیکی و غیر ایمونولوژیکی در مکانیسم اثر پروبیوتیک بر فاکتورهای بیماری‌های هلیکوباکتر پیلوری می باشد اسیدیته معده و مخاط معده به عنوان اولین فاکتور دفاعی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا هستند.

پروبیوتیک‌ها با تولید مواد ضد میکروبی، تحریک تولید موسین و ایجاد ثبات در سد مخاطی روده و رقابت با هلیکوباکتر پیلوری برای اتصال با گیرنده می تواند این سد را تقویت کند مطالعات مختلف در این زمینه نشان دهنده درصد بالاتری از ریشه کنی با عوارض جانبی کمتر در بیماران تحت درمان با پروبیوتیک‌ها در مقایسه با درمان استاندارد با انتی بیوتیک‌ها شد، ترکیبات ضد میکروبی توسط بیفیدوباکتریوم ترشح می شود موجب مهار رشد جدایه‌ها با هلیکوباکتر پیلوری می شود و این

<sup>4</sup> L. johsoni La1

<sup>5</sup> L. acidophilus-wconfusa

<sup>1</sup> Helicobacter pylori

<sup>2</sup> L. reuteri

<sup>3</sup> L. salivairus

۲- بیماری زا نباشد

۳- گرم مثبت باشد

۴- در مراحل فرایند کردن و ذخیره مواد غذایی پایدار باشد. هنگام تولید جیره های مخلوط و به خصوص هنگام پلت کردن و در حضور مواد معدنی، پروبیوتیک ها با تنشهای مختلف شیمیایی، مکانیکی و گرمایی مواجه می شوند. بنابراین قابلیت زنده ماندن پروبیوتیک ها در این شرایط ضروری است.

۵- در دستگاه گوارش، برابر اسید معده و نمک های صفراوی پایدار باشد

۶- به بافت پوششی روده یا مخاط بچسبید

۷- ترکیبات مهار کننده تولید کند

۸- فعالیت های میکروبی را تغییر دهد

**تولید و ساختار پروبیوتیکها:** مراحل تولید پروبیوتیکها ممکن است در وابستگی به نوع وسیله تولید و نوع میکروارگانیسم استفاده شده متفاوت باشد. با این حال، مراحل عمومی تولید و ساختار پروبیوتیکها عبارتند از:

**انتخاب میکروارگانیسم:** در این مرحله، میکروارگانیسمهایی که خاصیت پروبیوتیک دارند، انتخاب می شوند. معمولاً از جیره ها و باکتری هایی استفاده می شود که بر اساس تحقیقات علمی، خواص مفیدی برای سلامتی انسان دارند. به عنوان مثال، برخی از گونه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم به عنوان پروبیوتیکها شناخته شده اند.

**انتخاب محیط رشد:** میکروارگانیسمهای پروبیوتیک به محیط خاصی برای رشد و تکثیر نیاز دارند. بنابراین محیطی مطابق با نیازهای آنها برای رشد و تولید باید انتخاب شود.

برخی از محیط های معمول شامل محلول های غذایی مخصوص در کشت میکروبی هستند.

**کشت و رشد:** میکروارگانیسمها در محیط مناسب رشد میکنند و این مرحله شامل افزودن میکروارگانیسمها به محیط کشت و ایجاد شرایط مناسب برای رشد آنها است. شرایط مختلف مانند دما pH ، رطوبت و زمان کشت بسته به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده تنظیم میشوند.

**انتخاب و ثبت سویه:** پس از رشد میکروارگانیسمها، سویه های مناسب برای استفاده به عنوان پروبیوتیک انتخاب می شوند. سویه هایی که خواص مفید بیشتری دارند و توانایی بقا و تکثیر در محیط گوارش انسان را دارند انتخاب می شوند. سویه های انتخاب شده سپس ثبت می شوند.

**فرآوری و انتشار:** پس از انتخاب سویه های مناسب، فرآوری انجام می شود. فرآوری ممکن است شامل جداسازی سویه های میکروبی، تولید محصول نهایی (کپسول ها، پودرها، نوشیدنی ها و...) و بسته بندی آنها باشد.

مقادیر دقیق و مراحل تولید پروبیوتیکها بسته به شرکت تولید کننده و نوع محصول ممکن است متفاوت باشد اما این مراحل کلی مربوط به تولید و ساختار پروبیوتیکها را شرح داده اند (۳۸).

#### منابع غذایی پروبیوتیکها:

**ماست:** یکی از معروف ترین منابع غذایی حاوی پروبیوتیکها است این محصول از طریق تخمیر شیر با استفاده از سویه های مخصوص مانند لاکتو باسیلوس و بیفیدوباکتریوم تهیه می شود مصرف منظم ماست می تواند به حفظ تعادل باکتری ها، بهبود گوارش و حمایت از عملکرد سیستم ایمنی کمک می کند (۳۹).

**کیفیر:** یک نوشیدنی تخمیری مشابهی است که ه بخاطر حاوی پروبیوتیکها شناخته می شود این نوشیدنی با استفاده از سویه های کیفیر تهیه می شود که شامل باکتری های مخمر هستند کیفیر به دلیل دارا بودن تنوع بیشتری از میکروارگانیسمهای مضر نسبت به ماست یک منبع قوی پروبیوتیک محسوب می شود (۳۹).

**کیمچه:** یک غذای سنتی کره ای است که با تخمیر سبزیجات مانند کلم، تره و پیازچه با اضافه کردن ادویه جات تهیه میشود کیمچه شامل گستره ای از باکتری های پروبیوتیک است و بخاطر مزایای سلامتی محتمل خود شناخته می شود از جمله بهبود گوارش و حمایت از سیستم ایمنی (۴۰).

**میسو:** یک ادویه ژاپنی سنتی است که با تخمیر سویا با نمک و قارچ کوچی تهیه می شود این فرایند تخمیر منجر به تشکیل پروبیوتیکها می شود بطور معمول در سوپ

وسسها استفاده می‌شود و به همراه باکتری های مفید خود طعمی منحصر به فرد را ارایه می دهد (۴۰).

**ترشی:** یک غذای تخمیری حاوی کاهش یافته کرم هاست فرایند تخمیر شامل استفاده از باکتری های اسید لاکتیک است که قند ها را در کلم به اسیدهای الی تبدیل میکنند مصرف ترشی می‌تواند در گوارش بهبود جذب مواد غذایی و بهبود محیط روده ای سالم کمک کند (۴۰).

### حفظ پروبیوتیکها در آبمیوه:

**ذخیره در سردخانه:** نگهداری اب میوه حاوی پروبیوتیک در دمای پایین می تواند به حفظ قابلیت زنده مانی آن‌ها کمک کند ذخیره فعالیت سرد باکتری‌ها از جمله پروبیوتیکها را کاهش داده و عمر مفید آن‌ها را افزایش می‌دهد و خواص مفید آن‌ها را حفظ میکند.

**تخمیر کنترل شده:** تخمیر فرایندی است که باعث ورود باکتری‌های مفید به ابمیوه می شود با کنترل شرایط تخمیر مانند دما، می توان رشد پروبیوتیکها را ترویج داده و رشد میکرو\_اورگانسیم هایی که فساد می آورند را مهار می‌کند.

**بسته بندی محافظ:** بسته بندی نقش مهمی در حفظ قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها در ابمیوه دارد استفاده از بسته بندی هوای بندی شده وبا قابلیت محافظت در برابر نور می تواند مواجه ابمیوه با اکسیژن ونور ماورا بنفش را کاهش داده وتخریب پروبیوتیکها را جلوگیری کند وهم چنین از مواد بسته بندی با خواص مانع گیری قادر به جلوگیری از ورود الودگی کننده ها که می توانند ابمیوه را فاسد کنند (۳۸).

### آسیب‌های حاصل از فریز-خشک کردن و آزمون کنترل: کیفی لیوفیلیزاسیون پروبیوتیکها

فریز-خشک کردن یا لیوفیلیزاسیون، تکنیکی است که به طور متداول در صنایع دارویی و غذایی برای حفظ مواد حساس به حرارت مانند پروبیوتیکها به کار می رود. پروبیوتیکهای فریز-خشک شده، استحکام، عمر مفید بیشتر و راحتی بیشتری برای ذخیره سازی و حمل و نقل ارائه نقش به سزایی در تضمین زنده مانی و ( QC ) می‌دهند. آزمون کنترل کیفی کیفیت فرمولاسیون پروبیوتیکها دارد. با این حال، در طول فریز-خشک

کردن و آزمون کنترل کیفی لیوفیلیزاسیون، پروبیوتیکها ممکن است آسیب ببینند که قابلیت آنها را کاهش میدهد که در عین فریز-خشک کردن و آزمون کنترل کیفی لیوفیلیزاسیون من منجر به آسیب پروبیوتیکها می‌شود و اهمیت بهینه سازی دقیق این فرایند ها برای حفظ سلامت محصول را برجسته می‌کنند (۴۱).

عواملی که موجب آسیب پروبیوتیکها می‌شود تغییرات دما: فریز-خشک کردن شامل قرار دادن پروبیوتیکها در یک سری از تغییرات دما است از جمله یخ زدایی، خشک کردن اولیه و خشک کردن ثانویه. کنترل ناکافی دما یا تغییرات ناگهانی دما می‌تواند منجر به تشکیل بلورهای یخ شود که باعث شکست غشاهای حساس سلولی پروبیوتیکها می‌شود و قابلیت زنده مانی آن‌ها را کاهش می‌دهد.

شرایط خلا: در صورت فرایند خشک کردن ، استفاده از شرایط خلا برای حذف اب از نمونه های پروبیوتیکی ضروری است. با این حال، میزان خلا بیش از حد می‌تواند فشاری بر سلولهای پروبیوتیکی اعمال کند و منجر به آسیب یا مرگ سلولی شود. تنظیم دقیق میزان خلل برای جلوگیری از چنین آسیبی ضروری است.

زمان خشک کردن: مدت زمان خشک کردن بر زنده مانی و کیفیت پروبیوتیکها تاثیر می‌گذارد. طولانی شدن زمان خشک کردن میتواند به تماس بیش از حد با حرارت و خشکی منجر شود که بر زنده مانی و عملکرد سویه های پروبیوتیکی تاثیر منفی می‌گذارد.

محافظت یخ زن: معمولا محافظت یخ زنی مانند قند برای حفاظت از پروبیوتیکها در طول فریز-خشک کردن استفاده می‌شوند. با این حال ، انتخاب نادرست یا غلظت ناکافی محافظت یخ زنی میتواند به تنش اسمزی یا سمیت منجر شود که آسیب سلولی و کاهش قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها را نتیجه می‌دهد.

آماده سازی نمونه؛ حالت اولیه نمونه های پروبیوتیک قبل از بسته بندی یخ زدایی می‌تواند به طور قابل توجهی بر آسیب پذیری آنها تأثیر بگذارد. عواملی مانند چگالی سلولی، ترکیب تغذیه ای و شرایط پیش یخ زدایی باید با دقت بهینه سازی شوند تا نرخ بقا بهتری حاصل شود و آسیب در حین فرایند یخ زدایی کمینه شود.

استراتژی‌های کاهش آسیب: برای کاهش آسیب پروبیوتیک در حین فرآیند یخ زدایی و تست کنترل کیفی در زمان لیوفیلیزه، می‌توان چندین استراتژی اجرا کرد.

بهینه سازی پروتکل‌های یخ زدایی: آزمایش‌های دقیق و بهینه سازی پروتکل‌های یخ زدایی می‌تواند به شناسایی پروفایل‌های دما، زمان خشک کردن و شرایط واکنش خلا مناسب برای کاهش آسیب پروبیوتیک‌ها و حفظ قابلیت زنده مانی کمک کند.

انتخاب و بهینه سازی محافظت کننده های سرما: تحقیقات دقیق بر روی غلظت و ترکیب محافظت کننده ها از سرمای مناسب میتواند برای سلول‌های پروبیوتیک خاص موثر باشد.

نظارت و کنترل پارامترهای فرایند حیاتی: نظارت منظم بر پارامترهای حیاتی مانند دما، سطح خلا و زمان خشک کردن ضروری است تا شرایط ثابت و کنترل شده در طول فرایند یخ زدایی حفظ شود. سامانه های خودکار و ابزار های نظارت به صورت واقعی می‌تواند در تضمین تکرار پذیری فرایند و کاهش تغییر پذیری کمک کنند.

آزمون کنترل کیفیت: اجرای روش‌های قوی آزمون کنترل کیفیت در طول فرایند یخ زدایی و لیوفیلیزه برای شناسایی آسیب به پروبیوتیک‌ها حائز اهمیت است. تکنیک‌هایی مانند شمارش میکروبی، آزمون زنده مانی و آزمون تنش میتوانند درکی قابل ارزش از بقا و عملکرد پروبیوتیک‌ها ارائه دهند (۴۱).

### پست بیوتیک: نسل جدید پروبیوتیک‌ها

اگر چه تاکنون تصور بر این بود که اثرات سلامت بخشی باکتری‌های مفید روده یا پروبیوتیک‌ها در گرو زنده بودن این سلول‌ها و واکنش آن‌ها با دیگر سلول‌های زنده است اما در یک دهه اخیر نتایج مطالعات نشان داده شده است که فرم غیر فعال این باکتری‌ها (سلول مرده) اجزای سلولی حاصل از شکست، عصاره سلولی آن‌ها قادر به بروز اثرات سلامت بخش مشابه سلول زنده است از این رو از سال ۲۰۱۱ به بعد واژگانی چون پست بیوتیک‌ها مطرح گردید که نشان می‌داد لازمه بروز اثرات مثبت

پروبیوتیک‌ها، زنده بودن آن‌ها نیست و اجرای سلولی نیز چنین توانایی را دارند. پست بیوتیک‌ها به تمامی فاکتورهای محلولی اطلاق می‌شود که یا از سلول پروبیوتیک زنده ترشح می‌شود و یا پس از لیز سلولی آزاد می‌شود. این ترکیبات شامل آنزیم‌ها، پپتیدها، پلی ساکاریدها، اسیدهای آلی، تیکوئیک اسیدها و پروتئین-های سطح سلول مرده و اثرات آن‌ها در بهبود برخی بیماری‌های انسان و حیوانات اثبات شده است. شناسایی پست بیوتیک‌ها، امکان تولید و توسعه فرمولاسیون دارویی فاقد باکتری زنده را فراهم آورده است (۴۲).

### نتیجه گیری:

کشت در مقیاس بزرگ، کیفیت بالا در یکنواخت بودن سویه‌ها و برنامه‌های کنترل و اطمینان و تضمین کیفیت و نیازهای مختلف از ماندگاری تا شرایط نگهداری، ترکیب محصول و سویه مناسب، حداقل دوز موثر از موارد مهم در تولید پروبیوتیک به حساب می‌آیند. مهم است در نظر بگیریم که اگرچه پروبیوتیک‌ها وعده‌های خوبی در اثر بخشی دارند ولی بسته به سویه‌های خاص استفاده شده، دوزها و ویژگی‌های فرد بیمار و مدت زمان درمان متفاوت می‌باشد بنابراین نیاز به تحقیقات بیشتر برای شناسایی سویه‌ها و پروتوکل‌های درمانی بهینه برای اختلالات گوارشی به حساب می‌آیند.

۱- جایگزینی شیر با ماست در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز ۲- استفاده از ساکارومایسس بولاردی انتروکوکوس فاسیوم<sup>۱</sup> یخ زده برای جلوگیری از ADD-3 استفاده از حالت یخ زده ساکارومایسس بولاردی جلوگیری از عود اسهال به دلیل کلسترییدیوم دیفیسیل<sup>۲</sup> می‌باشد برای کوتاه کردن مدت اسهال به دلیل روتا ویروس در کودکان استفاده می‌کنند و بسیاری از کاربردهای بالقوه دیگر وجود دارد اما مطالعات پیشگیری کنترل شده بیشتری نیاز است.

<sup>2</sup> c. difficil

<sup>1</sup> E. facium

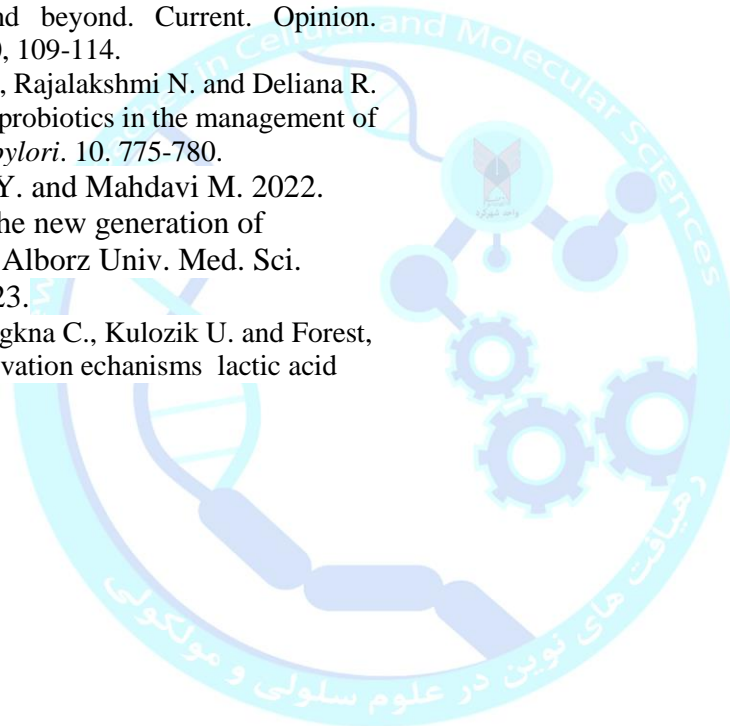
## منابع

1. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002, pp. 111. Available online: [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) (accessed on 16 March 2019).
2. Hill C., Guarner F. Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J. and Salminen S. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 506-514.
3. Johnston B.C., Lytvyn L. Lo C., K., Allen S.J., Wang D., Szajewska H., Miller, M., Ehrhardt S., Sampalis J. and Duman D.G. 2018. Microbial preparations (probiotics) for the prevention of clostridium difficile infection in adults and children: An individual patient data meta-analysis of 6851 participants. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 39: 771-781.
4. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-78.
5. Marteau P., Pochart P., Bouhnik Y. and Rambaud J.C. 1993. Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World. Rev. Nutr. Diet.* 74:1-721.
6. Biller J.A., Katz A.J., Flores A.F., Buie T.M. and Gorbach S.L. 1995. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21:224-6.
7. de Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. and Schrezenmeier J. 2001. Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 421S-95.
8. Harms H.K., Bertele-Harms R.M. and Bruer-Kleis D. 1987. Enzyme substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 316: 1306-1309.
9. Elmer G.W., Surawicz C.M. and McFarland L.V. 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *J.A.M.A.* 275:870-6.
10. Fabia R., Ar'Rajab A., Johansson M.L., Willen R. and Andersson R. 1993. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 28:155-62.
11. Colombel J.F., Cortot A., Neut C. and Romond C. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet.* 2:43
12. Pearce J.L. and Amilton J.R. 1974. Controlled trial of orally administered lactobacilli in acute infantile diarrhea. *J. Pediatr.* 84:261-262.
13. Mitra A.K. and Rabbaani G.H. 1990. A double-blind, controlled trial of bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology.* 99:1149-52.
14. Raza S., Graham S.M., Allen S.J., Sultana S., Cuevas L. and Hart C.A. 1995. Promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14:107-11.
15. Pant A.R., Graham S.M. and Allen S.J. 1996. *Lactobacillus GG* and acute diarrhea in young children in the tropics. *J. Trop. Pediatr.* 42:162-165.
16. Guandalini S., Pensaene L. and Zikri M.A. 2000. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:54-60.
17. Kaila M., Isolauri E., Saxelin M., Arvilommi H. and Vesikari T. 1995. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child.* 72: 51-53.
18. Bodilis J.Y. 1983. Etude contrôlée du Lacteol fort contre placebo et contre produit de référence dans les diarrhées aiguës de l'adulte. (Lacteol versus placebo in acute



- adult diarrhea: a controlled study) *Medecine Actuelle* 10:232-5
19. Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A. and Yolken R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophiles* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344:1046-1049.
  20. Maupas J.L., Champemont P. and Delforge M. 1983. Traitement des colopathies fonctionnelles –Essai en double aveugle de l’ultra-levure. (Treatment of irritable bowel syndrome with *Saccharomyces boulardii* a double-blind, placebo controlled study) *Medicine et Chirurgie Digestives*. 12:77-79
  21. Halpern GM., Prindiville T., Blanckenburg M., Hisa T. and Gerschwin ME. 1996. Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am. J. Gastroenterol*. 91:1579-1585.
  22. Hentschel C., Bauer J. and Dill N. 1997. Complementary medicine in non-ulcer dyspepsia: is alternative medicine a real alternative? A randomized placebo – controlled double-blind clinical trial with two probiotic agents. 23: 187-195.
  23. Marteau, P. and Boutron-Ruault MC. 2002. Nutritional advantage of 16,. Probiotics and Prebiotics. *Br. J. Nutr*. 87:S153-S157.
  24. Bleichner G., Blehaut H., Mentec H. and Moyses D. 1997. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intens. Care. Med*. 23:517-523.
  25. Attar A., Flourie B., Rambaud J.C., Franchisseur C., Ruszniewski P, and Bouhnik Y. 1999. Antibiotic efficacy in small intestinal bacterial over-growth-related chronic diarrhea: a crossover , randomized trial. *Gastroenterology*. 117:794-797.
  26. Rembacken B.J., Snelling AM., Hawkey PM., Chalmers DM. and Axon AT. 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet*. 354:635-9.
  27. Elmer G.W., Moyer K.A., Surawicz C.M., Collier A.C., Hooton T.M. and McFarland L.V. 1995. Evaluation of *Saccharomyces boulardii* for patients with IV-related chronic diarrhoea and healthy volunteers receiving. 65; 175-183.
  28. Sood A., Midha V. and Makharia GK. 2009. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 7(11):1202-209.
  29. Fabia R., ArRajab A., Johansson M.L., Willen R. and Andersson R. 1993. Effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand. J. Gastroenterol*. 28:155-62.
  30. Mao Y., Nobaek S. and Kasravi B, 1996. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology*. 111:334-344.
  31. Malin M., Suomalainen H., Saxelin M. and Isolauri E. 1996. Promotion of IgA immune with *Lactobacillus GG*. *Ann. Nutr. Metab*. 40:137-145.
  32. Plein K. and Hotz J. 1993. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn’s disease with special respect to chronic diarrhea a pilot study. *Gastroenterol*. 31:129-34.
  33. Campieri M. and Gionchetti P. 1999. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology*. 116:1246-249.
  34. Wollowski I., Reckemmer G. and Pool-Zobel B.L. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr*. 73:451S-5S.
  35. Rafter J.J. 1995. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand. J. Gastroenterol*. 30:497-502.
  36. Black F.T., Andersen P.L. and Orskov J, 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler’s diarrhea. *Travel. Med*. 7:333-735.
  37. Kollaritsch von H., Holst H., Grobara P. and Wiedermann G. 1993. Prophylaxe des Reisediarrhoe mit *Saccharomyces boulardii*. (Prevention of travelers’ diarrhea by *Saccharomyces boulardii*. Results of a placebo-controlled double-blind study. ) *Fortschritte der Medizin*. 111:153-156

38. Kurt F., Barbara F. and Chris Hollard. 2019. The production and Delivery of probiotics: A Review of a practical Approach. 18; 245-256.
39. Parvez S., Malik K.A., Kang S.A. and Kim H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl. Microbiol. 100(6), 1171-1185
40. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B. and Toole, P.W. 2021. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. Current. Opinion. Biotechnol. 70, 109-114.
41. Andera M., Rajalakshmi N. and Deliana R. 2022: Role of probiotics in the management of *Helicobacter pylori*. 10. 775-780.
42. Sanai M.Y. and Mahdavi M. 2022. Postbiotics: the new generation of probiotics. J. Alborz Univ. Med. Sci. 11(4): 513-523.
43. Santivarangkna C., Kulozik U. and Forest, P. 2008. Inactivation echanisms lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J. Apple. Microbiol. 105: 1-13.



## A review of probiotics in health and disease trends The effect of probiotics on gastrointestinal disease

Sohaila Fadaei\*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author: [soheilafadaei7957@gmail.com](mailto:soheilafadaei7957@gmail.com)

### Abstract:

Probiotics are a group of beneficial micro-organisms living in the intestine, which when consumed have a positive effect on the health or physiology of the host. They can affect the physiology of the intestine directly or indirectly by modulating the internal ecosystem. Results for the use of probiotics as a treatment for gastrointestinal disorders have been shown to include 1) the use of *Saccharomyces boulardii* and *Enterococcus faecium* to prevent or shorten the duration of antibiotic-associated diarrhea 2) the prevention of *Saccharomyces boulardii* associated diarrhea It prevents *Clostridium difficile*. 3) Use of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* in infants with rotavirus enteritis. 2) Prevention of *Saccharomyces boulardii*, which prevents diarrhea associated with *Clostridium difficile*. 3) Use of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* in infants with rotavirus enteritis. Therefore, according to the researchers, the consumption of probiotics leads to the re-balancing of the microbial composition of the intestine and the adjustment of inflammatory bowel diseases, gastroenteritis, lactose intolerance and diarrhea related to the use of antibiotics, therefore, biological substances are an effective way to prevent and treat diseases It is known.

Key words: probiotic, microorganism, rotavirus, lactose intolerance

## الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژنهای اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در جدایه های اشریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد عنوان مکرر: مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی اشریشیاکلی در شهرکرد

مرضیه سلیمانیان<sup>۱</sup>، ساناز خاکسار حقانی<sup>۲</sup>، نازیلا ارباب سلیمانی\*<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

نویسنده مسئول: نازیلا ارباب سلیمانی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

\*نویسنده مسئول: [Nazilaarbab@yahoo.co.uk](mailto:Nazilaarbab@yahoo.co.uk)

### چکیده

اینتگرون‌ها عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را حمل کنند. این عناصر در مکان‌های مختلفی از پلاسمید و کروموزوم یافت شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف ردیابی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد انجام شده است. در این تحقیق تعداد ۶۴ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از موارد عفونت ادراری در شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های مورد بررسی با استفاده از روش دیسک گذاری ساده در محیط مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ از زوج پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. پس از انجام آزمون آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۷۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به ایمپنم (۱۲/۵٪) مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪ و ۳/۱۲٪ مشاهده گردید. در ۵۲ جدایه هیچ یک از ژن‌های اینتگرون مشاهده نگردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ارتباط آماری معنی‌داری ( $p = 0.02 < 0.05$ ) مشاهده گردید. با توجه به این که ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌ها منتشر نمایند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دوچندان کرده است.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، اینتگرون، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت ادراری

### مقدمه

باسیل گرم منفی بی‌هوازی اختیاری در روده بوده، قادر است قند لاکتوز را به سرعت تخمیر کرده و تولید اسید نماید، اکسیداز منفی بوده، اغلب سویه‌ها متحرک بوده و از اسیدآمینه تریپتوفان ایجاد ایندول می‌نماید (۱). اشریشیاکلی مسئول انواع عفونت‌های روده‌ای و خارج

اشریشیاکلی یکی از ۵ گونه موجود در جنس اشریشیا از تیره اشریشیه و از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این باکتری برای اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط تئودور اشریش شناسایی و نام‌گذاری گردید. اشریشیا کلی

۵ تشکیل شده است. در ناحیه ۵ تمام اینتگرون‌ها ژن اینتگراز، سایت گیرنده *att1* و توالی پروموتور قرار دارد. ناحیه ۳ اینتگرون‌ها واجد سه ساختار متفاوت است که در کلاس‌های اینتگرون متفاوت می‌باشد. تا کنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است اما تنها ۴ کلاس اصلی در ارتباط با ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشد که اینتگرون‌های کلاس ۱ و متعاقباً اینتگرون‌های کلاس ۲ به عنوان شایع‌ترین کلاس‌ها در بین ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشند. اینتگرون‌های کلاس ۱ اولین بار توسط Stokes و Hall، در سال ۱۹۸۹ کشف شدند و بیش از ۴۰ ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها، ضد عفونی‌کننده‌ها و دزانفکتان‌ها را حمل می‌نمایند. این دسته از اینتگرون‌ها به طور گسترده‌ای در سویه‌های گرم منفی و به طور اندمیک در سویه‌های گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس*، *کورینه باکتریوم*، *آئروکوکوس* و *بروی باکتریوم* یافت می‌شوند (۸،۷). اینتگرون‌های کلاس ۲ شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند. *اسینتوباکتر*، *شیگلا* و *سالمونلا* از جمله باکتری‌های گرم منفی هستند که واجد این دسته از اینتگرون‌ها می‌باشند. انتهای ۳ در اینتگرون‌های کلاس ۲ شامل ژن‌های ترانسپوزیشن (*tmi*) و ژن‌های *resolvase* (*res*) می‌باشد. این دسته از کلاس‌ها در ترانسپوزون‌های Tn 7 و ترانسپوزون‌های وابسته یافت شده است. کاست‌های ژنی موجود در این دسته از کلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تریمتوپریم می‌باشند. ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۲ در حدود ۴۶ درصد مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۱ می‌باشد (۹). اینتگرون‌های کلاس ۳ برای اولین بار توسط Arakawa و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون‌ها به ندرت در نمونه‌های بالینی وجود دارند ولی اخیراً در نمونه‌های

روده‌ای در انسان می‌باشد (۲). در میان پاتوژن‌های ادراری، *شریشیالکی* عامل ۸۰ درصد عفونت‌های ادراری حاصل از اجتماع و ۵۰ درصد عفونت‌های ادراری مرتبط با بهداشت و درمان است. عفونت دستگاه ادراری دومین عفونت شایع در بیماران است، تا جایی که نزدیک به هفت میلیون بیمار از این نظر توسط پزشکان در هر سال ویزیت می‌شوند (۳). امروزه شیوع پاتوژن‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف نگرانی‌های بالینی را افزایش داده است به طوری که عفونت به این ارگانیزم‌ها با میزان مرگ و میر بیشتر، افزایش شیوع بیماری‌ها و افزایش هزینه‌های درمانی مرتبط است. این ارگانیزم‌ها به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که تولید بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف را کم می‌کنند، به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند (۴،۵). رایج‌ترین روش انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی کانجوگیشن می‌باشد. در این حالت پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را حمل می‌کنند و می‌توانند آن را از یک سلول به سلول دیگر حمل کنند (۶). سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های به دست آمده از جامعه و بیمارستان رو به افزایش است و این یک امر بزرگ جهانی می‌باشد. صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند که در این میان اینتگرون‌ها با استفاده از مکانیزم جدید انتشار، ژن‌های مقاوت را بین باکتری‌ها منتقل می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاوت و پیدایش گونه‌هایی با مقاوت چندگانه است. غالب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی مقاوت چندگانه، دارای ژن اینتگرون کلاس یک هستند (۵). اینتگرون‌های مقاومتی اساساً کاست‌های ژنی که منجر به مقاوت علیه آنتی‌بیوتیک‌ها و دزانفکتان‌ها می‌شود را حمل می‌نمایند و می‌توانند بر روی کروموزوم قرار گیرند. از نظر ساختاری تمام اینتگرون‌ها از سه جز اصلی شامل انتهای ۵ حفاظت شده، انتهای ۳ حفاظت شده و یک ناحیه مرکزی متغیر بین ناحیه ۳ و

1- *ESBL (Extended spectrum β-lactamase)*



کلینیکی نظیر *سراشیا مارسنس*، *سودوموناس پوتیدا* و *کلبسیلا پنومونیه* یافت شده است (۱۰).

هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین فراوانی ژن‌های مقاومتی اینتگرون در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد می‌باشد. نتایج این تحقیق علاوه بر فراهم آوردن اطلاعات اولیه در مورد شیوع عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* در شهرکرد می‌تواند جهت پایش و برنامه‌ریزی اصولی برای درمان‌های مؤثر بر علیه عفونت‌های مقاوم این باکتری مورد استفاده‌ی پزشکان و مدیران بهداشتی و درمانی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی تعداد ۶۴ جدایه *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از نمونه‌های عفونت ادراری شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی باکتری، نمونه مورد نظر پس از کشت بر روی محیط آئوزین متیلن بلو آگار کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی از قبیل چگونگی تخمیر قندها در محیط تی‌اس‌آی، مک کانکی، هم‌چنین دکربوکسیلاسیون اسدآمینة لایزین در محیط لایزین آیرون آگار، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MR VP broth، رشد در محیط سیمون سترات و اوره آگار مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت با استفاده از جداول استاندارد باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی گردیدند. در این تحقیق از *اشریشیا کلی* ATCC25922 (تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی-بایر<sup>۳</sup> بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارائه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: سفتریاکسون (30 CRO)، تتراسیکلین (30 TE)، ایمپنم (10 IPM)، نورفلوکساسین (10 NOR)، سفالوتین (30 CF)، نالیدیکسیک اسید (30 NA)، نیتروفورانثین (FM)

(300)، کوتریموکسازول (SXT)، آمیکاسین (AN 30)، جنتامایسین (GM 10) از شرکت پادتن طب ایران مورد استفاده قرار گرفتند (۱). به منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن<sup>۴</sup> بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بیوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید؛ که میزان ۱/۸ نشان دهنده نمونه DNA‌هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند. بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن *16srRNA/اشریشیا کلی* که در جدول (۱) نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد (۱۱).

واکنش PCR برای ردیابی ژن *16srRNA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (10x buffer) PCR، ۱۰۰ میکرومول MixdNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم (Mgcl2)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس - لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA/اشریشیا کلی* به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام شد.

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و اینتگرون کلاس ۲ واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰

<sup>3</sup>- Kirby Bauer

<sup>4</sup>- Boiling

<sup>1</sup>- Triple Sugar Iron Agar (TSI)

<sup>2</sup>- Lysine Iron Agar

تکثیر ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله‌های /اشریشیا کلی به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه Master Gradient cyclor استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA صورت گرفت و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه تراس لومیناتور Uviteck تصویر به دست آمده روی کاغذ حرارتی ثبت شد. نتایج حاصل از ارزیابی اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ با استفاده از آزمون دقیق فیشر و نرم‌افزار SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت.

میکرومول MixdNTP، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس - لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و اینتگرون کلاس ۲ در ایزوله‌های /اشریشیا کلی به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام شد (۱۲).

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۰۰ میکرومول MixdNTP، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA Polymerase) (فرمنتاس - لیتوانی) و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن‌های *16srRNA* و اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های /اشریشیا کلی

ژن	توالی پرایمر (۳-۵)	اندازه محصول (bp)	منبع
<i>16srRNA</i>	F: ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R: TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	۱۳۰	(۱۱)
<i>Int 1</i>	F:GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	۴۳۶	(۱۲)
<i>Int 2</i>	F:AGT GGG TGG CGA ATG AGT G R:GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	۷۸۸	(۱۲)
<i>Int 3</i>	F:TGT TCT TGT ATCGGC AGG TG R: GGC ATC CAA GCA GCA AG	۶۰۰	(۱۲)

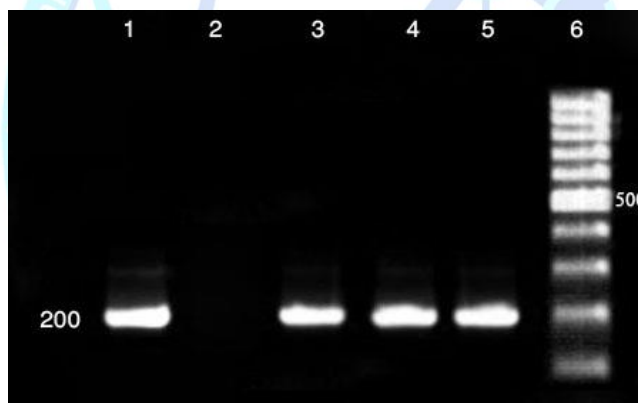
تشخیص قطعی باکتری منظور تشخیص قطعی باکتری /اشریشیا کلی و حضور توالی ژن *16srRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از تایید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی آزمون آنتی بیوگرام انجام شد. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقاومت نسبت به آمپی سیلین در ۷۵٪، مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۵۴/۷٪، مقاومت نسبت به

## نتایج

در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۴ جدایه /اشریشیا کلی به دست آمده از نمونه‌های عفونت اداری شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. پس از جداسازی باکتری /اشریشیا کلی در محیط کشت اختصاصی، تشخیص نوع باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. پس از استخراج DNA کیفیت DNA های مورد بررسی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. پس از انجام آزمون PCR به منظور

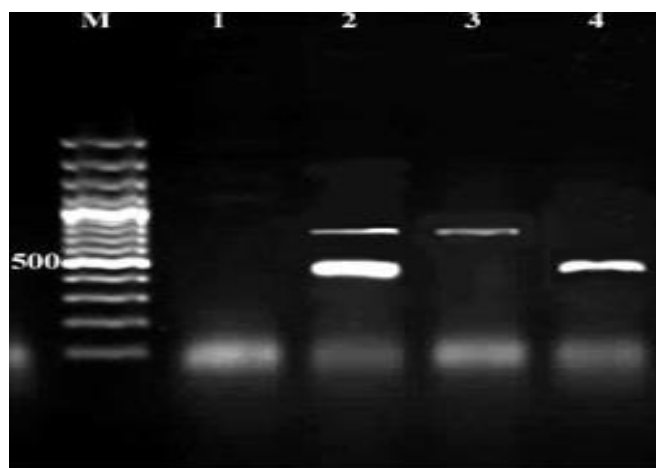
از ۶۴ نمونه بررسی شده در ۸ نمونه (۱۲/۵٪) اینتگرون کلاس ۱، در ۴ نمونه (۶/۲۵٪) اینتگرون کلاس ۲ و در ۲ نمونه (۳/۱۲٪) اینتگرون کلاس ۳ گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین مقاومت آنتی بیوتیکی با آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده و وجود ژن اینتگرون ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید ( $P=0/022<0/05$ ). اما براساس آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۲ و آنتی بیوتیک‌های مورد نظر ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $P=0/137>0/05$ ). هم چنین براساس آزمون دقیق فیشر بین اینتگرون کلاس ۳ و آنتی بیوتیک‌های مورد نظر نیز ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $P=0/994>0/05$ ).

کوتریموکسازول در ۵۰٪، مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید در ۴۳/۷٪، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در ۳۴/۳٪، مقاومت نسبت به آمیکاسین در ۳۷/۵٪، مقاومت نسبت به سفالوتین در ۳۱/۲٪، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در ۲۶/۵٪، مقاومت نسبت به نورفلوکساسین در ۳۱/۲٪، مقاومت نسبت به جنتامایسین در ۱۷/۲٪، و مقاومت نسبت به ایمپنم در ۱۲/۵٪، مشاهده گردید. حضور هم‌زمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ۶/۲۵٪ و حضور هم‌زمان ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۳ در ۱/۵۶٪ مشاهده گردید. اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ هم‌زمان در هیچ ایزوله‌ایی مشاهده نگردیدند. نتایج در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.



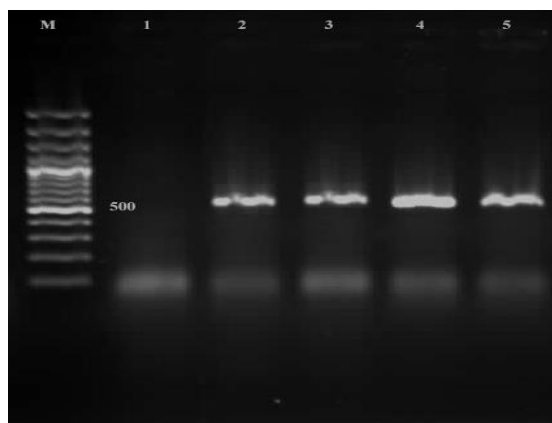
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* اشریشیا کلی.

ستون ۶: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی، ستون‌های ۳-۵: نمونه‌های مثبت مورد بررسی

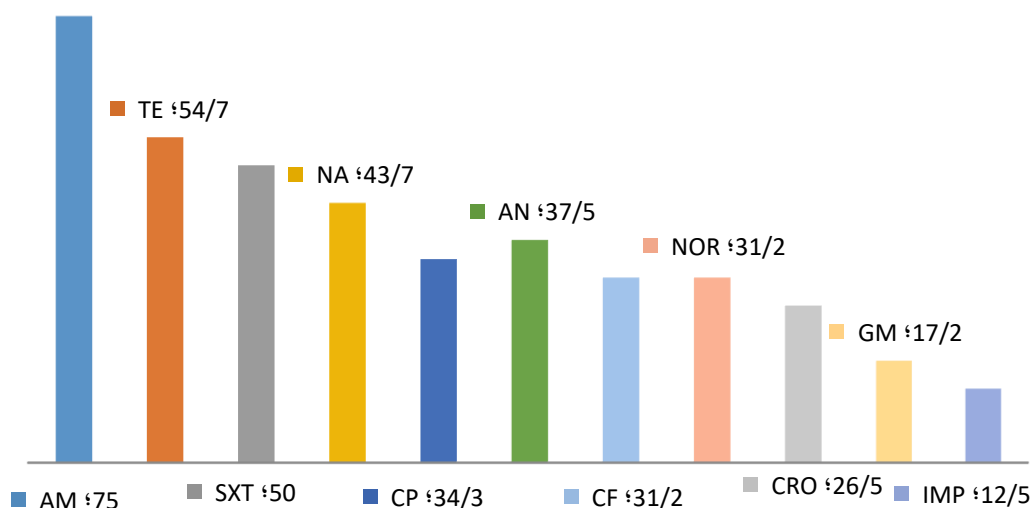


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲

ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون ۲: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱ و باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۳: باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۴: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن اینتگرون کلاس ۳.  
ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون‌های ۲، ۳، ۴ و ۵: باند ۶۰۰ جفت بازی ژن اینتگرون ۳.



نمودار ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلی به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

از پلاسמיד و کروموزوم یافت شده‌اند. اینتگرون‌ها قادرند ژن‌ها را در بر گرفته و آن‌ها را در حالی که در داخل کاست ژنی قرار دارند جا به جا نمایند. اولین مطالعه در مورد بررسی میزان شیوع اینتگرون‌ها توسط Sallen و همکاران در ۱۹۹۵ صورت گرفت. در این مطالعه شیوع اینتگرون در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه ۵۹٪ برآورد گردید (۱۳). در تحقیق حاضر که به منظور بررسی میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های اشریشیا کلی مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری شهرستان شهرکرد صورت گرفت، فراوانی اینتگرون‌ها به ترتیب ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪ و

### بحث

در چند سال اخیر روشن شده است که کلبسیلاها عفونت‌های بسیاری را در موارد مختلف باعث شده‌اند و اهمیت این گروه از ارگانیسم‌ها به عنوان عامل عفونت جدی در بیماران بستری شده بیمارستانی پذیرفته شده است. قابلیت این ارگانیسم در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و همین طور مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد. اینتگرون‌ها عناصر متحرک ژنتیکی بوده که قادرند ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف را حمل کنند. این عناصر در مکان‌های مختلفی

۳/۱۲٪ برآورد گردید. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های /شریشیا کلی مربوط به آنتی-بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۷۵٪)، تتراسایکلین (۵۴/۶۸٪)، کوتریموکسازول (۵۰٪) و نالیدیکسیک اسید (۴۳/۷۵٪) گزارش گردید. کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم (۱۲/۵٪) گزارش گردید. بررسی نتایج آنتی-بیوگرام به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی نسبت به مطالعات صورت گرفته قبلی در ایران می‌باشد، به طوری که در تحقیق حاضر میزان مقاومت در ایزوله‌های /شریشیا کلی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانئوئین و آمیکاسین بسیار بالاتر از مطالعه صورت پذیرفته توسط فرشاد و همکارانش می‌باشد. هم-چنین میزان فراوانی اینتگرون کلاسیک در مطالعه حاضر ۱۲/۵٪ بالاتر از میزان فراوانی آن (۶/۲۵٪) در مطالعه فرشاد است (۱۴).

در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران که به منظور بررسی مولکولی اینتگرون‌ها در سویه‌های /شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه یک بیمارستان در اراک صورت گرفت، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های /شریشیا کلی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۸۸٪، سفتری‌یاکسون ۷۶٪، آموکسیکلاو ۷۴٪، سفتازیدیم ۷۲٪ و سفوتاکسیم ۷۲٪ بود. در حالی که در تحقیق ما مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و سفتری‌یاکسون کمتر از مطالعه رنجبران و همکاران می‌باشد. در تحقیق ما مقاومت نسبت به ایمی پنم ۱۲/۵٪ گزارش گردید، در صورتی که در تحقیق رنجبران تمامی ایزوله‌های /شریشیا کلی نسبت به ایمی پنم حساسیت نشان دادند. شیوع بالای اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های /شریشیا کلی مقاوم به ایمی پنم تحقیق ما می‌تواند حاکی از وجود ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد. در تحقیق رنجبران ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین،

سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی کلاو گزارش گردید. در مطالعه دیگری که در بیمارستان‌های ایالت متحده آمریکا جهت تعیین فراوانی اینتگرون کلاسیک در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه و /شریشیا کلی صورت پذیرفت ۴۹٪ از ایزوله‌های /شریشیا کلی دارای اینتگرون کلاسیک بودند که این میزان بیش‌تر از میزان اینتگرون کلاسیک در مطالعه ما بود. در تحقیق حاضر از ۶۴ ایزوله مورد بررسی در ۲۸ ایزوله (۴۳/۷۵٪) به بیش از ۳ آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند و درصد بالایی از ایزوله‌ها فاقد مقاومت چندگانه بودند که این امر می‌تواند دلیلی برای کمتر بودن شیوع اینتگرون‌ها نسبت به تحقیقات سایر محققین باشد (۱۵، ۱۶)..

در تحقیق ما بین وجود مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفالوتین، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، جنتامایسین و ایمی پنم وجود اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید ( $P=0/022$ ) که نشان دهنده انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها از طریق اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد و علت این مقاومت می‌تواند حضور کاست‌های ژنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ژن اینتگرون کلاس ۱ باشد. اما بین اینتگرون‌های کلاس ۲ و ۳ و آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $P=0/137$ ) و ( $P=0/994$ ). که نشان دهنده این است که علاوه بر اینتگرون‌ها عوامل دیگری نظیر ترانسپوزون‌ها نیز می‌توانند در انتقال مقاومت نقش داشته باشند. نکته قابل توجه در تحقیق ما شیوع ۳/۱۲٪ اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله‌های /شریشیا کلی می‌باشد که نسبت به تحقیقات سایر محققین بیشتر می‌باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌گردد که یک ارتباط قوی بین حمل اینتگرون و افزایش مقاومت به تعدادی از کلاسه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. با توجه به این ژن‌های مقاومت بروی اینتگرون‌ها قرار دارند که می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند و



**تشکر و قدردانی**

باتشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد که در این تحقیق ما را یاری نمودند.

مقاومت را در بیمارستان یا دیگر محیط‌ها منتشر نمایند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی را دو چندان کرده و تعیین شیوع این ژن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و هم چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ممانعت از انتشار عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم را ضروری می‌نماید.



**Reference**

1. Ahangarzadeh Rezaee M., Sheikhalizadeh V. and Hasani A. 2011. Detection of integrons among multi drug resistant (MDR) *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens in Northern West of Iran. *Braz J Microbiol.* 42: 1308-1313.
2. Gould I.M. 2008. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents:* 32-39.
3. Shahidal AK., Rashed N. 2013. Study of extended-spectrum beta- lactamase producing bacterial from urinary tract infections in Bangladesh. *Tzu Chi Med J.* 25: 39-42.
4. Gootz TD. 2010. The global problem of antibiotic resistance. *Crit .Rev. Immunol.* 30 (1):79-93.
5. Gupta P., Murali MV., Faridi MM., Kaul PB., Ramachran VG and Talwar V. 1993. Clinical profile of *Klebsiella septicaemia* in neonates. *Indian. J. Paediatr.* 60(4):565-672.
6. Actis L.A., Tolmasky M.E. and Crosa J.H. 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci.* D43-D62.
7. Arora D.R. and Chugh T.D. 1981. Klebocin types of *Klebsiella pneumonia* isolated from normal diarrhoeal stool. *Indian J Med Res.* 72(1):856-859.
8. [Młynarczyk G.](#), [Młynarczyk A.](#), [Bilewska A.](#), [Dukaczewska A.](#), [Goławski C.](#), [Kicman A.](#) and [Pupek J.](#) 2006. High effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli. *Med Dosw Mikrobiol.* 58(1):59-65.
9. Obrien T.F. 2003. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin. Infect. Dis.* 34(3):S78-S84.
10. Essack S.Y. 2000. Treatment options for extended spectrum beta- lactamses-producers. *FEMS Microbiol Lett.* 90(2):181-184.
11. Kerrn M.B., Klemmensen T., Frimodt-Møller N. and Espersen F. 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *J Antimicrob Chemother.* 50(3):513-516.
12. Turton J.F., Perry C., Elgohari S. and Hampton CV. 2010. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J Med Microbiol.* 59(4):541-547.
13. Sallen B., Rajoharsion A. and Desvarrenne S.C.M. 1995. Molecular epidemiology of integrin-associated antibiotic resistance gene in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 195-202.
14. White P., McIver C and Rawlinson W. 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(9): 2658-2661.
15. Yu H, Lee J and Kang H. 2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol.* 41(12):Pp 5429-5433.
16. Muhammad I., Uzma M and Yasmin B. 2011. Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. *Braz. J. Microbiol.* 42(2): 462-466.

## Antibiotic resistance pattern and prevalence of class 1, 2 and 3 integron genes in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Shahrekord

Marzeyeh Soleymanian<sup>1</sup>, Sanaz Khaksar Haghani<sup>2</sup>, Nazila Arbab Soleymani<sup>3</sup>

1. PhD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran
2. MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran.
3. Department of Microbiology, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

\*Corresponding author: [Nazilaarbab@yahoo.co.uk](mailto:Nazilaarbab@yahoo.co.uk)

### Abstract

Integrations are mobile genetic elements capable of carrying resistance genes to various antibiotics. These elements have been found in different places of plasmid and chromosome. The aim of this present study was determine the prevalence of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolates isolated from urinary tract infection in Shahrekord. In this research, the number of 64 isolates of *Escherichia coli* were investigated. The antibiotic resistance of the investigated isolates was evaluated using a simple disk method in Mueller Hinton agar medium. In order to determine the frequency of class 1, 2 and 3 integrons, specific primer pairs were used. After the antibiogram test, the highest resistance to ampicillin (75%) and the lowest resistance to imipenem (12.5%) were observed. The frequency of class 1, 2 and 3 integron genes was observed as 12.5%, 6.25% and 3.12%, respectively. None of the integron genes were observed in 52 isolates. In the statistical analysis with chi-square test, a statistically significant relationship was observed between class 1 integron and resistance to the antibiotic ampicillin ( $p = 0.02 < 0.05$ ). Due to the fact that resistance genes are located on integrons and can be transferred from one strain to another strain and spread resistance in the hospital or other environments, this has doubled the importance of identifying this type of antibiotic resistance genes. Key words: *Escherichia coli*, integron, antibiotic resistance, urinary infection

## چاپرون ها، مولکول های حیاتی در میکروبوها

کیمیا گلستان فر\*<sup>۱</sup>

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

نویسنده مسئول: [Golestanfark@gmail.com](mailto:Golestanfark@gmail.com)

### چکیده

چاپرون های مولکولی پروتئین های بسیار حفاظت شده ای هستند که تاخوردگی مناسب سایر پروتئین ها را در داخل بدن ترویج می کنند. سیستم های چاپرون متنوع به فولد کردن و انتقالات پروتئین، جمع آوری کمپلکس های الیگومری، و بازیابی از باز شدن ناشی از استرس کمک می کنند. یک عملکرد اساسی چاپرون های مولکولی مهار فعل و انفعالات پروتئین غیرمولد با شناسایی و محافظت از سطوح آبرگیز است که در هنگام تا شدن یا به دنبال استرس پروتئوتوکسیک در معرض قرار می گیرند. بنابراین چاپرون ها در سیستم های سلولی از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند که در این مقاله مروری در مورد این مولکول ها و مکانیسم های عمل آن ها، بحث شده است. هم چنین در مورد تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری در راستای تحمل شرایط محیطی بحث خواهد شد.

**واژه های کلیدی:** چاپرون، اکسیداتیو، فولدینگ، استرس دمایی

مسیر رسیدن به حالت اصلی عبور کنند و در نتیجه حداواسط های فولدینگ در این مسیر به وجود می آید (شکل ۱). واسطه های فولد ناصحیح خارج از مسیر اصلی فولدینگ منجر به آهسته شدن فرایند می شوند. از طرفی در این مسیر برهمکنش های غیر طبیعی می توانند منجر به حالت های فولدینگ نادرست و پایدار شود (۱). علاوه بر این، واسطه های فولدینگ سطوح آبرگیز را در معرض محیط قرار می دهند که می توانند در تعاملات غیر عملکردی بین مولکولی موثر بوده و منجر به تجمع پروتئین های فولد نشده گردد (شکل ۱). مطالعات بیوفیزیکی فولدینگ پروتئین معمولاً بر روی پروتئین های مدل کوچک (اغلب کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه) تمرکز می کنند که به صورت نوترکیب بیان می شوند و فولدینگ برگشت پذیر قوی را در شرایط آزمایشگاهی نشان می دهند (۲).

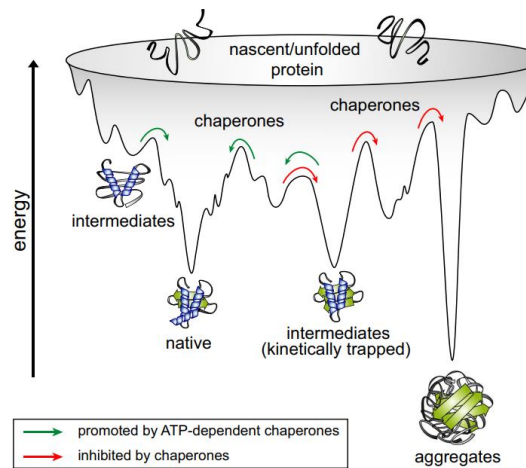
### مقدمه

باکتری ها و موجودات مختلف در شرایط حاد محیطی مختلفی قرار می گیرند. موجودات برای مقابله با این شرایط محیطی مکانیسم های مختلفی دارند تا به زنده ماندن آن ها کمک کند. در این مقاله ابتدا به چاپرون ها که از پروتئین های ضروری برای مقابله با شرایط حاد محیطی در موجودات مختلف هستند اشاره خواهد شد. در قسمت دوم تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری بررسی خواهد شد.

### چاپرون ها

#### فولدینگ پروتئین ها

چندین عامل منجر به پیچیده شدن فرآیند فولدینگ پروتئین ها می شوند. مسیر انرژی آزاد فولدینگ ناهموار است: زنجیره های پروتئینی باید از موانع انرژی قابل توجهی در



شکل ۱- فرایند فولدینگ طبیعی پروتئین‌ها (۳).

کند. لاسکی نوکلئوپلاسمین را یک همراه مولکولی می‌نامد، زیرا عملکرد یک همراه انسان را تقلید می‌کند که تعامل صحیح بین افراد را تضمین می‌کند. ایس و جورجوپولوس پروتئینی را مورد مطالعه قرار دادند که در نهایت به عنوان چپرونین<sup>۶</sup> (Cpn60) شناخته شد و مسئول شروع سیل عظیمی از مقالات در مورد چپرون‌های مولکولی در دو دهه گذشته بود. در حال حاضر، ایس یک چپرون مولکولی را اینگونه تعریف می‌کند: «یکی از گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌ها که دارای خاصیت کمک به مونتاژ/جداسازی غیرکووالانسی سایر ساختارهای ماکرومولکولی هستند، اما در صورت وجود، اجزای دائمی این ساختارها نیستند. عملکردهای بیولوژیکی طبیعی خود را انجام می‌دهند. تغییر و اصلاح بیشتر اصطلاحات قدیمی در مورد چپرون‌ها ضروری است، زیرا چپرون‌های مولکولی به طور دائمی در سلول تولید می‌شوند و غلظت‌های درون سلولی آن‌ها لزوماً در پاسخ به استرس افزایش نمی‌یابد. این پروتئین‌ها به عنوان چپرون‌های مولکولی تعریف می‌شوند اما Hsps یا پروتئین‌های استرس نیستند. چپرون‌های مولکولی، که غلظت آنها در پاسخ به استرس افزایش می‌یابد، هم چپرون هستند و هم پروتئین‌های استرس / پروتئین‌های شوک حرارتی (۶).

### انواع چپرون‌های مولکولی

اولین چپرون مولکولی فولدینگ- پروتئینی که کشف شد Cpn60 بود. از زمان شناسایی این پروتئین به عنوان یک چپرون مولکولی در سال ۱۹۸۸، پروتئین‌های بسیار بیشتری با عملکرد مولکولی واقعی یا فرضی کشف شده‌اند و این اصطلاح در حال حاضر برای ۲۵ خانواده از پروتئین‌ها به کار

مشکل فولدینگ پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی پیچیده تر می‌شود. غلظت بالای ماکرومولکول‌ها در سلول، تمایل پروتئین‌های غیربومی به تجمع را افزایش می‌دهد، در حالی که استرس پروتئوتوکسیک حالت طبیعی را بی‌ثبات می‌کند. علاوه بر این، تاخوردگی پروتئین در هنگام ترجمه اتفاق می‌افتد، که در نتیجه آن پلی‌پپتیدهای تازه سنتز شده در یک حالت ناقص از نظر فولد صحیح در معرض محیط سلولی قرار می‌گیرند که فاقد اطلاعات ساختاری مورد نیاز برای فولدینگ طبیعی پروتئین است. چپرون‌های مولکولی در پاسخ به این چالش‌ها تکامل یافته‌اند (۴).

### چپرون‌ها

از سال ۱۹۶۲، زمانی که فروچیو ریتوسا الگوهای پف کردن جدیدی را در کروموزوم‌های پلی‌تن مگس سرکه در دمای بالا انکوبه شده بود، کشف کرد، که استرس در سطح سلولی با تولید محصولات ژنی خاص پاسخ داده می‌شود. این محصولات پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsps) یا پروتئین‌های استرس سلولی نامیده شدند و در ابتدا به عنوان مولکول‌هایی شناسایی شدند که در پاسخ به حضور پروتئین‌هایی که ساختار فضایی خود را از دست داده‌اند، در سلول تولید می‌شوند (۵). با این حال، تا زمانی که کار پیشگامانه گروه‌های لاسکی، ایس و جورجوپولوس<sup>۱</sup> رابطه بین تولید درشت مولکول‌هایی که به درستی مونتاژ شده‌اند و پروتئین‌هایی که برای اطمینان از مونتاژ صحیح عمل می‌کنند، برقرار نشد. محققان پروتئین هسته‌ای نوکلئوپلاسمین را مورد مطالعه قرار دادند که مونتاژ صحیح هستون‌ها و DNA را در نوکلئوزوم‌ها تضمین می‌کند.



می‌رود (جدول ۱). در همه موجودات زنده، چاپرون‌های مولکولی به عنوان پروتئین‌های ضروری طبقه‌بندی می‌شوند و توالی‌های بین پروتئین‌های مورد استفاده توسط پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها (مانند اعضای خانواده تیوردوکسین [Trx]،

سیکلو‌فیلین‌ها، چپرونین‌ها، Hsp70 و Hsp90) حفظ می‌شود (۷).

جدول ۱- انواع چاپرون‌ها و عملکرد آن‌ها

خانواده پروتئینی	پروکاریوت‌ها	یوکاریوت‌ها	عملکرد
<b>Chaperonins</b>	GroEL, GroES	Hsp60, TriC, CCT	تا شدن پروتئین‌ها در ساختار قفس (cage)
<b>Thioredoxin</b>	Trx, DsbA to DsbE, glutaredoxin	Trx, glutaredoxin, protein disulfide isomerase	تبادل پروتئین تیول-دی سولفید
<b>Small Hsps</b>	IbpA, IbpB	Hsp25/27, a-crystallins	جذب زنجیره‌های باز شده برای جلوگیری از تجمع استرس
<b>Peptidyl-prolyl isomerases</b>	Cyclophilins, FKBP, parvulins	Cyclophilins, FKBP, parvulins	ایزومریزاسیون پیوند پپتیدی قبل از پرولین
<b>GrpE</b>	GrpE	GrpE	عامل تبادل ADP/ATP در تعامل با DnaK/DnaJ
<b>Hsp40/DnaJ</b>	DnaJ, CbpA, Rcs	Hsp40, Hdj2, Mtj1	کوچاپرون‌های Hsp70 که فعالیت Hsp70 را تنظیم می‌کنند
<b>Hsp70</b>	DnaK, Hsc66, BiP, mitochondrial Hsp70, etc	Many (e.g., Hsp70, Hsc70)	جلوگیری از تجمع زنجیره‌های پروتئینی باز شده
<b>Hsp90</b>	HtpG	Hsp90, Gp96	تنظیم مونتاژ پروتئین‌های انتقال سیگنال
<b>Hsp100</b>	ClpA, ClpB, ClpC, ClpX, ClpY	Hsp100	جداسازی الیگومرها و اگرگیته‌ها
<b>Prefoldin nascent chain associated complex</b>	Prefoldin	Nascent chain-associated complex	اتصال به زنجیره‌های تازه سنتز شده پروتئین‌ها هنگام بیرون آمدن از ریبوزوم‌ها

می‌توانند در خارج از سلول وجود داشته باشند و در اعمال غیر فولدینگ شرکت کنند (۸).

### مکانیسم عمل چاپرون‌ها

در ادامه برخی از مکانیسم‌های مهم چاپرون‌ها در فولدینگ پروتئین‌ها توضیح داده شده است.

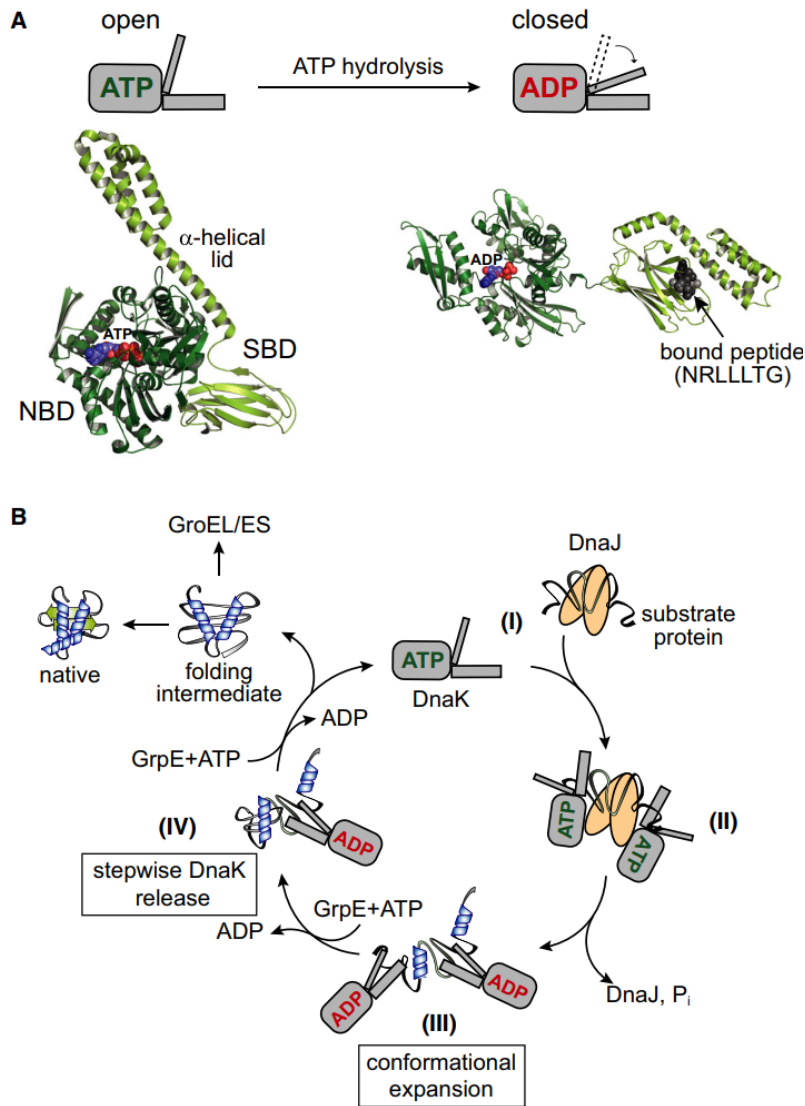
### تاخوردگی پروتئین‌ها به کمک سیستم چاپرون Hsp70

چاپرون‌های کلاس Hsp70 (DnaK در باکتری‌ها) ماشین‌های مولکولی آلوستریکی هستند که در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی از جمله تاخوردگی مجدد پروتئین، ری فولدینگ، جابه جایی، جداسازی و تخریب شرکت می‌کنند. این فعالیت‌های متنوع از به دلیل تمایل مولکول Hsp70 برای عناصر توالی کوتاه (۵-۷ اسید آمینه) در اسید آمینه‌های آبگریز (اغلب توسط اسیدهای آمینه با بار مثبت در کنار آن‌ها) می‌باشد (۹). اتصال برگشت پذیر پپتیدهای آبگریز به C ترمینال دومین اتصال سوبسترا (SBD) به Hsp70 توسط

سلول‌های یوکاریوتی دارای بخش‌های متعددی هستند (سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، هسته)، و در این محفظه‌ها تاخوردگی پروتئین ناشی از استرس به عنوان پاسخ پروتئین باز شده شناخته می‌شود. پاسخ‌های پروتئینی باز شده عنصر مهمی در زیست‌شناسی یک پارچه سلول هستند، با مسیره‌های سیگنال‌دهی کلیدی درون سلولی مرتبط هستند و اکنون با بیماری‌های انسانی مرتبط هستند. ضمناً در تعریف چپرون‌های مولکولی این بود که آن‌ها پروتئین‌های درون سلولی هستند که در تاخوردگی پروتئین‌ها در داخل محفظه‌های سلولی نقش دارند، که به دلیل غلظت بالای پروتئین (در حد ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر)، پروتئین-پروتئین نامناسب را ترجیح می‌دهند. فعل و انفعالات، که منجر به دناتوره شدن پروتئین قابل توجهی می‌شود. با این حال، مشخص شده است که بسیاری از چاپرون‌های مولکولی

شود، در نتیجه یک کمپلکس پایدار بین پروتئین سوبسترا و Hsp70 در ترکیب بسته و متصل به ADP ایجاد می‌کند (شکل ۲). اتصال بعدی به NEF تبادل ADP/ATP را کاتالیز می‌کند و آزادسازی بستر را تسهیل می‌کند، با پیشروی میانی تاشو حاصل یا مستقیماً به حالت اصلی یا انتقال به سایر سیستم‌های چاپرون، مانند چاپرونین یا Hsp90 (شکل B۲، حالت III) (۱۰).

اتصال ATP و هیدرولیز در دومین اتصال به نوکلئوتید (NBD) تنظیم می‌شود (شکل A۲). چرخه ساختاری مبتنی بر ATP Hsp70 توسط پروتئین‌های دامنه J کلاس Hsp40 (در باکتری DnaJ) و عوامل تبادل نوکلئوتیدی (NEFs؛ در باکتری GrpE) هماهنگ می‌شود. سوبستراها را به حالت باز و متصل به ATP Hsp70 تحویل می‌دهد (شکل B۲، حالت II). اتصال Hsp40 و پروتئین سوبسترا به طور هم افزایی باعث هیدرولیز ATP متصل می‌شود.



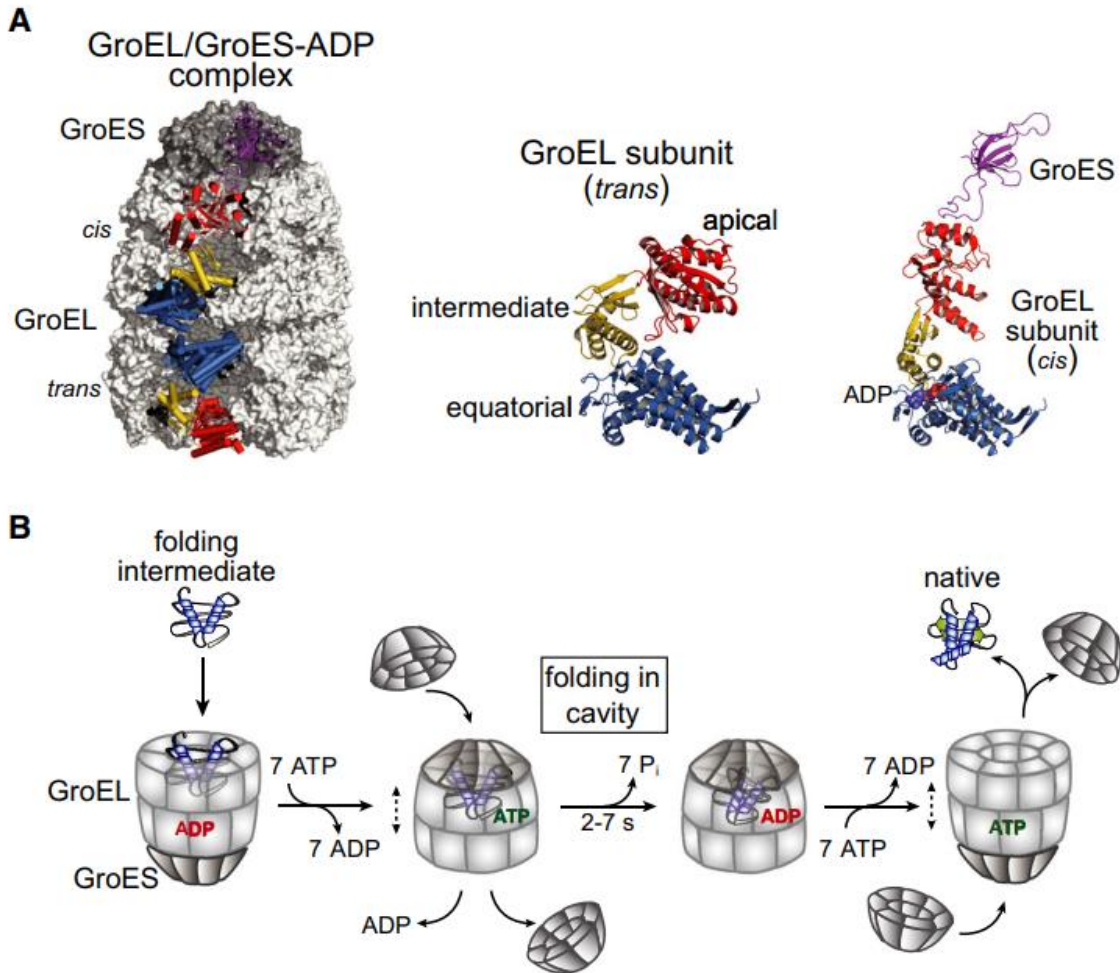
شکل ۲- مکانیسم مولکولی سیستم چاپرون Hsp70 (۱۱).

شوند. آن‌ها در فولدینگ ~ ۱۰٪ از پروتئوم سیتوزولی شرکت می‌کنند، از جمله پروتئین‌های ضروری که نمی‌توانند خود به خود به حالت اصلی خود برسند و نمی‌توانند از سایر سیستم‌های چاپرون استفاده کنند. چپرونین باکتریایی GroEL از دو حلقه از هفت زیرواحد یکسان ~ ۶۰ کیلو دالتون تشکیل

**کاتالیز فولدینگ توسط چپرونین GroEL/ES**  
 چاپرونین‌ها (هم‌چنین به عنوان Hsp60s نیز شناخته می‌شوند) کمپلکس‌های الیگومری بزرگی هستند که به عنوان نانو قفس برای مولکول‌های پروتئین منفرد عمل می‌کنند تا جدا

GroES ایجاد می‌شود، یک هیپتامر از زیر واحدهای ~ ۱۰ کیلو دالتون که به حوزه های آپیکال GroEL متصل می‌شود (شکل A۳) (۱۲).

شده است. هر زیر واحد شامل یک دامنه ATPase استوایی، یک دامنه لولای میانی، و یک دامنه آپیکال است که باقی‌مانده های آگریز را برای اتصال بسترهای غیربومی در معرض نمایش می‌گذارد (شکل A۳). محفظه فولدینگ با تعامل با



شکل ۳- مکانیسم مولکولی چپرونین GroEL/ES

اساساً شدت چندین اختلال عصبی و بسیاری دیگر از تا زدن اشتباه پروتئین‌ها را کاهش می‌دهند (۱۳).

**نقش چاپرون‌ها در بیماری**

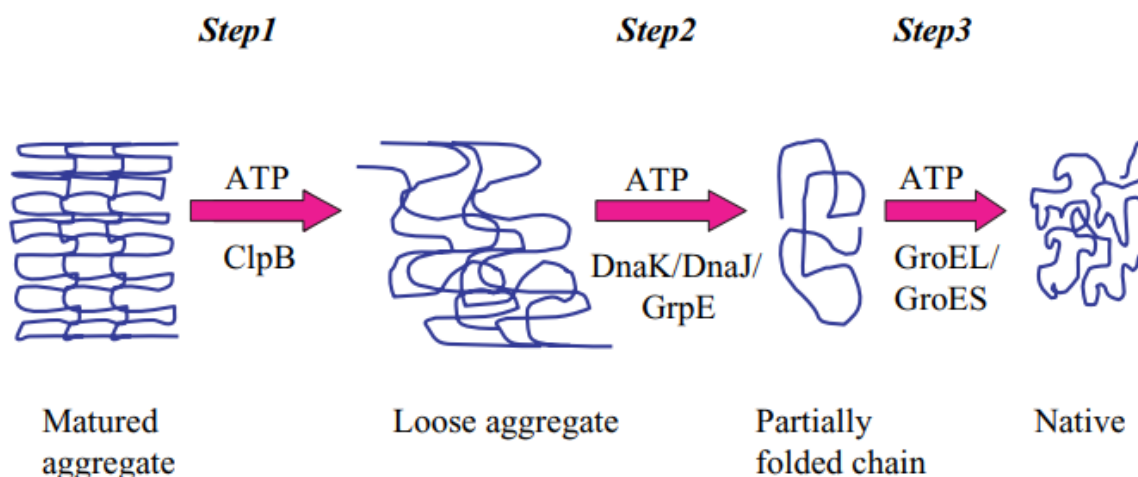
چاپرون های مولکولی عملکردهای مهمی برای کنترل آسیب در حین و پس از استرس دارند. در شرایط آزمایشگاهی، بسیاری از چاپرون‌ها مانند DnaJ, DnaK, E.coli IbpB, GroEL, HtpG و SecB و پروتئازهایی مانند DegP, HslU و Ion می‌توانند پلی پپتیدهای باز شده را متصل کرده و از تجمع آنها جلوگیری کنند. آن‌ها هم‌چنین در حل شدن اگیریگیت‌ها نقش دارند. اگیریگیت‌های پایدار در هنگام عملکرد جداگانه در برابر اکثر سیستم‌های چاپرون ATPase مقاوم هستند، به عنوان مثال GroELS, Hsp90, ClpB.

**بیماری های مرتبط با فولدینگ پروتئین‌ها**

تعداد زیادی از بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی در انسان ناشی از تاخوردگی و تجمع اشتباه پروتئین است. اعتقاد بر این است که تا کردن اشتباه پروتئین علت اصلی بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، بیماری کروتسفلد-جاکوب، فیبروز کیستیک، بیماری گوچر و بسیاری از اختلالات دژنراتیو و عصبی است. چاپرون‌های مولکولی سلولی، که همه‌جا پروتئین‌های ناشی از استرس هستند، و چاپرون‌های شیمیایی و دارویی تازه یافته‌شده، در جلوگیری از تا زدن نادرست پروتئین‌های مختلف بیماری‌زا مؤثر بوده و

چپرون Hsp104 وجود دارد و تولید بیش از حد یا غیرفعال شدن Hsp104 باعث از دست دادن [psi+] می‌شود، تکثیر می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که چپرون‌ها در پیشرفت بیماری پریون بسیار مهم هستند و سطح مشخصی از بیان چپرون می‌تواند سلول‌ها را از شر پریون‌ها خلاص کند، بدون اینکه بر قابلیت حیات آن‌ها تأثیر بگذارد. کنترل سطح بیان Hsp104 ممکن است درمانی در برابر بیماری پریون ارائه دهد. علاوه بر این، Hsp104، همراه با Hsp70، مسئول حل شدن دانه‌های پریون مانند در ساکارومیسیس سرویزیه است. بسیاری از پاسخ‌های مثبت دیگر در مورد جداسازی همراه با واسطه سلولی در داخل بدن گزارش شده‌اند. یک آزمایش کلاسیک توسط Goloubinoff و همکاران انجام شد، که پدیده‌های فعال‌سازی مجدد در شرایط آزمایشگاهی و تجزیه توده‌های پایدار مالات دهیدروژناز توسط ClpB همراه با DnaJ، DnaK و GrpE (KJE) را اثبات کردند و مکانیسم کل فرآیند تجزیه را بیشتر توضیح دادند. (شکل ۴).

و غلظت‌های پایین DnaK . Skowyra و همکاران مشاهده کردند که سیستم چپرون DnaK ممکن است برخی از اشکال تجمع پروتئین را دوباره فعال کند. مشاهده شده است که Hsp100، که شامل ClpA، Ipb، HslU و ClpX در شریشیا کلی است، دارای فعالیت جداسازی است. مشخص شده که ClpA و ClpX برخی از ساختارهای پروتئینی طبیعی را بی‌ثبات می‌کنند (۱۴). شریمر و همکاران نشان داده‌اند که Hsp70 و Hsp100 در ترکیب برای فعال کردن مجدد بسیاری از توده‌های پروتئینی عمل می‌کنند. آنها همچنین نشان دادند که Hsp104 با Hsp70 و Hsp40 در یک تجزیه آهسته و ناکارآمد همکاری می‌کند، که به طور کلی محدود به دانه‌های کوچک لوسیفرافز و  $\alpha$ -گالاکتوزیداز است. یافته‌های آن‌ها با شواهدی تأیید شده است که نشان می‌دهد هر دو همراه در کسب سلولی تحمل حرارتی با یکدیگر همکاری می‌کنند. گزارش شده است که فاکتور غیر مندلی مخمری [psi+]، که مشابه پریون‌های پستانداران است، زمانی که مقادیر متوسطی از پروتئین



شکل ۴- فرآیند ضدتجمع پروتئین در شریشیا کلی توسط چپرون

تخریب می‌شود، در حالی که در دمای پایین‌تر بخشی از آن ساختار طبیعی را تشکیل می‌دهد. این به کشف برخی از ترکیبات شیمیایی کمک کرد که پروتئین‌ها را در برابر دناتور شدن حرارتی تثبیت می‌کنند و ممکن است به اصلاح عیوب تا خوردگی پروتئین‌ها کمک کنند. این ترکیبات در مجموع چاپرون‌های شیمیایی نامیده می‌شدند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که چاپرون‌های شیمیایی در جلوگیری از تشکیل ساختار نادرست چین خورده و متعاقب آن تشکیل آمیلوئید موثر هستند. آن‌ها ترکیباتی با جرم مولکولی کم هستند که

### نقش چاپرون‌های شیمیایی و دارویی در حفظ ساختاری پروتئینی

چاپرون‌های شیمیایی راهبرد دیگر برای جلوگیری از تا خوردگی نادرست یا اصلاح ساختار کشنده پروتئین جهش یافته، تأثیرگذاری بر محیط فولدینگ پروتئین در داخل سلول است. به منظور آزمایش این ایده، پروتئین  $\Delta F508$  CFTR برای توانایی فولدینگ آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $> 30$  درجه سانتی‌گراد آزمایش شد. مشاهده شد که در دمای بالاتر، بخشی از پروتئین تازه سنتز شده به اشتباه تا خورده و



است. در اینجا، دو فاکتور  $\sigma$  جایگزین ( $\sigma 32$  و  $\sigma E$ ) در تنظیم شوک حرارتی نقش دارند، با  $\sigma 32$  نقش عمده‌ای در سنجش محرک‌های سیتوپلاسمی و غشای داخلی دارد، در حالی که  $\sigma E$  متعهد به پاسخ استرس برون سیتوپلاسمی است (۱۸).

در سایر گونه‌های باکتریایی، همزیستی مکانیسم‌های کنترل مثبت و منفی، همراه با تنظیم بیان مجموعه‌های متمایز -های شوک حرارتی، مشاهده شده است. به عنوان مثال، در پاتوژن گرم مثبت *لیستریا مونوسیژنوز*، سه گروه از ژن‌های شوک حرارتی وجود دارد که هر کدام با استراتژی متفاوتی کنترل می‌شوند. به طور مفصل، ژن‌های متعلق به کلاس I (اعضای رمزکننده سیستم‌های چپرون اصلی *DnaK* و *GroE*) و کلاس III (شاپرون‌های کدکننده و پروتئازهای *Clp* وابسته به ATP) به ترتیب توسط *HrcA* و توسط مهارکننده شوک حرارتی *CtsR* تنظیم منفی می‌شوند. در مقابل، ژن‌های متعلق به کلاس II (کدکننده پروتئین‌های استرس عمومی) به طور مثبت توسط فاکتور سیگما جایگزین  $\sigma B$  کنترل می‌شوند. جالب است که در سیانوباکتری‌ها، هر دو استراتژی مثبت و منفی تنظیم رونویسی برای کنترل بیان برخی از ژن‌های شوک حرارتی ترکیب می‌شوند. به عنوان مثال، در *Synechocystis PCC6803*، اپرون *groESL* به طور منفی توسط سیستم *HrcA/CIRCE* تنظیم می‌شود و به طور مثبت توسط فاکتورهای سیگما جایگزین *SigE* و *SigB* تنظیم می‌شود. علاوه بر این، هیستیدین کیناز *Hik34* در تنظیم منفی ژن چاپرونین نقش دارد. علاوه بر مکانیسم‌های رونویسی، تنظیم ژن‌های شوک حرارتی مبتنی بر RNA در سیانوباکتری‌ها نیز گزارش شده است. بیان ژن *hsp17* که برای پروتئین شوک حرارتی کوچکی که *HspA* نیز نامیده می‌شود، کد می‌کند، از نظر رونویسی به فاکتورهای سیگمای جایگزین *SigE* و *SigB* وابسته است و پس از رونویسی توسط ساختار RNA حساس به دما در بخش ۵'-UTR از ژن کنترل می‌شود (۱۹).

برای تثبیت ساختار پروتئین در برابر دنا توره شدن حرارتی و شیمیایی شناخته شده اند. نشان داده شده است که چاپرون-های شیمیایی اگرگیبت و تاخوردگی نا صحیح درون سلولی چندین پروتئین مختلف مانند CFTR،  $\alpha$ -آنتی تریپسین، آکوپورین-۲، گیرنده وازوپرسین-۲،  $\alpha$ -گالاکتوزیداز-A، p53 و P-گلیکوپروتئین را معکوس می‌کنند (۱۵، ۱۶).

### تنظیم بیان ژنهای شوک حرارتی

#### مکانیسم‌های تنظیم کننده ژن‌های شوک حرارتی

در باکتری‌ها، تنظیم ژن‌های شوک حرارتی می‌تواند مثبت یا منفی باشد. تنظیم مثبت از عوامل سیگما جایگزین استفاده می‌کند تا به طور خاص ماشین رونویسی را به زیر مجموعه ای از پروموتورهای انتخاب شده هدایت کند، در حالی که تنظیم منفی توسط سرکوبگرهای رونویسی تنظیم می‌شود. جالب توجه است، در حالی که چندین باکتری مکانیسم‌های منحصرأ مثبت یا منفی را اتخاذ می‌کنند، در برخی میکروارگانیسم‌ها این استراتژی‌های متضاد با هم وجود دارند و یک شبکه تنظیمی پیچیده از ژن‌های شوک حرارتی ایجاد می‌کنند (۱۷).

#### فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی شوک حرارتی

تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی درجات مختلفی از پیچیدگی را در میان میکروارگانیسم‌های مختلف نشان می‌دهد که منعکس‌کننده تنوع شدید مکانیسم‌های تنظیم کننده ژنتیکی در باکتری‌ها است. در چندین باکتری، تنظیم رونویسی شوک حرارتی منحصرأ توسط یک عامل  $\sigma$  اختصاصی مدیریت می‌شود که آنزیم RNA پلیمراز را قادر می‌سازد تا ژن‌های خاصی را که برای پاسخ به استرس دما مهم هستند رونویسی کند (جدول ۲). در چنین موارد ساده‌ای، تمام ژن‌های پاسخ‌دهنده به حرارت تحت کنترل یک تنظیم کننده هستند. برای مثال، در سودوموناس آئروژینوزا و در ویبریوکلا، تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی توسط یک فاکتور سیگما جایگزین خاص برای تنش گرمایی کنترل می‌شود که از نظر توالی و عملکرد مشابه  $\sigma 32$ /شریشیا کلی



جدول ۲- فاکتورها و ژنهای تحت تاثیر (۱۷).

ژنهای تنظیم شده	فاکتور تنظیم رونویسی	باکتری
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, clpP</i> and others	RpoH	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>groESL</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i> , and others	HrcA	<i>Bacillus subtilis</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
Class III: <i>clpP, clpE, ctsR-mcsA-mcsB-clpC</i> and others	CtsR	
	Unknown	
Class IV: <i>htpG</i>	CssS/CssR	
Class V: <i>htrA, htrB</i> and others	Unknown	
Class VI: <i>ftsH, clpX</i> and others		
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, ibpA</i> and others	$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ , RpoH)	<i>Escherichia coli</i>
<i>degP, clpX, lon</i> and others	$\sigma^E$ ( $\sigma^{24}$ )	
<i>cbpA-hspR-helicase, groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HspR	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK</i> , and others	HrcA	<i>Listeria monocytogenes</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
Class III: <i>clpP, clpB, hslU</i> and others	CtsR	
<i>dnaK, lon, clpB</i>	HrcA	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>groESL, dnaK, clpP, hsp18</i> and others	HrcA	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>groESL, dnaK</i> , and others	$\sigma^H$ (RpoH)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>hrcA-dnaK, groESL</i>	HrcA	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>clpP, clpC, clpB, hrcA-dnaK, groESL</i>	CtsR	
genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i>	HrcA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>groESL, clpP, clpC, clpE</i>	CtsR	
<i>clpP, groESL, dnaK</i>	HrcA	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>clpP, groESL</i> , other clp genes	CtsR	
<i>groESL1, groEL2, dnaJ2</i>	HrcA	<i>Streptomyces albus</i>
<i>dnaK, clpB</i>	HspR	
<i>hsp18</i>	RheA	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2</i> and others	HrcA	<i>Synechocystis PCC6803</i>
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigB	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigE	
<i>groESL, dnaK2, htpG</i>	HiK34	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, lon, clpB</i> , and others	$\sigma^{32}$ (RpoH)	<i>Vibrio cholerae</i>

مکانیسمهای سنجش گرما در باکتریها در پاسخ به محیط

توانایی باکتریها برای واکنش سریع به افزایش ناگهانی دما به مکانیسمهای حسگر حرارت بستگی دارد که نشانههای محیطی را برای فعال کردن مسیرههای پاسخ مناسب ادغام می کنند. تا به امروز، مکانیسمهای مختلفی از تنظیم حرارت در باکتریها توصیف شده است و تقریباً تمام کلاسهای بیومولکولها از جمله لیپیدها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک (یعنی هم DNA و هم RNA) را شامل می شود. همه این کلاسها می توانند به عنوان حسگرهای حرارتی عمل

کنند که تغییرات دمای محیط را تشخیص داده و پاسخهای سلولی مربوطه را آغاز می کنند. مکانیسمهای حسگر گرما می توانند مستقیم باشند، که توسط آن دما به طور مستقیم بر فعالیت مولکول زیستی حسگر تأثیر می گذارد، یا می تواند غیرمستقیم باشد، که به وسیله آن پیامدهای افزایش ناگهانی دما (به عنوان مثال، تجمع پروتئینهای تا شده اشتباه در سیتوپلاسم) شناسایی می شود. اگرچه دما یک سیگنال فراگیر است که چندین مسیر سلولی را تحت تأثیر قرار می دهد، این فصل عمدتاً بر مکانیسمهای حسی متمرکز است که بیان ژن شوک حرارتی را تحریک می کند و تنها چند نمونه از

دماسنج‌های RNA به نام ROSE برای سرکوب بیان ژن‌های شوک حرارتی است. عناصر ROSE به طور معمول در تنظیم پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک نقش دارند و طول آنها از ۶۰ تا حدود ۱۲۰ نوکلئوتید متغیر است. عناصر ROSE به عنوان یک عنصر DNA حفاظت شده قبل از چندین ژن شوک حرارتی در ریزوبیاهای مختلف مورد توجه قرار گرفتند. در ابتدا، حدس زده شد که آن‌ها در سطح DNA عمل می‌کنند و مکانیسم تنظیمی آنها به اتصال یک پروتئین سرکوبگر وابسته است. با توجه به اینکه امکان پیش‌بینی ساختار ثانویه مشابه برای همه ۱۵ عنصر ROSE شناخته شده وجود داشت، یک مکانیسم پس از رونویسی پیشنهاد شد و با تجزیه و تحلیل جهش دقیق یک همجوشی ترجمه‌ای ROSE-hspA-lacZ تأیید شد. مشخصات مولکولی و ساختاری گسترده بعدی برخی از ویژگی‌های کلیدی این نوع دماسنج‌های RNA را نشان داد. جالب توجه است، نشان داده شد که دماسنج‌های RNA مبتنی بر ROSE شامل دو تا چهار حلقه ساقه هستند و می‌توانند به تدریج به تغییرات دما پاسخ دهند و سطوح مختلف تنظیم بیان را با توجه به شدت تنش گرمایی ارائه دهند (۲۲).

#### سنجش دما از طریق DNA

در برخی موارد، تغییرات دما را می‌توان مستقیماً توسط DNA سلول باکتری تشخیص داد. چندین مسیر متابولیک فیزیولوژیکی یک میکروارگانیسم تحت تأثیر شرایط خارجی تجربه شده است. به نوبه خود، وضعیت متابولیک سلول از جمله نسبت ADP به ATP تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در نتیجه، آنزیم‌هایی که به ATP به عنوان کوفاکتور نیاز دارند، مانند DNA gyrase، تحت تأثیر قرار خواهند گرفت. این آنزیم که فعالیت آن کاملاً با وضعیت توپولوژیکی DNA مرتبط است، به ATP وابسته است و توسط ADP مهار می‌شود (بنابراین تغییر در نسبت ATP:ADP بر فعالیت DNA گیراز تأثیر می‌گذارد). به همین دلیل، شرایط نوسان خارجی که بر فرآیندهای متابولیک، از جمله شوک اسمزی و حرارتی تأثیر می‌گذارند، می‌توانند در نهایت بر سطح جهانی ابرپیچ‌زنی DNA تأثیر بگذارند. با توجه به اینکه ابرپیچ DNA می‌تواند بر رونویسی ژن تأثیر بگذارد، DNA را می‌توان به عنوان یک حسگر حرارتی تغییر دمای محیط در نظر گرفت که از طریق تغییرات وضعیت توپولوژیکی جهانی کروموزوم در پاسخ به محرک‌های خارجی عمل می‌کند. یکی از پارامترهای اولیه توپولوژی DNA که به تغییرات دما پاسخ می‌دهد، ابرپیچ پلاسمیدی است. به طور خاص، هم در

حسگرهای حرارتی که در تنظیم عوامل بیماری‌زا است توضیح داده می‌شوند (۲۰).

#### سنجش دما از طریق RNA

سریع‌ترین روش تغییر بیان ژن در پاسخ به تغییرات دما بر اساس یک عنصر تنظیم‌کننده سیس است که بخشی از mRNA است که پروتئین شوک حرارتی را کد می‌کند. این مکانیسم تنظیم حرارت، پاسخ بسیار سریعی را پس از درک سیگنال تضمین می‌کند، زیرا دما بر کارایی ترجمه هر دو مخزن درون سلولی مولکول‌های mRNA و هم‌چنین رونویسی در حال انجام تأثیر می‌گذارد. اصل کلی مبتنی بر تشکیل ساختارهای ثانویه زیپ مانند و حساس به دما است که mRNA های تحت این نوع تنظیم را مشخص می‌کند (شکل A۵). به طور خاص، در دمای فیزیولوژیکی، ناحیه ۵' این دسته از mRNA ساختاری را تشکیل می‌دهد که مانع از عناصر توالی حیاتی برای شروع ترجمه می‌شود، مانند محل اتصال به ریبوزوم (همچنین به عنوان دنباله شاین-دالگارنو شناخته می‌شود) و شروع ترجمه. کدون هنگامی که چنین عناصر توالی در یک ساختار ثانویه دخالت دارند، تشخیص و اتصال رونوشت توسط ریبوزوم با مشکل مواجه می‌شود و در نتیجه بر ترجمه mRNA منفی می‌گذارد. با افزایش دما، ساختار ثانویه از طریق یک بازآرایی یا ذوب جزئی می‌رود. در نتیجه، ریبوزوم‌ها می‌توانند به راحتی به ناحیه 5' mRNA دسترسی پیدا کنند و ترجمه افزایش می‌یابد. چندین توالی RNA حساس به دما که به عنوان دماسنج RNA نیز شناخته می‌شوند، در دو دهه اخیر کشف و با جزئیات مشخص شده‌اند (۲۱).

اولین دماسنج RNA در اشریشیا کلی کشف شد و بیان فاکتور سیگما جایگزین شوک حرارتی  $\sigma^{32}$  را تنظیم می‌کند. این یکی از پیچیده‌ترین دماسنج‌های RNA را نشان می‌دهد که تاکنون شناخته شده‌اند، با ساختار ثانویه گسترده‌ای که فقط به ناحیه 5' RpoH mRNA محدود نمی‌شود. به طور خاص، اگرچه در ساختار ثانویه مشخص شده، توالی Shine-Dalgarno تا حدی در معرض دید قرار می‌گیرد، ترجمه mRNA ژن *rpoH* در دمای پایین توسط جفت شدن درون مولکولی بین ناحیه ترجمه نشده ۵' و بخشی از توالی کد کننده بلافاصله در پایین دست کدون شروع AUG مانع می‌شود. با این حال، دماسنج‌های RNA بسیار ساده‌تری وجود دارند که نمونه‌ای از آن با کنترل بیان ژن تنظیم‌کننده سیس، عضو موسس فراوان‌ترین دسته

تجربی آزمایشگاهی نشان داده شد. به طرز جالبی، با افزایش دما، این ناحیه DNA تحت یک انتقال ساختاری ناگهانی (در حدود ۳۲ درجه سانتیگراد) قرار می گیرد که بر دسترسی H-NS به سایت های DNA هدف تأثیر می گذارد و پروموتور *virF* را سرکوب می کند. یک فعل و انفعال مشابه بین خم شدن DNA وابسته به دما و اتصال H-NS برای تعدیل بیان ژن همولیزین در ارگانیزم مدل /شریشیا کلی و افزایش بیان یک سیستم ترشح نوع III در بالای ۳۰ درجه سانتیگراد در *S. enterica* نشان داده شد (۲۵).

به طور خلاصه، حتی اگر چندین مثال از تنظیم بیان ژن وابسته به دما به نقش DNA به عنوان یک مولکول زیستی حسگر اشاره می کند، به نظر می رسد که این مکانیسم سنجش گرما به جای گرما، برای تنظیم بیان ژن های حدت- پاسخ شوک بسیار مناسب تر است.

#### پروتئین های حسگر

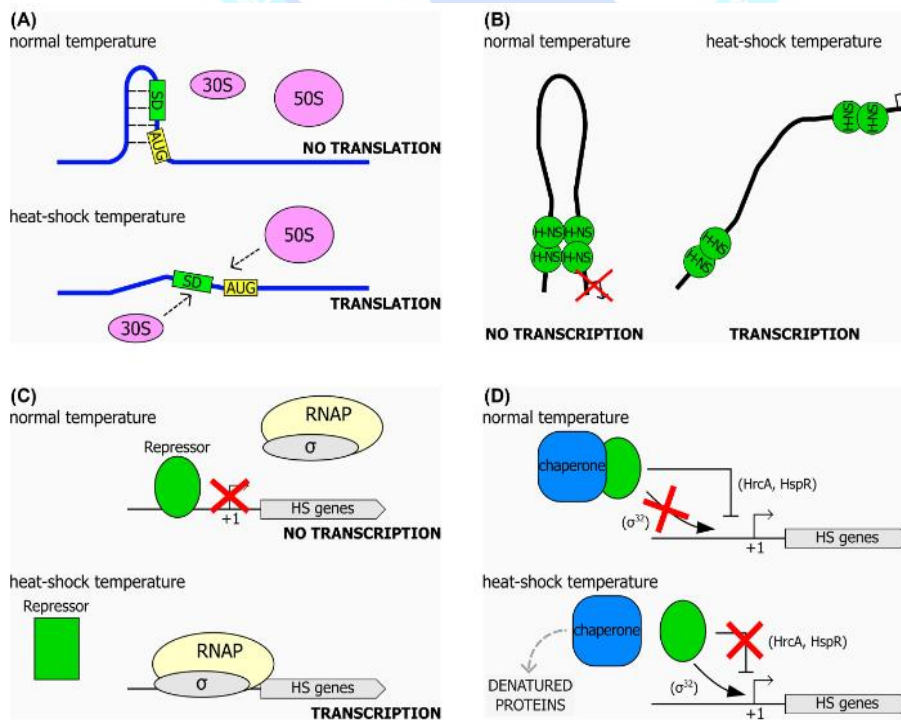
باکتری ها همچنین می توانند با استفاده از پروتئین ها به عنوان حسگرهای حرارتی، نوسانات دما را در جایگاه های اکولوژیکی خود حس کرده و به آن پاسخ دهند. طبقات مختلف پروتئین ها، از جمله کینازها، سرکوبگرهای رونویسی شوک حرارتی و چاپرون ها، به عنوان حسگرهای تغییرات دما مشخص شده اند. با این حال، دو دسته اخیر پروتئین ها در درجه اول برای انتقال سیگنال های استرس گرمایی استفاده می شوند که پاسخ شوک حرارتی رونویسی را تحریک می کنند. سرکوبگرهای رونویسی حسگر حرارت ذاتی قادر به تعدیل مستقیم رونویسی ژن های هدف در پاسخ به نوسانات دما هستند. به طور خاص، آن ها فقط در دمای فیزیولوژیکی برای اتصال پروموتور و سرکوب رونویسی ژن صلاحیت دارند. پس از شوک حرارتی، این سرکوبگرهای حرارتی تحت یک تغییر ساختاری قرار می گیرند که میل اتصال نسبی را برای اپراتورهایشان کاهش می دهد. در نتیجه، رونویسی ژن هدف کاهش می یابد (شکل ۵). با توجه به نکته قبلی، *CtsR*، سرکوبگر جهانی ژن های شوک حرارتی *باسیلوس سوبتیلیس* و سایر باکتری های گرم مثبت با *GC* پایین، یکی از بهترین نمونه های مشخص شده است (۲۶). سنجش های اتصال به DNA آزمایشگاهی که در دماهای مختلف انجام شد نشان داد که فعالیت اتصال *CtsR* به پروموتور *clpC* در شرایط شوک حرارتی (۵۰ درجه سانتیگراد)، در مقایسه با دمای طبیعی رشد در ۳۷ درجه سانتیگراد، به شدت کاهش می یابد. جالب توجه است، از دست دادن وابسته به دما فعالیت اتصال به DNA *CtsR* برگشت پذیر نشان داده شد. در واقع، زمانی

باکتری های مزوفیل و هم در باکتری های هیپرتروفیل نشان داده شد که تغییرات ناگهانی دما منجر به تغییرات گذرا در توپولوژی DNA پلاسمید می شود و این اثر، به نوبه خود، تأثیر قابل توجهی بر کارایی رونویسی دارد (۲۳).

با این حال، در برخی موارد دیگر، ساختارهای DNA محلی، حس دما را واسطه می کنند و رونویسی ژن های همسایه را تحت تأثیر قرار می دهند. برخی از توالی های DNA شناسایی شده در *E. coli* و در چندین باکتری دیگر با ترکیب توپولوژیکی خاص توالی مشخص می شوند که می تواند ترکیب های مختلفی را در پاسخ به تغییرات دما در نظر بگیرد. هنگامی که این نواحی DNA نزدیک به پروموتورها هستند، تغییرات ساختاری محلی ناشی از شوک حرارتی به مدولاسیون از کارایی اتصال RNA پلیمرز تبدیل می شود و در نتیجه رونویسی ژن های پایین دست را تحت تأثیر قرار می دهد. یک مثال با ناحیه بالادست ژن *plc* نشان داده شده است که فسفولیپاز *C (PLC)* را در کلسترییدیوم پرفریژنز کد می کند. در این مورد، سه بخش *A-tracts* که قبل از ژن کد کننده PLC هستند، یک ترکیب خمیده قوی به این توالی DNA می دهند. با استفاده از روش های رونویسی آزمایشگاهی، نشان داده شد که اثر تحریکی بر فعالیت پروموتور توالی *A-tract* وابسته به دما است، احتمالاً به دلیل تغییر در زاویه خمش بر نوسانات دما. علاوه بر فعال سازی مستقیم رونویسی با واسطه DNA خم شده از طریق تسهیل اتصال RNA پلیمرز، انحناهای DNA محلی وابسته به دما می توانند به طور غیرمستقیم کارایی رونویسی را با تأثیر بر تعامل پروتئین ها با نقش تنظیمی بر بیان ژن تنظیم کنند. از این نظر، پروتئین های مرتبط با نوکلئید مانند *HU*، *Fis*، *IHF* و *H-NS* نشان داده شده است که در این نوع فرآیند نقش دارند. یکی از بهترین نمونه های مطالعه شده مربوط به تنظیم وابسته به دما رونویسی *virF* در *شیگلا فلکسنری*، یک باکتری بیماری زا است که می تواند به اپیتلیوم روده انسان حمله کند (شکل ۵). تنظیم کننده *VirF* شبه *AraC*، پروتئینی که باعث فعال شدن چندین ژن با عملکردهای تهاجمی می شود، باید تنها پس از انتقال از محیط بیرون به میزبان بیان شود. نشان داده شده است که رونویسی پروموتور *virF* در دماهای غیرمجاز (زیر ۳۲ درجه سانتیگراد) توسط پروتئین H-NS مرتبط با نوکلئید سرکوب می شود (۲۴). علاوه بر این، نشان داده شد که پروموتور *virF* دارای دو محل اتصال H-NS است که توسط یک منطقه خمیده ذاتی جدا شده اند، که وجود آن در سلیکو پیش بینی شده بود و با نتایج

B. باسیلوس سوبتیلیس و کمپلکس‌های *thermoglucosidasius HrcA-CIRCE* بسیار با دماهای رشد متفاوت دو میکروارگانیسم سازگار است، به این پیشنهاد منجر شد که رپرسور *HrcA* ممکن است نقشی به‌عنوان حسگر حرارتی داشته باشد. نقش مستقیمی به‌عنوان حسگر حرارتی اخیراً برای سرکوبگر *HrcA* هلیکوباکتر پیلوری نشان داده شده است. به‌طور خاص، نتایج سنجش ردیابی *DNaseI* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که اتصال *DNA* با واسطه *HrcA* به شدت وابسته به دما است. هنگامی که هلیکوباکتر پیلوری *HrcA* در معرض دمای بالاتر از ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، به‌طور چشمگیری میل اتصال به اپراتورهای *CIRCE* را کاهش داد و اساساً غیرفعال شد. به‌طور جالب توجهی، از دست دادن فعالیت اتصال پس از درمان شوک حرارتی به‌نظر می‌رسد در شرایط آزمایشگاهی غیرقابل برگشت باشد، که احتمالاً به‌عنوان یک نتیجه از تغییرات ساختاری عمده در دمای بیش از ۴۰ درجه سانتیگراد است. با این حال، وضعیت در داخل بدن متفاوت است، جایی که *HrcA* قادر است عملکرد سرکوب کننده خود را پس از چالش دما بازیابی کند (۲۷).

که *CtsR* ابتدا در دمای غیرمجاز و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، تنظیم کننده فعالیت اتصال به *DNA* را به دست آورد. در مورد *CtsR*، تغییر ساختاری وابسته به دما که مسئول از دست دادن فعالیت اتصال به *DNA* است، به یک ناحیه حلقه غنی از گلیسین کوتاه در *DBD* محدود می‌شود، که مکان عملکردی دقیقی را برای سنجش گرما تشکیل می‌دهد. نشان داده شد که سرکوبگر شوک حرارتی *Streptomyces albus RheA*، قادر به تشخیص تغییرات دما در غیاب سایر عوامل است و رفتاری مشابه با *CtsR* دارد. پس از چالش گرما، *RheA* فعالیت اتصال به *DNA* را از دست می‌دهد و انتقال از شکل فعال به غیرفعال (۲۷). یک الگوی مشابه از ظرفیت اتصال به *DNA* وابسته به دما نیز به‌وضوح برای تنظیم کننده *RovA* مرتبط با حدت یرسینیا پستیس و برای تنظیم کننده *TlpA* باکتری *سالمونلا انتریکا* نشان داده شد. در مثال دوم، به‌طور خاص، دما به‌طور برگشت‌پذیری بر دومین‌های مناسب اتصال به *DNA* در حالت الیگومریزه شده پروتئین تأثیر می‌گذارد و در نتیجه بر توانایی اتصال به *DNA* تأثیر می‌گذارد. یکی دیگر از مهارکننده‌های شوک حرارتی گسترده، *HrcA*، می‌تواند در برخی موارد به‌عنوان یک دماسنج پروتئینی ذاتی عمل کند. مشاهده این‌که پروفایل‌های دناتوراسیون حرارتی



شکل ۵- مکانیسم‌های حسگر دما (۱۷).



را کد می‌کند، که بیان آن‌ها ممکن است توسط OxyR سرکوب شود، زیرا بیان آنها در سویه جهش یافته  $\Delta oxyR$  افزایش یافته است. علاوه بر این، القای برخی از ژن‌ها مستقل از OxyR بود که نشان‌دهنده وجود سایر حسگرها و تنظیم‌کننده‌های پراکسید در *اشریشیا کلی* است. به عنوان مثال، اپرون *isc*، که فعالیت‌های تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S را مشخص می‌کند، توسط پراکسید هیدروژن در سویه‌های فاقد OxyR یا تنظیم‌کننده‌های پاسخ سوپراکسید SoxRS القا شد. این نتایج درک ما را از پاسخ استرس اکسیداتیو گسترش می‌دهد (۲۸).

### پاسخ وابسته به OxyR

مشخصه پاسخ *اشریشیا کلی* به پراکسید هیدروژن، القای سریع و قوی مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیم شده با OxyR از جمله *dps*، *katG*، *grxA* و *ahpCF* است. القای بیش از ۲۰ برابر مشاهده شده همه این ژن‌ها در سویه نوع وحشی در جدول ۳ نشان داده شده است.

تغییرات بیان ژن‌ها در شرایط استرسی در باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین رویدادها در موجودات مختلف در مواجهه با شرایط حاد محیطی تغییرات بیان ژن‌ها برای مقابله و زنده ماندن در آن شرایط حاد می‌باشد که در ادامه به یکی از مهمترین تغییرات بیان ژن در شرایط استرس اکسیداتیو پرداخته می‌شود. مشخصات رونویسی ژنومی سلول‌های *اشریشیا کلی* تیمار شده با پراکسید هیدروژن با یک ریزآرایه DNA متشکل از ۴۱۶۹ فریم خواندن باز *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه‌گیری بیان ژن در سویه‌های حذفی نوع وحشی و OxyR، تأیید شد که تنظیم‌کننده پاسخ پراکسید OxyR اکثر ژن‌های بسیار القایی با پراکسید هیدروژن را فعال می‌کند. اندازه‌گیری‌های میکروآرای DNA امکان شناسایی چندین ژن جدید فعال شده با OxyR، از جمله ژن بیوسنتزی *hemH* هم را فراهم کرد. اپرون *suf* شش ژنی که ممکن است در مونتاژ یا تعمیر خوشه Fe-S و چهار ژن با عملکرد ناشناخته شرکت کند. ما هم‌چنین چندین ژن از جمله *uxuA* را شناسایی کردیم که هیدرولاز مانونات

جدول ۳-۳۰ ژن القا شده با پراکسید هیدروژن.

Gene	b no.	Induction ratio <sup>a</sup>	Function <sup>b</sup>
<i>dps</i>	b0812	180	Stress response DNA binding protein
<i>yaiA</i>	b0389	56	Function unknown
<i>katG</i>	b3942	44	Catalase hydrogen peroxidase I
<i>grxA</i>	b0849	37	Glutaredoxin I
<i>yfiA</i>	b2597	36	Function unknown
<i>ibpA</i>	b3687	29	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yjiD</i>	b4326	29	Function unknown
<i>ycfR</i>	b1112	26	Function unknown
<i>ahpF</i>	b0606	22	Alkyl hydroperoxide reductase large subunit
<i>trxC</i>	b2582	21	Thioredoxin 2
<i>sufA</i>	b1684	21	Homology with IscA
<i>yngB</i>	b1166	20	Function unknown
<i>ahpC</i>	b0605	20	Alkyl hydroperoxide reductase small subunit
<i>ibpB</i>	b3686	18	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yaaA</i>	b0006	18	Function unknown
<i>tnaA</i>	b3708	18	Tryptophanase
<i>fpr</i>	b3924	17	Ferredoxin NADP <sup>+</sup> reductase
<i>cysK</i>	b2414	16	Cysteine synthase
<i>sufB</i>	b1683	16	Function unknown
<i>dsdX</i>	b2365	15	Homology with gluconate permease
<i>ybjM</i>	b0848	15	Function unknown
<i>yeeD</i>	b2012	14	Function unknown
<i>dsdA</i>	b2366	13	d-Serine deaminase
<i>soxS</i>	b4062	13	Regulatory protein of <i>soxRS</i> regulon
<i>sbp</i>	b3917	12	Periplasmic sulfate binding protein
<i>sufC</i>	b1682	12	Putative ABC transporter
<i>phoH</i>	b1020	12	Member of <i>pho</i> regulon
<i>hemH</i>	b0475	11	Ferrochelatase
<i>yljA</i>	b0881	11	Function unknown
<i>ycgZ</i>	b1164	11	Function unknown



**hemH (i)**

یک ژن، *hemH* (b0475)، که بیان آن ۱۱ برابر توسط پراکسید هیدروژن در سویه نوع وحشی القا شد، یک فروکلاناز را کد می‌کند که ادغام یون آهن را در پروتوپورفیرین IX در نهایی کاتالیز می‌کند. مرحله در بیوسنتز پروتوهم جایگاه *hemH* نیز *visA* نامیده شد زیرا برخی از جهش‌های فروکلاناز/شریشیا کلی به دلیل داشتن یک فنوتیپ حساس به نور شناسایی شدند. قبلاً مشخص شده بود که حساسیت به نور ناشی از افزایش سطوح پروتوپورفیرین IX است که در جهش‌های فاقد فروکلاناز تجمع می‌یابد (۲۹).

**(ii) اپرون suf**

سه ژن *sufA/ydiC* (b1684)، *sufB/ynhE* (b1683) و *sufC/ynhD* (b1682) که بیان آن‌ها به شدت در سویه نوع وحشی القا شد. این ژن‌ها در یک جهت رونویسی می‌شوند و پتانسیل جفت شدن انتقالی را نشان می‌دهند. Patzer و Hantke پیشنهاد کردند که خوشه ژنی یک اپرون را تشکیل می‌دهد و به دلیل دخالت احتمالی در تجمع گوگرد، ژن‌ها را *sufA*، *sufB*، *sufC*، *sufD*، *sufE* و *sufS* نامیدند. از شش ORF، ژن *sufS* و محصول آن بهترین مشخصه‌ها هستند. این ژن یکی از سه همولوگ NifS در *شریشیا کلی* را کد می‌کند و هم‌چنین *csdB* نامیده شده است. هر سه همولوگ ژن NifS در *شریشیا کلی*، *IscS*، *CSD*، و *Sufs/CsdB* حذف گوگرد از ال-سیستئین و سلنیوم از ال-سلنوسیستئین را کاتالیز می‌کنند. با این حال، پروتئین SufS/CsdB 290 برابر بر ال-سلنوسیستئین فعال تر از ال-سیستئین است و بنابراین به عنوان همتای E. coli سلنوسیستئین لیاز پستانداران در نظر گرفته شد. محصولات ژنی پنج ژن باقیمانده *suf* کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما برخی مشابهت‌های جالبی را با سایر پروتئین‌های مشخص شده نشان می‌دهند. *sufA* یک همولوگ از *IscA* را کد می‌کند که همراه با محصولات ژن‌های *iscS* و *iscU* در تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S نقش دارد. ژن‌های *sufB*، *sufC* و *sufD* اجزای یک انتقال دهنده کاست اتصال (ABC) ATP را رمزگذاری می‌کنند. هیچ داده بیوشیمیایی در رابطه با این سه ژن یافت نمی‌شود. با این حال، مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که جهش‌یافته‌های E. coli *sufC* القای وابسته به *soxR* یک همجوشی ژن *soxS-lacZ* را به تاخیر انداخته‌اند، و پایداری پروتئین یون ردوکتاز [Fe-2S<sub>2</sub>] که توسط *fhuF* کدگذاری می‌شود در *sufD* جهش یافته‌ها کاهش می‌یابد. ژن نهایی در اپرون،

*sufE*، یک اکسیدوردوکتاز حفاظت‌شده را کد می‌کند، که همولوگ آن در پایین دست ژن *csd* وجود دارد (۳۰). اگرچه فقط *sufA*، *sufB*، و *sufC* جزو ژن‌های بسیار القای شده هستند، *sufD* (b1681)، *sufS* (b1680) و *sufE* (b1679) نیز با نسبت‌های بالاتری در سویه نوع وحشی القا می‌شوند. برای تأیید تنظیم *OxyR* این اپرون و برای ترسیم شروع رونوشت *suf*، سنجش‌های گسترش پرایمر را انجام دادیم. مطابق با داده‌های ریزآرایه، القای *sufA* وابسته به *OxyR* را شناسایی کردیم. هنگامی که RNA جدا شده از سویه نوع وحشی به عنوان الگو استفاده شد، یک محصول گسترش پرایمر قوی که به یک باقیمانده T در موقعیت ۱۷۶۲۴۴۲، ۳۲ جفت باز در بالادست کدون شروع *sufA* در موقعیت ۱۷۶۲۴۱۰ ختم می‌شد، مشاهده شد. ردپای DNase I که با استفاده از یک قطعه ۳۷۸ جفت باز از ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH* انجام شد، نشان داد که *OxyR* اکسید شده منحصراً به سایت پیش‌بینی شده متصل است. با این حال، این تک محل اتصال *OxyR* از انتهای محصول گسترش پرایمر در بالادست فاصله داشت، و در تمام پروموتورهای شناخته شده فعال شده با *OxyR*، فاکتور رونویسی در موقعیتی با هم‌همپوشانی یا مستقیماً در بالادست دنباله -۳۵ پروموتور متصل می‌شود. احتمالاً رونوشت اولیه *sufA* طولانی‌تر است و یا پردازش می‌شود یا به یک ساختار ثانویه پیچیده غیرقابل نفوذ نسبت به رونوشت معکوس تبدیل می‌شود. با توجه به حفاظت غیرمعمول بالای ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH*، این احتمال وجود دارد که تنظیم بیان *sufA* پیچیده باشد. ما تنظیم قوی *Fur* بیان *sufA* را در شرایط مورد استفاده در آزمایش‌های خود مشاهده نشد. با این حال، دو محل اتصال *Fur* فرضی، در موقعیت‌های ۱۷۶۲۴۶۰ و ۱۷۶۲۴۶۶، در پروموتور *suf* پیش‌بینی شده‌اند، و بیان وابسته به *Fur* ترکیبات *sufD-lacZ* و *sufS-lacZ* قبلاً مشاهده شده است. برای درک کامل تنظیم اپرون *suf* به آزمایشات بیشتری نیاز است (۳۱).

**(iii) ژن‌های با عملکرد ناشناخته.**

چهار ORF با عملکرد ناشناخته، *yaiA*، *yaaA*، *yljA*، و *ybjM*، القای پراکسید بسیار قوی‌تری را در سویه نوع وحشی نسبت به سویه حذف *oxyR* نشان دادند. *yaaA* و *yljA* ORF‌های حفاظت شده هستند، اما داده‌های تجربی در مورد عملکرد پروتئین‌های مربوطه را نمی‌توان در مقالات یافت. سنجش گسترش پرایمر تأیید کرد که رونوشت‌هایی که مستقیماً در بالادست اولین کدون پیش‌بینی شده ORF‌های



ibpA و ibpB که پروتئین‌های شوک حرارتی را کد می‌کنند نیز به شدت در هر دو سویه نوع وحشی و  $\Delta oxyR$  القا شدند. القای مشاهده شده ژن‌های کدکننده‌های چاپرون HSP20 در پاسخ به استرس اکسیداتیو با گزارش اخیر مطابقت داشت

که سویه‌های -ibpA، -ibpB و -ibpAB بیان بیش از حد، نه تنها به گرما، بلکه در برابر درمان پاراکوات نیز مقاوم هستند (۳۵).

رمزگذاری دی-سرین دامیناز. ما هم‌چنین القای مختصری از ژن‌های دیگر را در مسیر بیوسنتز سیستئین مشاهده کردیم. القای این ژن‌ها تلاش هماهنگ برای تجمع سیستئین بیشتر در پاسخ به درمان پراکسید هیدروژن را پیشنهاد می‌کند. دو ژن دیگر، tnaA و tnaL، که به روشی مستقل از OxyR القا شده بودند، در کاتابولیسم اسید آمینه نقش دارند. ژن‌های



## References

1. AlQuraishi MJC. (2019). End-to-end differentiable learning of protein structure. 8(4):292-301. e3.
2. Bartlett AI, Radford SEJNs, biology m. (1009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. 16(6):582-8.
3. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJS. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. 353(6294):aac4354.
4. Liutkute M, Samatova E, Rodnina MVJB. (2020). Cotranslational folding of proteins on the ribosome. 10(1):97.
5. Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, (2014). Kaloshian IJPotNAoS. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. 111(24):8919-24.
6. Henderson B, Allan E, Coates ARJI. (2006). Immunity. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. 74(7):3693-706.
7. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT. (1988). Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. 333(6171):330-4.
8. Kaufman RJTiCB. (2004). A trip to the ER: coping with stress. 2004;14:20-8.
9. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau BJNrmcb. The Hsp70 chaperone network. 2019;20(11):665-80.
10. Luengo TM, Kityk R, Mayer MP, Rüdiger SGJMc. Hsp90 breaks the deadlock of the Hsp70 chaperone system. 2018;70(3):545-52. e9.
11. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJFl. (2020). Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. 594(17):2770-81.
12. Hayer-Hartl M, Bracher A. (2016). Hartl FUJTibs. The GroEL–GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. 41(1):62-76.
13. Cohen FE, Kelly JWJN. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. 426(6968):905-9.
14. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA. (1996). Lindquist SJTibs. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. 21(8):289-96.
15. Burrows JA, Willis LK. (2000). Perlmutter DHJPotNAoS. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in  $\alpha$ 1-AT deficiency. 97(4):1796-801.
16. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F. (2002). Kanazawa IJNod. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. 10(2):88-99.
17. Roncarati D, Scarlato VJFmr (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. 41(4):549-74.
18. Slamti L, Livny J, Waldor MKJJob. (2007). Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* rpoH deletion mutant. 189(2):351-62.
19. Kojima K, Nakamoto HJFl. (2007). A novel light-and heat-responsive regulation of the groE transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria. 581(9):1871-80.
20. Shapiro RS, Cowen LEJM. (2012). Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. 3(5):10.1128/mbio.00238-12.
21. Kortmann J, Narberhaus FJNrm. (2012). Bacterial RNA thermometers:



- molecular zippers and switches. 10(4): 255-65.
22. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus FJRb. (2009). The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. 6(4):455-63.
23. Dorman CJ, Corcoran CPJNAR. (2009). Bacterial DNA topology and infectious disease. 37(3):672-8.
24. Colonna B, Casalino M, Fradiani PA, Zagaglia C, Naitza S, Leoni L, et al. (1995). H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. 177(16):4703-12.
25. Duong N, Osborne S, Bustamante VH, Tomljenovic AM, Puente JL, Coombes BKJJoBC. (2007). Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 282(47):34077-84.
26. Elsholz AK, Michalik S, Zühlke D, Hecker M. (2010). Gerth UJTEJ. CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. 29(21):3621-9.
27. Servant P, Grandvalet C, Mazodier PJPotNAoS. (2000). The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. 2000;97(7):3538-43.
28. Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz GJJob. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. 2001;183(15):4562-70.
29. Bachmann BJJec, cellular St, biology m. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. 1996:2460.
30. Nachin L, El Hassouni M, Loiseau L, Expert D, Barras FJMm. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. 2001;39(4):960-72.
31. Patzer SI, Hantke KJJob. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. 1999;181(10):3307-9.
32. Zheng M, Wang X, Doan B, Lewis KA, Schneider TD, Storz GJJob. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. 2001;183(15):4571-9.
33. Nunoshiba T, Hidalgo E, Amabile Cuevas C, Demple BJJJob. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. 1992;174(19):6054-60.
34. Kambampati R, Lauhon CTJB. IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. 1999;38(50):16561-8.
35. Maki Y, Yoshida H, Wada AJGtc. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. 2000;5(12):965-74.



## Chaperones, vital molecules in microbes

Kimia Golestanfar<sup>\*1</sup>

Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch,  
Islamic Azad University, Shahrekord, Iran <sup>1\*</sup>

**\*Corresponding author::** [Golestanfark@gmail.com](mailto:Golestanfark@gmail.com)

### Abstract

Molecular chaperones are highly conserved proteins that promote proper folding of other proteins inside the body. Diverse chaperone systems contribute to protein folding and translocation, assembly of oligomeric complexes, and recovery from stress-induced unfolding. A fundamental function of molecular chaperones is to inhibit nonproductive protein interactions by recognizing and protecting hydrophobic surfaces that are exposed during folding or following proteotoxic stress. Therefore, chaperones are of special importance in cellular systems, which are discussed in this review article about these molecules and their mechanisms of action. Also, changes in gene expression in oxidative conditions in bacteria will be discussed in order to tolerate environmental conditions.

**Keywords:** Chaperone, folding, temperature stress

## بررسی آلودگی مواد غذایی نیمه آماده و فست فودها نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در استان چهارمحال و بختیاری

منوچهر مؤمنی شهرکی<sup>۱</sup>، فاطمه شیرازی باصری<sup>۲</sup>، یاس محمدی<sup>۳\*</sup>، حسین خدابنده شهرکی<sup>۱</sup>

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

۲. دانشجوی کارشناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

\*نویسنده مسئول: Yasimo79810momo@gmail.com

### چکیده

غذاهای سریع و سرد به علت عدم نیاز به زمان پخت و نیز به دلیل تماس باد دست کارگران رستوران هنگام آماده سازی، موجب افزایش خطر میکروبیولوژیکی مصرف کنندگان می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس*، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در غذاهای نیمه آماده و فست فودها و شناسایی به روش PCR است.

در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی (فرآورده‌های گوشتی، فلافل، پیتزا، مرغ) به شکل تصادفی از مراکز تهیه و ارائه این غذاها در شهرستان بروجن، شهرکرد و فارسان در یک بازه زمانی یک ماهه جمع آوری و جهت بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های فرآورده‌های گوشتی (۶۴/۱ درصد)، فلافل (۲۱/۲ درصد)، پیتزا (۲۰ درصد)، مرغ (۳۰/۸ درصد) مشاهده شد. میانگین باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های مثبت (۳۹ درصد) گزارش گردید.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت از آنجا که نتایج مراحل و تهیه تولید فست فود و مواد غذایی نیمه آماده به صورت دستی است احتمال آلودگی مواد غذایی از طریق نیروی انسانی کاملاً وجود دارد. اگرچه درصد آلودگی نمونه‌ها زیاد بوده است ولی تعداد باکتری‌های موجود در نمونه پایین و خطر بالقوه ایی برای سلامت مصرف کننده ندارد. لذا آموزش بهداشت شخصی و محیطی به منظور کاهش میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* در افرادی که در تهیه و تولید غذا نقش دارند از اهمیت بالایی برخوردار است.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، آلودگی میکروبی، مواد غذایی، PCR

### مقدمه

می‌شوند. (۱) در انسان، این باکتری در قسمت قدامی بینی بزرگسالان وجود دارد و در ۲۰ تا ۳۰ درصد از جمعیت انسانی به صورت دائم و پایدار و در ۶۰ درصد افراد به صورت متناوب دیده می‌شود. لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل آوری و توزیع غذا فعالیت دارند، در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی قادرند باکتری را به

بیماری‌های منتقله از غذا (food borne-diseases) معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه با صرف هزینه‌های چند میلیون دلاری، ملیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا شده و برخی دچار مرگ یا بستری شدن در بیمارستان‌ها

و به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال یافت. ۱۰ گرم از هر نمونه به ۹۰ گرم از محلول استریل بافر نمک فسفات اضافه شد و سپس به مدت چند دقیقه به هم زده شد تا به صورت هموزن درآید. جهت جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از محلول سوسپانسیون حاوی نمونه‌ها بر روی سطح پلیت حاوی محیط کشت بردپارکر آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری شدند. در نهایت کلنی‌ها بر روی محیط کشت مذکور مشاهده و از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند و جهت تأیید تشخیص باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* رنگ آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز، کوآگولاز، تست DNase و تخمیر مانیتول بر روی کلنی‌ها انجام گرفت. (۹)

### استخراج DNA

به منظور انجام دادن این آزمون، باکتری‌های جداسازی شده در محیط لوریا برتانی برات کشت داده شدند و سپس طبق دستور العمل کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت سیناژن DNA استخراج گردید.

### واکنش PCR برای شناسایی ژن 16SrRNA

واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۲ چرخه دمایی، هر چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه که هر کدام به ترتیب اختصاص به مراحل واسرشت ثانویه، اتصال پرایمر، و گسترش اولیه بود. مرحله نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام دادن PCR محصولات PCR، درژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE1x به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد و براساس بانندی که محصولات PCR در دستگاه gel-documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

غذا انتقال دهند. (۲) در میان *استافیلوکوکوس ها*، *استافیلوکوکوس اورئوس* مهاجم‌ترین گونه است و به عنوان مسبب بیماری‌های مختلفی، مانند عفونت پوست، آبسه، مسمومیت غذایی، سندروم شوک سمی، سپتی سمی، اندوکاردیت و ذات الریه شناخته می‌شود. (۴،۳) مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی در جهان است و در اکثر کشورها سه عامل اول مسمومیت‌های غذایی محسوب می‌شود. (۵) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای توکسین‌های مختلفی مانند لکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین است؛ که در بیماری‌های غذازاد، انتروتوکسین از اهمیت زیادی برخوردار است و مصرف غذای آلوده به این توکسین موجب بروز مسمومیت غذایی می‌گردد. (۶)

این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فراورده‌های لبنی و فراورده‌های گوشتی و غذاهای نیمه آماده و فست فودها به خصوص غذایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می‌باشد، قابل جدا شدن است. با وجود اینکه سویه‌های این باکتری بخشی از فلور طبیعی انسان هستند؛ به عنوان باکتری بیماری‌زا فرصت طلب یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و گستره وسیعی آرای بیماری‌های انسانی و حیوانی (پوستی، گوارشی، تنفس و ...) را موجب می‌شود. (۷) *استافیلوکوکوس اورئوس* هم به صورت فنتوتیپی و هم به صورت ژنوتیپی قابل جداسازی و تأیید است؛ اما به دلیل تنوع در ویژگی‌های مختلف می‌توان این گونه را به انواع مختلفی تقسیم بندی کرد. تایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* روش مناسبی برای اهداف اپیدمیولوژیک است. (۸)

### مواد و روش کار

آماده سازی نمونه‌ها، ۱۰۰ نمونه از غذاهای فست فودی و نیمه آماده شامل ۳۹ نمونه فرآورده‌های گوشتی، ۳۳ نمونه فلافل، ۱۵ نمونه پیتزا، ۱۳ نمونه مرغ جمع آوری

توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگر مورد استفاده در این تحقیق

پرایمر	سکانس الیگونوکلئوتیدی	اندازه محصول	ژن هدف
<i>S. aureus.F</i>	5'- AAGGGCGAAATAGAAAGTGCCGG-3'	515bp	16srRNA
<i>S. aureus.R</i>	5'- ATGGTCGGTTCCTTAGAAAACAACACTTG-3'	515bp	

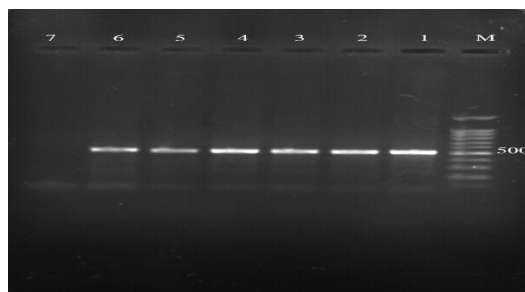
در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی (فرآورده‌های گوشتی، فلافل، پیتزا، مرغ) به شکل تصادفی از مراکز تهیه و ارائه این غذاها در شهرستان بروجن، شهرکرد و فارسان در یک بازه زمانی یک ماهه جمع آوری و جهت بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع آلودگی به

جدول ۱: درصد فراوانی آلودگی مواد غذایی نیمه آماده و فست فودها به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

ردیف	نوع نمونه	نمونه‌های مثبت	نمونه‌های منفی	کل
۱	فرآورده‌های گوشتی	۲۵ (۶۴/۱ درصد)	۱۴ (۳۵/۹ درصد)	۳۹
۲	فلافل	۷ (۲۱/۲ درصد)	۲۶ (۷۸/۸ درصد)	۳۳
۳	پیتزا	۳ (۲۰ درصد)	۱۲ (۸۰ درصد)	۱۵
۴	مرغ	۴ (۳۰/۸ درصد)	۹ (۶۹/۲ درصد)	۱۳
۵	جمع نمونه	۳۹	۶۱	۱۰۰

*استافیلوکوکوس اورئوس* انتخاب گردید. نتایج شناسایی مولکولی و محصول PCR در تصویر شماره ۱ قابل مشاهده است.

همه نمونه‌های انتخابی برای تأیید نهایی از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* بودن به روش مولکولی بررسی شد. ژن 16srRNA برای شناسایی و تأیید باکتری



تصویر شماره ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز. M مارکر ۱۰۰bp، چاهک شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، نمونه‌های مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، شماره ۶ کنترل مثبت، شماره ۷ کنترل منفی

بحث

کارکنان، آلودگی مواد اولیه مصرفی یا آلودگی ثانویه باشد. به عنوان مثال طبق بررسی انجام شده، بسیاری از کارکنان شاغل در صنایع غذایی و رستورانها دارای آلودگی باکتریایی هستند. (۱۱)

در مطالعه رسولی و همکاران در سال ۱۳۹۴، به منظور بررسی وضعیت آلودگی کارکنان، ادوات و مواد غذایی بخش طبخ، ۲۲۰ نمونه جمع آوری گردید. (۵۰ درصد) ۳۹ جدایه / استافیلوکوکوس / اورئوس از نمونه کارکنان، (۴۸/۱ درصد) ۲۶ جدایه از ادوات طبخ و (۲۵ درصد) ۲۱ جدایه از مواد غذایی جدا شد. (۱۲)

استافیلوکوکوس / اورئوس یکی از مهمترین میکروارگانیسمهای پاتوژن در مواد غذایی می باشد که می تواند عامل انتقال عفونت های استافیلوکوکوس و همچنین مسمومیت های غذایی به انسان گردد. (۱۳) نتایج این مطالعه نشان داد که ۷۳/۷ درصد از نمونه های بسته بندی شده گوشت چرخ کرده آلوده به استافیلوکوکوس / اورئوس بودند. بالا بودن آلودگی در نمونه های خام می تواند به دلایل مختلفی از جمله آلودگی اولیه و ثانویه (ناشی از آماده سازی با دست و عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی در حین آماده سازی باشد). (۱۴). در مطالعه ای که توسط Mustafa و همکاران در سال ۲۰۰۹ در یک پادگان نظامی در هند انجام گرفت، آلودگی ۷۷/۷ درصد از مواد گوشتی خام به استافیلوکوکوس / اورئوس تأیید شد که این میزان بسیار به مطالعه حاضر شباهت داشت. (۱۴)

TavaKoli و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز در مطالعه ای که بر روی غذاهای سرو شده در رستوران های مراکز نظامی انجام دادند آلودگی ۵۵/۶ درصد غذای گوشتی به استافیلوکوکوس / اورئوس را گزارش نمودند. (۱۵)

موضوع مشترک در بین تمام این تحقیقات، گستردگی زیاد سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک در دنیا می باشد. بنابراین، تشخیص سریع و به موقع جدایه های مقاوم، به منظور جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد. با توجه به این که

در مطالعه تاجبخش و همکاران، آلودگی میکروبی سالادهای الویه سنتی و صنعتی شهرستان شهرکرد به باکتری استافیلوکوکوس / اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. از ۵۰ نمونه سالاد الویه (۳۰ نمونه صنعتی و ۲۰ نمونه سنتی)، بر اساس آزمایش های انجام شده، آلودگی سالادهای الویه صنعتی و سنتی به ترتیب استافیلوکوکوس / اورئوس ۴۶ درصد و ۳۴/۸ درصد گزارش شد. که این مقادیر در مورد استافیلوکوکوس / اورئوس به طور چشمگیری از فراوانی به دست آمده در مطالعه بالاتر حاضر می باشد. (۱۰)

در مطالعه حاضر تعداد ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی (فرآورده های گوشتی، فلافل، پیتزا، مرغ) به شکل تصادفی از مراکز تهیه و ارائه این غذاها در شهرستان بروجن، شهرکرد و فارس در یک بازه زمانی یک ماهه جمع آوری و جهت بررسی حضور استافیلوکوکوس / اورئوس مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع آلودگی به استافیلوکوکوس در نمونه های فرآورده های گوشتی (۶۴/۱ درصد) ۲۵، فلافل (۲۱/۲ درصد) ۷، پیتزا (۲۰ درصد) ۳، مرغ (۳۰/۸ درصد) ۴ مشاهده شد. میانگین باکتری های استافیلوکوکوس / اورئوس در نمونه های مثبت (۳۹ درصد) گزارش گردید.

Aycicek و همکاران، میزان آلودگی غذاها و سالادهای آماده مصرف به استافیلوکوکوس / اورئوس را در رستوران های مراکز شهر نظامی شهر آنکارا در ترکیه مورد بررسی قرار دادند و ۵۱۲ نمونه شامل انواع سالاد، پیتزا و انواع غذاهای گوشتی را که به صورت سنتی تهیه می شوند، آزمایش کردند. ۴۸ نمونه ۹/۴ درصد به استافیلوکوکوس / اورئوس کوآگولاز مثبت بودند و در سالادها (سالاد روسی و سالاد سبزیجات) و نوعی غذای گوشتی (به نام میت بال) که در تهیه آنها بیش تر از دست استفاده

می شود، آلودگی به استافیلوکوکوس / اورئوس به طور معناداری از سایر نمونه ها بیشتر بود. این موضوع احتمالاً می تواند ناشی از عدم رعایت بهداشت فردی توسط



### تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از تمامی پرسنل کاردان مرکز تحقیقات تغذیه و غذاهای ارگانیک و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد

غذاهای سرد در ایران با دخالت دست تهیه می‌شود و از طرف دیگر به دلیل بالا بودن احتمال آلودگی نیروی انسانی، انتقال باکتری به مصرف کنندگان بسیار محتمل است. بنابراین مصرف این نوع مواد غذایی آماده را باید به حداقل رساند. استفاده مداوم کارکنان از دستکش برای طولانی مدت در شرایط عدم رعایت بهداشت شخصی توسط کارگران؛ ممکن است آثار معکوس داشته باشد. اگر چه استفاده از دستکش تأثیر قابل توجهی بر کاهش انتقال متقابل دارد. دستکش نسبت به بعضی از باکتری‌ها نفوذ پذیر است.

### نتیجه گیری

با توجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی، شیوع بیماری‌های منتقله از غذا یکی از مشکلات تغذیه‌ای جهان است. باکتری‌هایی که در شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی دخالت دارند، کلی فرم‌ها، اشرشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری‌های (CDC) این باکتری‌ها سالانه به بستری شدن ۲۰۰۰ نفر و مرگ ۶۰ آمریکایی منجر می‌شوند. (۱۶) مسمومیت غذایی با *استافیلوکوکوس اورئوس* به علت وجود سویه‌های آنترتوکسیژنیک، در غذا و هضم آن ایجاد می‌شود و خسارت‌های اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را موجب می‌گردد. (۱۷) این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی، اتم از شیر و فرآورده‌های لبنی، گوشت و فرآورده‌های گوشتی و به خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است. (۱۸)

بر اساس نتیجه تحقیق حاضر می‌توان گفت، از آنجا که مراحل تهیه و تولید همبرگر دست ساز، فلافل، سمبوسه، کباب و سالاد ماکارونی در ایران به صورت دستی است، احتمال آلودگی مواد غذایی از طریق نیروی انسانی و انتقال سویه‌های مقاوم به افرای دیگر کاملاً وجود دارد. لذا آموزش بهداشت شخصی و محیط به منظور کاهش میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* در افرادی در تهیه غذا نقش دارن، از اهمیت بالایی برخوردار است.

منابع

- مختلف. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۷، شماره ۷، صفحات ۴۷۶-۴۷۰
۱. اشراقی، سعید؛ پورمند، محمدرضا؛ رحیمی دروشانی، عباس؛ زهرا صالحی، محمدتقی؛ آقامیری، سولماز؛ همکاران (۱۳۸۸). بررسی توزیع فراوانی ژن *tst* با ژن‌های *ent A/C*, *ent A*, *ent C* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از مواد غذایی *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *J Vet Microbiol.* 141: 393-394.
  ۲. Best, N., Fraser, J. D., Rainey, P. B., Roberts, S. A., Thomas, M. G., Ritchie, S. R. (2011). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. *N Z Med J*, 124(1332), 31-39.
  ۳. Chambers HF, DeLeo FR. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(9):629-41.
  ۴. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*Scmec*) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol.* 60(2):95-103.
  ۵. Khakpoor M, Ezzati M, Mahmoodi K, Khalaji Pirbaluti M, Khaksar R. (2013). Prevalence of Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in local Cheese in West Azerbaijan with culture and PCR method. *Iran. J. Nutr. Sci. Food Technol.* 7(5):238-42.
  ۶. Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int J Food Microbiol*, 68(1-2), 105-113.
  ۷. Rahimi F, Karimi S. (2014). Antibiotic resistance pattern and prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from chicken husbandries in tehran. *Iran. J Infect. Dis. Trop. Med.* 18(62):17-22.
  ۸. Razavilar V. (2009). Epidemiology of pathogenic microbes in food and food poisoning. Tehran: Tehran University Press.
  ۹. Rahimi, E., and Ghasemian, H. (2010). Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *J Vet Microbiol.* 141: 393-394.
  ۱۰. Tajbakhsh F, Tajbakhsh E, Momeni M. (2015). Detection Of *Staphylococcus Aureus* And *Salmonella* Typimurium Intraditional And Industrial Olivier Salads In Shahrekord City..
  ۱۱. Aycicek H, Cakiroglu S, Stevenson TH. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food control.* 16(6):531-4.
  ۱۲. Walderhaug M. (2014). *Bad Bug Book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook*: BrainFeed Press.
  ۱۳. Best, N., Fraser, J. D., Rainey, P. B., Roberts, S. A., Thomas, M. G., Ritchie, S. R. (2011). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. *N Z Med J*, 124(1332), 31-39.
  ۱۴. Mustafa, M., Jain, S., Agrawal, V. (2009). Food poisoning outbreak in a military establishment. *Armed Forces Med J India*, 65(3), 240-243.
  ۱۵. Tavakoli, H., Farhang, K., A, K. Z., Heydari, E. (2012). Bacteriological quality of ready to eat food in four military restaurants. *Journal Mil Med*, 13(4), 207-212.
  ۱۶. Masoumalinejad Z, Zinatizadeh MR, Meybodi SM, Zaree F. (2017) Isolation of microbial contamination of wet and dry sweets in Sirjan city. *J. Prev. Med.*; 4(1):60-7
  ۱۷. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. (2011) Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated

from Chinese children. *J. Med. Microbiol.* 60(1):35-45

18. Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Bakhtyari R, TP AM, Mardani N, et

al.(2009). Prevalence of *tst*, *entC*, *entA* and *entA/C* genes in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. *Tehran Univ. Med. Sci.*;67(7)



### Investigation of the contamination of semi-prepared foods and fast foods with respect to *Staphylococcus aureus* bacteria in Chaharmahal and Bakhtiari province.

Manouchehr Momeni Shahraki<sup>1</sup>, Fatemeh Shirazi Baseri<sup>2</sup>, Yas Mohammadi\*<sup>3</sup>, Hossein Khodabandeh Shahraki<sup>1</sup>

1. Nutrition and Organic Products Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2. Bachelor student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

\* Corresponding author Email: Yasimo79810momo@gmail.com

#### Abstract

Fast and cold foods increase the microbiological risk of consumers due to the lack of cooking time and the contact of restaurant workers' hands during preparation. *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of foodborne diseases. The purpose of this study is to determine the abundance of *Staphylococcus aureus* in semi-prepared foods and fast foods and to identify them by PCR method.

In this research, 100 food samples (meat products, falafel, pizza, chicken) were randomly collected from the food preparation and serving centers in Borujen, Shahrekord and Farsan cities in a period of one month to investigate the presence of *Staphylococcus aureus*. Tested. In total, staphylococcus contamination was observed in samples of meat products (64.1%), falafel (21.2%), pizza (20%), chicken (30.8%). The average number of *Staphylococcus aureus* bacteria in positive samples was reported (39%).

Based on the results of the present research, it can be said that since the results of the production steps and preparation of fast food and semi-prepared foods are manual, there is a possibility of food contamination through human labor. Although the percentage of sample contamination is high, the number of bacteria in the sample is low and does not pose a potential risk to the health of the consumer. Therefore, personal and environmental health education is of great importance in order to reduce the amount of *Staphylococcus aureus* in people who are involved in food preparation and production.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, microbial contamination, food, PCR

## بررسی و شناسایی آلودگی ماهی و میگوهای پرورشی به ویبریو در استان خوزستان

رضا سلطانی<sup>۱</sup>، زهرا متقی<sup>۱\*</sup>، حسین خدابنده شهرکی<sup>۲</sup>

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

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

\*نویسنده مسئول: zmotaghi1372@gmail.com

### چکیده

بیماری ویبریوزیس یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین ماهیان پرورشی و انسان در صنعت آبزی پروری است. این باکتری از خانواده ویبریوناسه بوده و شامل باسیل‌های خمیده، متحرک، بی‌هوازی اختیاری شیمیوارگانوتروف، کاتالاز و اکسیداز مثبت است. هدف از تحقیق حاضر بررسی حضور احتمالی باکتری ویبریو در ماهیان قزل‌آلا، کپور و میگو پرورشی است. برای این منظور ۱۲۰ عدد ماهی قزل‌آلا، کپور و میگو از مزارع پرورشی استان خوزستان صید و در مجاورت یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید، سپس از قسمت کبد و محوطه بطنی نمونه‌های ذکر شده به شکل جداگانه نمونه برداری و پس از هموژنیزاسیون در محیط Trypticase Soy Broth (TSB) ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از آن بر روی محیط تیوسولفات سیترات بایل ساکارز آگار (TCBS) کشت داده شدند، محیط‌ها به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس بر اساس وجود یا عدم وجود پرگنه‌های رشد کرده، ۳۰/۸۴ درصد از گوشت نمونه‌های مطالعه شده (۳۷ قطعه) آلوده به ویبریو بودند که بسیار شایان توجه بود. با توجه به بررسی‌های عمل‌آمده قبلی و نتایج حاصل از این مطالعه، نظارت و کنترل زنجیره تولید و تشخیص به موقع این ارگانیسم در طول این زنجیره می‌تواند در کاهش آلودگی فراورده‌های دریایی از جمله ماهی‌ها نقش به‌سزایی داشته باشد. این امر در نهایت باعث به حداقل رسیدن ابتلا به این بیماری در افراد جامعه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور، میگو، ویبریو، بیماری مشترک

### مقدمه

طور فراوانی از محدوده وسیعی از مواد غذایی دریایی خام جدا شده‌اند. مصرف غذاهای دریایی خام و نیم‌پز آلوده به برخی از گونه‌های ویبریو منجر به گاستروانتریت حاد و علائم بالینی خواهد شد. گونه‌های ویبریو، ارگانیسم‌هایی مقاوم به نمک بوده که به صورت طبیعی در آب‌های شور در مناطق گرمسیری و معتدل یافت می‌شوند، اما برخی گونه‌ها ممکن است در آب شیرین هم دیده شوند. جنس‌های ویبریو باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند و با تازه‌قطبی دارای حرکت می‌باشند. این باکتری‌ها یک بیماری زئونوز بوده و به عنوان عامل بیماری زای دستگاه گوارش انسان به خوبی

توسعه آبزی پروری نقش عمده‌ای را در تأمین غذای بشر و اقتصاد کشورهای جهان به عهده دارد. در مزارع پرورش ماهی‌ها به واسطه‌ی تراکم، بروز و شیوع بیماری‌ها با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. از آنجا که محیط آبی مورد استفاده سایر موجودات آبزی، جانوران اهلی، وحشی و حتی انسان قرار می‌گیرد، لذا شناخت شیوع و گسترش بیماری‌ها در محیط آبی از اهمیت برخوردار است. (۱-۳)

ویبریوها پاتوژن‌های انسانی هستند که به طور وسیعی در محیط‌های دریایی منتشر هستند. این ارگانیسم‌ها به



شناخته شده‌اند. این ارگانیس‌ها در ماهی‌ها، حلزون‌ها، برخی سخت پوستان، پلانکتون‌ها و همچنین رسوبات نیز یافت می‌شوند. از سال ۱۹۸۰، جنس ویبریو مورد بازبینی دقیق قرار گرفته است و در حال حاضر در این جنس ۴۴ گونه وجود دارد که تعدادی از آنها برای ماهی‌ها، میگوها، صدف‌های پرورشی و سایر آبزیان بیماری‌زا می‌باشد. (۱۰-۴)

نظر به اینکه ویبریوها بومی محیط‌های آبی و دریا هستند در آبزیان حضور داشته و به عنوان عامل آلودگی آبزیان خام یا نیم پز بیان شده‌اند. (۱۱)

در بین اعضای جنس ویبریو ۱۲ گونه بیماری‌زای انسان هستند که هشت مورد از آنها ممکن است عامل گاستروانتریت باشند (۱۲) وجود گونه‌های ویبریو در نواحی ساحلی و خور معمول است و تعداد آن بستگی به عمق آب و حدود جذر و مد دارد. ویبریوها خصوصاً در آب‌های گرم نواحی گرمسیری فراوان بوده و در فصل تابستان نیز در نواحی معتدل یافت می‌شوند. گونه‌های ویبریو همچنین آلوده کننده طبیعی آب‌های شور نواحی گرمسیری بوده و می‌توانند در ماهی‌های پرورشی در این گونه مناطق حضور داشته باشند. (۱۳) برای کنترل آلودگی ویبریو لازم است که آبزیان از آب‌های سالم صید شوند. خطرات حاصله از گونه‌های ویبریو در آبزیان را می‌توان با پختن (حرارت بالاتر از ۶۵ درجه سلسیوس) و جلوگیری از آلودگی ثانویه محصولات پخته مانع شد به طور کلی موارد شیوع ویبریوز مربوط به مصرف محصول نیم پز، یا محصولی است که بعد از فرآیند حرارتی آلوده شده باشد. (۱۴)

ماهی منبع تعداد زیادی از میکروارگانیس‌ها بوده و (Endogenous) بعضی از میکروارگانیس‌ها بومی در ماهی وجود دارند و بقیه در مراحل مختلف از زمان صید تا رسیدن بدست مصرف کننده، ماهی را آلوده می‌کنند. غالب این میکروارگانیس‌ها غیر بیماری‌زا هستند و فقط ماهی را فاسد می‌کنند، در حالی که بعضی بیماری‌زا بوده و باعث مسمومیت غذایی می‌شوند. باکتری‌های

بیماری‌زای بومی شامل گونه‌های ویبریو و آئروموناس و باکتری‌های غیر بومی شامل گونه‌های لیستریا، استافیلوکوکوس، سالمونلا، اش‌ریشیا، شیگلا و مانند آن می‌باشد. (۱۵،۱۶)

### مواد و روش کار

#### جمع آوری نمونه‌ها و جداسازی ویبریو

برای انجام بررسی حاضر در کل ۱۲۰ نمونه فراورده‌های پرورشی از مزارع استان خوزستان شامل ۴۰ نمونه ماهی قزل آلا، رنگین کمان، ۴۰ نمونه ماهی کپور و ۴۰ نمونه میگو، با رعایت شرایط کامل بهداشتی در پاییز ۱۴۰۲ صید شد. نمونه‌ها پس از جمع آوری در عرض ۱۶-۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مرکز تحقیقات مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، انتقال داده شدند.

تمام نمونه‌ها بلافاصله پس از ارسال به آزمایشگاه و آماده سازی، مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند. به این منظور در شرایط آسپتیک با کمک اسکالپل سترون، ۲۵ گرم از قسمت کبد و محوطه بطنی نمونه‌های ماهی قزل آلا، کپور و میگو به شکل جداگانه جداسازی و پس از هموژنیزاسیون در محیط Trypticase Soy Broth (TSB) حاوی ۰.۳٪ نمک (pH=۸/۳) (مرک، آلمان)، برای ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. در ادامه یک لوپ از محلول گرم خانه گذاری شده به شکل سطحی روی محیط تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار (مرک، آلمان) کشت و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از طی شدن دوره گرم خانه گذاری، پرگنه‌های رشد یافته در محیط TCBSA از نظر پرگنه‌های ویبریو مورد بررسی قرار گرفتند. پرگنه‌های ویبریو در سطح این محیط به رنگ زرد خاکستری با تالو آبی رنگ، نمایان می‌شوند. ویبریوپاراهمولیتیکوس به صورت پرگنه‌های سبز یا آبی با ضخامت ۳-۲ میلی‌متر ظاهر می‌شود. سپس کل پرگنه‌های رشد یافته توسط تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور ۳-۱ کلنی رشد

انجام آزمون PCR، در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شدند. در این بررسی هر یک از نمونه‌های DNA استخراج شده از نظر حضور گونه‌های ویبریو *آلجینولیتیکوس* و ویبریو *پاراهمولیتیکوس* با استفاده از تست PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. جفت پرایمر 5'-AAGACCTCAACTGGCGGTA-3' و 5'-GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT-3' (۲۴۸) جفت باز (اختصاصی ژن *flaE* ویبریو *پاراهمولیتیکوس*) و جفت پرایمر 5'-GAGAACCCGACAGAAGCGAAG-3' و 5'-CCTAGTGCGGTGATCAGTGTG-3' (۳۳۷) جفت باز (اختصاصی ژن *gytB* ویبریو *آلجینولیتیکوس*) در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور انجام تمام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزاسیون از دستگاه مسترسایکلر گرادپانت ساخت شرکت اپندورف آلمان در قالب برنامه‌های PCR استفاده شد. (۱۸، ۱۹)

یافته بر محیط اختصاصی جهت خالص سازی روی محیط آگار مغذی به آب گوشت قلب و مغز منتقل شد و برای ۴-۶ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد تا کدورتی بیشتر یا برابر OD = ۰/۵ در ۶۲۰ نانومتر به دست آید. سپس نمونه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی از جمله تست سیترات، مقاومت به نمک، اوره آزه، تست VP، تخمیر قندهای سلوبیوز، سالیسین، گلوکز، ساکارز، آرابینوز، مانیتول، اورنیتین، آرژینین و تست ONPG، مورد بررسی قرار گرفتند. (۱۷)

**استخراج DNA و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR)**

DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، از پرگنه‌های تپیک رشد کرده که به مدت یک شب در محیط کشت آب پیتونه قلیایی (مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شده بودند، استخراج شد. تمامی نمونه‌های DNA تا زمان

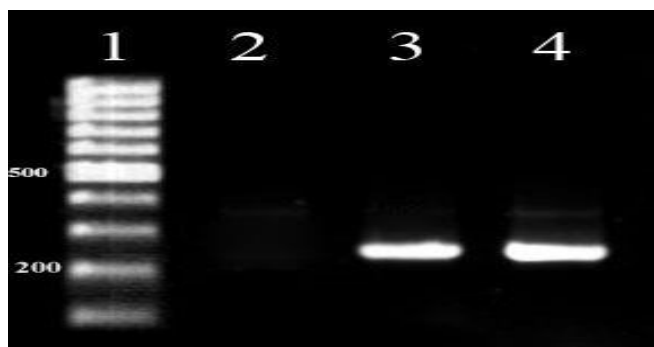
جدول ۱: حجم و فرایندهای دمایی مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزاسیون

ژن هدف	مقادیر PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
ویبریو <i>پاراهمولیتیکوس</i>	1 cycle: 15 min. ----- 0C95	5 μL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 μM dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
	35 cycle: 40 s ----- 0C94	
	60 s ----- 0C57	
	90 s ----- 0C72	
	1 cycle: 8 min ----- 0C72	
ویبریو <i>آلجینولیتیکوس</i>	1 cycle: 15 min. ----- 0C95	5 μL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 μM dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
	35 cycle: 60 s ----- 0C94	
	60 s ----- 0C62	
	60 s ----- 0C72	
	1 cycle: 8 min ----- 0C72	

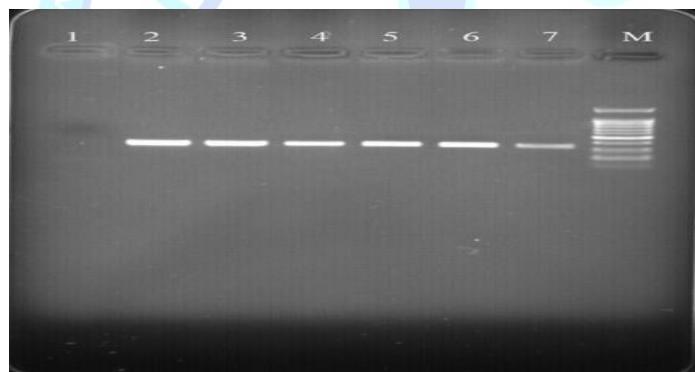
الکتروفورز محصولات PCR

و به داخل چاهک ژل منتقل گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت و در نهایت محصول الکتروفورز توسط دستگاه قرائت کننده ژل مورد بررسی قرار گرفت. (تصویر شماره ۱ و ۲)

در نهایت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شدند. برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۲ میکرولیتر رنگ نشانگر Loading buffer مخلوط



تصویر شماره ۱: چاهک شماره ۱ مربوط به مارکر ۱۰۰ bp، چاهک شماره ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت ویبریو پاراهمولیتیکوس



تصویر شماره ۲: چاهک M مربوط به مارکر ۱۰۰ bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک‌های ۲ تا ۷ نمونه‌های مثبت ویبریو آلجینولیتیکوس

جدول ۲: نتایج درصد آلودگی نمونه‌ها به گونه‌های ویبریو

تعداد کل نمونه	نمونه‌های منفی	ویبریو پاراهمولیتیکوس	ویبریو آلجینولیتیکوس
۴۰	۳۴ (/۸۵)	-	۶ (/۱۵)
۴۰	۲۵ (/۶۲/۵)	-	۱۵ (/۳۷/۵)
۴۰	۲۴ (/۶۰)	۲ (/۵)	۱۴ (/۳۵)
۱۲۰	۸۳ (/۶۹/۱۶)	۲ (/۱/۶۷)	۳۵ (/۲۹/۱۷)

نمونه  
ماهی قزل آلی  
رنگین کمان  
ماهی کپور  
میگو  
جمع

بحث

درصد و ۱۷/۱۴ درصد بوده است که بسیار قابل توجه است.

Mahmud و همکاران (۲۲) ۶۰۰۰ سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس را از آب دریا و جلبک‌های دریایی جدا کردند که ۱۸ نمونه از آن‌ها حامل ژن سمی یا توکسیژنیک بودند. Ottaviani و همکاران (۲۳) مطالعه‌ای را بر روی غذاهای دریایی صید شده از دریای آدریاتیک، انجام دادند. نتایج بررسی آن‌ها نشان می‌دهد که از ۱۴۴ گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس، ۳۵ سویه (۲۴/۳۰ درصد) پاراهمولیتیکوس پروتاز مثبت بودند. آن‌ها وجود ژن‌های *tdh* و *trh* را در این نمونه‌ها ثابت کردند و نشان دادند که این ژن‌ها باعث همولیز شدن گلبول قرمز شده و سیستم ایمنی را تضعیف می‌کند. بر طبق این گزارش ویبریو پاراهمولیتیکوس به دلیل داشتن ژن‌های حدت، دارای قدرت بیماری‌زایی بیشتری در اثر خوردن فرآورده‌های خام و نپخته آلوده، می‌باشد (۲۳). بنابراین حضور این ژن‌های حدت در باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس نقش به‌سزایی در بیماری‌زایی باکتری دارد.

مقایسه نتایج بررسی‌های مختلف نشان دهنده اختلاف فاحشی در فراوانی آلودگی به گونه‌های مختلف ویبریو در فرآورده‌های دریایی است که این مسأله را می‌توان به نوع نمونه‌ها، فصل نمونه‌گیری، شرایط اکولوژیک، آلودگی محیطی، تفاوت گونه‌ای و هم‌چنین تفاوت چشمگیر در کیفیت شرایط بهداشتی از زمان صید تا عرضه نسبت داد.

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده قبلی و نتایج حاصل از این مطالعه که شیوع این عامل بیماری‌زا را در بین ماهیان و مواد غذایی دریایی در حدود ۵ الی ۱۰ درصد نشان می‌دهد، نظارت و کنترل زنجیره تولید و تشخیص به موقع این ارگانسیم در طول این زنجیره می‌تواند در کاهش آلودگی فرآورده‌های دریایی از جمله ماهی‌ها نقش به‌سزایی داشته باشد. این امر در نهایت باعث به حداقل

نتایج به دست آمده از این تحقیق بیان گر این بود که ۳۰/۸۴ درصد از گوشت نمونه‌های مطالعه شده (۳۷ قطعه) آلوده به گونه‌های ویبریو بودند که بسیار شایان توجه بود. برخی گونه‌های ویبریو برای انسان بیماری‌زا هستند و ممکن است برای ماهی نیز بیماری‌زا باشند. به طور کلی دز عفونی در بیماری‌های روده‌ای و خطر محتمل از خوردن ماهی نیز بالا است. بیماری ویبریوزیس وابسته به مصرف ماهی‌های خام و یا فرآورده‌های ماهی است و در برخی مزارع پرورش ماهی گزارش شده است. (۲،۶)

میزان شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس در نمونه‌های ماهی صید شده از پرتقال و یونان به ترتیب ۳۵٪ و ۱۴٪ گزارش شد. اما هیچ گونه نمونه مثبتی از نظر حضور ویبریو پاراهمولیتیکوس در نمونه‌های ماهی صید شده از انگلیس و فرانسه یافت نشد. نتایج بررسی‌های ذکر شده در انگلیس، پرتقال، فرانسه و یونان نشان می‌دهد که هر گونه ویبریو در یک منطقه خاص فراوانی بیشتری دارد. میزان شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس در مطالعات انجام پذیرفته در ایران شامل بررسی‌های Shirazi و همکاران (تهران) (۲۰) و Jalali jafari و همکاران (اصفهان) (۲۱) به ترتیب ۱۰-۵ درصد و ۳/۹ درصد گزارش شده است که از نتایج بررسی حاضر به مراتب کمتر است. بررسی انجام پذیرفته در کشور ایتالیا (۲۳) میزان شیوع بسیار بالاتری را برای گونه‌های ویبریو و خصوصاً ویبریو پاراهمولیتیکوس، گزارش کرده است. (۳۲/۶ درصد). احتمالاً شیوع فصلی این باکتری و نوع نمونه‌های مورد بررسی دلیل اصلی این اختلاف در میزان شیوع در ایران و ایتالیا بوده‌اند.

بررسی دیگری در تایلند (۲۴) نشان داد که میزان شیوع گونه‌های ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس در غذاهای دریایی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۰ درصد بوده است که به مراتب از نتایج بررسی ما بیشتر است. مطالعه پیشین در حیدرآباد (۲۵) نشان داد که از کل ۳۵ نمونه ماهی، ۳۵ نمونه خرچنگ و ۳۵ نمونه میگو جمع‌آوری شده، میزان شیوع ویبریو کلرا ۴۵/۷۱ درصد، ۵۷/۱۴

برای تعیین گونه‌ها احتیاج به آزمایش‌های تکمیلی می‌باشد. که این باکتری و روش‌های کنترلی و مبارزه با آن‌ها باید مورد توجه قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

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

#### تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

رسیدن ابتلا به این بیماری در افراد جامعه می‌شود. ( ۱۰-۴)

#### نتیجه گیری

ویبریو خاص آب‌های شور است ، حال با توجه به جداسازی آن از ماهی قزل آلا احتمال این وجود دارد که از غذای آلوده به ماهی سرایت کرده ولی چون در محیط آب شیرین چندان دوامی ندارد مشکل خاصی نیز ایجاد نمی‌کند ، زیرا در منابع نیز تاکید شده که این باکتری را می‌توان از آزاد ماهیان پرورش داده شده در قفس‌های دریایی جدا کرد . بنابراین لزوم توجه نتایج این تحقیق نشان داد که از تعداد ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۳۷ عدد نمونه ( ۳۰/۸۴ درصد ) آلوده به ویبریو بودند که



۳. سلطانی، م. کاکولکی، ش. آوخ کیسمی، م. (۱۳۷۹). جداسازی و شناسایی گونه‌های غالب ویبریو در میگوهای پرورشی تعدادی از کارگاههای پرورش میگوی بوشهر مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۵۵ (۲): ۳۲-۲۹
۴. اخلاقی، م، حقیقی ز منصوری، ه. (۱۳۹۱). مطالعه ایمنوسیتوشیمی، کبد، طحال و روده ماهی قزل آلی رنگین کمان ایمن شده با آنتی ژن ویبریو آنکوئیلاروم مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۷ (۲): ۱۹۷-۱۹۱
5. Ansari M, Raissy M (2010). In vitro susceptibility of commonly used antibiotics against isolated from Lobster (*Panulirus homarus*). Af. J. Microb. Res., pp. 629-631. Vibrio
6. Austin B; Austin DA. (2007) Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish, 4rd ed. Springer, Praxis Publishing, UK.
7. Chrisolite B, Thiyagarajan S, Alavandi SV, Abhilash EC, Kalaimani N, Vijayan KK, Santiago TC (2008). Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. Aquaculture, 275: 13-19.
8. Di Pinto A, Ciccarese G, Tantillo G, Catalano D, Fortel VT (2005). A Collagenase- Targeted Multiplex PCR Assay for Identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholera* and *Vibrio parahaemolyticus*. J. Food. Prot., 68: 150-153.
9. Garrity GM; Holt JG.(2001) The road map to the manual. In; Brgey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed, Vol. 1 (edsD. R Boone and R. W Castenbolz). Springer, New York.
10. Hosseini H, Cheraghali MA, Yalfani R, Razavilar V (2004). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. Food Control., 15: 187-190.
11. Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I. (2005). Occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environment, implication for food safety. International Journal of Food Microbiology, 102: 151-159.
12. Oliver, J.D. and Japer, J.B. (1997). *Vibrio* species. In: Doyle MP, Beuchat L.R and Montville T.J. (Eds.), Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers. Washington DC: ASM Press, pp. 228-264.
13. Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E. and Citterio, B. (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed sea food products. International Journal of Food Microbiology, 54: 9-18.
14. Codex Alimentarius (2009). Code of practice for fish and fishery products, First edition, FAO and WHO, Rome.
15. Kvenberg, E.J. (1991). Non-indigenous Bacterial Pathogens, In: Microbiology of Marine Food Products. (Eds.), Donn RW, Cameron H Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 263-291.
16. Rodricks, E.G. (1991). Indigenous Pathogen: *Vibrionaceae* In: Microbiology of Marine Food Products. (eds) Donn, R. W. and Cameron, H. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 285-295.
17. Tarr CL, Patel JS, Puhr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA. (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. J Clin Microbiol.; 45(1):134-40.

18. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. (1999). Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tlh, tdh and trh. J Microbiol Method. 1999;36(3):215–225.
19. Zhou, S., Hou, Z., Li, N and Qin, Q. (2007) Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood, J Appl Microbiol. 103:1897-1906. PMID: 17953599.
20. Shirazi MH, Ranjbar R, Salari MH, Bagheri Tirtash Y, Najafi A, Sadeghifard, N. (2007) Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from fish in Tehran and their antimicrobial resistance. Iranian J Infect Diss Trop Med.;11(35):65-68.
21. Jalali jafari B, Barzegar dolatabadi M. (2009). Shrimp health management. 2nd ed. Tehran: Noorbakhsh Publications.
22. Mahmud Z, Kassu A, Mohammad A, Yamato M, Bhuiyan NA, Balakrish Nair G, et al..(2006). Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the kii Channel, Japon. Microbiol Res 161(1):25-37.
23. Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C, Bacchiocchi I. (2005). Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. Food Microbiol. 22(6):585-590.
24. Senachai P, Chomvarin C, Namwat W, Wongboot W, Wongwajana S, Tangkanakul W. (2013). Application of tetraplex PCR for detection of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. mimicus* in cockle. Southeast Asian J Trop Med Publ Health. 44(2):249-58.
25. Maheshwari M, Krishnaiah N, Ramana V. (2011). Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the detection of *Vibrio cholerae* in Contaminants. Ann Biol Res 2(4):212-217.

## Investigating and identifying *Vibrio* contamination of farmed fish and shrimps in Khuzestan province

Reza Soltani<sup>1</sup>, Zahra Mottaghi<sup>1\*</sup>, Hossein Khodabandeh Shahraki<sup>2</sup>

1. Ph.D. student of food hygiene, faculty of veterinary medicine, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran
2. Nutrition and Organic Products Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

\* Corresponding author Email: zmotaghi1372@gmail.com

### Abstract

Vibriosis is one of the important common diseases between farmed fish and humans in the aquaculture industry. This bacterium belongs to the Vibrionaceae family and includes curved, motile, facultatively anaerobic chemoorganotroph, catalase and oxidase positive bacilli. The purpose of this research is to investigate the possible presence of *Vibrio* bacteria in farmed salmon, carp and shrimp. For this purpose, 60 pieces of salmon, carp and shrimp were caught from the breeding farms of Khuzestan province and transported to the laboratory of the food research center of Azad University, Shahrekord branch, next to the ice. Then, the liver and ventricular area were cultured on thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS), the environments were kept in a greenhouse for 48 to 72 hours at 25°C, and then based on the presence or absence of grown colonies, 30/84% of the meat of the studied samples (37 pieces) were infected with vibrio, which was very noteworthy. According to the previous investigations and the results of this study, the monitoring and control of the production chain and the timely diagnosis of this organism during this chain can play a significant role in reducing the contamination of marine products, including fish. This will ultimately reduce the incidence of this disease in the community.

**Key words:** rainbow trout, carp, shrimp, vibrio, joint disease

### Contents

**Contents****Determine the antibiotic resistance patterns and tsst-1 gene frequency in *staphylococcus aureus* strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz**

Ziba Shanaki Bavarsad\*, Maryam Reisi, Marzeyeh Soleymanian

**A review of probiotics in health and disease trends The effect of probiotics on gastrointestinal disease**

Sohaila Fadaei\*

**Antibiotic resistance pattern and prevalence of class 1, 2 and 3 integron genes in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Shahrekord**

Marzeyeh Soleymanian, Sanaz Khaksar Haghani, Nazila Arbab Soleymani

**Chaperones, vital molecules in microbes**

Kimia Golestanfar

**Investigation of the contamination of semi-prepared foods and fast foods with respect to *Staphylococcus aureus* bacteria in Chaharmahal and Bakhtiari province.**

Manouchehr Momeni Shahraki, Fatemeh Shirazi Baseri, Yas Mohammadi\*, Hossein Khodabandeh Shahraki

**Investigating and identifying *Vibrio* contamination of farmed fish and shrimps in Khuzestan province**

Reza Soltani, Zahra Mottaghi\*, Hossein Khodabandeh Shahraki