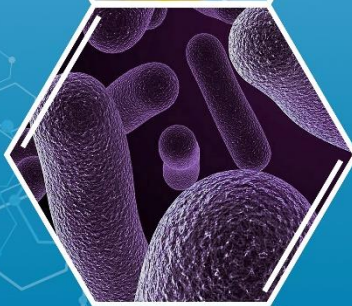
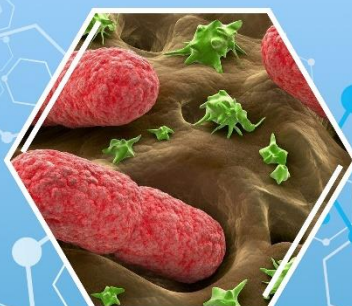




مجله علمی رہیافت‌های نوین در علوم سلولی و مولکولی

New approaches in Cellular and Molecular Sciences



فهرست

- فراوانی جمعیت بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در روده مبتلایان به چاقی مفرط قبل و بعد از جراحی معده
 ۳..... کیمیا گلستان فر، لعیا تکبیری اسگویی، الهام سیاسی تربتی.....
- بررسی خصوصیات مولکولی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده بیوفیلم جدا شده از گوشت و فراورده‌های گوشتی
 مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های انتروتوکسین در استافیلوکوکوس آرنئوس
 ۱۸..... کبری عباسی، منوچهر مؤمنی شهرکی.....
- شناسایی باکتری‌های ایجاد کننده عفونت ادراری در بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد
 ۴۲..... محمد رجبی، پیام رازقی.....
- تشخیص مولکولی باکتری‌های ایجاد کننده اسهال در کودکان مبتلا به اسهال در شهرستان شهرکرد
 ۵۶..... زینب مرضات، محمد رجبی، پیام رازقی تهرانی.....
- بررسی آلودگی گونه‌های ویبریو در ماهیان عرضه شده در بازار شهرستان شهرکرد
 ۶۳..... مهران خلیلی دهکردی، فرشته صالحیان دهکردی، مجید اسماعیلی.....
- آنالیز مولکولی ویروس هپاتیت دلتا
 ۷۲..... الهه تاج بخش، فاطمه خداوردی پور، نغمه میرابوالقاسمی.....

فراوانی جمعیت بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در روده مبتلایان به چاقی مفرط قبل و بعد از جراحی معده

کیمیا گلستان فر^۱، لعلیا تکبیری اسگویی^{۲*}، الهام سیاسی تربتی^۲

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

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: l_takbiri@iau-tnb.ac.ir

چکیده

چاقی یک بیماری مزمن چند عاملی مرتبط با ژنتیک می باشد. مطالعات نشان داده اند در افراد چاق، کمیت و به احتمال بالا، کیفیت جمعیت باکتری های میکروبیوتای روده با افراد سالم متفاوت است. جهت بررسی بیشتر، در مطالعه حاضر جمعیت دو گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم قبل و بعد از عمل جراحی باریاتریک، به یکی از دو روش بای پس یا اسلیو مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۳۰ فرد مبتلا به چاقی مفرط با شاخص توده بدنی ۳۰ و بالاتر که کاندید جراحی باریاتریک با یکی از دو روش بای پس یا اسلیو بودند، همراه با ۱۸ فرد سالم بعنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مدفوع پس از جمع آوری، با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفتند. پس از اطمینان از غلظت و خلوص DNA استخراج شده، با استفاده از روش Real-time PCR جمعیت دو باکتری فوق در نمونه های بیماران (قبل و بعد از جراحی) و نمونه های سالم در گروه کنترل تعیین گردید. در مطالعه حاضر میانگین جمعیت دو باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی، قبل و بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (بای پس و اسلیو) به میزان قابل توجهی بیشتر بود ($P < 0.05$). در صورتی که میانگین این باکتری در افراد مورد بررسی بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود ($P < 0.05$). همچنین میزان باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم قبل و بعد از عمل جراحی در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود ($P < 0.05$). بطور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش بای پس و اسلیو، میانگین باکتری های بیفیدو باکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه تحت عمل بای پس محسوس تر بود ($P < 0.05$).

با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد کاهش وزن بواسطه جراحی می تواند در تغییر میزان باکتری های موجود در میکروبیوتای روده تاثیر بسزایی داشته باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بیماری چاقی با فراوانی باکتری های فلور میکروبی روده مرتبط می باشد.

واژه های کلیدی: چاقی مفرط، جراحی معده، بیفیدو باکتریوم لانگوم، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم.

مقدمه

چاقی وضعیت پزشکی است که طی آن بافت چربی بیش از حد طبیعی در بدن فرد انباشته می‌شود. این امر می‌تواند باعث پسرقت شاخص‌های سلامتی، از جمله کاهش میانگین طول عمر و یا کاهش کیفیت زندگی گردد. شایع‌ترین روش برای تخمین چاقی استفاده از شاخص توده بدن^۱ (BMI) است. شاخصی که با تقسیم کردن وزن شخص بر حسب کیلوگرم بر توان دوم قد وی بر حسب متر به دست می‌آید. طبق تعریف هنگامی که شاخص توده بدن بالاتر از ۳۰، آن فرد چاق محسوب می‌شود^(۱). مرض چاقی بیشتر به وسیله ترکیب بیش از اندازه انرژی غذایی ورودی، تحرکات بدنی کم و استعداد ژنتیکی، ایجاد می‌شود. هرچند اندک مواردی در ابتدا به وسیله ژن، اختلالات غده درون‌ریز، داروها یا امراض روانی ایجاد می‌شود^(۲).

جراحی باریاتریک یک گزینه درمانی برای افراد مبتلا به چاقی مفرط است که موفق به کاهش وزن توسط سایر روش‌ها نظیر رژیم‌های کاهش وزن، افزایش فعالیت بدنی و درمان‌های دارویی نشده‌اند. جراحی‌های کاهش وزن را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم کرد، جراحی محدودکننده حجم معده که با ایجاد تغییرات در معده سبب کاهش حجم معده می‌گردند. در این روش، فرد در هر بار غذا خوردن احساس سیری زودتری نسبت به قبل دارد و حجم معده سریع‌تر پر می‌شود. روش کوچک کردن معده با حلقه تنظیم شونده به روش لاپاروسکوپی روش گاستروکتومی اسلیو، تا کردن معده، بالون معده از جمله این روش‌ها هستند. دسته دوم جراحی کاهش‌دهنده جذب غذا که در این روش، تغییراتی در روده کوچک صورت گرفته که باعث می‌گردد بدن فرد، کالری و مواد مغذی کمتری از مواد غذایی و نوشیدنی‌ها جذب کند. این گروه شامل روش جراحی تغییر مسیر صفرا و پانکراس که این تغییر مسیر با جابجایی اثنی عشر می‌باشد. دسته سوم اعمال جراحی ترکیبی که از دو حالت قبل باهم استفاده می‌شود و روش

بای پس معده در این گروه قرار می‌گیرد. در ایران روش حلقه گذاری قابل تنظیم معده، روش گاستروکتومی اسلیو و روش بای پس معده بیشتر از سایر روش‌ها رایج می‌باشد^(۳). در روش جراحی اسلیو یا اسلیو معده به دلیل برداشتن قسمتی از معده که مواد اشتهازا تولید می‌کند، بیمار بعد از جراحی چاقی به مدت چندین ماه بی اشتها می‌شود و لاغری و کاهش وزن بیشتری را تجربه می‌کند، ولی پس از این که اشتها بهتر شده چون کاهش چشم گیری در حجم معده صورت گرفته است، بیمار با مصرف مقدار کم غذا احساس سیری می‌کند و در نتیجه کالری مصرفی کاهش یافته و کاهش وزن و کاهش سایز بروز می‌کند و تا ۲ سال بعد از جراحی چاقی ادامه می‌یابد. در این روش بیمار پس از ۶ ماه در حدود نصف اضافه وزن خود را از دست داده و ظرف ۲ سال به وزن نرمال و ایده آل خود خواهد رسید^(۴).

باکتری‌های روده جز مهمی از اکوسیستم میکروبی در دستگاه گوارش انسان هستند و نقش مهمی در سلامت انسان مانند تامین مواد مغذی ضروری، سنتز ویتامین K، کمک به هضم سلولز و عملکرد عصب روده بازی می‌کنند بزرگترین میکروبیوم بدن انسان، میکروبیوم دستگاه گوارش تحتانی و بطور خاص روده بزرگ می‌باشد که محل اصلی باکتری‌ها در بدن است بطوری که ۲۰٪ مدفوع انسان حاوی باکتری‌ها می‌باشد. براساس تعریف FAO/WHO پروبیوتیک‌ها^۵ به عنوان میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که وقتی به میزان مناسب تجویز شوند به نفع سلامت میزبان خواهند بود^(۵). فلور میکروبی روده همه انسان‌ها، یک سری وظایف اصلی و اساسی را به انجام می‌رساند اما در عملکردهای تخصصی متفاوت هستند. چنان که برخی از جوامع نسبت به برخی دیگر در بیماری‌های انسان، مانند دیابت و چاقی بیشتر دیده می‌شوند^(۶). تعیین کامل ترکیب میکروبیوم انسان و ارتباط آن با سلامتی و بیماری میزبان یکی از چالش‌های اصلی در قرن ۲۱ می‌باشد. بررسی‌ها

³ Food and Agriculture Organization

¹ Body mass index

² World Health Organization

⁴ Probiotic

نشان می‌دهند که میکروبیوتا یک عامل محیطی در کنترل وزن بدن و تعادل انرژی می‌باشد. بسیاری از میکروب‌های روده دارای روابط همزیستی با میزبان خود هستند و با مشارکت هم در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از جمله فعالیت‌های شبکه سیستم ایمنی میزبان عمل می‌کنند. در فلور باکتریایی روده انسان بیش از ۹۰ درصد از گونه‌ها، متعلق به شاخه فرمیکوتس و باکترئیدتس، و سپس شاخه اکتینوباکتریا و پروتئوباکتریامی باشد. ترکیب کلی میکروبیوم روده از فردی به فرد دیگر متغیر است، اما مجموعه‌ای از گونه‌ها در افراد مختلف حفظ شده است و در بین جمعیت مشترک می‌باشد و ممکن است برای عملکرد حیاتی خاصی از دستگاه گوارش ضروری باشند (۷). بیفیدوباکتریوم یک جنس از باکتری‌های غیر پاتوژن، بی‌هوازی اجباری، گرم مثبت، غیر متحرک، کاتالاز مثبت و فاقد اسپور و کپسول است که از لحاظ مورفولوژی دارای اشکال گوناگون به صورت باسیل‌های شاخه‌شاخه ظاهر می‌شوند. گونه‌های متعلق به جنس بیفیدوباکتریوم تولیدکننده اسیدلاکتیک هستند که بخش بزرگی از میکروفلور روده انسان و دیگر جانوران را تشکیل می‌دهند. گونه‌های بیفیدوباکتریوم، پروبیوتیک غالب در میکروبیوتای روده هستند و خواص درمانی آنها شامل حفظ تعادل بین باکتری روده و میزبان و نگهداشتن متابولیسم میزبان در حد نرمال می‌باشد (۸).

اثر پروبیوتیک روی میکروب‌های روده بستگی به سویه میکروب دارد و می‌تواند باعث کاهش وزن شود. کاهش وزن نیز همراه با تغییر در میکروب‌های روده است. که می‌توانند متابولیسم بدن را تغییر دهند. این تحقیق به مرور اثرات میکروب‌های روده روی تنظیم وزن و توانایی بالقوه آنها برای کاهش وزن پرداخته است. و بیان کرده است که امروزه، میکروب‌های روده به عنوان یک عضو میکروبی در انسان شناخته می‌شوند. بنابراین با بهبود استراتژی‌های دستکاری میکروب‌های روده می‌توان باعث کنترل بیماری‌های متابولیک شد (۱۱). پروفایل‌های میکروبی روده انسان منعکس کننده همکاری متابولیکی میان

فیلوتیپ‌های مختلف باکتریایی می‌باشد. هیچ جنسی نمی‌تواند تمامی سوبستراها را تجزیه کند؛ برای مثال تمام اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (SCFAs) توسط یک جنس باکتری تولید نمی‌شود. SCFAs نقش مهمی در تنظیم متابولیسم انرژی، ایمنی و گسترش بافت چربی دارند. فلور میکروبی روده همه انسان‌ها یک سری وظایف اصلی و اساسی را به انجام می‌رساند اما در عملکردهای تخصصی متفاوت هستند. چنان که برخی از جوامع نسبت به برخی دیگر با بیماری‌های انسان، دیابت و چاقی بیشتر دیده می‌شود (۹).

در مطالعه‌ای این نتایج حاکی از آن است که، پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لانگوم، متابولیسم روده را از طریق تغییر در جامعه میکروبی روده تغییر می‌دهد. در این مطالعه افزایش معنا دار سطح پیمالات مدفوع را به عنوان یک ماده پیش ساز بیوتین و بوتیرات و همچنین افزایش قابل توجه سطح بیوتین را در مدفوع تحت تاثیر مکمل بیفیدوباکتریوم لانگوم مشاهده کردند. و این یافته‌ها اثر بیفیدوباکتریوم لانگوم را روی متابولیسم روده از طریق تعامل با جامعه میکروبی به وضوح نشان داد (۱۰). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که نسبت باکتریوئیدس در افراد چاق در مقایسه با افراد لاغر کاهش یافته است و نسبت آنها با کاهش وزن در رژیم غذایی کم کالری، افزایش می‌یابد. یافته‌های آنها نشان داد که چاقی یک جزء میکروبی دارد، که ممکن است کاربردهای درمانی بالقوه داشته باشد (۱۲). شواهد حاکی از آن است که میکروبیوتای روده انسان در اولین سال زندگی او بنا نهاده می‌شود. نشان داده شده است که در افراد چاق تعداد باکتری‌های باکترئوئیدس ساکن در محیط روده کمتر و باکتری‌های فرمیکوتس بیشتر است. این در حالی است که این ترکیب در افراد لاغر معکوس می‌باشد. از آنجایی که روش‌های درمان چاقی می‌تواند به دلیل تغییر اکوسیستم روده، در تغییر فلور نرمال نقش داشته باشد، بررسی فلور نرمال این افراد قبل و بعد از جراحی و پیگیری وزن بیماران می‌تواند ارتباط نقش تغییر فلور نرمال را در افزایش وزن این بیماران روشن کند و پیش بینی راهی برای

شرکت سازنده استخراج شد و تا زمان انجام آزمایش های استخراج شده در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش کار Real-Time PCR

ابتدا محاسبات مقدار محتوای هر واکنش انجام شد سپس مسترمیکس، محلول کاری پرایمر و پروب و نمونه‌های DNA بیماران از فریزر خارج و هم دمای محیط شدند. و مخلوط واکنش به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق مقادیری که در جدول ۳-۵ ذکر گردید، بدست آمد. مخلوط واکنش در میکروتیوب‌های استریل ۰/۲ میکرولیتری برچسب گذاری شده، تقسیم شد. لازم به ذکر است که برای هر واکنش Real-Time PCR (در مورد هر نمونه بیمار و برای هر ژن باکتریایی مورد نظر) دو مخلوط واکنش آماده سازی شد تا هر آزمایش به صورت دو گانه انجام شود و خطاهای آزمایش حذف شود. پس از تهیه مخلوط واکنش یک مرحله اسپین سریع انجام شد تا کل محتوای میکروتیوب ته نشین و میکس شود. هرکدام از میکروتیوب‌ها را با یک پنبه برای عدم وجود کمترین کدورت پاک کرده و در نهایت داخل دستگاه قرار داده شد. برنامه زمانی و دمایی انجام واکنش Real-Time PCR در جدول ۱ ارائه شده است. قابل توجه است که برای کنترل صحت واکنش و پی بردن به آلودگی احتمالی در هر بار انجام تست از یک کنترل منفی استفاده گردید که شامل همه اجزای واکنش Real-Time PCR به غیر از DNA الگو بود. هر Real-Time PCR شامل ۳۵-۴۰ چرخه حرارتی است. این چرخه‌ها نیز به طور معمول دارای ۳-۲ درجه حرارت مشخص می باشند که معمولاً از سیکل‌های حرارتی دو مرحله ای استفاده می کنند. درجه حرارت‌هایی که استفاده می شوند و مدت زمان‌هایی که رعایت می گردند به عوامل متعددی از جمله نوع آنزیم مورد استفاده، غلظت یون‌های دو ظرفیتی و دزوکسی نوکلئوتیدها و درجه حرارت ذوب شدن پرایمرها بستگی دارد

جلوگیری از جراحی مجدد بیمار باشد، در مطالعه حاضر دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم بعنوان نمونه‌ای از باکتری‌های حائز اهمیت موجود در فلور روده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه گیری

نمونه مدفوع از افراد واجد شرایط، زن و مرد، مراجعه کننده به بیمارستان حضرت رسول اکرم تهران صورت گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۵۵ نفر از لحاظ معیارهای موجود در مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت از بین این افراد ۳۰ فرد مبتلا به چاقی تحت درمان و کاندید برای جراحی و ۱۸ فرد سالم به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. در مرحله بعد هر دو گروه شرکت کننده (گروه مبتلا به چاقی و گروه سالم) برای مدت ۳ ماه از مصرف هرگونه آنتی بیوتیک، پروبیوتیک و پری بیوتیک‌ها، انواع مکمل‌های غذایی مؤثر بر میکروبیوم روده و هر نوع داروی مختل کننده سیستم گوارشی منع شدند. پس از طی این دوره، نمونه برداری و جمع آوری نمونه‌های مدفوع به صورت دوره ای و در طی سه نوبت با فواصل ۱، ۳ و ۶ ماه بعد از عمل جراحی در گروه هدف و همچنین در گروه کنترل انجام شد. این مدت زمان برای فواصل نمونه گیری در گروه هدف و گروه کنترل به منظور نشان دادن روند تغییرات میکروبی روده در گروه مورد مطالعه و همچنین ثبات جمعیت میکروبی در گروه کنترل بوده است.

استخراج DNA

بعد از انجام مرحله نمونه‌گیری حدود ۲۰۰ میکروگرم مدفوع جدا و در میکروتیوب ۲ میلی لیتری قرار داده شد. در صورت استفاده از نمونه فریز شده باید از ذوب شدن آن تا مرحله دوم یعنی افزودن بافر به نمونه جلوگیری نمود تا از تجزیه شدن DNA پیشگیری شود. ژنوم تمامی نمونه‌های مدفوع بیماران با استفاده از کیت اختصاصی استخراج DNA از مدفوع (QIAamp® DNA Stool mini kit) تهیه شده از شرکت کیاژن طبق دستورالعمل

جدول ۱- ترکیب واکنش Real-Time PCR

غلظت نهایی	میزان	اجزا
۱X	۱۲ μl	Premix Ex Taq (probe qPCR) mastermix
۲۵۰-۸۰ nM	۰/۵ μ	Primer Forward(10pmol/ μl)
۲۵۰-۸۰ nm	۰/۵ μ	Primer Reverse(10pmol/ μl)
	۰/۵ μ	TaqMan probe
۱۰-۰۱ ng/ μl	۱ μ	Template DNA(2-10ng)
-	۵/۵ μ	PCR-grade Water
	۲۰ μl	Total

جدول ۲- برنامه انجام واکنش Real-Time PCR

سیکل	زمان	دما	برنامه
۱	۳۰ Sec	۹۵ °C	مرحله آغاز
۳۵	۵ Sec	۹۵ °C	واسرشت شدن
	۳۰ Sec	۶۰ °C	اتصال
			طویل شدن

منحنی تکثیر و تعیین حد آستانه

آستانه تشخیص فلورسانس^۱ وسط دستگاه با پایان فاز ۱ و آغاز فاز ۲ (فاز لگاریتمی که آمپلیفیکاسیون قابل تشخیص و نور فلورسانس افزایش تصاعدی دارد) شروع می شود. بنابراین حد آستانه (Threshold) خطی موازی محور Xها است که بایستی تمامی منحنی‌های تکثیر در یک آزمایش (منحنی‌های مربوط به واکنش‌های جداگانه) را در فاز تصاعدی قطع کند. در نتیجه برای تمامی واکنش‌ها یک خط آستانه انتخاب می شود. در واقع حد آستانه نشان دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به صورت لگاریتمی تکثیر می شوند. برای مطمئن بودن از

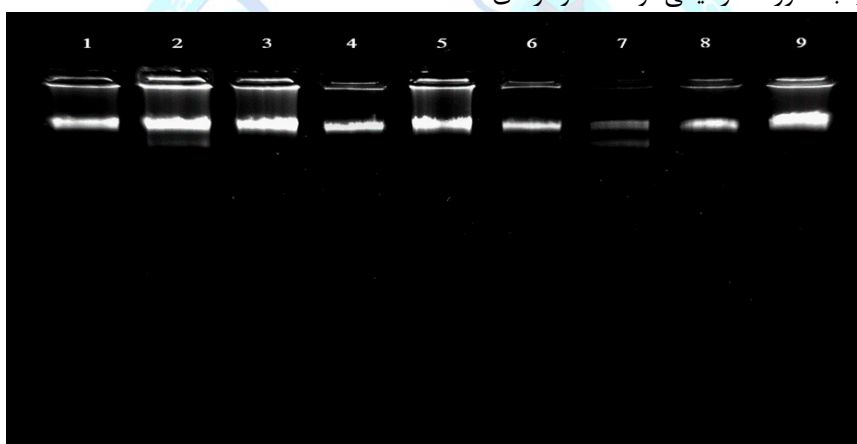
اینکه نقطه آستانه را به درستی انتخاب کرده ایم، می توان آن جایی را که نمودار از فاز زمینه خارج شده و شروع به بالا آمدن می کند را به عنوان آستانه در نظر گرفت. سیکلی را که در آن خط آستانه منحنی‌های PCR را قطع می کند سیکل آستانه (Ct) یا سیکل آستانه می گوئیم. اندازه گیری کمی مقدار ژن‌ها نیز در سیکلهایی از واکنش PCR که در فاز تصاعدی قرار دارند (یعنی سیکل آستانه) انجام می پذیرد. نرم افزار دستگاه Real-time PCR به صورت اتوماتیک سیکل آستانه را برای استفاده کننده بعد از انجام واکنش PCR مشخص می کند. البته

^۱ Threshold Detection Florescence

نتایج

نتایج کیفی و کمی استخراج ژنوم باکتری

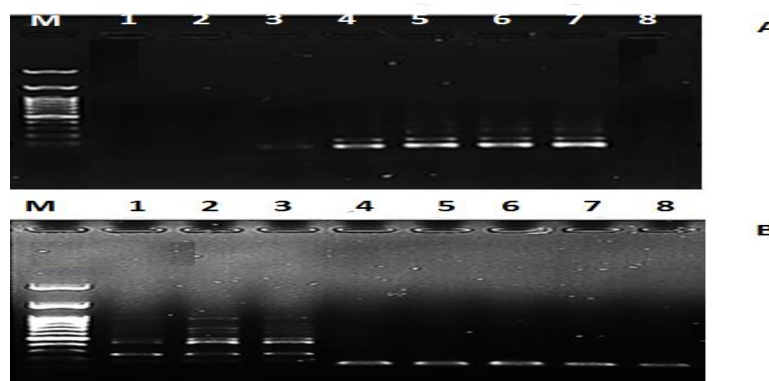
در طی انجام این مطالعه از کیت استخراج DNA جهت تخلیص ژنوم باکتری استفاده گردید. جهت تعیین غلظت و اطمینان از کیفیت DNA تخلیص شده $5\mu\text{l}$ از DNA به همراه $2\mu\text{l}$ از بافر بارگزاری بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید (شکل ۱) که نمونه‌ها غلظت و کیفیت مناسبی را در ژل نشان دادند



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده توسط کیت. نمونه‌های ۹-۱ شامل ژنوم سویه‌هایی است که با استفاده از کیت تخلیص DNA استخراج گردیده است.

نتایج انجام واکنش PCR

بهینه سازی تکنیک PCR با تکثیر توالی ۱۶S rRNA باکتری‌های مورد هدف با استفاده از گرادیان دمایی و تعیین دمای مناسب برای هر یک از پرایمرها در مورد هر باکتری تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج تست تعیین کارایی پرایمرهای (A) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم 200 bp ، (B) بیفیدوباکتریوم لانگوم 185 bp . M: مارکر (۱۰۰ bp)، چاهک‌های شماره‌ی ۱ الی ۸ گرادیان دمایی از دمای ۵۵ الی ۶۵ درجه سلسیوس

شاخص توده بدنی BMI

نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که شاخص توده بدنی بیماران در سه زمان اندازه گیری شده بین سه گروه از نظر آماری متفاوت می‌باشد. بطوریکه گروه بای پس در ابتدای مطالعه دارای بیشترین میانگین شاخص توده بدنی $44/99$ با انحراف معیار $3/87$ بود ($P < .001$). این شاخص در دو

گروه اسلیو و بای پس در طی ماه‌های مورد بررسی تقریباً به یک نسبت مشابه کاهش یافت (جدول ۳). همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمون توکی میانگین شاخص توده بدنی دو گروه بای پس و اسلیو تفاوت آماری معنی داری با گروه کنترل داشت (جدول ۴ و نمودار ۱).

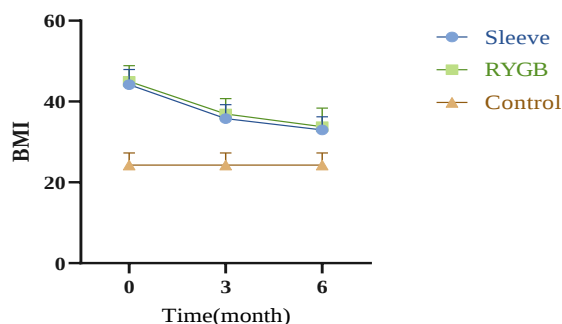
جدول ۳- مقایسه میانگین BMI بیماران بین گروه‌های مورد مطالعه

P-value	انحراف معیار	میانگین	N		
	3.73	44.17	14	اسلیو	
<.001	3.87	44.99	16	بای پس	BMI0
	3.00	24.28	18	کنترل	
	3.44	35.79	14	اسلیو	
<.001	3.81	36.92	16	بای پس	BMI3
	3.00	24.28	18	کنترل	
	3.25	32.99	14	اسلیو	
<.599	4.59	33.77	16	بای پس	BMI6
	3.00	24.28	18	کنترل	

جدول ۴- نتایج آزمون توکی برای مقایسات دو تایی میانگین شاخص توده بدنی بیماران

Sig.	گروه (J)	گروه (I)	متغیر وابسته
.800	بای پس	اسلیو	BMI0
.000	کنترل		
.800	اسلیو	بای پس	
.000	کنترل		
.645	بای پس	اسلیو	BMI3
.000	کنترل		
.645	اسلیو	بای پس	
.000	کنترل		
.830	بای پس	اسلیو	BMI6

کنترل	.000
بای پس	.830
اسلیو	.000
کنترل	.000



نمودار ۱- نتایج آزمون توکی برای مقایسات دو تایی میانگین شاخص توده بدنی بیماران

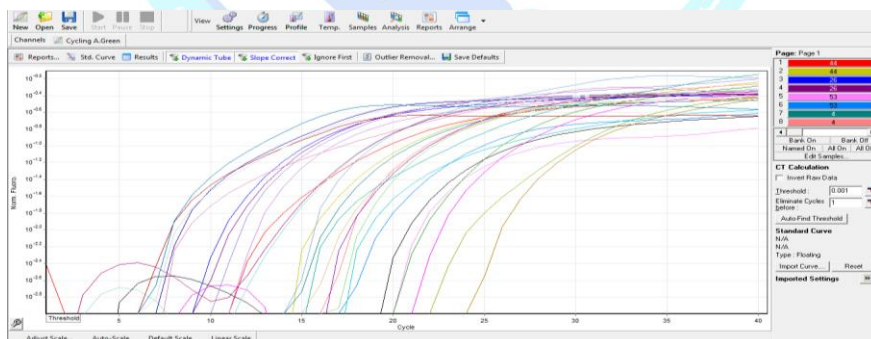
شرکت کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr در نمودار ۲ و ۳ نشان داده شده است.

تعیین اختصاصیت واکنش Real-time PCR با

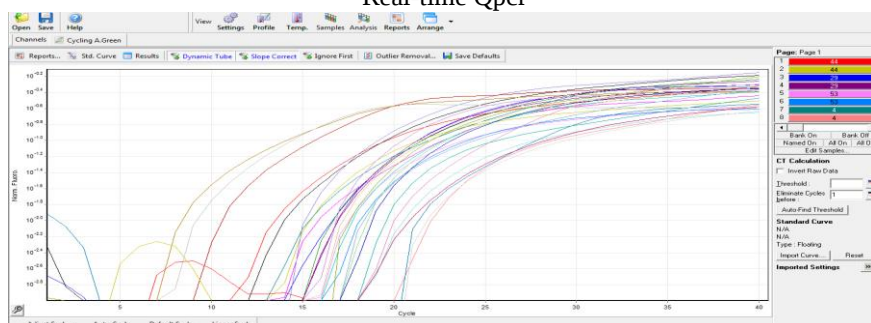
استفاده از بررسی منحنی ذوب

منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به باکتری‌ها

بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم در افراد



نمودار ۲- منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به بیفیدوباکتریوم بیفیدوم افراد شرکت کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr



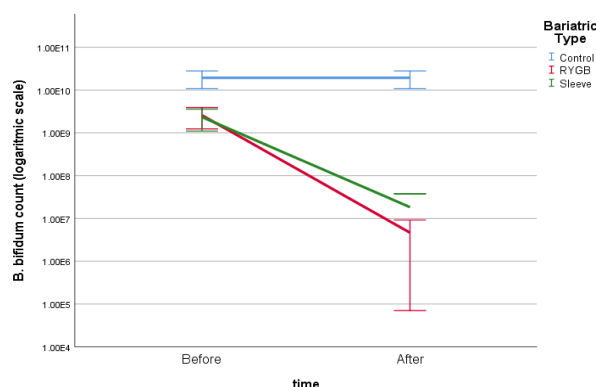
نمودار ۳- منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم افراد شرکت کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr

عمل باریاتریک در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود. بر اساس نتایج حاصل از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس این اختلاف مشاهده شده بین گروه‌ها مورد مطالعه از نظر آماری معنی دار بود ($P < .05$). بطور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش اسلیو و بای پس میانگین باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه بای پس محسوس‌تر بود.

همانگونه که در جدول ۵ و نمودار ۴ نشان داده شده است، میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی قبل و بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (اسلیو و بای پس) به میزان قابل توجهی بیشتر بود. همچنین میزان این باکتری قبل از عمل جراحی در گروه بای پس از گروه اسلیو بیشتر بود. در صورتی که میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی بعد از انجام

جدول ۵- مقایسه میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

			بیفیدو باکتریوم بیفیدوم	میان	انحراف معیار	P-value
قبل	نوع چاقی	کنترل		15848931924.00	17243545152.87	.000
		بای پس		1954496343.50	2315602526.61	
		اسلیو		1584829237.00	2327200135.22	
بعد	نوع چاقی	کنترل		15848931924.00	17243545152.87	.000
		بای پس		1072262.50	7908269.01	
		اسلیو		8326458.50	36368229.59	



نمودار ۴- مقایسه میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (اسلیو و بای پس) به میزان قابل توجهی بیشتر بود.

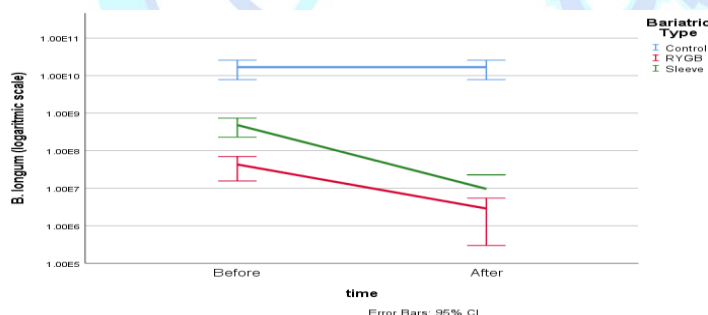
همانگونه که در جدول ۶ و نمودار ۵ نشان داده شده است، میانگین بیفیدو باکتریوم لانگوم در افراد مورد بررسی قبل و

طور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش اسلیو و بای پس میانگین باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه بای پس محسوس تر بود.

همچنین میزان این باکتری قبل و بعد از عمل جراحی در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود. بر اساس نتایج اصل از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس اختلاف میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌ها مورد مطالعه قبل و بعد از عمل جراحی از نظر آماری معنی دار بود ($P < .05$). به

جدول ۶- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

			میان	انحراف معیار	P-value
		کنترل	11350860378.50	17858236569.09	
قبل	نوع چاقی	بای پس	5754395.50	38809504.34	.000
		اسلیو	63095725.00	409520930.54	
		کنترل	11350860378.50	17858236569.09	
بعد	نوع چاقی	بای پس	5754395.50	38809504.34	.000
		اسلیو	63095725.00	409520930.54	
		کنترل	11350860378.50	17858236569.09	



نمودار ۵- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

معناداری قبل و بعد از جراحی تغییر وجود دارد. همچنین این نتایج دال بر این نکته بود که جمعیت باکتری‌های مورد مطالعه بعد از جراحی اختلاف معناداری با گروه سالم داشته اند.

یافته‌های مطالعات جدید بر پایه تکنیک‌های متاژنومیک مانند توالی یابی ژن 16SrRNA، فلورسنت هیبریداسیون درجا و Real Time PCR ارتباط بین ترکیب میکروبیوتای روده با چاقی را نشان داده اند. گزارش شده است که میکروارگانیسم‌های روده جذب مونوساکارید از مجاری دستگاه گوارش را افزایش می‌دهد و به میزان دستور افزایش تولید تری گلیسیرید در کبد را می‌دهند. این پدیده

بحث

این مطالعه روی ۳۰ فرد مبتلا به چاقی مفرط در دو گروه (افرادی که تحت جراحی اسلیو و بای پس قرار گرفته اند) قبل و بعد از جراحی در مدت زمان ۱ و ۳ و ۶ ماه بعد از جراحی انجام شد. همچنین برای مقایسه میزان تغییرات ترکیب جمعیت میکروبی، گروه کنترل شامل ۱۸ فرد سالم انتخاب شد. در مطالعه حاضر دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم بعنوان نمونه ای از باکتری‌های حائز اهمیت موجود در فلور روده مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که در میزان جمعیت میکروبی هر دو گونه بیفیدوباکتریوم به صورت

با توسعه مقاومت به انسولین مرتبط است. با این حال، چندین فاکتور دیگر مانند استعداد ژنتیکی، استرس روانی و عفونت نیز ممکن است در ابتلا به چاقی نقش داشته باشند. اولین خط درمان برای درمان چاقی بدنی، بالا بردن میزان سوخت و ساز بدن در کنار کاهش کالری دریافتی در افراد می‌باشد. ولی متأسفانه در برخی از افراد این امر محقق نمی‌شود و تأثیرات ناشی از این درمان، کوتاه مدت بوده و تمامی افراد توانایی باقی ماندن در این روش درمانی برای رسیدن به وزن مناسب را ندارند. در نتیجه درمان‌های جایگزین مثل مداخله با جراحی‌های باریاتریک توانسته است با تغییر فیزیولوژیکی و متابولیکی ایجاد شده، باعث ایجاد تأثیر طولانی مدت و کاهش بیماری‌هایی از جمله دیابت تیپ دو و بیماری‌های مرتبط شود. این جراحی به طور معمول برای افرادی که شاخص توده بدنی بالای ۴۰ دارند و یا افرادی با شاخص توده بدنی بالای ۳۵ و بیماری زمینه‌ای خطرناک برای سلامتی فرد، در نظر گرفته می‌شود (۱۳). از آنجایی که جراحی‌های باریاتریک می‌تواند به دلیل تغییر اکوسیستم روده، در تغییر فلور نرمال نقش داشته باشد، بررسی فلور نرمال این افراد قبل و بعد از جراحی و پیگیری وزن بیماران می‌تواند ارتباط نقش تغییر فلور نرمال را در افزایش وزن این بیماران روشن کند و پیش‌بینی راهی برای جلوگیری از جراحی مجدد بیمار باشد، از آنجایی که جراحی باریاتریک تنها راه درمان بیماران مبتلا به چاقی مرضی می‌باشد، بالا بردن کارایی این خط درمان برای تمامی بیماران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۴). در یک مطالعه حیوانی که توسط M. Leonor و همکارانش در سال ۲۰۲۰ انجام شد، این مطالعه نقش چاقی ناشی از رژیم غذایی را در تغییرات در سلامت استخوان و متابولیسم را بررسی کرده است و اینکه آیا می‌توان این تغییرات را با تجویز خوراکی بیفیدوباکتریوم سودو باکتریوم CECT^۱ 7765 ترمیم کرد. برای انجام این کار، موش‌های نر بالغ از نوع وحشی C57BL-6 با رژیم غذایی استاندارد یا پرچرب

(HFD)، مکمل یا بدون مکمل بیفیدوباکتریوم سودو باکتریوم (109CFU/day) CECT 7765 به مدت ۱۴ هفته تغذیه شدند. HFD با هموستاز طبیعی استخوان تداخل دارد که منجر به افزایش از دست دادن استخوان می‌شود. در موش‌های چاق، بیفیدوباکتریوم سودو باکتریوم CECT 7765 از دست دادن توده استخوانی را کاهش داد و با کاهش تحلیل استخوان و افزایش تشکیل استخوان، BMD را افزایش داد (۱۵). در مطالعه‌ای که توسط M. Million و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی مدفوع ۶۸ فرد چاق و ۴۷ گروه کنترل انجام شد که باکتری‌های فیرمیکوتس، باکتریوتیدتس، متانوبروایباکتر اسمیسی^۲، لاکتوباسیلوس لاکتیس، بیفیدوباکتری، را مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داد که چاقی با افزایش خطرات سلامتی با تغییر در میکروبیوتای روده باکتریایی همراه است و عمدتاً میزان باکتریوتیدها کاهش می‌یابد همچنین جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم ممکن است نقش مهمی در تنظیم وزن به عنوان یک اثر ضد چاقی در مدل‌های تجربی و انسانها داشته باشد. و نشان داد برخی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم یا لاکتوباسیلوس با وزن طبیعی و برخی دیگر با چاقی همراه بودند. این مطالعه نشان دهنده وجود یک رابطه متقابل احتمالی بین برخی از انواع پروبیوتیک است، که برای مصرف انسان در جای دیگری به بازار عرضه شده است و گونه‌ی بیفیدوباکتریوم را با چاقی در انسان مرتبط می‌کند که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Jean-Pierre Furet همکاران در سال ۲۰۱۰ روی میکروبیوتای روده از نمونه‌های مدفوع با استفاده از روش PCR کمی بر ۱۳ فرد کنترل بدون چربی و در ۳۰ فرد چاق (با هفت دیابتی نوع ۲) پس از بای پس مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که جراحی‌های باریاتریک بر روی افراد مبتلا به چاقی مفرط می‌تواند باعث تغییر در فلور نرمال روده شود این تغییر با افزایش و کاهش برخی باکتری‌ها نشان داده شده است که

¹ *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

² *Methanobrevibacter smithi*

با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در این مطالعه نشان داده شد که جمعیت باکتریوئیدتس، پروتلا افزایش داشته است و همچنین جمعیت در بیفیدوباکتریوم، لاکتوباسیلوس پدیوکوکوس کاهش یافته است این نتایج نشان می‌دهد که اجزای میکروبیوم روده غالب به سرعت در شرایطی مانند گرسنگی ناشی از بای پس سازگار می‌شوند در حالی که گونه فکالیباکتریوم پروتسنیتزی به طور مستقیم با کاهش حالت التهابی درجه پایین در چاقی و دیابت مستقل از مصرف کالری ارتباط دارد (۱۷). در مطالعه ای که توسط Hyang Mi An و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام شد، هدف بررسی اثرات ضد چاقی و کاهش چربی بیفیدوباکتریوم بود. این مطالعه بر روی ۳۶ موش نر نژاد Sprague-Dawley با رژیم غذایی پرچرب انجام شد و پس از ۷ هفته، وزن بدن، اندام و چربی، مصرف غذا، سطح سرمی خون، شمارش لاکتوباسیلوس مدفوع و فعالیت‌های مضر آنزیم اندازه گیری شد. این داده‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های بیفیدوباکتریوم اثرات مفیدی بر ضد چاقی دارد و با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۸).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر جمعیت میکروبی دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم در افراد دچار چاقی مفرط نسبت به افراد سالم به میزان چشمگیری کمتر بود. همچنین در افراد دچار چاقی مفرط جمعیت این دو باکتری بعد از عمل به طور معناداری کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد کاهش وزن بواسطه جراحی می‌تواند در تغییر کمیت باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده موثر باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بیماری چاقی با فراوانی باکتری‌های فلور میکروبی روده مرتبط باشد.

منابع

1. Al-Isa, A. (1997a). Changes in body mass index (BMI) and prevalence of obesity among Kuwaitis 1980–1994. *International journal of obesity*, 21(12), 1093-1099.
2. Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643.
3. Zhao, L., & Fei, N. (2015). Obesity animal model and methods for making and using thereof: Google Patents.
4. Rosen, D., Dakin, G., & Pomp, A. (2009). Sleeve gastrectomy. *Minerva chirurgica*, 64(3), 285-295.
5. Hoy-Schulz, Y. E., Jannat, K., Roberts, T., Zaidi, S. H., Unicomb, L., Luby, S., & Parsonnet, J. (2016). Safety and acceptability of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* 35624 in Bangladeshi infants: a phase I randomized clinical trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 44.
6. Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2011). Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual review of nutrition*, 31, 15-31.
7. Diamant, M., Blaak, E., & De Vos, W. (2011). Do nutrient–gut–microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity reviews*, 12(4), 272-281.
8. Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 27(1), 73-83.
9. Nozari, N. J. G. (2018). Role of Gut Microbiota on Weight Regulation. 23(1), 7-17.
10. Hartstra, A. V., Bouter, K. E., Bäckhed, F., & Nieuwdorp, M. (2015). Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes care*, 38(1), 159-165.
11. Sugahara, H., Odamaki, T., Fukuda, S., Kato, T., Xiao, J.-z., Abe, F., . . . Ohno, H. (2015a). Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. *Scientific reports*, 5.
12. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. J. n. (2006). Human gut microbes associated with obesity. 444(7122), 1022-1023.
13. Pajecski, D., de Oliveira, L. C., Sabino, E. C., de Souza-Basqueira, M., Dantas, A. C. B., Nunes, G. C., Santo, M. A. (2019). Changes in the intestinal microbiota of superobese patients after bariatric surgery. *Clinics*, 74.
14. Ulker, I., & Yildiran, H. (2018). The effects of bariatric surgery on gut microbiota in patients with obesity: a review of the literature. *Bioscience of microbiota, food and health*, 18-018.
15. Santoro, M., Masciullo, M., Bonvissuto, D., Bianchi, M. L. E., Michetti, F., & Silvestri, G. (2013). Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Molecular and cellular biochemistry*, 380(1), 259-265.
16. Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., . . . Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International journal of obesity*, 36(6), 817-825.
17. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., . . . Corthier, G. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
18. An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., . . . Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in health and disease*, 10(1), 1-8.

Population frequency of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* in the intestine of obese patients before and after gastric surgery

Kimia Golstanfar¹, Laya Takkiri Osgoei^{2*}, Elham Siasi Torbati²

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

2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

*Corresponding author: l_takkiri@iau-tnb.ac.ir

Abstract

Introduction: Obesity is a chronic multifactorial disease related to genetics. Studies have shown that in obese people the quantity and quality of the intestinal microbiota population differs from that of healthy individuals. For further clarification in the present study, the populations of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* were examined before and after bariatric surgery (either RYGB or Sleeve).

Material and Methods: In this study, 30 obese individuals who were candidates for bariatric surgery using either RYGB or Sleeve participated in the examination along with 18 healthy controls. After collection, fecal samples were extracted using a special kit. After ensuring the concentration and purity of the extracted DNA using real-time PCR method, the population of the above two bacteria in patient samples (before and after surgery) and healthy control samples were determined.

Results: In the present study, the mean populations of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* in the subjects before and after bariatric surgery in the control group were significantly higher than the other two groups (RYGB and Sleeve) ($P < .05$). In the RYGB group, the mean population of *Bifidobacterium bifidum* before bariatric surgery was higher than the Sleeve group. However, the mean population of this bacterium in the subjects after bariatric surgery in the Sleeve group was higher than the RYGB group ($P < .05$). Also, the population of *Bifidobacterium longum* before and after surgery in Sleeve group was higher than RYGB group ($P < .05$). In general, after bariatric surgery with both RYGB and Sleeve methods, the mean population of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* decreased compared to before surgery and this decrease was more noticeable in RYGB group ($P < .05$).

Conclusion: According to the results, it seems that weight loss through surgery can be effective in changing the quantity of bacteria in the intestinal microbiota. Therefore, it is possible that obesity is associated with an abundance of bacteria in the gut microbial flora.

Keywords: Obesity, gastric surgery, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*.

بررسی خصوصیات مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده بیوفیلم جدا شده از گوشت و فراورده‌های گوشتی

مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*

کبری عباسی^۱، منوچهر مؤمنی شهرکی^۲*

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

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

momeniman@yahoo.com* نویسنده مسئول:

چکیده:

یکی از پاتوژن‌هایی که به راحتی می‌تواند گوشت را آلوده سازد، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. تحقیق حاضر برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع ژن‌های انتروتوکسین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت خام و فراورده‌های گوشتی انجام شده است. در این مطالعه در طی فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۸ تعداد ۴۴۰ نمونه انواع گوشت خام و فراورده‌های گوشتی از فروشگاه‌های عرضه کننده در شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. شایع‌ترین ژن‌های انتروتوکسین و ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در حضور پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی ۶۱ نمونه (۱۳/۸۶ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. که در ۵۶ ایزوله (۹۱/۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد. بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۸۳/۶۰ درصد) و کمترین مقاومت به ونکومايسين (۰ درصد) گزارش شد. فراوانی حضور ژن‌های *seb* و *sec* در ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد گزارش شد. با توجه به این که بین ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک و تولید بیوفیلم ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید، مشخص می‌گردد که مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشند نسبت به سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نمی‌باشند بیشتر است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، بیوفیلم، گوشت

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی سلامت و بهداشت عمومی، بیماری‌های منتقل شونده از راه غذا می‌باشد که سالانه با صرف هزینه‌های زیاد، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شود. مسمومیت غذایی با/استافیلوکوکوس/اورئوس به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذا و هضم آن ایجاد می‌شود و موجب خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای می‌گردد (۱). این باکتری به‌علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فراورده‌های لبنی، گوشت و فراورده‌های گوشتی و به-خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می-باشند، قابل جدا شدن است. گوشت با داشتن املاح معدنی مانند آهن، پروتئین، کلسیم و ویتامین‌ها به عنوان یکی از غنی‌ترین منابع پروتئین در جهان، روزانه توسط میلیون‌ها نفر مورد مصرف قرار می‌گیرد و به این علت توجه به بهداشت گوشت از اهمیت فراوانی، برخوردار است. متأسفانه کنترل دقیقی بر روی بازررسی گوشت طیور و گوشت نشخوارکنندگان در ایران انجام نمی‌پذیرد. علاوه بر این اکثر کشتارگاه‌ها معمولاً به شکل سنتی و با استفاده از نیروی کار غیر مجرب، اداره می‌شوند. از این رو امکان انتقال عفونت‌های ثانویه از محیط کشتارگاه، کارکنان و وسایل به لاشه و گوشت دام و طیور وجود دارد (۲).

یکی از پاتوژن‌هایی که به راحتی می‌تواند گوشت را آلوده سازد، باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس است که یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در خانواده میکروکوکاسه است. این پاتوژن عامل اصلی بیشتر عفونت‌های مکرر در بیمارستان‌ها و القا مشکلات شدید در انسان و حیوانات است (۳). علاوه بر این باکتری قادر است از طریق غذاهای آلوده به دستگاه گوارش انسان وارد شود و سبب بروز عواقب شدید مانند استفراغ، دل درد، دل پیچه و تهوع شود. انتروتوکسین‌های/استافیلوکوکوس/اورئوس محلول بوده و توسط برخی از سویه‌های/استافیلوکوکوس ترشح می‌شود. انتروتوکسین ماده‌ای پروتئینی است و این سم در برابر

حرارت مقاوم است و قادر است حرارت ۱۰۰ درجه سانتی-گراد را به مدت ۳۰ دقیقه تحمل کند. در ضمن آنزیم‌های گوارشی روده بر آن تاثیری ندارد. این سم به صورت A، B، C1، C2، C3، D، E و H وجود دارد و یکی از علل مهم مسمومیت‌های غذایی به حساب می‌آید تولید این سم در غذاهایی که دارای کربوهیدرات و پروتئین است صورت می‌گیرد. انتروتوکسین از جمله فاکتورهای ویروالانس مهم این باکتری و از دسته سوپر آنتی‌ژن‌های پیروژنیک (PTSAgs) می‌باشند که تأثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. وجود انتروتوکسین به میزان خیلی کم، در حد ۲۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم، بسته به نوع انتروتوکسین می‌تواند موجب بروز علائم مسمومیت غذایی شود به طوری که اگر تعداد 10^5 باکتری در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد باکتری می‌تواند انتروتوکسین تولید کند و حتی اگر در صورت حرارت باکتری از بین رفته باشد، توکسین فعال باقی مانده و باعث مسمومیت غذایی می‌گردد. از میان انتروتوکسین‌های/استافیلوکوکوس/اورئوس انواع SEA تا SEE که نسبت به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیکی دستگاه گوارش مقاومت بیشتری دارند، در مسمومیت غذایی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند (۴،۵). تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها و مصرف بی رویه آن‌ها در ایجاد/استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک نقش دارد. در سال ۱۹۴۱ بعضی از سوش‌های/استافیلوکوکوس به پنی سیلین مقاوم شدند. یک دهه بعد سوش‌های مقاوم چندگانه به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومايسین گزارش شد. برای اولین بار در سال ۱۹۶۱/استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد. /استافیلوکوکوس/اورئوس علاوه بر آنتی بیوتیک متی‌سیلین، نسبت به آنتی بیوتیک‌های دیگری مثل بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، لینکوزامیدها، فلوروکینولون‌ها، استرپتوگرامین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم است (۶،۷). تا کنون بیشترین میزان مقاومت‌های آنتی بیوتیکی برای باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس گزارش شده است به همین علت معمولاً به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نمی‌دهد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که

به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. پس از گذراندن زمان فوق پلیت‌های مشکوک به کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شدند پلیت‌هایی با حضور کلنی‌های محدب، براق، سیاه، با هاله رسوبی از نظر ریخت شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند و جهت تأیید و تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* تست‌های گرم، کاتالاز، کوآگولاز، DNase بر روی پرگنه‌های مشکوک انجام شد (۸).

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی-بایر^۸ مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ۲۰۱۹ استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پادتن طب تهیه گردید و شامل: پنی‌سیلین (P 10µg)، متی‌سیلین (P 2µg)، آمپی‌سیلین (AM 25µg)، اگزاسیلین (OX 5µg)، ونکومايسين (V 30µg)، تتراسایکلین (TE 10µg)، جنتامایسین (G 10µg)، استرپتومايسين (S 20µg)، کانامایسین (K 30µg)، کلرامفنیکل (C 30µg)، اریترومايسين (E 15µg)، لینکومايسين (L 2µg)، کلیندامایسین (CC 2µg)، ریفامپین (R 2µg) بودند (۹).

آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی قدرت اتصال باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس پیدرمیدیس* ATCC12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در این مطالعه جهت ارزیابی تولید بیوفیلم، کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد کرده بر روی محیط جامد به محیط TSB (Trypticase soy broth) حاوی یک درصد گلکز تلقیح شد. از نمونه‌های تلقیح شده کدورتی معادل نیم مک فارند تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استیرن

سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* غذا دارای مقاومت بالا (۶۱٪ تا ۷۱٪) نسبت به اکثر انواع آنتی بیوتیک‌ها هستند که بسیار قابل توجه است (۲).

باتوجه به اهمیت غذازاد بودن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، مصرف گوشت توسط ایرانیان و در نهایت با توجه به فقدان مطالعات میکروبیولوژی، اپیدمیولوژیکی و بهداشتی در زمینه بار آلودگی، خصوصیات میکروبی و مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در انواع گوشت، بررسی حاضر با هدف تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت و فراورده‌های گوشتی و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های انترتوکسین در شهرستان شهرکرد انجام شد.

مواد و روش کار

جمع آوری و شناسایی نمونه‌ها

مطالعه‌ای حاضر در طی فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۸ بر روی ۴۴۰ نمونه انواع گوشت خام و فراورده‌های گوشتی از قبیل: گوشت گاو، گوشت مرغ، سوسیس، کالباس، همبرگر مرغ، ژامبون مرغ، کباب لقمه، جوجه کباب همبرگر گوشت، کباب کوبیده و ناگت مرغ از فروشگاه‌های عرضه کننده در شهرستان شهرکرد صورت گرفت. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن با رعایت شرایط اسپتیک به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. تمامی نمونه‌ها از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش قرار گرفتند.

ابتدا در زیر هود در شرایط استریل نمونه‌ها با استفاده از اسکالپل استریل قطعه قطعه شدند. سپس ۱۰ گرم از هر نمونه به ۹۰ گرم از محلول استریل بافر فسفات نمکی اضافه شد و سپس به مدت دو دقیقه با استفاده از استومکر مخلوط گردید تا به صورت همگن درآید و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس توسط سواب استریل به محیط بردپاگر حاوی تلوریت پتاسیم و امولسیون تخم مرغ انتقال داده شدند و

دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه‌های DNA که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

۵- تشخیص قطعی و ردیابی ژن‌های انتروتوکسین و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

تشخیص قطعی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از پرایمر *16sRNA* صورت گرفت. از طریق بررسی مطالعات مشابه در این زمینه، بهترین پرایمر مربوط به ژن‌های انتروتوکسین شامل: *sea*، *seb*، *sec*، *sed* و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل: ژن‌های *aac A-D* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها)، *ermC* و *ema* (کد کننده مقاومت به اریترومايسين)، *mecA* (کد کننده مقاومت به متی‌سیلین)، *blaZ* (کد کننده مقاومت به داروهای بتالاکتام)، *tetK* و *tetM* (کد کننده مقاومت به تتراسیکلین)، *vanA* (کد کننده مقاومت به ونکومايسين)، *Lina* (کد کننده مقاومت لینکوزامیدها) که بیشترین فرانس به آن داده شده بود، انتخاب و جهت تهیه به شرکت سیناژن سفارش داده شد و توالی آن در پایگاه داده‌های NCBI بلاست و مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است (۸، ۱۱، ۱۲).

منتقل شده و پس از گذشت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. چاهک‌ها با استفاده از فسفات بافر سالین چهار مرتبه شستشو داده شد و پس از خشک شدن کامل چاهک‌های پلی‌استرین رنگ آمیزی انجام شد. در این روش از رنگ کریستال ویوله به مدت ۱۵ دقیقه در هر چاهک استفاده شد. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب معمولی شستشو داده شد و جهت آزاد سازی رنگ موجود در دیواره

بakterی‌هایی که مولد بیوفیلم می‌باشند، ۱۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به اضافه‌ی اتانول ۷۰ درصد به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طوح موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا بررسی شد. نمونه کنترل منفی در این روش، محیط TSB حاوی یک درصد گلوکز بود. جهت اطمینان از روش کار برای جدایه‌های مورد مطالعه ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی نمونه‌ها از نظر تولید بیوفیلم نمونه‌هایی با جذب نوری کمتر از ۰/۱ به عنوان ایزوله‌های منفی از نظر تولید بیوفیلم، جدایه‌های با جذب نوری بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلم ضعیف و ایزوله‌های با جذب نوری ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان ایزوله‌های بیوفیلم متوسط و نمونه‌های با جذب نوری بالای ۰/۳ به عنوان ایزوله‌های بیوفیلم قوی مطرح شدند.

نمونه‌هایی که از نظر تشکیل بیوفیلم مثبت و منفی تشخیص داده می‌شوند، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت استخراج DNA، DNA آن‌ها استخراج گردید.

آزمایشات مولکولی

به منظور تشخیص مولکولی و تائید تشخیص باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (DNPTM) شرکت سیناژن و طبق راهنمای آن استخراج شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگارز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA استخراج شده از

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Sequence	Number Accession	Size (bp)
<i>16srRNA</i>	F: CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R: CTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCG	CP050691	791
<i>See</i>	F: CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC R: CACCTTACCGCCAAAGCTG	M21319	482
<i>Sec</i>	F: CTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACATG R: CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	X05815	275
<i>Sea</i>	F: GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTT	M18970	560
<i>Seb</i>	F: CAATCACATCATATGCGAAAGCAG R: CATCTACCCAAACATTAGCACC	M11118	404
<i>Sed</i>	F: GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R: GCTGTATTTTTCTCCGAGAGT	M28521	492
<i>mecA F</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTC	Y00688	532
<i>blaZ</i>	F: TACAACTGTAATATCGGAGGG R: CATTACTCTTGGCGGTTTC	NG-05599	861
<i>Aac A-D</i>	F: TAATCCAAGAGCAATAAGGGC R: GCCACACTATCATAACCACTA	M18086	227
<i>Erm A</i>	F: AAGCGGTAAACCCCTCTGA R: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	X03216	190
<i>Erm C</i>	F: AATCGTCAATTCTGCATGT R: TAATCGTGAATACGGGTTTG	V01278	299
<i>Tet K</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	S67449	360
<i>Tet M</i>	F: AGTGGAGCGATTACAGAA R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA	AF117258	268
<i>Lin A</i>	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R: GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTCGA	X61307	323

بسته به اندازه قطعات ژنی مورد مطالعه، آزمایش PCR در سه مرحله در قالب PCR چندگانه با شرایط ذکر شده در جدول ۲ صورت گرفت.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده، اجزای واکنش PCR و برنامه‌ی دمایی

Gene	M-PCR Volume (50 µL)	PCR programme
<i>16srRNA</i>	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl ₂ , 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 31 cycles of 45s at 95 °C, 60 s at 59 °C and 60s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 5 min.
<i>See</i>	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl ₂	Initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35
<i>Sec</i>	200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 58 °C and 120 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 10 min.
<i>Sea</i>	5 µL PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl ₂ , 200 µM dNTP,	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30
<i>Seb</i>	0.5 µM of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 µL	cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 51 °C and 60 s at 73 °C, and
<i>Sed</i>	DNA template	final extention at 72 °C for 6 min.
<i>mecA F</i>	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl ₂ , 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 °C, 60 s at 55 °C and 60 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 5 min.

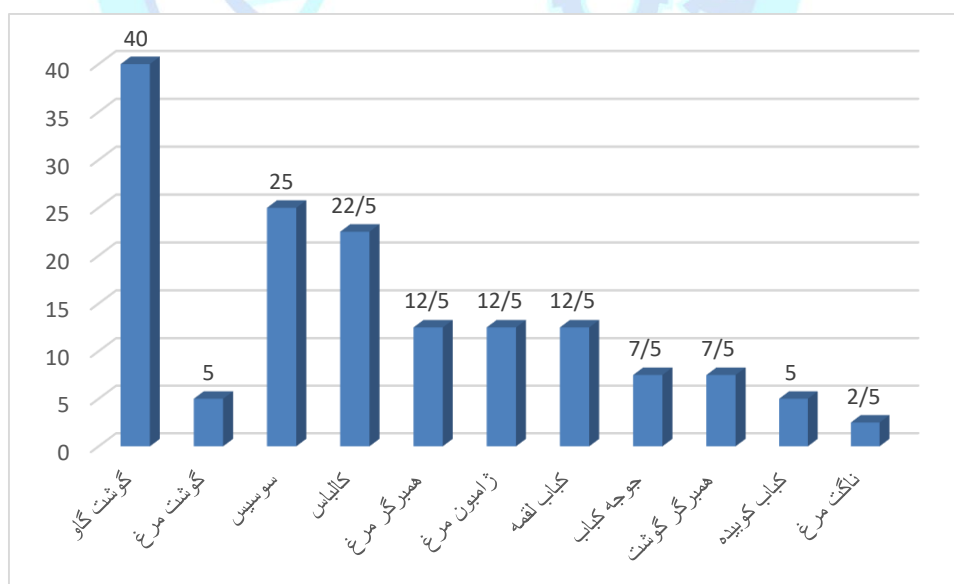
<i>blaZ</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 °C, 60 s at 50 °C and 60 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 5 min.
<i>vanA</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 °C, 60 s at 55 °C and 60 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 5 min.
<i>Aac A-D</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 6 min, followed by 30 cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 55 °C and 45 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 7 min.
<i>Erm A</i> <i>Erm C</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 6 min, followed by 30 cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 55 °C and 45 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 7 min.
<i>Tet K</i> <i>Tet M</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 94 °C for 6 min, followed by 35 cycles of 60 s at 95 °C, 90 s at 55 °C and 45 s at 73 °C, and final extention at 72 °C for 7 min.
<i>Lin A</i>	5 μ L PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 μ M dNTP, 0.4 μ M of each primers, 1 U Taq DNA polymerase, 3 μ L DNA template	Initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 °C, 60 s at 57 °C and 60 s at 72 °C, and final extention at 72 °C for 5 min.

نتایج

نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی

در این تحقیق از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی ۶۱ نمونه (۱۳/۸۶ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت

بودند. از فراورده‌های گوشتی مختلف از هر کدام ۴۰ نمونه تهیه شد که پس از انجام آزمون‌های میکروبی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت زیر گزارش شد:



نمودار ۱: شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در فراورده‌های گوشتی

نتایج مربوط به تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی در روش میکروتیتر پلیت به منظور تشکیل بیوفیلم، ۶۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند از ۶۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی در ۵۶

ایزوله (۹۱/۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد. در ۲۹ ایزوله (۴۷/۵۴ درصد) بیوفیلم قوی و در ۲۷ ایزوله بیوفیلم ضعیف (۴۴/۲۶ درصد) و در ۵ ایزوله (۸/۲ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده نگردید. در جدول ۳ واکنش بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از انواع گوشت

یک از نمونه‌ها و واکنش بیوفیلیم ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0.05$).

مورد بررسی نشان داده شده است. برطبق نتایج جدایه‌های جدا شده از گوشت گاو بیشترین قدرت تولید بیوفیلیم قوی را داشتند (۳/۳۱٪). براساس آزمون دقیق فیشر بین هیچ

جدول ۳: واکنش بیوفیلیم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از انواع گوشت مورد بررسی

نوع نمونه	واکنش بیوفیلیم					
	قوی		ضعیف		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گوشت گاو	۹	۳۱/۰۳	۴	۱۴/۸۲	۳	۶۰
گوشت مرغ	۱	۳/۴۵	۲	۷/۴۱	۰	۰
سوسیس	۵	۱۷/۲۴	۵	۱۸/۵۲	۰	۰
کالباس	۵	۱۷/۲۴	۴	۱۴/۸۲	۰	۰
همبرگر مرغ	۳	۱۰/۳۴	۲	۷/۴۱	۰	۰
ژامبون مرغ	۲	۶/۹	۳	۱۱/۱۱	۰	۰
کباب لقمه	۲	۶/۹	۳	۱۱/۱۱	۰	۰
جوجه کباب	۱	۳/۴۵	۱	۳/۷	۱	۲۰
همبرگر گوشت	۱	۳/۴۵	۱	۳/۷	۱	۲۰
کباب کوبیده	۰	۰	۱	۳/۷	۰	۰
ناگت مرغ	۰	۰	۱	۳/۷	۰	۰
مجموع	۲۹	۱۰۰	۲۷	۱۰۰	۵	۱۰۰

تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۷۹۱ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند.

نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی پس از انجام آنتی بیوگرام بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین در ۵۱ ایزوله (۸۳/۶۰ درصد) و آمپی‌سیلین در ۴۸ ایزوله (۷۸/۶۸ درصد) گزارش شد.

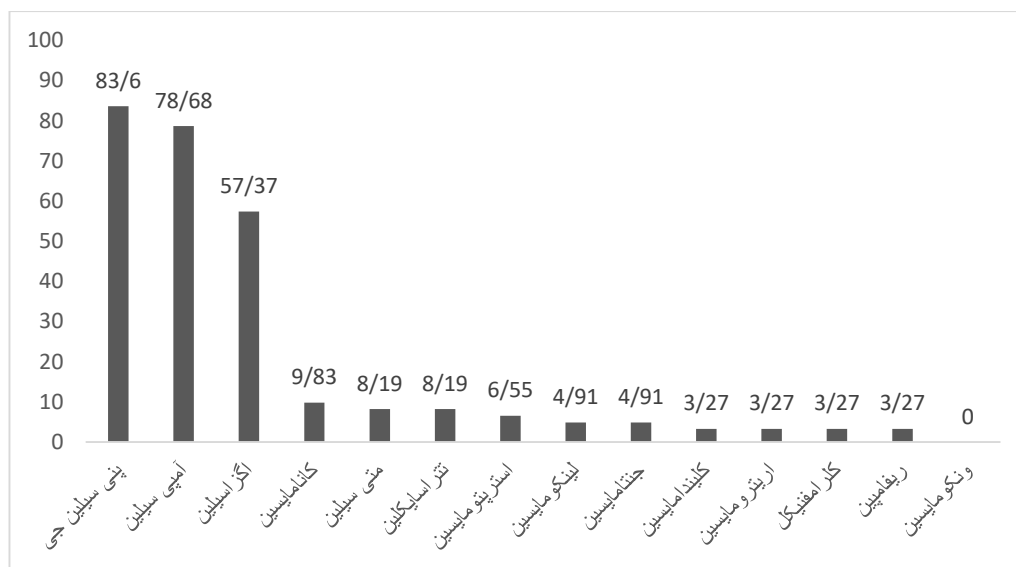
نتایج مربوط به ردیابی ژن *16srRNA*/استافیلوکوکوس

اورئوس

پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* درحضور توالی ژن *16srRNA*، باکتری‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفتند.

سیلین و اگزاسیلین ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$) اما بین انواع گوشت با سایر آنتی-بیوتیک‌ها ارتباط آماری معناداری مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0.05$).

مقاومت به ونکومايسين در هیچ یک از جدایه‌ها گزارش نشده است. نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمودار ۱ نشان داده شده است. براساس آزمون دقیق فیشر بین انواع گوشت با آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی



نمودار (۱): مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع گوشتی

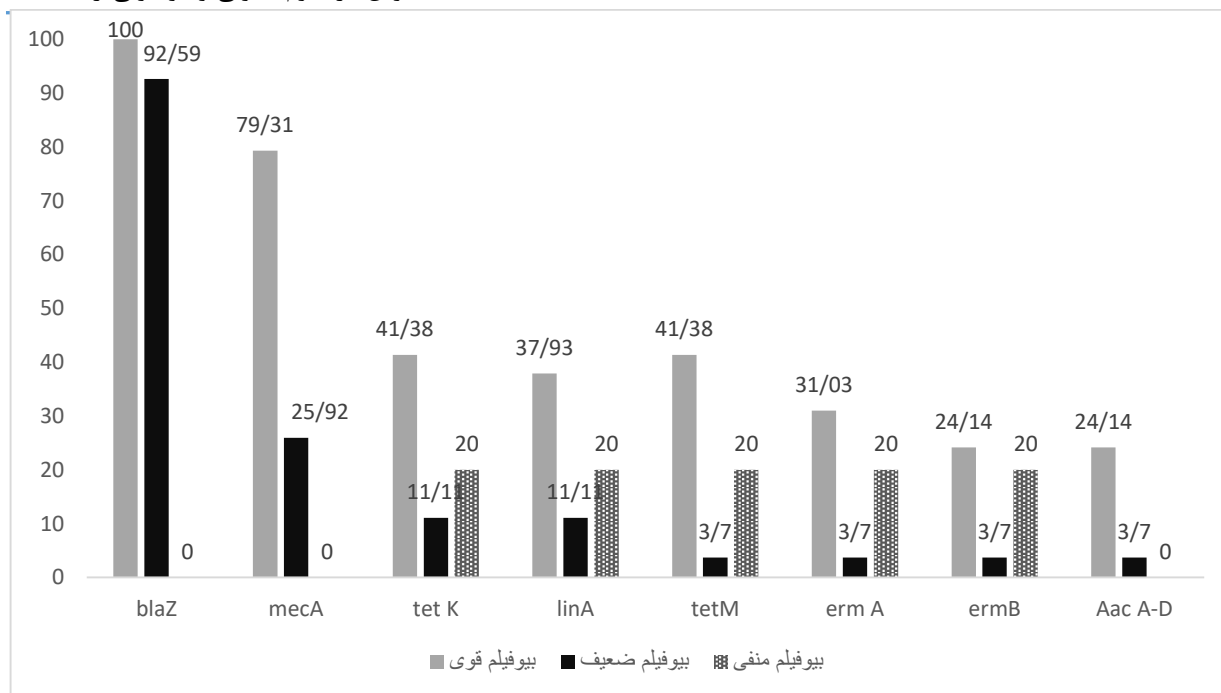
فیشر بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با بیوفیلیم منفی ارتباط آماری مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0.05$).

فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس

در این تحقیق فراوانی ژن‌های *ermA*, *ermB*, *Aca-D*, *tetM*, *linA*, *tetK*, *mecA* و *blaZ* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ژن *blaZ* (۱۰۰ درصد) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. فراوانی سایر ژن‌های دیگر به شرح زیر می‌باشد. *mecA* (۲۴/۱۴ درصد)، *tetK* (۴۱/۳۸ درصد)، *linA* (۳۷/۹۳ درصد)، *tetM* (۴۱/۳۸ درصد)، *ermA* (۳۱/۰۳ درصد)، *ermB* (۲۴/۱۴ درصد) و *Aca-D* (۲۴/۱۴ درصد).

همان‌گونه که ذکر گردید بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین و اگزاسیلین گزارش گردید. برحسب نتایج به‌دست آمده، جدایه‌های تولید کننده بیوفیلیم قوی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مذکور مقاومت بیشتری نسبت به جدایه‌های تولید کننده بیوفیلیم ضعیف و منفی داشتند. در تجزیه و تحلیل آماری با براساس آزمون کای دو بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با واکنش بیوفیلیم قوی ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$). هم‌چنین براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با واکنش بیوفیلیم ضعیف نیز ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$). اما براساس آزمون دقیق



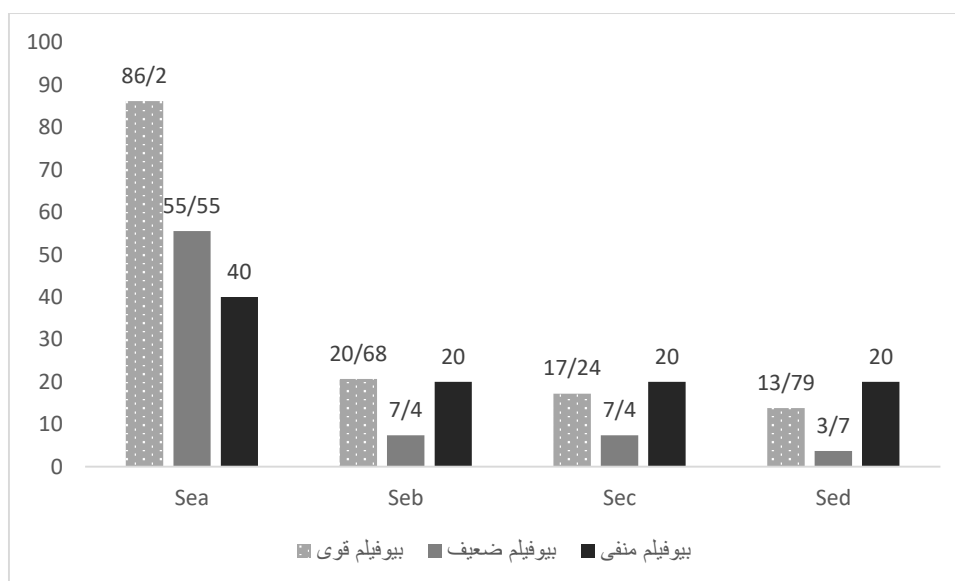
نمودار (۲) فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس واکنش بیوفیلیم

به روش PCR چند گانه‌ای استفاده شد. نتایج نشان داد که فراوانی حضور ژن‌های *sea*, *seb*, *sec* و *sed* در ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد می‌باشد. در این میان ژن *sea* با فراوانی ۳۹/۳۴ درصد شایع‌ترین ژن انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه می‌باشد

بر اساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مقاومت آنتی-بیوتیکی و تولید بیوفیلیم ارتباط آماری معنی داری وجود دارد ($p\text{-value} < 0.05$).

فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

جهت ارزیابی ژنوتیپی توان تولید انتروتوکسین در ایزوله‌های مورد مطالعه از ردیابی ژن‌های *sea*, *seb*, *sec* و *sed*



نمودار (۳) فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس واکنش بیوفیلیم

مشابه است، که شیوعی برابر با ۹/۵ درصد را گزارش کرده‌اند، این تشابه می‌تواند به علت تشابه سطح بهداشتی و هم‌چنین نحوه تولید و توزیع مواد غذایی در داخل کشور باشد (۱۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از عوامل مهم مسمومیت غذایی محسوب می‌شود که از طریق تولید بیوفیلیم در سطح فرآورده‌های غذایی سبب ایجاد بیماری‌های مزمن می‌گردد. بنابراین شناخت ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و مطالعه ایجاد بیوفیلیم توسط این باکتری و جنبه‌های مختلف تشکیل بیوفیلیم از اهمیت به سزایی برخوردار است. اخیراً اطلاعات متعددی مرتبط با فاکتورهای مؤثر در تولید بیوفیلیم در برخی از باکتری‌ها و نقش آن‌ها در بیماری‌زایی باکتری و تنظیم بیان این فاکتورها ارائه شده است؛ از جمله در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* که عنوان شده است در این باکتری تولید بیوفیلیم با تأثیر بر بیان برخی ژن‌ها و تحت تأثیر قراردادن شرایط متابولیکی باکتری صورت می‌پذیرد (۱۶).

تولید پلی ساکارید اتصالی بین سلولی تحت کنترل لوکوس ژنی *ica* می‌باشد که ژن‌های *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* و *icaR* تشکیل شده است. بیان این لوکوس ژنی تحت کنترل فاکتورهای محیطی و پروتئین‌های تنظیمی می‌باشد. به نظر می‌رسد تولید بیوفیلیم در ارتباط با بیان این لوکوس ژنی می‌باشد. مشخص گردیده سوبیه‌هایی که فاقد ژن *ica* می‌باشند، بیماری‌زا نیستند. از طرفی استقرار و تکثیر باکتری در سطوح مواد غذایی زمینه ساز تولید انتروتوکسین و تشدید بیماری و مسمومیت غذایی می‌شود. (۱۷). در تحقیق حاضر در روش میکروتیتر پلیت واکنش بیوفیلیم قوی ۴۷/۵۴ درصد، بیوفیلیم ضعیف ۴۴/۲۶ درصد گزارش گردید. ۸/۲ درصد جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلیم نبودند. در تحقیق انجام شده توسط خرمیان طوسی و همکاران که بر روی ۹۰ جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام در گاوداری‌های اطراف تهران صورت گرفت، ۳۶ جدایه (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلیم متوسط و ۴ جدایه (۴۳/۳ درصد) واکنش بیوفیلیم قوی و ۵۰ جدایه (۴۳/۳ درصد) واکنش بیوفیلیم ضعیف داشتند. شیوع ژن‌های *icaA*

براساس آزمون کای‌دو بین ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین با واکنش بیوفیلیم قوی و ضعیف ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$) اما براساس آزمون قیق فیشر بین ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین با بیوفیلیم منفی ارتباط آماری وجود نداشت ($p\text{-value} > 0.05$)

بحث

از نظر سازمان جهانی بهداشت غذاهای گوشتی که از پر مصرف‌ترین غذاها در جوامع مختلف محسوب می‌شوند، در گروه غذاهای پرخطر شناخته شده‌اند و سالانه گزارشات متعددی در زمینه مسمومیت‌های غذایی ارائه می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از عوامل مهم مسمومیت غذایی محسوب می‌شود و از طریق تولید بیوفیلیم در سطح فرآورده‌های غذایی سبب ایجاد بیماری‌های مزمن می‌گردد. بنابراین شناخت ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و مطالعه ایجاد بیوفیلیم توسط این باکتری و جنبه‌های مختلف تشکیل بیوفیلیم از اهمیت به سزایی برخوردار است لذا در این تحقیق ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ارتباط با آلوده سازی مواد گوشتی توسط این باکتری و توانایی تشکیل بیوفیلیم در فرآورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار می‌گیرد (۱۳). در مورد میزان آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مناطق مختلف اطلاعات پراکنده ایی وجود دارد. شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه حاضر ۱۳/۸۶ می‌باشد که بیشترین آلودگی در گوشت گاو و کمترین آلودگی در ناگت مرغ گزارش گردید که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین نوع نمونه و آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ارتباط آماری معنا دار گزارش گردید. در تحقیق معشوف و همکاران که بر روی ۱۰۵۰ نمونه ماده غذایی صورت گرفت، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۹۸ ایزوله (۹/۳ درصد) گزارش گردید (۱۴). در مطالعه Aydin و همکاران در ترکیه شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی ۱۳/۸ درصد گزارش شد که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، مشابه می‌باشد (۷). در مطالعه‌ی انجام شده توسط حسینی و همکاران شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی ۹/۶ درصد گزارش شد که با مطالعه اشراقی و همکاران در شهر تهران

بودند. تنها ۱/۲۶ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمده از نمونه‌های گوشت به تمامی ۲۶ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی حساس بوده و ۹۴/۶ درصد از جدایه‌ها به بیش از ۳ آنتی‌بیوتیک مقاومت یا حساسیت حدواسط داشتند و ۱۲٪ جدایه‌ها به بیش از ۱۰ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (۲۴). در مطالعه‌ی Xing و همکاران ۹۸/۴ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به بیش از یک آنتی‌بیوتیک و ۵۸/۶ درصد به بیش از سه آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (۲۵).

در تحقیق حاضر ژن *blaZ* در ۵۴ جدایه (۸۸/۵۲ درصد)، *mecA* (کد کننده مقاومت به متی‌سیلین)، در ۳۰ جدایه (۴۹/۱۸ درصد)، *tetK* (کد کننده مقاومت به تتراسیکلین)، در ۱۶ جدایه (۲۶/۲۲ درصد)، *linA* در ۱۵ جدایه (۳۶/۰۵ درصد)، *tetM* در ۱۴ جدایه (۲۲/۹۵ درصد) *ermA* در ۱۱ جدایه (۱۸/۰۳ درصد)، *ermB* (کد کننده مقاومت به اریترومایسین) در ۹ جدایه (۴/۷۵ درصد) و *aac-D* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها)، در ۸ جدایه (۱۳/۱۱ درصد) گزارش شد. در تجزیه و تحلیل آماری براساس آزمون کای دو بین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی با بیوفیلیم قوی و بیوفیلیم ضعیف ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید. ($p\text{-value} < 0.05$). اما براساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی با بیوفیلیم منفی رابطه معناداری آماری یافت نشد ($p\text{-value} > 0.05$). در تحقیق معشوف و همکاران که بر روی ۱۰۵۰ نمونه ماده غذایی صورت گرفت، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۹۸ ایزوله (۹/۳ درصد) و فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، ۷۷/۶ درصد گزارش گردید؛ به‌طوری‌که ژن *sea* (۲۵/۵ درصد)، *see* (۱۸/۴ درصد)، *sed* (۱۱/۲ درصد)، *sec* (۵/۱ درصد) و *seb* (۴/۱ درصد) گزارش گردید (۱۴). در تحقیق حاضر فراوانی حضور ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed* در ایزوله‌های مورد بررسی به‌ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط عزیز خانی و نوریان که بر روی ۱۵۰ نمونه گوشت چرخ شده گوساله (۹۵ نمونه خام و ۵۵ نمونه طبخ شده) صورت گرفت، ۶۸ درصد از نمونه‌ها آلوده به

icaD و در این تحقیق ۸۸/۷ درصد گزارش گردید (۱۸). استفاده بی‌رویه و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌های قلمرو پزشکی در کشاورزی به‌عنوان محرک رشد یا به‌عنوان عامل پیشگیری کننده با دوز کمتر از دوز درمان باعث ایجاد فشار انتخابی روی جمعیت‌های باکتریایی ساکن روده حیوانات و بروز مقاومت می‌شود. این گونه باکتری‌های مقاوم می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق فرآورده‌های دامی به انسان انتقال یافته و در انسان ایجاد بیماری کنند یا این-که مخزن انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها به باکتری‌های بیماری‌زای انسان باشند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* یک مساله‌ی مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می‌شود به‌گونه‌ای که شاهد افزایش روز افزون مقاومت این باکتری نسبت به گروه بتالاکتام و ونکومایسین می‌باشیم. به این ترتیب گردش سویه‌های مقاوم باکتری در محیط و به دنبال آن آلودگی آب و مواد غذایی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۲۱-۱۹). در تحقیق Ge و همکاران در آمریکا میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سال ۲۰۱۷ در نمونه‌های گوشت مورد مطالعه ۲۷/۹ درصد گزارش شد که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما بالاتر می‌باشد (۲۲). هم‌چنین نتایج حاصل از تحقیق ما آلودگی کمتری را از مقادیر گزارش شده توسط Tang و همکاران در سال ۲۰۱۷ را نشان می‌دهد که میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های گوشت ۶۸ درصد در دانمارک گزارش کردند (۲۳). در مطالعه حاضر ۳۱ جدایه (۵۰/۸۱ درصد) به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، ریفامپین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، لینکومایسین و کلیندامایسین موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های گوشت بوده به‌طوری‌که حتی نسبت به ونکومایسین هیچ مقاومتی مشاهده نشد. در مقابل مقاومت بسیار بالا به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و اگزاسیلین مشاهده گردید. در مطالعه Wu و همکاران که در چین ۱۸۵۰ نمونه گوشت خام و محصولات گوشتی از ۳۹ شهر چین جمع‌آوری کرده بودند ۳۵ درصد نمونه‌ها با *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده

غذایی را مشخص کرد. افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از مواد غذایی می‌تواند یک مشکل جدی برای سلامت جامعه باشد. بنابراین باید تصمیمات جدی برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و افزایش سطح بهداشتی اتخاذ گردد.

در مجموع نتایج این تحقیق میزان آلودگی گوشت و فراورده‌های گوشتی با *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱۳/۸۶ درصد نشان داد و غالب جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلم بودند. کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مهم پزشکی در صنعت پرورش دام می‌تواند در کاهش مقاومت به این آنتی-بیوتیک‌ها دخیل باشد. بنابراین باید کنترل مناسبی بر میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات با کاربرد غذایی و بهداشت مواد غذایی در مراحل مختلف تهیه آن‌ها از پرورش دام، کشتارگاه، بسته بندی و..... صورت گیرد تا از پیدایش و انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت شود

استافیلوکوکوس اورئوس بودند. در میان ۹۲ جدایه، ۲۳ جدایه (۲۵ درصد) حامل ژن کد کننده انترتوکسین بودند (۲۶). در تحقیق انجام شده توسط حسینی و همکاران، در همدان ۵۱۰ نوع ماده غذایی از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند و ۴۹ سویه (۹/۶۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله گردید. سویه‌ها به ترتیب بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به اریترومايسين و تتراسایکلین (۳۰/۶۱ درصد)، جنتامایسین (۲۸/۵۷ درصد)، کلیندامایسین (۲۶/۵۳ درصد)، سیپروفلوکساسین و ریفامپین (۲۴/۴۸ درصد)، تریمتوپریم/سولفامتاکسازول (۱۴/۲۸ درصد) و سفوکسیتین (۶/۱۰ درصد) داشتند (۱۵). در تحقیق مشعوف و همکاران، مقاومت به اریترومايسين، تتراسایکلین، جنتامایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین و ریفامپین به ترتیب ۳۰/۶ درصد، ۲۹/۶ درصد، ۲۷/۶ درصد، ۲۶/۵ درصد، ۲۴/۵ درصد و ۲۴/۵ درصد گزارش گردید (۱۴).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت خام بیشتر از محصولات گوشتی پخته می‌باشد، علت این امر آن است که شرایطی مانند pH و آب در دسترس در گوشت خام نسبت به محصولات گوشتی طبخ شده یا فرآوری شده برای رشد و فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس* مناسب‌تر است. علت اصلی آلودگی گوشت به این باکتری وقوع آلودگی ثانویه در اثر دستکاری گوشت توسط افراد بیمار، عدم شستن دست‌ها پیش از تماس با ماده غذایی و نگهداری طولانی مدت ماده غذایی در دمای محیط می‌باشد.

نتیجه گیری

باتوجه به این که *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی بالا در مواد غذایی وجود دارد، نباید نقش این میکروارگانیسم به عنوان یکی از عوامل مسمومیت نادیده گرفته شود. از آن جایی که انترتوکسین‌های این باکتری مقاوم به حرارت و پروتئاز هستند و در پروسه گرم کردن و پختن از بین نمی‌روند، میزان بالای شیوع ژن‌های انترتوکسین در این مطالعه، نقش بالقوه این باکتری برای ایجاد مسمومیت

1. Wu, D., Li, X., Yang, Y., Zheng, Y., Wang, C., Deng, L., and 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 Microb. 60 (1): 35- 45.
2. Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Asgarifar, A., and Momeni, M. 2013. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. J Appl Poult Res. 22(4): 913–921.
3. Steinberg, J.P., Clark, C.C., and Hackman, B.O. 1996. Nosocomial and community acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. Clin Infect Di. 23(2): 255-259.
4. Eftekhari, F., Rezaee, R., Azad, M., Azimi, H., Goudarzi, H., and Goudarzi, M. 2017. Distribution of adhesion and toxin genes in *staphylococcus aureus* strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU. Arch Pediatr Infect Dis. 5(1):1-8.
5. Imani-Fooladi, A.A., Riazipour, M., and Sattari, M. 2010. Molecular and serological detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. J Shahrekord Uni Med Sci. 11: 19-26.
6. Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., and et al. 2004. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol. 42(11): 4947-455.
7. Aydin, A., Sudagidan, M., and Muratoglu, K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int J Food Microbiol. 148 (2): 99-106.
8. Hoffman, L.R., Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.L. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature, 436: 1171–1175.
9. CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentyfifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute
10. Kaplan, J.B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs. 34: 737–751.
11. Katsande, S., Matope, M.N., and Pfukenyi, D.M. 2013. Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. J Vet Res. 80: 523-527.
12. Kateete, D.P., Kabugo, U., Baluku, H., Nyakarahuka, L., Kyobe, S., and Okee, M. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cow with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PLoS ONE. 8: e63413.
13. Eshraghi, S., Salehipour, Z., Pourmand, M.R., Bakhtyari, R., Mardani, N., Amiri, S., and 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): 1145-1152.
14. Mashouf, R.Y., Hosseini, S.M., Mousavi, S.M., and Arabestani, M.R. 2015. Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal originated foods in West of Iran. Oman Med J. 30: 283-290.

16. Hosseini, S.M., Arabestani, M.R., Mahmoodi, H., and Farhangara, E. 2015. Prevalence of G, H, I, J enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern in *Staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. J Mazandaran Univ Med Sci. 25(123): 1-10.
17. Mack, D., Beckerb, P., Chatterjeec, I., Dobinskya, S., Knoblocha, JKM., and Petersb G. 2004. Mechanisms biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. Int J Med Microbiol. 294(2): 203-212.
18. Shojaei, M., Karimi, D.H., and Javadi, A. 2014. Distribution of genes encoding biofilm production in *S. aureus* isolated from raw milk in Kurdistan. J Food Hygiene. 14;4(14):1-8.
19. Khoramian, B., Emaneini, M.E., Bolourchi, M., and Eslampour, MA. 2009. Evaluation of the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Iran. J Comp Pathobiol; 6(4):109-114
20. Normanno, G., Corrente, M.L., and Salandra, G. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol. 2007; 219-22.
21. Founou, L.L., Founou, R.C., Essack, S.Y. 2016.. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. Frontiers microbiol. 15;7:1881-1890.
22. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., and Lipsitch, M. 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? Evolutionary applications. 8:240-247.
23. Ge B., Mukherjee, S., Hsu, C.H., Davis, J.A, Tran., T.T.T., and Yang Q. 2017. MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US retail meats, 2010-2011. Food Microbiol. 62:289-297.
24. Tang., Y, Larsen., J, Kjeldgaard., J, Andersen., P.S., Skov., R, and Ingmer., H. 2017. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. Int j Food Microbiol. 2017; 249:72- 276.
25. Wu., S, Huang., J, Wu., Q, Zhang., J, Zhang., F, and Yang., X. 2018. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. Frontiers Microbiol. 9 (2):2767-2783.
26. Xing., X, Li., G., Zhang, W., Wang, X., Xia, X., and Yang. 2014. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and enterotoxin gene detection of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods in Shaanxi, People's Republic of China. Journal of food protection. 2014;77:331-334.
27. عزیزخانی، مریم، و توریان، فهیمه. (۱۳۹۸). ارزیابی فراوانی ژنهای انتروتوکسین زای *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های گوشت چرخ شده اغذیه فروشی‌های استان مازندران. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۴ (۱): ۶۵-۷۲

Prevalence of antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* producing biofilm isolated from meat and meat products

Antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus*

Kobra Abbasi¹, Manochehr Momeni Shahraki^{* 2}

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: momeniman@yahoo.com

Abstract:

Staphylococcus aureus is one of the pathogens that can easily infect meat. The present study was performed to evaluate the antimicrobial resistance and distribution of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates isolated from raw meat and meat products. 440 samples of raw meat and meat products were collected from suppliers in Shahrekord city and the presence of *Staphylococcus aureus* was examined using biochemical and molecular tests. The most common enterotoxin genes and genes encoding antibiotic resistance were examined in the presence of specific primers. In this study, out of 440 samples, 61 samples (13.86%) were positive for *Staphylococcus aureus*. Biofilm reaction was observed in 56 isolates (91.8%). The highest resistance to penicillin (83.60%) and the lowest resistance to vancomycin (0%). The frequency of the presence of *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes in the studied isolates were reported 39.34%, 27.86%, 26.22% and 37.70%, respectively.

Considering that there was a statistically significant relationship between antibiotic resistance genes and biofilm production, it is clear that antibiotic resistance in strains that are able to produce biofilm compared to strains that are not able to produce biofilms are more

Key Words: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Enterotoxin, Meat

شناسایی باکتری‌های ایجاد کننده عفونت ادراری در بیماران دیابتی در

شهرستان شهرکرد

محمد رجبی^۱، پیام رازقی^۲

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

۲- گروه تکوین، دانشکده ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشکاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: drpayamrazeghi@gmail.com

چکیده

بیماران دیابتی به عفونت بسیار حساس بوده و ایجاد عفونت در آن‌ها بسیار مخاطره انگیز می باشد. با توجه به این که عفونت ادراری شایع ترین عفونت در این بیماران می باشد، لذا شناخت عوامل شایع ایجاد کننده عفونت و به طبع آن انتخاب یک آنتی بیوتیک اثر بخش، می تواند گام موثری در درمان بیماران دیابتی داشته باشد. در این پژوهش با نمونه گیری از ادرار ۳۰۰ بیمار مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ در شهرستان شهرکرد، نمونه های دارای عفونت مشخص و میکروارگانیسم های عامل عفونت توسط کشت و تست های بیوشیمیایی جدا سازی شدند و تشخیص مولکولی توسط PCR برای اثبات وجود باکتری ها صورت پذیرفت. ارگانیسم شایع در این بیماران / شریشیا کلی بود. هم چنین ۷۰ درصد این بیماران زن بودند و با توجه به این که عفونت ادراری در بیماران دیابتی در سنین بالا اتفاق می افتد، اغلب بیماران باکتریوری بی علامت داشتند. لذا انجام معاینات دوره ای و کشت ادرار بیماران دیابتی به صورت تست های دوره ای شدیداً احساس می گردد و توصیه می شود که بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام، داروی موثر در درمان عفونت ادراری انتخاب گردد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد / شریشیا کلی با ۵۱٪ شایع ترین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری می باشد. در مطالعات انجام شده در سایر نقاط ایران و دنیا نیز این میکرو ارگانیسم به عنوان شایع ترین عامل مولد عفونت ادراری شناخته شده است.

واژگان کلیدی: باکتری، عفونت ادراری، دیابت.

مقدمه

سیستم ادراری به صورت معمول استریل و فاقد باکتری است ولی باکتری‌های کلونیزه شده در ناحیه پرینه که عمدتاً باکتری‌های موجود در رکتوم هستند از راه مجرای ادراری وارد مثانه می‌شوند. در شرایط معمول مکانیسم‌های دفاعی مانع رشد و تکثیر باکتری‌ها و بروز عفونت ادراری می‌گردد. در شرایطی که تعداد باکتری‌های وارد شده و یا شدت بیماری‌زایی آن‌ها زیاد باشد و یا قدرت دفاعی سیستم ادراری کاهش یافته باشد عفونت ادراری ایجاد می‌شود. تعریف عفونت ادراری یک پاسخ التهابی اوروتلیوم به تهاجم باکتری است که معمولاً همراه باکتریوری و پیوریاس است. باکتریوری به وجود باکتری در ادرار که به طور طبیعی بدون باکتری است اطلاق می‌گردد. باید توجه داشت که وجود باکتری در ادرار همیشه به معنای وجود باکتری در یوروتلیوم سیستم ادراری نمی‌باشد (۱-۵). گاهی علی‌رغم وجود باکتری در یوروتلیوم باکتریوری دیده نمی‌شود. دیابت^۹ یا بیماری قند^۱ یک اختلال متابولیک در بدن است. در این بیماری توانایی تولید انسولین در بدن از بین می‌رود و یا بدن در برابر انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد (۱-۳). دیابت از جمله شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های موجود در جهان می‌باشد و مبتلایان خود را در معرض خطر بالایی از نظر ابتلا به عفونت قرار می‌دهد (۵-۸). در این میان دستگاه ادراری شایع‌ترین محل بروز عفونت در بین مبتلایان به دیابت می‌باشد. دیابت به دلیل ایجاد چندین ناهنجاری در سیستم دفاعی، سبب مستعد شدن فرد به عفونت دستگاه ادراری می‌گردد (۴-۶). صدمات وارد شده در اعمال مختلف گلبول‌های سفید از جمله مهاجرت، فاگوسیتوز و کموتاکسی از جمله این ناهنجاری‌ها می‌باشند. علاوه بر این، نوروپاتی دیابتی نیز به علت نقص در تخلیه کامل مثانه، سبب ایجاد عفونت دستگاه ادراری می‌شود. غلظت‌های بالاتر قند در ادرار

ممکن است نقش مهمی در افزایش بروز عفونت دستگاه ادراری در بیماران دیابتی بازی کند. خطر مرگ و میر زودرس، بیماری‌های قلبی، کلیوی، عصبی و نابینایی در افراد دیابتی دو برابر افراد غیردیابتی است. بنابراین نیاز به شناخت موثر و سریع عفونت ادراری و درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌هایی که میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری کم‌ترین درجه مقاومت را به آن نشان می‌دهند، به شدت احساس می‌شود. سویه‌های /شریشیا کلی یوروپاتوژن شایع‌ترین سویه‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مهم‌ترین خصوصیت سویه‌های /شریشیا کلی یوروپاتوژن توانایی کلونیزه شدن آن‌ها در سطح سلول‌های یوروپیتلیوم میزبان می‌باشد (۹،۸). شیوع دیابت در سه دهه اخیر سه برابر شده و بر طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۰ تقریباً ۳۴۶ میلیون نفر در سرتاسر جهان به دیابت مبتلا هستند. بر طبق یک ارزیابی از شیوع جهانی دیابت در بین بالغین تخمین زده می‌شود، شیوع دیابت در بین بالغین به ۴۳۹ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ برسد. بیماری دیابت از جمله شایع‌ترین اختلالات غدد درون ریز است (۱۰). این تحقیق با هدف شناسایی باکتری‌های ایجاد کننده عفونت ادراری در بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر یک در یک فاصله زمانی شش ماهه، در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۱۳۹۹ بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران دیابتی مشکوک به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت. ۵ تا ۱۰ سی سی نمونه ادرار توسط بیمار و از طریق تکنیک ادرار وسط در ظروف استریل جمع‌آوری و بلافاصله پس از نمونه‌گیری، جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی و تشخیص نوع باکتری به آزمایشگاه ارسال شدند. هنگام جمع‌آوری نمونه

1 - Diabetes Mellitus

9- Diabetes

اطلاعاتی هم چون سن، جنس، سابقه ابتلا به عفونت دستگاه ادراری در گذشته، سابقه بستری شدن در بیمارستان و سابقه استفاده از سوند ادراری در فرم گردآوری اطلاعات ثبت شد.

نمونه ادرار میانی گرفته شده در بطری‌های استریل به محض رسیدن به آزمایشگاه کشت شد. کشت کمی بوده و با استفاده از لوپ کالیبره ۰/۰۱ میلی لیتر، از نمونه ی ادرار سانتریفوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط‌های مک کانکی آگار (برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی) و بلاد آگار (برای شناسایی باکتری‌های گرم مثبت) کشت داده شدند. پس از انجام کشت به روش خطی، محیط‌های کشت داده شده به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. چنانچه در مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، رشدی در پلیت‌ها دیده نمی‌شد، ۲۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری شده و در صورت عدم رشد، به‌عنوان کشت منفی ثبت می‌شد. بعد از طی گرمخانه گذاری، تعداد کل باکتری‌های رشد کرده در میلی لیتر ادرار با ضرب کردن تعداد کلنی‌های ظاهر شده در محیط بلاد آگار در ۱۰۰ تعیین و با سیل‌های گرم منفی از نظر مورفولوژی در محیط EMB یا مک کانکی، مورد بررسی قرار گرفتند. شمارش کمتر از ۱۰۰۰ عدد عموماً نشانگر آلودگی نبود. در صورتی که بین هزار تا یک صد هزار کلنی (۱۰^۳ تا ۱۰^۵) در یک میلی لیتر ادرار به دست می‌آمد، احتمال عفونت وجود داشت که به کمک تکرار کشت، مشخص می‌شد. شمارش یک صد هزار و بالاتر در هر میلی لیتر ادرار (10⁵ CFU/ml)، نشانگر عفونت ادراری بود و به عنوان یک کشت مثبت در نظر گرفته شد و سایر آزمایشات در مورد آن‌ها صورت گرفت. در مورد باکتری *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، تعداد بیش از ده هزار باکتری در میلی لیتر ادرار (10⁴ CFU/ml) نیز مثبت تلقی گردید (۱۱، ۱۲).

بیمارانی که دارای علائم بالینی از جمله تب، سوزش ادرار، تکرر ادرار و ... بودند به عنوان باکتریوری با علامت و بیمارانی که کشت ادراری آن‌ها مثبت بوده ولی علائم بالینی مشخصی نداشتند، به عنوان بیماران دارای باکتریوری بدون علامت قلمداد شدند. به منظور تشخیص مولکولی و تأیید تشخیص باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن^۱ روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر ساخت شرکت مرک آلمان، به عنوان منبع برای استخراج DNA، مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ میکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشد یافته در محیط‌های کشت مورد بررسی (هر نمونه به شکل جداگانه)، با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل^۲ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد (۶۰). بعد از آماده سازی نمونه های DNA، واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط دستگاه ترمال سایکلر ایندورف^۳ ساخت کشور آلمان انجام گرفت. به منظور تأیید تشخیص باکتری‌ها، پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن 16srRNA طراحی گردیدند (۱۳).

پس از مشخص شدن نمونه های UTI مثبت، تعیین هویت باکتری‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت تشخیص مولکولی برای باکتری‌های /شریشیا کلی، کلبسیلا، پروتئوس، انتروباکتر، سیتروباکتر، سینتوباکتر^۴، سراسیا، پروویدنسیا^۵، مورگانلا^۶، لئودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس صورت پذیرفت. به منظور شناسایی باکتری‌های گرم منفی از تست‌هایی نظیر IMViC، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده گردید (۱۱، ۱۲).

¹ Acinetobacter	4
¹ Providensia	5
¹ Morganella	6

¹ Boiling	1
¹ Distilled Water	2
¹ Eppendorf thermal cycler	3

جدول (۱): تست های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی باکتری های گرم منفی (۷۱).

نوع باکتری	تولید اندول	متیل رد	ووزس پروسکائر	سیترات	H ₂ S	اوره	لیزین دکربوکسیلاز
اشریشیا کلی	+	+	-	-	-	-	-
کلبسیلا پنومونیه	-	-	+	+	-	+	+
پروتئوس	-	+	-	+	+	+	-
اسنیتوباکتر	-	-	-	+/-	-	-	-
سیتروباکتر	-	+	-	+	+	+/-	-
انتروباکتر	-	-	+	+	-	-	+
پروویدنسیا	-	-	-	+	-	+	-
مورگانلا	+	+	-	-	+/-	+	-

باکتری های لاکتوز مثبت رشد کرده در محیط مک کانکی جهت بررسی حضور / اشریشیا کلی، کلبسیلا، سراشیا و انتروباکتر مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱،۱۲).

از آن جا که این باکتری لاکتوز منفی می باشد، جهت جداسازی آن از باکتری های لاکتوز منفی رشد کرده در محیط مک کانکی برداشت و جهت بررسی تولید پیگمان در محیط نوترینت آگارکشت داده شدند. هم چنین تست های کاتالاز و اکسیداز نیز در مورد این باکتری انجام شد (۱۱،۱۲).

د) جداسازی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس:

باکتری های غیر همولیتیک رشد یافته بر روی محیط بلاد آگار، جهت بررسی استافیلوکوکوس / پیدرمیدیس رنگ آمیزی گرم در مورد آن ها صورت گرفت. با مشاهده کوکسی های گرم مثبت، تست هایی نظیر تخمیر قند مانیتول، بررسی مقاومت به نووبیوسین، DNase و اوره آز مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱،۱۲).
پرایمرهای مورد استفاده برای تایید تشخیص باکتری ها که در این تحقیق توسط نرم افزار Gene runner ورژن ۳/۰۱ طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید (۱۳).

الف) جداسازی باکتری های لاکتوز مثبت رشد کرده بر روی محیط مک کانکی آگار:

کلنی های مشکوک به اشریشیا کلی در محیط EMB آگار ساخت شرکت مرک آلمان، انکوبه گذاری شدند. کلنی های سبز متالیک با جلای فلزی رشد کرده در این محیط به عنوان باکتری اشریشیا کلی مورد پذیرش قرار گرفتند. جهت جداسازی سایر باکتری های لاکتوز مثبت از هر پلیت، یک کلنی برداشت و سایر تست های بیوشیمیایی شامل IMViC، کشت در محیط TSI و اوره، در مورد آن ها انجام شد (۱۱،۱۲).

ب) جداسازی باکتری های لاکتوز منفی رشد کرده بر روی محیط مک کانکی آگار:

جهت بررسی باکتری های پروتئوس، پروویدنسیا، مورگانلا و استینوباکتر نیز از هر پلیت یک کلنی برداشت و تست های بیوشیمیایی شامل IMViC، کشت در محیط TSI و اوره در مورد آن ها انجام شد (۱۳).

ج) جداسازی پseudomonas آئروژینوزا:

جدول (۲): توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تایید تشخیص باکتری های عامل UTI در بیماران دیابتی

نام باکتری	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (bp)	دمای انلینگ
<i>Escherichia coli</i>	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3' 5'- CCGTCAATTCATTTGAGTTT -3'	۹۱۹	۵۹
<i>Kelebiella pneumoniae</i>	5'- CAAGTCGAGCGGTAGCACAGAG -3' 5'- ACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG -3'	۲۷۴	۶۲
<i>Proteus spp</i>	5'- ACTTGGGAATTGCATCTGAAACTG -3' 5'- ACATCGTTTACAGCGTGGACTACC -3'	۲۰۱	۶۴
<i>Enterobacter spp</i>	5'- ATGTCTGGGAAACTGCCTGATG -3' 5'- CGGGTAACGTCAATAGACAAGG -3'	۳۷۲	۶۴
<i>Citrobacter spp</i>	5'- TAATACCGCATAACGTCGCAAG -3' 5'- CTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATG -3'	۳۳۱	۶۳
<i>Acinetobacter spp</i>	5'- ATGCAAGTCGAGCGGAGATGAG -3' 5'- TACCCCACTAAGTCTAATCCG -3'	۲۰۲	۶۵
<i>Serratia marcescens</i>	5'- TGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC -3' 5'- AACCAACATTCCACAACACGAG -3'	۳۲۰	۶۵
<i>Morganella spp</i>	5'- ATAATACTACAGGAAACGGTCGCTAATAC -3' 5'- CACCTTCCTCCCGACTGAAAGTAC -3'	۳۰۸	۶۵
<i>Providencia spp</i>	5'- GTAGTCCACGCTGTAAACGATGTC -3' 5'- TCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGT -3'	۲۰۲	۶۳
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5'- AATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC -3' 5'- TCAGTGTCAAGTATCAGTCCAGGTG -3'	۲۹۵	۶۱
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5'- AAGCTGTAACAAAAGGTATTAAGGAAC -3' 5'- TTACCTGTGATTGGCAAATATAATAG -3'	۲۸۱	۶۱

آزمون PCR برای هر ژن به صورت جداگانه و در حجم ۲۵ هر پرایمر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ساخت شرکت سیناژن، ۲/۵ میکرولیتر از DNA انجام گرفت. برنامه واکنش PCR در جدول (۳) نشان داده شده است (۱۴).

جدول (۳): برنامه واکنش PCR برای شناسایی باکتری های شایع عامل عفونت ادراری بیماران دیابتی

باکتری	برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز
<i>Escherichia coli</i>	1 cycle: 95 °C ----- 6 min. 31 cycle: 95 °C ----- 45 s 59 °C ----- 60 s 72 °C ----- 60 s 1 cycle: 72 °C ----- 5 min
<i>Kelebiella pneumoniae</i>	1 cycle: 94 °C ----- 1 min. 30 cycle:

	94 ^{0C} ----- 60 s 62 ^{0C} ----- 30 s 72 ^{0C} ----- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 5 min
<i>Proteus spp</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 1 min. 31 cycle: 95 ^{0C} ----- 45 s 64 ^{0C} ----- 30 s 72 ^{0C} ----- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 5 min
<i>Enterobacter spp</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 1 min. 31 cycle: 95 ^{0C} ----- 45 s 62 ^{0C} ----- 30 s 72 ^{0C} ----- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 5 min
<i>Citrobacter spp</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 1 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ----- 60 s 63 ^{0C} ----- 30 s 72 ^{0C} ----- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 5 min
<i>Acinetobacter spp</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 2 min. 30 cycle: 95 ^{0C} ----- 45 s 65 ^{0C} ----- 30 s 73 ^{0C} ----- 30 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 10 min
<i>Serratia marcescens</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 2 min. 30 cycle: 95 ^{0C} ----- 45 s 65 ^{0C} ----- 30 s 73 ^{0C} ----- 30 s 1 cycle: 72 ^{0C} ----- 10 min
<i>Morganella spp</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 2 min. 30 cycle: 95 ^{0C} ----- 45 s

	65 °C ----- 30 s
	73 °C ----- 30 s
	1 cycle:
	72 °C ----- 10 min
<i>Providencia spp</i>	1 cycle:
	95 °C ----- 6 min.
	31 cycle:
	95 °C ----- 45 s
	62 °C ----- 60 s
	72 °C ----- 60 s
	1 cycle:
	72 °C ----- 5 min
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 cycle:
	95 °C ----- 6 min.
	31 cycle:
	95 °C ----- 45 s
	61 °C ----- 60 s
	72 °C ----- 60 s
	1 cycle:
	72 °C ----- 5 min
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 cycle:
	95 °C ----- 6 min.
	31 cycle:
	95 °C ----- 45 s
	61 °C ----- 60 s
	72 °C ----- 60 s
	1 cycle:
	72 °C ----- 5 min

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

و یا بالاتر، عفونت ادراری محسوب شد که از این تعداد ۱۰۰ نفر (۳۳/۳۳٪) مبتلا به عفونت دستگاه ادراری تشخیص داده شدند که ۷۰ نفر (۲۳/۳۳٪) از افراد دیابتی مراجعه کننده دارای علائم بالینی نبوده و باکتریوری در آن‌ها از نوع بی علامت بود و در ۳۰ نفر (۱۰٪) باکتریوری دارای علامت از جمله: تب، سوزش ادرار، تکرر ادرار و ... بودند.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS و آزمون Chi-Square و تایید این آزمون با تست فیشر^{۱۷} استفاده گردید. در برخی آزمون‌های صورت گرفته، سطح معنی داری کوچک تر از ۱ درصد ($P < 0.01$) و در بقیه تست‌ها، سطح معنی داری کوچک تر از ۵ درصد ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی

پس از شمارش کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط بلاد آگار، تعداد 10^5 باکتری در هر میلی لیتر ادرار

¹ Fisher's Exact Test

جدول (۲): تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری

بیماران دیابتی مورد مطالعه	بیماران دیابتی مبتلا به UTI	بیماران دیابتی دارای علائم	بیماران دیابتی بدون علائم UTI	
تعداد	۳۰۰	۱۰۰	۷۰	۳۰
درصد	٪ ۱۰۰	٪ ۳۳/۳۳	۲۳٪/۳۳	۱۰٪

از ۱۰۰ بیمار دیابتی مبتلا به عفونت دستگاه ادراری ۷۰ نفر زن (۰/۷۰٪) و ۳۰ نفر مرد (۰/۳۰٪) بودند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین جنسیت و ابتلا به عفونت

(value=0/012<0/05)

جدول (۳): تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری بر اساس جنسیت

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

از ۱۰۰ نفر بیمار دیابتی مبتلا به UTI، ۸۰ نفر (۰/۸۰٪) عفونت ادراری مرتبط معنی داری مشاهده گردید (p-) قبل از عفونت ادراری مبتلا شده بودند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین سابقه عفونت قبلی و ابتلا به

(value=0/000<0/05)

جدول (۴): تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری با سابقه عفونت ادراری

سابقه عفونت ادراری	بیماران دیابتی مبتلا به UTI		بیماران دیابتی عدم مبتلا به UTI		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
دارند	۸۰	۸۰	۳۰	۱۵	۰/۰۰۰
ندارند	۲۰	۲۰	۱۷۰	۸۵	

از ۱۰۰ نفر بیمار دیابتی مبتلا به عفونت ادراری ۲۰ نفر (۰/۲۰٪) سابقه بستری شدن در بیمارستان را داشتند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین

ابتلا به عفونت ادراری و سابقه بستری شدن در بیمارستان ارتباط معنی دار مشاهده گردید (p-) (value=0/000<0/05)

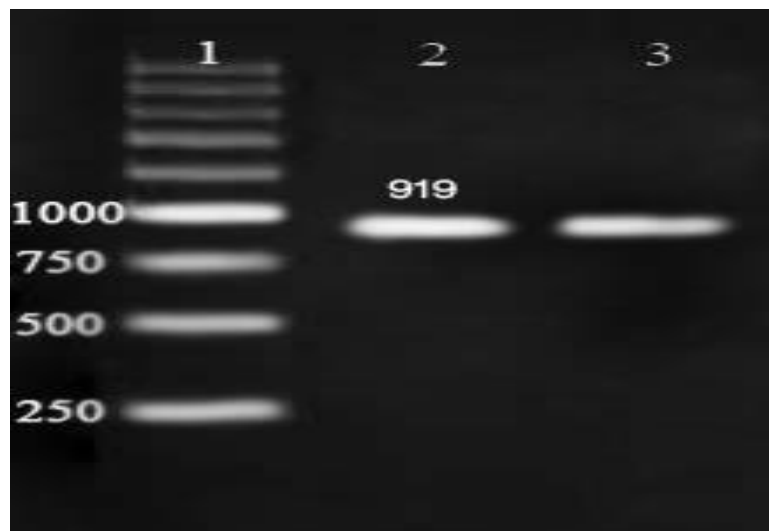
جدول (۵): تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری بر اساس سابقه بستری شدن در بیمارستان

p-value	بیماران دیابتی عدم مبتلا به UTI		بیماران دیابتی مبتلا به UTI		سابقه بستری در بیمارستان
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰/۰۰۱	۷/۵	۱۵	۲۰	۲۰	دارند
	۹۲/۵	۱۸۵	۸۰	۸۰	ندارند

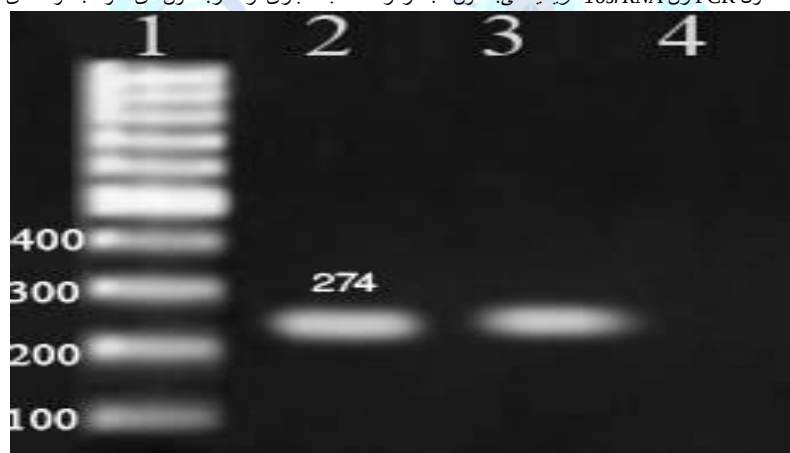
از ۱۰۰ نفر بیمار دیابتی مبتلا به عفونت ادراری و سابقه استفاده از سوند ارتباط معنی داری مشاهده نگردید ($p\text{-value}=0/102>0/05$)
 ۱۰ نفر از سوند ادراری استفاده کرده اند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین ابتلا به عفونت ادراری
 جدول (۶): تعداد و درصد بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری بر اساس سابقه استفاده از سوند

p-value	بیماران دیابتی عدم مبتلا به UTI		بیماران دیابتی مبتلا به UTI		سابقه استفاده از سوند
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰/۱۰۲	۵	۱۰	۱۰	۱۰	دارند
	۹۵	۱۹۰	۹۰	۹۰	ندارند

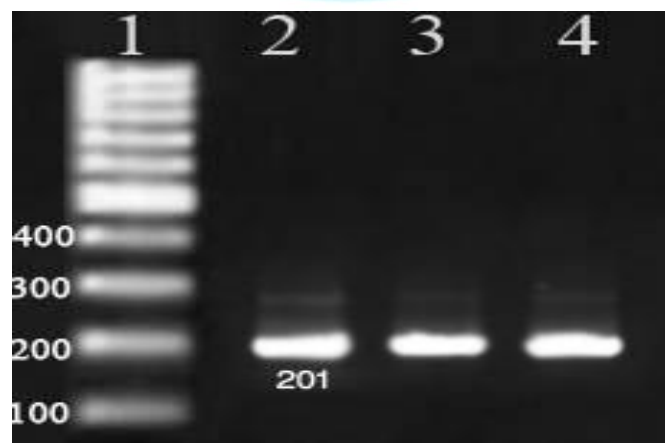
بافتهای تشکیل شده در ژل الکتروفورز، وجود DNA باکتری‌های /شریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس، /ستافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، /سنتوباکتر، سیتروباکتر، انتروباکتر، سودوموناس آئروژینوزا و پروویدنسها را اثبات نمود لازم به ذکر است که باکتری های سریشیا مارسسنس و مورگانلا در آزمون PCR یافت نشدند. در شکل‌های زیر طول محصول PCR حاصل از انجام آزمایش نشان داده شده است.



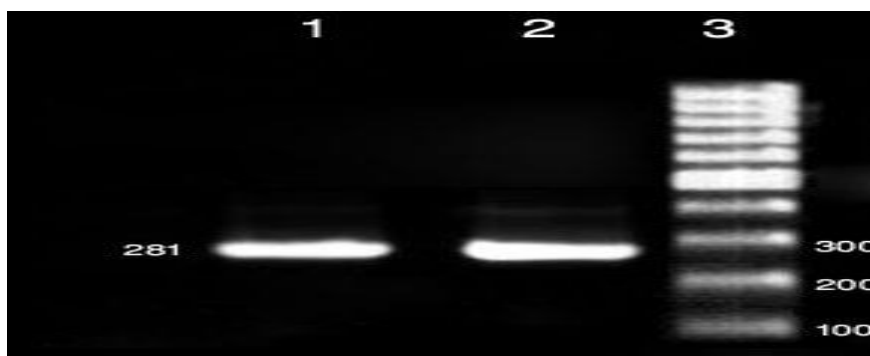
شکل (۱): الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA* شریشیا کلی. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز. ستون‌های ۲ و ۳: نمونه‌های مثبت دارای باند ۹۱۹



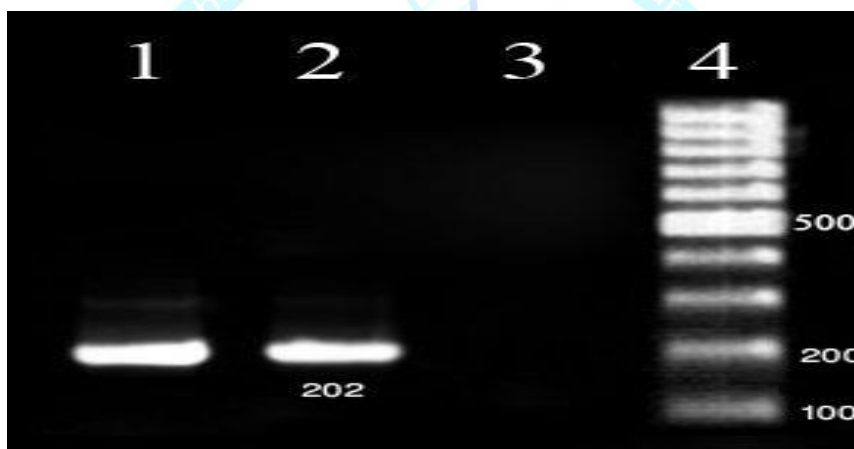
جفت بازی شکل (۲): الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA* کلپسیلا پنومونیه. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز. شماره‌های ۲ و ۳: نمونه‌های مثبت از نظر آلودگی به کلپسیلا پنومونیه (دارای باند ۲۷۴ جفت بازی). شماره ۴: کنترل منفی.



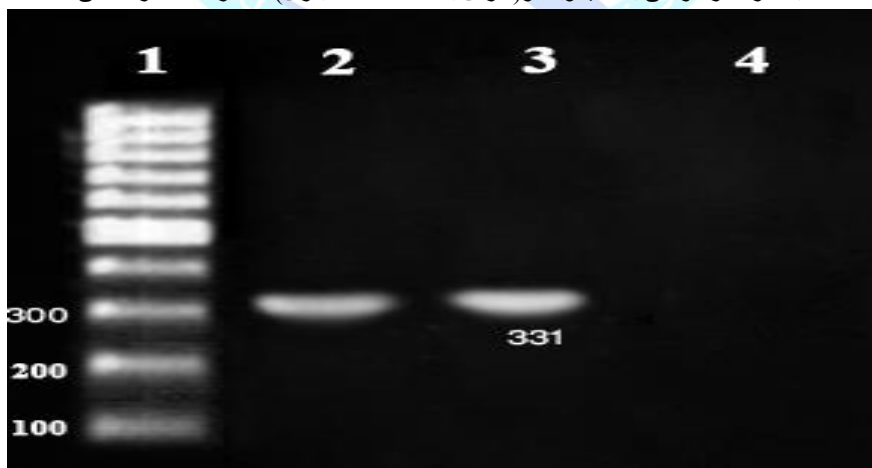
شکل (۳): الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA* پروتئوس. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز. شماره‌های ۲ تا ۴: نمونه‌های مثبت از نظر آلودگی به پروتئوس (دارای باند ۲۰۱ جفت بازی).



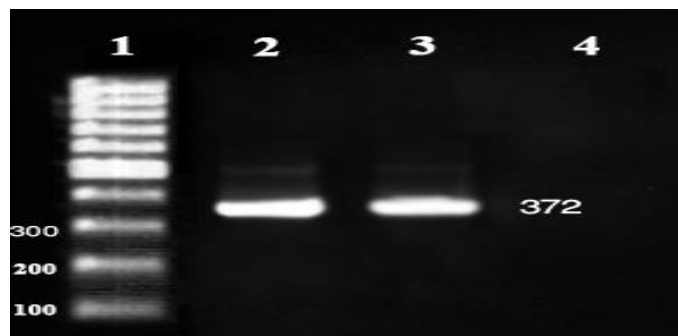
شکل (۴): الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA* استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس. شماره ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز. شماره های ۱ و ۲: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (دارای باند ۲۸۱ جفت بازی).



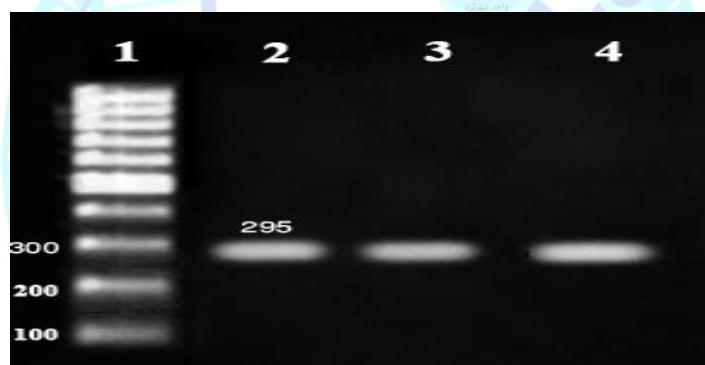
شکل (۵): الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA* سینتوباکتر. شماره ۴: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز. شماره های ۱ و ۲: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به سینتوباکتر (دارای باند ۲۰۲ جفت بازی). شماره ۳: کنترل منفی.



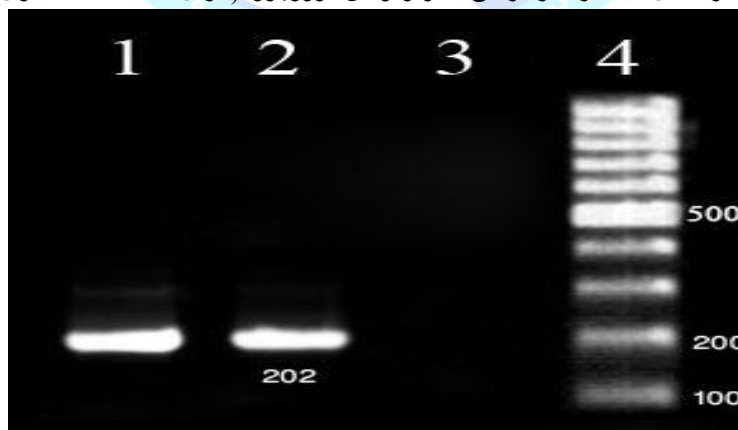
شکل (۶): الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* سیتروباکتر. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز. شماره های ۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به سیتروباکتر (دارای باند ۳۳۱ جفت بازی). شماره ۴: کنترل منفی.



شکل (۷): الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* انتروباکتر. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز. شماره های ۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به انتروباکتر (دارای باند ۳۷۲ جفت بازی). شماره ۴: کنترل منفی.



شکل (۸): الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* سودوموناس آئروژینوزا. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز. شماره های ۲ تا ۴: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به سودوموناس آئروژینوزا (دارای باند ۲۹۵ جفت بازی).



شکل (۹): الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA* پرووینسیا. شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز. شماره های ۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر آلودگی به پرووینسیا (دارای باند ۲۰۲ جفت بازی). شماره ۴: کنترل منفی.

باکتری‌های ایزوله شده

۱۰٪، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۸٪، اسنیتوباکتر

۵٪، سیتروباکتر ۴٪، انتروباکتر ۳٪، سودوموناس آئروژینوزا

۱٪ و پرووینسیا ۱٪ برآورد گردید.

از ۱۰۰ بیمار دیابتی مبتلا به عفونت ادراری، آلودگی به

اشریشیا کلی ۵۱٪، کلبسیلا پنومونیه ۱۷٪، پروتئوس

جدول (۷): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری

سم	میکروارگانی	اشریشیا کلی	پنومونه	کلبسیلا	پروتئوس	س	استافیلوکوک	اسنیوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آئروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۵۱	۱۷	۱۰	۸	۴	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
درصد	۵۱٪	۱۷٪	۱۰٪	۸٪	۴٪	۳٪	۱٪	۱٪	۱٪	۱٪	۱٪	۱٪	۱٪

از ۷۰ بیمار دیابتیک زن مبتلا به عفونت ادراری، آلودگی به /اشریشیا کلی در ۳۸ نمونه (۵۴/۳٪)، کلبسیلا پنومونه در ۱۱ نمونه (۱۵/۷٪)، پروتئوس ۷ نمونه (۱۰٪)، اس-تافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۵ نمونه (۷/۱٪)، اسنیوباکتر ۳ نمونه (۴/۳٪)، سیتروباکتر ۲ نمونه (۲/۹٪)، انتروباکتر ۲ نمونه (۲/۹٪)، سودوموناس آئروژینوزا ۱ نمونه (۱/۴٪) و آلودگی به پروویدنسیا در ۱ نمونه (۱/۴٪) گزارش گردید.

جدول (۸): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری بر اساس جنسیت

جنسیت زن	آلودگی در	اشریشیا کلی	پنومونه	کلبسیلا	پروتئوس	س	سپروفیتیک	وس	استافیلوکوک	اسنیوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آئروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۳۸	۱۱	۷	۵	۳	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
درصد	۵۴/۳٪	۱۵/۷٪	۱۰٪	۷/۱٪	۴/۳٪	۲/۹٪	۲/۹٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪	۱/۴٪

از ۳۰ بیمار دیابتیک مرد مبتلا به عفونت ادراری، آلودگی به /اشریشیا کلی در ۱۳ نمونه (۴۳/۳٪)، کلبسیلا پنومونه در ۶ نمونه (۲۰٪)، پروتئوس ۳ نمونه (۱۰٪)، اس-تافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۳ نمونه (۱۰٪)، اسنیوباکتر ۲ نمونه (۶/۷٪)، سیتروباکتر ۲ نمونه (۶/۷٪)، انتروباکتر ۱ نمونه (۳/۳٪)، سودوموناس آئروژینوزا و پروویدنسیا در هیچ کدام از نمونه ها گزارش نگردید.

جدول (۹): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مرد مبتلا به عفونت ادراری

جنسیت مرد	آلودگی در	اشریشیا کلی	پنومونه	کلبسیلا	پروتئوس	س	استافیلوکوک	اسنیوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آئروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۱۳	۶	۳	۳	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
درصد	۴۳/۳٪	۲۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۶/۷٪	۶/۷٪	۳/۳٪	۳/۳٪	۳/۳٪	۳/۳٪	۳/۳٪	۳/۳٪	۳/۳٪

سیتروباکتر ۱ نمونه (۵٪)، انتروباکتر ۱ نمونه (۵٪)،
پسودوموناس آئروژینوزا ۱ نمونه (۵٪) و آلودگی به
پروویدنسیا در ۱ نمونه (۵٪) گزارش گردید.

از ۲۰ بیمار دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری که
سابقه بستری شدن در بیمارستان را داشتند، آلودگی به
شریشیاکلی در ۱۰ نمونه (۵۰٪)، کلبسیلا پنومونیه در ۱
نمونه (۱۰٪)، پروتئوس ۲ نمونه (۱۰٪)، استافیلوکوکوس
ساپروفیتیکوس ۱ نمونه (۵٪)، سنیتوباکتر ۱ نمونه (۱٪)،

جدول (۱۰): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری با سابقه بستری شدن

بیمارستان را	بستری شدن	سابقه	کلی	شریشیا	پنومونیه	کلبسیلا	پروتئوس	وکوس	استافیلوک	سنیتوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آئروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۱۰	۲	۲	۱۰	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
درصد	۵۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۵٪	۵٪	۵٪	۵٪	۵٪	۵٪	۵٪	۵٪

سنیتوباکتر ۴ نمونه (۵٪)، سیتروباکتر ۳ نمونه (۳۷٪)،
انتروباکتر ۲ نمونه (۲۵٪) گزارش گردید. آلودگی به
پسودوموناس آئروژینوزا و پروویدنسیا در هیچ کدام از نمونه
ها گزارش نگردید.

از ۸۰ بیمار دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری که سابقه
بستری شدن در بیمارستان را نداشتند، آلودگی به
شریشیاکلی در ۴۱ نمونه (۵۱/۲٪)، کلبسیلا پنومونیه در
۱۵ نمونه (۱۸/۸٪)، پروتئوس ۸ نمونه (۱۰٪)،
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۷ نمونه (۸/۸٪)،

جدول (۱۱): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری با عدم سابقه بستری شدن

بستری	سابقه	بیمارانی که	آلودگی در	شریشیا	پنومونیه	کلبسیلا	پروتئوس	وکوس	استافیلوک	سنیتوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آئروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۴۱	۱۵	۸	۷	۴	۳	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
درصد	۵۱٪/۲	۱۸٪/۸	۱۰٪	۸٪/۸	۵٪	۳٪/۷	۲٪/۵	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪

ساپروفیتیکوس ۱ نمونه (۱۰٪)، سنیتوباکتر ۱ نمونه
(۱۰٪)، سیتروباکتر ۱ نمونه (۱۰٪)، انتروباکتر ۱ نمونه
(۱۰٪)، پسودوموناس آئروژینوزا ۱ نمونه (۱۰٪) و آلودگی
به پروویدنسیا در ۱ نمونه (۱۰٪) گزارش گردید.

از ۱۰ بیمار دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری که سابقه
استفاده از سوند را داشتند، آلودگی به/شریشیاکلی در ۲
نمونه (۲۰٪)، کلبسیلا پنومونیه در ۱ نمونه (۱۰٪)،
پروتئوس ۱۴ نمونه (۱۰٪)، استافیلوکوکوس

جدول (۱۲): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری با سابقه استفاده از سوند

از داشتند	سابقه از سوند را	بیمارانی که	آلودگی در	اشریشیا کلی	کلبسیلا پنومونیه	پروتئوس	سایروفیتیکوس	استافیلوکوکوس	اسیتوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آنروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
درصد	۲۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪	۱۰٪

از ۹۰ بیمار دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری که سابقه استفاده از سوند را نداشتند، آلودگی به / اشریشیا کلی در ۴۹ نمونه (۵۴/۵٪)، کلبسیلا پنومونیه در ۱۶ نمونه (۱۷/۸٪)، پروتئوس ۹ نمونه (۱۰/۱٪)، استافیلوکوکوس یک از نمونه ها (۰/۰٪) گزارش نگردید

جدول (۱۳): تعداد و درصد باکتری‌های ایزوله شده در بیماران دیابتیک مبتلا به عفونت ادراری با عدم سابقه استفاده از سوند

سوند را از	سابقه از	بیمارانی که	آلودگی در	کلی	اشریشیا	پنومونیه	کلبسیلا	پروتئوس	استافیلوک	اسیتوباکتر	سیتروباکتر	انتروباکتر	آنروژینوزا	سودوموناس	پروویدنسیا
تعداد	۴۹	۱۶	۹	۷	۴	۳	۲	-	-	-	-	-	-	-	-
درصد	۵۴/۵	۱۷/۸	۱۰/۱	۷/۸	۴/۴	۳/۳	۲/۲	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع دیابت در سه دهه اخیر سه برابر شده است و طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۰ تقریباً ۳۴۶ میلیون نفر در سرتاسر جهان به دیابت مبتلا هستند. بر طبق یک ارزیابی از شیوع جهانی دیابت در بین بالغین تخمین زده می شود، به ۴۳۹ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ برسد (۱). بیماری دیابت از جمله شایع‌ترین اختلالات غدد مستعد شدن فرد به عفونت ادراری می‌گردد. صدمات وارد شده در اعمال مختلف گلوبول‌های سفید از جمله مهاجرت، فاگوسیتوز و کموتاکسی از جمله این ناهنجاری‌ها می‌باشند

درون ریز است. این بیماری از جمله شایع ترین و مهم‌ترین بیماری‌های موجود در جهان می‌باشد و مبتلایان خود را در معرض خطر بالایی از نظر ابتلا به عفونت قرار می دهد (۲-۵). در این میان دستگاه ادراری شایع ترین محل بروز عفونت در بین مبتلایان به دیابت می باشد (۸، ۹). دیابت به دلیل ایجاد چندین ناهنجاری در سیستم دفاعی، سبب (۸). علاوه بر این، نوروپاتی دیابتی نیز به علت نقص در تخلیه کامل مثانه، سبب ایجاد عفونت ادراری می‌شود غلظت‌های بالاتر قند در ادرار ممکن است نقش مهمی در

افزایش بروز عفونت ادراری در بیماران دیابتی بازی کند. افزایش خطر ابتلا به عفونت در بیماران دیابتی را می‌توان تا حدودی با کاهش T سل‌های میانه پاسخ ایمنی و اختلال عملکرد نوتروفیل در مبتلایان به دیابت توضیح داد برخی از مطالعات حتی نشان داد که دیابت باعث افزایش خطر بستری شدن در بیمارستان و مرگ و میر ناشی از عفونت‌ها می‌شود (۶). شیوع آن برحسب سن و جنس متفاوت است. در سنین ۱۶ تا ۳۵ سال در زنان ۲۰٪ و در مردان ۵/۰٪ و در سنین ۳۶ تا ۶۵ سال در زنان ۳۵٪ و در مردان ۲۰٪ می‌باشد. در مطالعه حاضر شیوع عفونت ادراری در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۳۳/۳۳٪ برآورد گردید. در مطالعات مختلف شیوع متفاوتی از عفونت ادراری در بیماران دیابتی گزارش شده است. در مطالعات انجام شده توسط Makuyana و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۲ و نیز Medoza و همکاران در سال ۲۰۰۲، شیوع باکتریوری در افراد دیابتی ۳۲٪ بوده است (۱۶). در تحقیق انجام شده توسط Sewify و همکاران که بر روی ۷۲۲ نمونه ادرار افراد دیابتی صورت گرفت، شیوع عفونت ادراری ۳۵٪ گزارش گردید (۱۷) که با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می‌باشد.

در مطالعاتی که در ایران صورت گرفته است، از جمله مهدی پور و همکاران، شیوع عفونت ادراری در بیماران دیابتیک را ۱۱/۳٪ گزارش نموده اند (۱۷). در بررسی علی بیش‌تری دچار باکتریوری بدون علامت و عفونت ادراری نسبت به افراد بدون دیابت می‌شوند (۲۰).

دلائل این افزایش شیوع شامل ناهنجاری‌های کاملاً شناخته نشده ایمنی سلولی، هایپرگلیسمی و کاهش میزان خون رسانی عروق می‌باشد. دستگاه ادراری به دلیل هایپرگلیسمی مستعد رشد ارگانیسم‌ها می‌شود و ممکن است افراد به عفونت‌های ادراری بدون علامت دچار شوند. در این حالت دفع باکتری در ادرار وجود داشته و اثرات زیان‌آور این باکتریوری متوجه بیمار است در حالی‌که او هیچ‌گونه علامت کلینیکی و شکایت و ناراحتی ندارد. در

زاده شیوع عفونت ادراری در بیماران دیابتیک، ۱۱/۳٪ گزارش شده است (۱۹). این موضوع ممکن است به دلایلی از جمله، مراجعه کمتر بیماران دیابتی برای درمان عفونت ادراری یا عدم اطلاع آن‌ها از بیماری خود باشد. عوارض ناشی از عفونت ادراری (از قبیل باکتریمی، آبسه کلیه، نکروز کلیه) در افراد مبتلا به دیابت بیشتر بوده و حتی گرفتاری کلیوی بدون علامت (مانند پیلونفریت تحت حاد) هم در این بیماران شایع‌تر است.

در مطالعه حاضر مشخص شد، که شیوع باکتریوری علامت دار ۳۰٪ (۳۰ نفر) و شیوع باکتریوری بدون علامت ۷۰٪ (۷۰ نفر) در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ می‌باشد. باکتریوری بدون علامت به باکتریوری بارز در بیمارانی که علائم عفونت ادراری را ندارند، اطلاق می‌شود. به بیمارانی که باکتریوری بارز همراه با علائم عفونت دستگاه ادراری دارند، باکتریوری علامت دار گفته می‌شود.

در تحقیق حاضر از ۳۰۰ بیمار دیابتی مورد بررسی ۱۰۰ نفر (۳۳/۳۳٪) مبتلا به عفونت دستگاه ادراری تشخیص داده شدند که ۷۰ نفر (۲۳/۳۳٪) از افراد دیابتی مراجعه کننده دارای علائم بالینی نبوده و باکتریوری در آن‌ها از نوع بی علامت بود و در ۳۰ نفر (۱۰٪) باکتریوری دارای علامت گزارش گردید. بیماران مبتلا به دیابت با شیوع

مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا آمار متفاوتی از باکتریوری ذکر شده است که از حداقل ۶/۱٪ تا حداکثر ۳۲٪ متغیر بوده است (۲۰). در تحقیق Nitzan و همکاران شیوع عفونت ادراری بدون علامت در افراد دیابتی ۲۷٪ گزارش شده است (۲۱). در مطالعه حاضر نسبت جنسی بیماران زن بیشتر از مرد ها می‌باشد، به نحوی که ۷۰٪ جمعیت زنان دیابتی مبتلا به عفونت ادراری را زنان و ۳۰٪ باقی مانده را مرد ها تشکیل می‌دهند، در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین جنسیت و ابتلا به عفونت ادراری ارتباط معنی داری مشاهده گردید. در مطالعه Zhanel و همکاران مشخص شد که شیوع عفونت

ادراری در زنان دیابتی ۳ برابر زنان غیر دیابتی می باشد، در حالی که ریسک ابتلا مردان دیابتی و غیردیابتی یکسان بود (۲۲).

در بررسی Greelings مشخص گردید که افزایش شیوع عفونت ادراری در زنان دیابتی نتیجه تاثیر فاکتورهای ویروالانس و کاهش حساسیت های آنتی بیوتیکی در افراد غیر دیابتی می باشد (۲۰). لذا به بیماران دیابتی خصوصاً خانم‌های مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ توصیه می گردد، جهت شناسایی باکتریوری بی علامت احتمالی و درمان سریع آن، به صورت دوره ای آزمایش کشت ادرار بدهند. در یک مطالعه ۷ ساله که در کویت بر روی ۱۶۰۶ بیمار با باکتریوری قابل ملاحظه انجام شده بود، ۷۴/۵٪ را زنان و ۲۵/۵٪ را مردان تشکیل می دادند، که تقریباً مشابه مشاهدات ما می باشد (۲۳). در مطالعه ای دیگر که در ترکیه سودوموناس، انتروباکتر و دیگر گونه ها با فراوانی ۶۷/۳٪، ۳۶/۳٪، ۷۶/۵٪ و ۹/۱۳٪ گزارش گردیدند.

در مطالعه Chaurasia در هند /شریشیا کلی با فراوانی ۶۲٪، کلبسیلا پنومونیه ۱۲٪، پسودوموناس ۲٪، پروتئوس ۱۰٪، انتروباکتر ۳٪ و استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی ۳٪ گزارش گردید (۲۴).

این مطالعه نشان داد نسبت فراوانی /شریشیا کلی به سایر میکروارگانیسم‌ها در زنان مبتلا به عفونت ادراری نسبت به جنس مذکر میزان بالاتری داشته که احتمالاً به علت کوتاهی پیشابراه و نزدیکی دهانه خارجی آن با مهبل و مقعد

انجام گرفته است، نسبت زن به مرد را ۳/۵ گزارش نموده اند که بیشتر از مشاهدات ما می باشد (۲۴).

از ریسک فاکتورهای مورد بررسی در این تحقیق دارا بودن سابقه عفونت ادراری، سابقه بستری شدن در بیمارستان و استفاده از سوندهای ادراری می باشد که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین سابقه عفونت قبلی و سابقه بستری شدن در بیمارستان با ابتلا به عفونت ادراری ارتباط معنی داری مشاهده گردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد /شریشیا کلی با ۵۱٪ شایع ترین عامل ایجادکننده عفونت ادراری می باشد. در مطالعات انجام شده در سایر نقاط ایران و دنیا نیز این میکروارگانیسم به عنوان شایع ترین عامل مولد عفونت ادراری شناخته شده است. شیوع این باکتری در مطالعه جارسياه و همکارانش که بر ۲۰۸ نمونه در ایران انجام گرفت ۷۳/۰۷٪ گزارش گردید. در این تحقیق کلبسیلا،

در زنان می باشد. در مطالعه Molaabaszadeh نیز میزان عفونت ادراری در جنس مونث شایع تر بود. /شریشیا کلی به عنوان شایع ترین عامل مولد عفونت ادراری (۲۵)، مشابه اکثر مطالعات دانشمندان، در این مطالعه نیز مشخص گردید، اکثر جمعیت مبتلا به دیابت را زنان تشکیل داده و ارگانیسم شایع در اکثر بیماران دیابتی، /شریشیا کلی می باشد. در مطالعاتی که بر روی بیماران غیر دیابتی صورت گرفته نیز، زنان بیشتر از مردها به عفونت ادراری دچار شده و /شریشیا کلی ارگانیسم غالب می باشد.

منابع:

1. Shaw JE, Sicree RA., Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research Clinical Practice*; 87(1): 4-14.
2. Greelings SE., Meiland R., and Hoepelmn A. 2002. Pathogenesis of bacteriuria in women with diabetes mellitus. *Journal of Antimicrobial Agents*.19: 539-545.
3. BalasoIU D., van Kessel KC., Van kats., Renaud HJ., Collet J., and Hoepolman AI. 1997. Granulocyte functions in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. *Diabetes Care*. 20:393-395.
4. Bertoni AG., Saydah S., and Brancati FL. 2001. Diabetes and the risk of infection related mortality in the US. *Diabetes Care*. 24 (3): 1004-10049.
5. Pozzilli P., and Lesli RDG. 1994. Infections and diabetes: Mechanisms and prospects for prevention. *Diabetic Medicine*. 11 (5): 935-941.
6. Carton JA., Maradona JA., Nuno FJ., Fernandez-Alvarez R., Perez-Gonzalez F., and Asensi V. 1992. Diabetes mellitus and bacteremia: A comparative study between diabetic and non diabetic patients. *European Journal of Medicinal Chemistry*.1 (4): 281-287.
7. Boyko EJ., Fihn SD., Scholes D., Abraham L., and Monsey B. 2005. Risk of Urinary Tract Infection and Asymptomatic Bacteruria among Diabetes and Non diabetic Postmenopausal Women. *American Journal of Epidemioliology*. 161 (7): 557-564.
8. Bonadio M., Boldirini E., Forrotti G., Matteucci E., Vigna A., Mori S., and Giampietro O. 2004. Asymptomatic bacteriuria in women with diabetes: in Xuence of metabolic control. *Clinical Infection Disease*. 38 (4): 41-45.
9. Mac Farlane IA., Brown RM, Smyth RW, Burdon DW, FitzGerald MG. Bactereamia in diabetics. *J Infect* 1986; 12: 213-219.
10. Wheat LJ.1980. Infection and diabetes mellitus. *Diabets care*. 3: 187-197.
۱۱. نوروزی ج، کارگر م. (۱۳۸۰). مکانیسم مولکولی بیماری زایی باکتری‌ها. انتشارات جعفری. ۴۴۰-۴۵۰
۱۲. ادیب فر، پ. (۱۳۷۵) میکروب شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه تهران، ۵۰۴-۴۳۱.
13. Tajbakhsh E., Tajbakhsh S, Khamesipour F. (2015). Isolation and Molecular Detection of Gram Negative Bacteria Causing Urinary Tract Infection in Patients Referred to Shahrekord Hospitals, Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 17(5): e24779.
14. Tajbakhsh E., Tajbakhsh S., and Khamesipour F. 2015. Isolation and Molecular Detection of Gram Negative Bacteria Causing Urinary Tract Infection in Patients Referred to Shahrekord Hospitals, Iran. *Iran Red Crescent Medical Journal*. 17(5): e24779.
15. Makuyana D., Mhlabi D., Chipfupa M., Muny T., and Gwan L 2002. Asymptomatic bacteriuria among outpatients with diabetes mellitus in an urban black population. *Central African J Medical*. 48(7.8):78-82.
16. Mendoza T., García de los Ríos M., Lafourcade M., Soto C., Durruty P., and Alvo M. 2002. Asymptomatic bacteriuria in type 2 diabetic women. *Revista Medical the Chil*. 130(9):1001-1007.
17. Sewify M., Nair Sh., Warsame S., Murad M., Alhubail A., Behbehani K., Al-Refaei F., and Tiss A. 2016. Prevalence of urinary tract infection and antimicrobial susceptibility among diabetic patients with

controlled and uncontrolled glycemia in Kuwait. Journal of Diabetes Research. 3 (5): 1-7.

۱۸. مهدی پور ع.، علیزاده م.، صابری س. بررسی شیوع UTI در افراد دیابتیک در بیمارستان سهند، مجله علوم پزشکی سنندج، شماره سوم، سال چهارم، ۱۳۸۲: ۶۵-۶۱.

۱۹. علی زاده ب. (۱۳۸۳). شیوع UTI در افراد دیابتیک مراجعه کننده به کلینیک ۱۷ شهریور یزد. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یزد. شماره دوم، سال یازدهم، ۵۹-۵۴.

20. Geerlings SE., Stolck RP., Camps MJ, Netten PM., Hoekstra JB., and Bouter KP. 2000. Asymptomatic bacteriuria may be considered a complication in women with diabetes. diabetes mellitus women asymptomatic bacteriuria utrecht study group. Diabetes Care. 23 (6): 744-749.

21. Nitzan O., Elias M., Chazan B., and Saliba W. 2015. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 8 (2):129-136

22. Zhanel GG., Nicolle LE., and Harding GK. 1995. Prevalence of asymptomatic bacteriuria and associated host factors in women with diabetes mellitus. Clinical Infectious Disease. 21 (3): 316-325.

23. Jarsiah P., Alizadeh A, Mehdizadeh E, Ataee R, Khanalipour N. 2014. Evaluation of antibiotic resistance model of *Escherichia coli* in urine culture samples at Kian hospital lab in Tehran, 2011-2012. Journal of Mazandaran University Medical Sciences. 24:78-83.

24. Chaurasia D., Shrivastava RK., Shrivastava S., Dubey D., and Songra M. 2015. Bacterial pathogens and their antimicrobial susceptibility pattern isolated from urinary tract infection in a tertiary care centre. International Journal of Pharmacy & Bio-Sciences. 1 (3): 20-24.

25. Molaabaszadeh H., Hajisheikhzadeh B., Mollazadeh M., Eslami K., and Mohammadzadeh Gheshlaghi N. 2013. Study of sensibility and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Tabriz city. Journal of Fasa Univesity Medical Science. 3 (2):3:149-154.

Identification of bacteria causing urinary tract infections in diabetic patients in Shahrekord city

Mohammad Rajabi¹, Payam Raeghi Tehrani²

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

2. Department of Developmental Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran

***Corresponding author** drpayamrazeghi@gmail.com

Abstract

Diabetic patients are extremely sensitive to infection and the infection is very risky. In this study, urine samples from 300 patients with type 2 diabetes mellitus in Shahrekord in 1394, instances of infection and infection-causing micro-organisms were isolated by culture and biochemical tests and molecular detection by PCR test for prove the existence of bacteria was carried out.

E. coli was common organisms in these patients. Therefore, periodic exams and urine of diabetic patients for periodic testing and recommended strongly felt that based on the result Antibigram, effective drug for treatment of urinary tract infection is selected. Results of this study show that the most common pathogen E. coli by 51% is administrative. In studies conducted in other parts of the world, these micro-organisms is known as the most common cause of UTI.

Key words: assessment, bacteria, infections, diabetes, blood sugar

تشخیص مولکولی باکتری‌های ایجاد کننده اسهال در کودکان مبتلا به اسهال در شهرستان شهرکرد

زینب مرزات^۱، محمد رجبی^۱، پیام رازقی تهرانی^{۲*}

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

۲- گروه تکوین، دانشکده ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: drpayamrazeghi@gmail.com

چکیده

اسهال یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد و دومین عامل مرگ و میر بعد از عفونت‌های تنفسی است. برآورده می شود سالانه ۵-۳ میلیون از موارد این بیماری در سراسر جهان به مرگ منجر می شود. وقوع موارد مرگ و میر به ویژه در کودکان زیر ۵ سال قابل توجه می باشد. در این تحقیق نمونه های اسهال ۶۰ کودک مبتلا به اسهال در طی فصول تابستان و پاییز ۱۳۹۸ که به بیمارستان های هاجر و امام علی (ع) شهرستان شهرکرد، مراجعه کرده بودند از نظر عوامل باکتریایی نظیر /شریشیا کلی، کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کلی، سالمونلا /انتریتیدیس و یرسینیا /انتروکولیتیکا به روش مولکولی، در حضور پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. فراوان‌ترین ژن مورد بررسی ژن مربوط به *16srRNA* /شریشیا کلی بود. به طوری که در ۱۵ نمونه (۲۵٪) این ژن شناسایی گردید. از ۱۵ نمونه مورد بررسی که از نظر توالی ژن *16srRNA* /شریشیا کلی مثبت تشخیص داده شدند، توالی ژن *ipaH* که مربوط به باکتری های /شریشیا کلی ایجاد کننده اسهال بود در ۲ نمونه (۳۳٪) مشاهده گردید. توالی ژن *hipo* که مربوط به کمپیلوباکتر ژژونی بود در ۱ نمونه (۱۶٪) و توالی ژن *asp* که مربوط به کمپیلوباکتر کلی بود در هیچ نمونه ای مشاهده نگردید. آلودگی به سالمونلا /انتریتیدیس در ۵ نمونه (۳۳٪) مشاهده گردید. فراوانی ژن *ail* که مربوط به آلودگی به یرسینیا /انتروکولیتیکا بود در ۱ نمونه (۱۶٪) گزارش گردید.

اطلاعات در مورد میزان شیوع باکتری های عامل اسهال می تواند در کنترل و مدیریت صحیح بیماری اسهال در نوزادان و کودکان موثر باشد. لذا لازم است تحقیقات وسیعی در طی فصول مختلف سال و هم چنین در کلیه شهرستان های استان چهارمحال و بختیاری صورت گیرد.

واژه های کلیدی: پاتوژن های عامل اسهال، تشخیص مولکولی، کودکان، شهرکرد

مقدمه:

مواد و روش ها:

اسهال یکی از مشکلات عمده دنیا به خصوص در کشورهای در حال توسعه است که همه ساله موجب زیان های جبران ناپذیر اقتصادی و تلفات انسانی می گردد. عوامل گوناگونی از قبیل تراکم جمعیت، فقر، عدم دسترسی به امکانات بهداشتی، سوء تغذیه و شرایط اجتماعی و رفتاری در این امر دخیل هستند. به علاوه شرایط سنی، سیستم ایمنی، جنسیت و وزن زمان تولد نقش مهمی در ابتلا کودکان به اسهال ایفا می کند. اسهال یکی از بیماریهای شایع و کشنده کودکان در کشورهای در حال توسعه است و سالانه ۵ تا ۱۰ میلیون کودک در اثر این بیماری از بین می روند (۳-۱). شیوع اسهال در کودکان روستایی بالاتر از کودکان شهری می باشد. استفاده از آب های آلوده و ناتوانی کودکان در شستشوی صحیح و مجاورت منازل با زباله ها عوامل دیگری در ایجاد اسهال کودکان می باشد (۴). اسهال به مدفوع آبکی به جای مدفوع قوام یافته یا نرم و افزایش وزن مدفوع روزانه اطلاق می شود که حد بالای طبیعی آن در جوامع صنعتی ۲۰۰ گرم است و با تکرار دفع مدفوع (بیش از سه حرکت روده ای در روز) همراه است (۵). در نتیجه این بیماری زمان کافی برای باز جذب آب و الکترولیت ها در روده باقی نمی ماند و موجب از دست رفتن شدید آب بدن می شود (۵).

در این مطالعه بروی ۶۰ نفر کودک مبتلا به اسهال در طی فصول تابستان و پاییز ۱۳۹۸ که به بیمارستان های هاجر و امام علی (ع) شهرستان شهرکرد، مراجعه کرده بودند از نظر عوامل باکتریایی نظیر های /شریشیا کلی، کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کلی، سالمونلا /انتریتیدیس و یرسینیا /انتروکولیتیکا به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های اسهالی در ظرف استریل حاوی مواد بازی جمع آوری گردید. استخراج DNA از نمونه های مدفوع از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNPTM) استفاده نمودیم. جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از نمونه های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز و دستگاه بایوفتومتر استفاده نمودیم. به منظور ردیابی ژن های مورد نظر شامل *16srRNA* /شریشیا کلی و *ipaH* در نمونه های مثبت از نظر توالی ژن *16srRNA* /شریشیا کلی و ژن های *asp* و *hipo* کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلی و ژن *ail* یرسینیا /انتروکولیتیکا و ژن های سالمونلا /انتریتیدیس از پرایمرهای اختصاصی هر باکتری که در جدول ۱ آورده شده استفاده نمودیم.

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing (0C)	Size of product (bp)	Reference
<i>E. coli</i> (<i>16srRNA</i>)	GAAGCTTGCTTCTTTGCT GAGCCCGGGGATTTCACAT	45	544	
<i>E. coli</i> (<i>ipaH</i>)	GTTCCCTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	62	600	
<i>C. jejuni</i> (<i>hipo</i>)	GAC TTC GTG CAG ATA TGG ATG CTT' GCT ATA ACT ATC CGA AGA AGC CAT CA	65	344	
<i>C. coli</i> (<i>asp</i>)	'GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G 'ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG	57	500	
<i>s. enteritidis</i> S1, S4	GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC	56	250	
<i>y. enterocoliica</i> (<i>ail</i>)	TTAATGTGTACGCTGGGAGTG GGAGTATTCATATGAAGCGTC	62	425	

جدول (۱) توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن های *16srRNA* /شریشیا کلی، *ipaH* /شریشیا کلی عامل اسهال، *hipo* /کمپیلوباکتر ژژونی و *S1, S4* سالمونلا /انتریتیدیس، *ail* یرسینیا /انتروکولیتیکا.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و باتوجه برنامه حرارتی که برای هر ژن به صورت زیر می باشد.

جدول (۲-۱): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA*/شریشیا کلی (۶).

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴°C	۳۰s	۱
Cycle	Denaturation	۹۴°C	۴۵s	۴۰
	Annealing	۴۵°C	۳۰s	
	Extention	۷۲°C	۴۵s	
Final extention		۷۲°C	۱۰Min	۱

جدول (۳-۲): برنامه دمایی برای تکثیر ژن

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴°C	۶۰S	۱
Cycle	Denaturation	۹۵°C	۶۰S	۳۵
	Annealing	۶۲°C	۳۰s	
	Extention	۷۲°C	۶۰S	
Final extention		۷۲°C	۷Min	۱

(۴۸)

ipaH

جدول (۳-۱): برنامه دمایی برای تکثیر ژن *ipaH* (۷)

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴°C	۲Min	۱
Cycle	Denaturation	۹۴°C	۶۰S	۴۰
	Annealing	۶۵°C	۸۰S	
	Extention	۷۲°C	۶۰S	
Final extention		۷۲°C	۵Min	۱

جدول (۴-۱): برنامه دمایی برای تکثیر ژن های *asp* و *hipo* (۸)

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴°C	۴۵S	۱
Cycle	Denaturation	۹۴°C	۴۵s	۳۶
	Annealing	۶۲°C	۴۵S	
	Extention	۷۲°C	۴۵s	
Final extention		۷۲°C	۷Min	۱

جدول (۵-۱): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *ail* یرسینیا/انتروکولیتیکا (۹)

Stage		Temp.	Time	No.cycle
Hot start		۹۴°C	۶۰S	۱
Cycle	Denaturation	۹۴°C	۶۰S	۳۵
	Annealing	۵۶°C	۳۰S	
	Extention	۷۲°C	۶۰S	
Final extention		۷۲°C	۱۰Min	۱

جدول (۶-۱): برنامه حرارتی برای تکثیر ژن مورد نظر سالمونلا/انتریتیدیس (۱۰)

یافته ها

همکاران (۷۸-۱۳۷۷) شیوع سویه های مولد اسهال /شریشیا کلی در کودکان زیر ۶ سال در شهر زاهدان ۱۳٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می باشد (۱۱). در مقابل Katia R.S Aranda و همکاران (۲۰۰۴) در یک مطالعه در برزیل تنها در ۱/۳٪ موارد اسهال کودکان ژن *ipaH* شناسایی گردید (۱۲). در این بررسی ۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس (۸/۳۳٪) جدا گردید در مطالعه سلطان دلال که بر روی ۳۱۰ نمونه اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال در بیمارستان مرکز طبی کودکان صورت گرفت. میزان آلودگی به پاتوژن های باکتریایی مختلف ۳۰/۳٪ و میزان آلودگی به به سرووارهای مختلف جنس سالمونلا ۲/۶٪ گزارش شده است (۱۳). در این بررسی ۱ نمونه (۱/۶۶٪) ژن *ail* که مربوط به یرسینیا/انتروکولیتیکا مثبت گزارش گردید. در مطالعه انجام شده توسط سلیمانی رهبر و همکاران در سال ۱۳۸۶ در کشت نمونه اسهالی ۸۰۰ کودک زیر ۱۰ سال در شهر قم در محیط کشت اختصاصی ۱۴مورد یرسینیا/انتروکولیتیکا (۱/۷۵٪) جداسازی شد. (۱۴). در این مطالعه فقط ۱ مورد مثبت کمپیلوباکتر ژرونی در موارد اسهالی یافت شد (۱/۶۶٪) این مساله برخلاف انتظار بود زیرا در بسیاری مطالعات کمپیلوباکتر به ویژه در کشور های در حال توسعه به عنوان یکی از عوامل اصلی اسهال به ویژه در کودکان معرفی شده است. در مطالعه انجام شده توسط ایراجیان و

در این بررسی از ۶۰ کودک مبتلا به اسهال ۱۵ مورد ژن *16srRNA* /شریشیا کلی جدا گردید که از این تعداد ۷ نفر مونث (۴۶/۷٪) و ۸ نفر مذکر (۵۳/۳٪) بودند. ۲مورد ژن *ipaH* /شریشیا کلی مثبت گزارش شد که یک مورد مونث (۵۰٪) و یک مورد مذکر بودند. ۱مورد کمپیلو باکتر ژرونی مربوط به جنس مذکر (۱۰۰٪) جدا گردید و ۵ مورد سالمونلا/انتریتیدیس که ۳ مورد مونث (۶۰٪) و ۲ مورد مذکر (۴۰٪) بودند. ۱ مورد یرسینیا/انتروکولیتیکا مربوط به جنس مونث بود. از ۶۰ نمونه اسهالی ۵ نمونه مربوط به گروه سنی کمتر از یک سال (۸/۳۳٪) و ۲۰ نمونه در گروه سنی بین ۱-۵ سال (۵۰٪) و ۱۰ نمونه مربوط به گروه سنی ۶-۱۲ (۱۶/۶۶٪) و ۲ نمونه مربوط به گروه سنی بالای ۱۲ سال (۳/۳۳٪) قرار داشتند. از آن جا که نمونه گیری طی دو فصل تابستان و پاییز صورت گرفته است، فراوانی ژن های ژن های *16srRNA* /شریشیا کلی، *ipaH* سویه های ایجاد کننده اسهال /شریشیا کلی، *hipo* کمپیلو باکتر ژرونی، *asp* کمپیلوباکتر کولی، *S1*، *S4* سالمونلا/انتریتیدیس و *ail* یرسینیا/انتروکولیتیکادر طی فصل تابستان به ترتیب ۸۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۰٪، ۸۰٪ و ۰٪ و در طی فصل پاییز به ترتیب ۲۰٪، ۰٪، ۰٪، ۰٪، ۲۰٪ و ۱۰۰٪ گزارش شد.

بحث

در این بررسی از ۶۰ نمونه ۱۵ مورد ژن *16srRNA* /شریشیا کلی و ۲مورد (۱۳/۳۳٪) ژن *ipaH* /شریشیا کلی مثبت گزارش گردید در مطالعه ای که توسط جوادزاده و

همکاران که در سال ۱۳۸۶ بر روی مدفوع ۳۰۶ نفر از افراد مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مراکز بهداشتی

شهرستان سمنان ۳۸ مورد (۱۲/۴٪) از نظر کمپیلو باکتر
ژژرونی مثبت شدند (۵)

نتیجه گیری

اطلاعات در مورد میزان شیوع باکتری های عامل اسهال
می تواند در کنترل و مدیریت صحیح بیماری اسهال در
نوزادان و کودکان موثر باشد. لذا لازم است تحقیقات وسیعی
در طی فصول مختلف سال و هم چنین در کلیه شهرستان
های استان چهارمحال و بختیاری صورت گیرد. در این
تحقیق /شریشیا کلی به عنوان شایع ترین پاتوژن عامل
اسهال در شهرستان شهرکرد مشخص گردید.



منابع

۱. بکائیان م، دبیر زاده م، صفاری م، نوری ع. (۱۳۷۸). جستجوی کمپیلوباکتر در کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان تخصصی اطفال زاهدان در سال ۷۷. طیب شرق. ۱: ۹-۷۳.
2. Mohammed Osman M., Nur hassan A. and Holie M. 2012. Bacterial etiology of diarrhoeal diseases in children under 5 years old in Ombadda Hospital Sudan. Sudanise journal of public health. 7: 93-97.
۳. شریف م، نصراللهی م. (۱۳۷۹). شیوع اسهال ناشی از /شرشیا کلی انتروپاتوژن در کودکان زیر یک سال مراجعه کننده به مراکز درمانی ساری. مجله علوم پزشکی و خدمات درمانی قزوین. ۱۳: ۸-۶۳.
4. Mengistie B., Berhane Y. and Worku A. 2013. Prevalence of diarrhea and associated risk factors among children under-five years of age in Eastern Ethiopia: A cross-sectional study. Open Journal of Preventive Medicine. 3(7): 446-453.
۵. ایرجیان غ، جزایری مقدس ع، بهشتی ا، صالحیان ع، قدس ف، منعم م. (۱۳۸۶). فراوانی حضور کمپیلوباکتر ژرونی در مدفوع مبتلایان به اسهال مراجعه کننده به مراکز بهداشتی شهرستان سمنان ۱۳۸۶. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱(۴): ۳۹-۳۵.
6. Sabat G., Rose P., Hickey WJ, and Harkin JM. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. Applied Environmental Microbiology. (66) 2: 844-849.
- i7. Aranda KR., Fabbriotti SH., Fagundes-Neto U. and Scaletsky IC. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiology Letter. 267(2):145-150.
8. Persson S, Olsen KE. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. Journal of Medical Microbiology. 54 (11): 43-1047.
9. Wannet WBJ., Reessink M., Brunings HA. and Maas HME. 2012. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 39 (12): 4483-4486.
10. Soumet C, Ermet G, Rose V, Rose N, Drouin, P, Salvat, G. and Colin P. (1999). Identification by a multiplex PCR based assay of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in applied microbiology*, 29(1): 1-6.
11. Javadzadeh M., Dabiri S. and Zangiabadi M. 2003. Role of Shigella, Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Entamoeba Histolytica* in causing dysentery in children and antibiotic sensitivity testing. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 39(13): 29-35.
12. Katia RS A., and Sandra H. 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett. 267(6): 145-150.
13. Soltan Dallal MM., Moezardalan K. 2004. Aeromonas spp associated with children's diarrhoea in Tehran: a case-control study. Annals of Tropical Paediatric. 24(1):45-51
14. Soleymani-Rahbar AA., Fayaz F., Zargarizadeh A. and Nikazman R. 2007. Surveying the prevalence and pattern of antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* among diarrheal children attending health care centers in Qom. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2(3):143-147.

Molecular detection of bacteria causing diarrhea in children with diarrheaZeynab Marzat¹, Mohammad Rajabi¹, Payam Razeghi Tehrani²

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
 2. Department of Developmental Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran
- *Corresponding author** drpayamrazeghi@gmail.com

Diarrhea is one of the most prevalent diseases in the children especially in the developing countries and is considered as the second cause of mortality following respiratory infections. It is estimated that 3-5 million cases of this disease result in death each year. Mortality rate especially in the children under 5 is significant. In this study 60 diarrhea samples of children who referred at Hajar and Imamali Hospitals of Shahrekord, at the present of specific primers for common bacterial pathogens such as *E. coli*, *C. jejuni*, *C. coli*, *S. Enteritidis* and *Y. enterocolitica*, were tested. The most abundant studied gene was related to *16srRNA E.coli*, so that it was identified in 15 samples (25%). Out of 15 studied cases diagnosed as positive in respect of *16srRNA* gene sequence, *ipaH* gene related to *E.coli* bacteria resulting in diarrhea was observed in 2 samples (13.33%). *hpa* gene sequence related to *C. jejuni* was observed in 1 sample and *asp* gene sequence related to *C. coli* wasn't observed in any samples. Redundancy of *ail* gene related to Information about the prevalence of diarrhea resulting bacteria can be effective on correct control and managing the diarrhea in the infants and children. Then it is necessary to do wide research in various seasons of the year and also in all towns of Chharmahal and Bakhtiary province.

Keywords: Bacteria, Children, Diarrhea, Molecular detection, Shahrekord.

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

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

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

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

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

مکاتبه با نویسنده: Salehian_f67@yahoo.com

چکیده:

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

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

مقدمه:

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

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

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

مواد و روش کار:

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

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

ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. در مرحله آخر کشت میکروبی با استفاده از روش کشت سطحی، از سه رقت آخر در محیط کشت انتخابی TCBS (مرک، آلمان) استفاده و سپس پرگنه ها شمارش گردید. پرگنه های ویبریو در سطح این محیط به رنگ زرد تا خاکستری مشاهده می گردید. پرگنه های گونه پاراهمولیتیکوس سبز تا آبی رنگ می باشد. پرگنه های ایجاد شده پس از شمارش به محیط کشت آگار خوندار (مرک، آلمان) به جهت ماندگاری تا زمان فرایند PCR انتقال یافت (۵). باروری محیط های کشت میکروبی در مورد نمونه کنترل مثبت باکتری ویبریو (ATCC 17802) مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تأیید گردید.

استخراج DNA:

در این مرحله از همه باکتری های شناسایی شده در محیط جامد TCBS که در محیط ژلوز خون دار نگهداری می گردید، در محیط کشت Broth LB (مرک، آلمان) کشت می گردید. در این مرحله ابتدا با استفاده از کیت (سیناژن، ایران)، DNA استخراج گردید. برای استخراج DNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اقدام گردید. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000Pq lab) مورد ارزیابی قرارگرفت. DNA های استخراج شده تا زمان مصرف در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایش Nested PCR:

در این تحقیق دو مرحله از فرایند PCR، یک مرحله برای تعیین جنس باکتری ها و مرحله دوم با استفاده از محصول مرحله اول آزمایش پلیمرز آشیانه ای (Nested PCR) برای تعیین گونه ها انجام گردید. در این آزمایش در مرحله اول قطعات بزرگتری تولید و سپس این قطعات به عنوان الگو برای

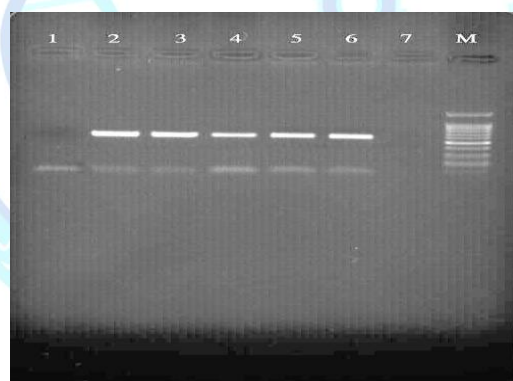
مرحله دوم بکار می رود. با انجام این روش حساسیت و اختصاصیت آزمایش به طور قابل ملاحظه ای افزایش پیدا می کند. پس از آماده سازی پرایمرها و طراحی سیکل های حرارتی، فرایند PCR انجام گردید. آزمون PCR در مورد تأیید جنس با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن های RNA ریبوزومی صورت پذیرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) سنتز گردیدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه تقریبی محصول به دست آمده در جدول ۱ آمده است (۶) برای استفاده از پرایمرها، ابتدا پرایمرهای مورد استفاده طبق دستور العمل شرکت سازنده رقیق و استفاده گردید. در نهایت جهت انجام فرایند PCR، از مستر های تجاری (Master Mix) شرکت سیناژن استفاده گردید. مقدار $5/7 \mu\text{l}$ از این مسترها شامل (PCR، بافر، dNTP، mgcl_2 ، Taq polymerase و Loading buffer) می باشد (با $1 \mu\text{l}$ از F primer و $1 \mu\text{l}$ R primer، $3/5$ از D.W و $2 \mu\text{l}$ از DNA در یک تیوب مخلوط و سپس تیوب ها در دستگاه ترموسایکر (اپندروف، آلمان) قرار داده شد. به جهت نداشتن کنترل مثبت در مورد گونه های میمیکوس و ولنیفیکوس، صرفاً از گونه پاراهمولیتیکوس (ATCC 17802) جهاد دانشگاهی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. کلیه مراحل فوق در مورد نمونه کنترل مثبت نیز انجام و در مورد نمونه کنترل منفی نیز از آب مقطر تزریقی بجای DNA استفاده گردید. چرخه های PCR در مورد جنس شامل مراحل دناتوراسیون اولیه (واشرستگی) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، و ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و امتداد در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت (۶).

جدول ۱ توالی پرایمرهای جنس و گونه های ویبریو

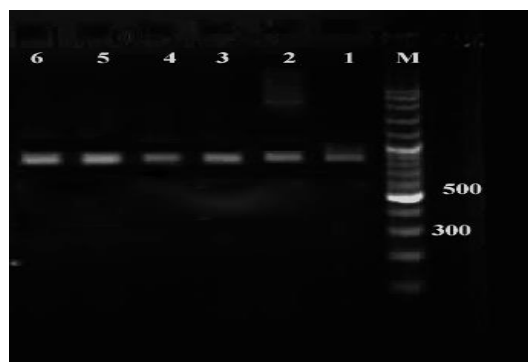
نام باکتری	ژن مربوطه	پهنای باند (bp)	توالی و جهت پرایمر
All Vibrio spp	V.16S	663	F - CGGTGAAATGCGTAGAGA- R - TTACTAGCGATTCCGAGTTC-
V. vulnificus	Vv.hsp	410	F - GTCTTAAAGCGGTTGCTGC- R - CGCTTCAAGTGCTGCTGGTAGAAG
V. parahaemolyticus	Vp.flasE	897	F- GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT- R- ATTATCGATCGTGCCACTCAC-
V. mimicus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

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

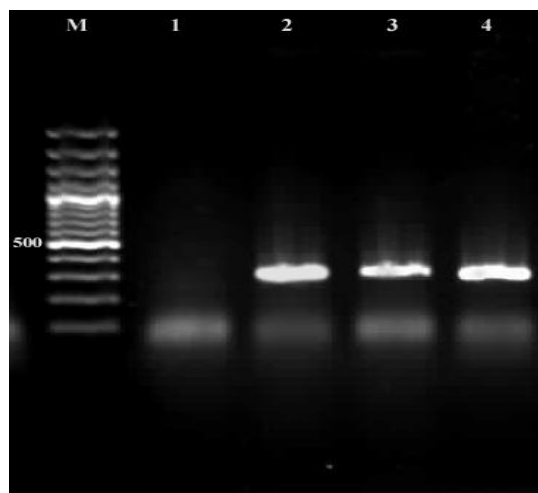
پس از انجام PCR، به منظور مشخص کردن اندازه محصولات
 تولید شده، از روش الکتروفورز استفاده شده و محصولات روی
 ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و به همراه
 مارکرهای DNA در ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز



تصویر شماره ۱: چاهک شماره M مربوط به مارکر ۱۰۰bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه های مثبت ویبریو



تصویر شماره ۲: چاهک شماره M مربوط به مارکر ۱۰۰bp، چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه های مثبت ویبریو پاره مولیتیکوس



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

جدول ۲: تعداد و درصد نمونه‌های مثبت گونه‌های ویبریو

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

بحث و نتیجه گیری:

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

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

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

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

آلجینولیتیکوس و ۳۹ درصد ولنیفیکوس در ماهی گزارش شده است (۱۲).

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

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

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

منابع:

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

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

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

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

Correspondence to the author: Salehian_f67@yahoo.com

Abstract:

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

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

آنالیز مولکولی ویروس هپاتیت دلتا

الهه تاج بخش^{۱*}، فاطمه خداوردی پور^۱، نغمه میرابوالقاسمی^۱

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

*نویسنده ی مسئول: ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

ویروس هپاتیت دلتا، ویروس RNA دار ناقصی است که برای عملکرد آن حضور ویروس هپاتیت B ضروری است. این ویروس می‌تواند منجر به بیماری کبدی حاد و مزمن شود. سویه‌های HDV به ۷ ژنوتیپ و ۸ شاخه طبقه بندی شده‌اند. میزان شیوع عفونت HDV در اهداکنندگان خون ایران از ۲/۴ تا ۱۰ درصد متفاوت است. هدف از این مطالعه مقایسه فیلوژنتیک ویروس هپاتیت دلتای جدا شده از بیماران HBsAg مثبت شهرستان شهرکرد با سایر نقاط دنیا می‌باشد. در این مطالعه ۳۵۰ نمونه سرمی از افراد مبتلا به هپاتیت B، از سازمان انتقال خون شهرستان شهرکرد تهیه شد. در این تحقیق RNA ویروس هپاتیت دلتا با استفاده از کیت RNX Plus ساخت شرکت سیناژن، ایران استخراج گردید. پس از ساخت cDNA با استفاده از کیت RT PreMix ساخت شرکت بایونر^۱ آلمان نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت تخلیص PCR ساخت شرکت راج^۲ آلمان تخلیص شدند و جهت تعیین توالی قطعه ۴۲۱ جفت بازی به شرکت ماکروژن^۳ گره ارسال گردیدند. سپس ۲ نمونه مثبت مورد نظر با استفاده از نرم افزار کلسنال ایکس^۱ با توالی‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی NCBI مقایسه و بعد از تعیین میزان مشابهت، درخت فیلوژنی حاصله به کمک نرم افزار ان جی پلات^۲ ترسیم گردید. توالی HDVag ایزوله‌های ایرانی در این مطالعه با ۱۵ توالی از ایزوله‌های HDV از کشورهای مختلف مقایسه شد. نمونه‌های مورد مطالعه دارای ۹۹/۷-۹۹/۱ درصد قرابت با توالی‌های این ویروس از کشورهای جنوب شرقی آسیا (چین و تایوان) بودند. بر پایه مطالعات قبلی می‌توان این ویروس‌ها را در شاخه‌ی ژنوتیپ II ویروس HDV قرار داد. **کلمات کلیدی:** ژنوتیپ II ویروس، قرابت فیلوژنتیک، ویروس هپاتیت دلتا.

1 - Bioneer	8
1 - Roche	9
2 - Macrogen	0
2 - Clustal X	1
2 - Njplot	2

مقدمه

عفونت با HDV^{3} در سراسر دنیا وجود دارد اما آمار دقیقی از شیوع و بروز آن در دسترس نیست که این امر ناشی از آمار نادرست و یا با تاخیر در ارائه آماده می‌باشد (۱-۳). در سراسر دنیا ۱۵ میلیون نفر به HDV آلوده می‌باشند. ویروس دلتا هپاتیت به قطر ۳۶ نانومتر شامل یک ژنوم RNA و ۷۰ کپی از پروتئین نوکلئوکسپید ویروسی (آنتی ژن هپاتیت دلتا) می‌باشد. که توسط آنتی ژن‌های سطحی کمکی HBV^{24} پوشیده می‌شوند و به عنوان کوچک‌ترین پاتوژن انسانی معروف می‌باشد (۴). پوشش پروتئینی ویروس هپاتیت B برای ایجاد عفونت زایی ویروس هپاتیت D ضروری است. برای ایجاد عفونت توسط ویروس HDV بیان ژن‌های Pre-S1 و Pre-S2 ویروس هپاتیت B ضروری می‌باشد زیرا این ویروس، هپادنا ویروس‌های مختلف را تحت شرایط آزمایشگاهی به عنوان کمکی استفاده کرده و در هر مورد، روکش HDV دارای مشخصه‌های فیزیکی و آنتی ژنی از ویروس کمکی می‌باشد (۴). ویروس هپاتیت D در سراسر جهان یافت می‌شود ولی بیشترین میزان شیوع آن در میان ایتالیایی‌ها، افرادی که ترانسفیوزهای متعدد داشتند و افرادی که در تماس نزدیک با آن‌ها بوده‌اند گزارش گردیده است. دوره نهفتگی از ۲ تا ۱۲ هفته متغیر می‌باشد. این دوره در حاملین HBV که با عامل دلتا آلوده می‌شوند نسبت به افراد حساسی که هم‌زمان با هر دو عامل HBV و دلتا آلوده می‌گردند کوتاه تر است. عفونت با عامل دلتا را می‌توان از طریق شناسایی IgM ضد دلتا طی مرحله حاد و یا مزمن بیماری تشخیص داد. افرادی که در عفونت با عامل دلتا بهبود می‌یابند در برخورد با این عامل یا HBV مصون می‌باشند (۵). آلودگی به HDV توزیع جهانی دارد. اما دو الگوی اپیدمیولوژیک برای آن وجود دارد. در کشور های مدیترانه ای عفونت HDV در افراد مبتلا به هپاتیت B اندمیک می باشد و عمدتاً از طریق غیر پوستی منتقل می

شود. در مناطق غیر اندمیک، ایالات متحده و اروپای شمالی، عفونت HDV منحصر به افراد در معرض خون و فرآورده های خونی، معتادین به مواد مخدر و مبتلایان به هموفیلی است. در مقیاس جهانی عفونت HDV رو به کاهش است (۶). ویروس دلتا دارای یک سروتایپ و هفت ژنوتایپ می‌باشد. بر اساس توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌های I, II و III فراوان ترین هستند، بدین ترتیب که ژنوتایپ III در آمریکای جنوبی و بیشتر در بومیان یوپکا کشور ونزوئلا شیوع دارد و موجب بیماری‌های شدید کبدی می‌گردد. همین ژنوتایپ در منطقه سفلی رودخانه آمازون بیماری تب سیاه آمازون را ایجاد می‌کند که یک نوع هپاتیت وخیم از این ویروس می‌باشد. ژنوتایپ II ویروس دلتا بیشتر در آسیای شرقی با سیری کندتر و بیماری تا حدودی سبک تر را تولید می‌کند و ژنوتایپ I در اروپا و آمریکای شمالی شایع است که بیماری تولید شده غالباً برق آسا و یا سیروز پیشرونده با سیر سریع را موجب می‌شود (۷). از آن‌جا که HDV در ایران اندمیک می‌باشد و بیماران با عفونت مزمن HDV در خطر پیشرفت به سمت نارسایی کبدی قرار دارند (۸،۳). هم‌چنین از آنجا که آماری از شیوع HDV در شهرستان شهرکرد موجود نیست بر آن شدیم تا این تحقیق را در این شهرستان انجام دهیم.

مواد و روش ها

تعداد ۳۵۰ نمونه سرمی (در حجم حدود ۳ میلی لیتر) از افراد مبتلا به هپاتیت B (HBs Ag) که قبلاً آلودگی آن به دو روش سرمی الایزا و وسترن بلات تأیید شده بود از سازمان انتقال خون شهرستان شهرکرد تهیه و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. با توجه به این که ویروس هپاتیت D یک ویروس RNA دار است جهت استخراج RNA از نمونه‌های سرم مورد مطالعه از کیت استخراج RNA (RNX-PLUS) ساخت شرکت سیناژن ایران طبق روش پروتکل استفاده شد. بعد از کیفیت سنجی

RNA استخراج شده (با انجام الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصدی) از زوج پرایمرها (نشان داده شده در جدول (۱))، ۳ میکرولیتر RNA های آماده شده جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه cDNA و ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز (سیناژن، ایران) تنظیم جهت ساخت cDNA از کیت RT PreMix (ساخت شرکت بایونر، آلمانی) جهت ارزیابی محصول PCR از ژل ۱/۵ درصد آگارز استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مربوطه استفاده شد. سپس جهت انجام آزمایش ژل حاصله با دستگاه تصویر بردار از ژل (با تابش نور UV) مورد بررسی PCR، واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واحد ۵ میکرولیتر بافر PCR گرفت و نتیجه حاصله روی کاغذ حرارتی ثبت گردید (۹).
10X ، ۰/۲ میلی مول منیزیم کلرید، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

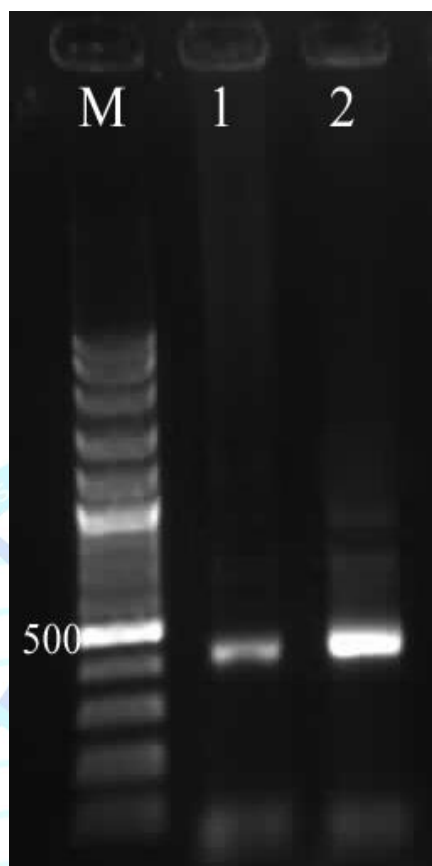
اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن
۴۲۱	۵'-TGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA-۳'	HDV F
	GAGAGACGGGATCACCGAAGAAGGAAGGC-۳'	HDV R

(France, M55042-Netherland, AF008420-USA
مقایسه و بعد از تعیین میزان مشابهت (با نرم افزار بیو
ادیت)، درخت فیلوژنی حاصله به کمک نرم افزار ان جی
پلات ترسیم گردید.

نتایج

از مجموع ۳۵۰ نمونه سرم مورد مطالعه در ۲ نمونه (۵۷/۰ درصد) آلودگی با ویروس HDV در روش RT-PCR مشاهده شد که ژل حاصل از آلودگی PCR مربوط به نمونه‌های مثبت شده در تصویر (۱) نشان داده شده است:

محصول PCR مربوط به ۲ نمونه مثبت در آزمایش PCR
تخلیص و جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه ۴۲۱ جفت
بازی تکثیر یافته در PCR (مربوط به ژن کد کننده آنتی ژن
دلتا ویروس HDV به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.
توالی تعیین شده از ۲ نمونه مورد نظر با استفاده از نرم افزار
کلسنال ایکس با توالی‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی
(NCBI - JF694493-Iran, AF425644-Taiwan, U25667-
China, AF309420-Japan, AJ309880-Russia, U81989-
Ethiopia, U81988-Somalia, JX888135-Luxembourg,
AB037949-Venezuela, KC590319-Brazil, L22065-
South America, AF247965-Sweden, HF679406-



۲ نمونه مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی انتخاب و تعیین توالی شده در آن‌ها با سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی NCBI مقایسه گردید. میزان مشابهت توالی نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سایر کشورها در جدول (۲) آورده شده است:

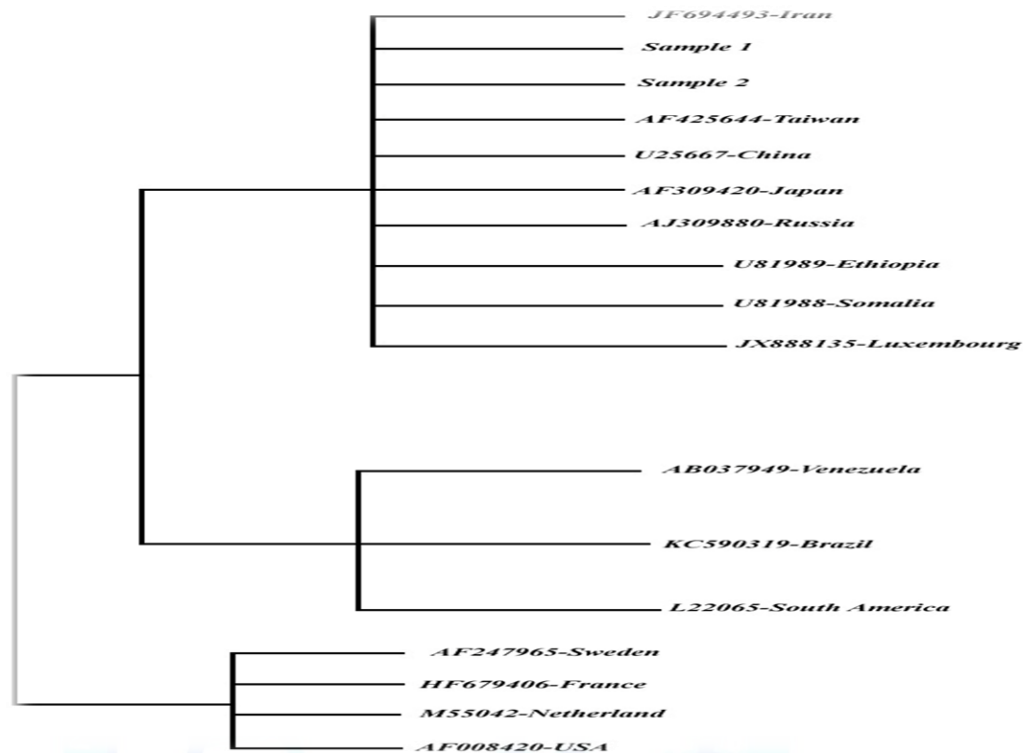
جہانی

8420-UK	55042-France	67940-France	24796-France	565-USA	50313-Brazil	3037949-Venezuela	4888135-Luxembourg	135-81988-Malawi	81989-Thiopia	30988039420-Russia	420-Japan	567-China	425644-Taiwan	4493-Ireland	2-Ireland	1-Seq	
0.999	0.99	0.991	0.991	0.999	0.99	0.999	0.998	0.99	0.999	0.999	0.999	0.999	0.991	0.99	ID	Sample 1	
0.99	0.991	0.999	0.999	0.99	0.991	0.999	0.999	0.991	0.999	0.999	0.99	0.991	0.99	0.999	ID	0.99	Sample 2
0.999	0.99	0.99	0.99	0.998	0.99	0.99	0.99	0.991	0.999	0.999	0.998	0.998	0.991	ID	0.999	0.991	IF694493-Iran
0.999	0.999	0.999	0.998	0.99	0.999	0.998	0.999	0.99	0.999	0.999	0.998	1	ID	0.991	0.99	0.991	F425644-Taiwan
0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.991	0.99	0.999	ID	1	0.998	0.991	0.999	U25667-China
0.999	0.998	0.998	0.99	0.991	0.998	0.99	0.99	0.998	0.999	0.991	ID	0.999	0.998	0.998	0.99	0.999	F309420-Japan
0.999	0.999	0.999	0.998	0.998	0.999	0.998	0.999	0.998	ID	0.991	0.99	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	F309880-Russia

81989-Ethiopia	0/952	0/956	0/953	0/972	0/971	0/964	0/958	ID	0/94	0/951	0/944	0/944	0/954	0/936	0/921	0/921	0/932
81988-Somalia	0/95	0/951	0/951	0/97	0/972	0/968	0/948	ID	0/94	0/948	0/942	0/938	0/95	0/932	0/92	0/92	0/936
8135-Luxembou	0/948	0/949	0/95	0/962	0/965	0/96	0/952	ID	0/948	0/951	0/932	0/948	0/94	0/912	0/919	0/928	0/928
37949-Venezue	0/942	0/945	0/94	0/958	0/956	0/95	0/948	ID	0/938	0/942	0/944	0/948	0/94	0/929	0/928	0/908	0/921
C590319-Brazil	0/94	0/941	0/94	0/945	0/946	0/948	0/945	ID	0/929	0/932	0/938	0/944	0/945	0/935	0/92	0/899	0/897
65-South Amer	0/939	0/94	0/938	0/96	0/962	0/961	0/958	ID	0/94	0/95	0/948	0/94	0/935	0/924	0/91	0/908	0/904
247965-Sweder	0/931	0/936	0/93	0/938	0/939	0/94	0/938	ID	0/924	0/92	0/928	0/94	0/932	0/93	0/913	0/921	0/921
F679406-France	0/931	0/936	0/93	0/929	0/927	0/928	0/926	ID	0/921	0/91	0/899	0/908	0/912	0/92	0/921	0/921	0/928
5042-Netherlan	0/93	0/931	0/93	0/926	0/925	0/928	0/927	ID	0/921	0/92	0/919	0/901	0/897	0/908	0/913	0/921	0/914
F008420-USA	0/929	0/93	0/927	0/924	0/922	0/924	0/936	ID	0/921	0/928	0/936	0/932	0/924	0/92	0/904	0/921	0/928

(AF008420-USA) با ۹۲/۹ درصد قرابت تعیین شد. ترسیم درخت فیلوژنی (تصویر ۴-۲) این موضوع را تایید نمود و همان گونه که مشهود است نمونه‌های مورد مطالعه در شاخه نمونه‌های ایران و کشورهای آسیای جنوب شرقی قرار گرفته ولی نمونه‌های آمریکا و کشورهای اروپایی در شاخه ای جداگانه قرار گرفته اند.

همان گونه که مشهود است، میزان تفاوت ژنتیکی بین ۲ نمونه مورد مطالعه با سکانس‌های ثبت شده ویروس HDV از سایر کشورها و ایران بین ۰/۳-۷/۱ درصد بود که در این میان بیشترین قرابت ژنتیکی بین سکانس تعیین شده در این مطالعه با نمونه ایران (JF694493-Iran) با ۹۹/۷ درصد قرابت و نمونه چین (U25667-China) با ۹۹/۱ درصد قرابت و کمترین مشابهت بین توالی تعیین شده با کشور آمریکا



نمودار ۱: درخت فیلوژنیک رسم شده براساس میزان قرابت نوکلئوتیدی ترسیم شده با نرم افزار ان جی پلات

بحث

عفونت با ویروس دلتا عفونتی است که در سراسر جهان دیده می‌شود ولی شیوع آن در نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت است. از ۳۵۰ میلیون نفر مبتلا به HBV در سراسر جهان ۵ درصد آن‌ها از عفونت توأم HBV و HDV رنج می‌برند. از نظر گسترش جغرافیایی مناطق جغرافیایی جهان را به ۳ گروه تقسیم کرده‌اند: نواحی با همه گیری بالا مانند نواحی آمازون در ونزوئلا، برخی از کشورهای آفریقایی، نواحی آندمیک مانند جنوب ایتالیا، یونان، کشورهای حوزه مدیترانه، بنگلادش و نواحی با شیوع کم مانند کشورهای پیشرفته که بین افراد با ریسک خطر بالا مانند معتادان به مواد مخدر تزریقی دیده می‌شود (۱۰). RNA ویروس تقریباً دارای ۱۷۰۰ نوکلئوتید می‌باشد و یک رشته منفرد حلقوی است که از نظر ساختمانی هیچ‌گونه شباهتی با ژنوم HBV ندارد. هتروژنیسته ویروس بالا بوده و RNA ویروس در هر فرد می‌تواند با فرد دیگر در توالی اسیدهای نوکلئیک متفاوت باشد. HDAG تنها پروتئینی

ویروس هپاتیت D برای اولین بار به عنوان یک آنتی ژن هسته‌ای جدید در هسته هپاتوسایت‌های کبدی بیماران مبتلا به HBV شناخته شد و با هپاتیت حاد شدید یا مزمن همراه بود. سپس این آنتی ژن را آنتی ژن دلتا نامیدند و از محصولات ژنی HBV محسوب کردند. بعداً فهمیدند که آنتی ژن دلتا با یک عامل قابل انتقال بیماری همراه بوده و از محصولات ژنوم HBV نیست. HDAG در کبد یا سرم بیماران به دو گونه یافت می‌شود که بر مبنای تعداد اسید آمینه یا وزن آن است. دلتا آنتی ژن کوچک با وزن ۲۴ هزار کیلو دالتون و دلتا آنتی ژن بزرگ با وزن ۲۷ هزار کیلو دالتون که در ۱۹ اسید آمینه تفاوت دارند و حاصل جمع دو نوع mRNA می‌باشند. HDAG در تشکیل ساختمان ویروس اهمیت داشته و در هسته سلول‌های کبدی جای می‌گیرد (۱۰).

مشخص کردند که همه نمونه‌ها متعلق به ژنوتیپ I ویروس می‌باشند (۵). تحقیقی که توسط عطاران^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص گردید که نمونه‌های مورد بررسی متعلق به گروه HDV I می‌باشند (۱۳). در تحقیق انجام شده توسط منصور^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۷۰۰ اهداکننده خون HBsAg مثبت در نواکشوت، موریتانی مشخص گردید که ژنوتیپ ۵ با ۱۰/۷ درصد و ژنوتیپ ۱ با ۸۹/۳ درصد شیوع بالایی در این منطقه داشتند (۱۴). لگال^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۱۲ تحقیقی را در مرکز و شرق ترکیه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بر روی ۳۴ نمونه از بیماران HBV/HDV مثبت انجام دادند. بررسی فیلوژنتیکی قطعه ۱۲۸۰-۹۰۰ ژنوم HDV نشان داد که تمام سویه‌ها، متعلق به ژنوتیپ HDV I بودند (۱۵).

کیم^{۱۲} و همکاران در سال ۲۰۱۱ تحقیقی را در بین بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن به منظور بررسی شیوع عفونت همزمان با هپاتیت دلتا در کره جنوبی انجام دادند. این تحقیق بر روی ۹۴۰ بیمار انجام گرفت که فقط ۳ نفر از نظر Anti-HDV مثبت گزارش شد. تمامی موارد مثبت پس از بررسی فیلوژنتیکی متعلق به گروه HDV I بودند (۱۶). در تحقیق انجام شده توسط فوپوپوگنی^{۱۳} گنی^{۱۴} و همکاران در ۲۰۱۱ که بر روی ۲۳۳ کامرونی HBsAg صورت گرفت، RNA ویروس HDV از سرم افراد HDV-Ab استخراج گردید، در این بررسی از ۲۳۳ بیمار HBsAg مثبت ۴۱ مورد HDV-Ab مثبت تشخیص داده شدند که در ۲۵ مورد از آن‌ها RNA ویروس دلتا شناسایی گردید. آنالیز فیلوژنتیک انجام شده بر روی ۲۵ نمونه مورد نظر نشان داد که ۲۲ نمونه (۸۸ درصد) از استرین‌ها متعلق به ژنوتیپ I بودند (۱۷). در تحقیق انجام شده توسط کلیک^{۱۵} و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۹

است که توسط HDV ساخته می‌شود و جز داخلی ساختمان ویروس محسوب می‌شود (۱۰). ویروس دلتا دارای یک سروتایپ و هفت ژنوتایپ می‌باشد. بر اساس توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌های I، II و III فراوان‌ترین هستند، بدین ترتیب که ژنوتیپ III در آمریکای جنوبی و بیشتر در بومیان یوپکا کشور ونزوئلا شیوع دارد و موجب بیماری‌های شدید کبدی می‌گردد. همین ژنوتایپ در منطقه سفلاهی رودخانه آمازون بیماری تب سیاه آمازون را ایجاد می‌کند که یک نوع هپاتیت سنگین این ویروس می‌باشد. ژنوتیپ II ویروس دلتا بیشتر در آسیای شرقی با سیری کندتر و بیماری تا حدودی سبک‌تر را تولید می‌کند و ژنوتیپ I در اروپا و آمریکای شمالی شایع است که بیماری تولید شده غالباً برق‌آسا و یا سیروز پیشرونده با سیر سریع را موجب می‌شود (۷).

در تحقیق انجام شده توسط بهزادیان^{۱۶} و همکاران، برای اولین بار به طور کامل ژنوم ویروس هپاتیت دلتا ایران تعیین توالی گردید. ایزوله‌های ویروس HDV در ایران تقریباً طولی معادل ۱۶۷۶ نوکلئوتید دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ویروس هپاتیت دلتا در ایران، متعلق به ژنوتیپ I می‌باشد. در این تحقیق توالی کامل از این ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین شباهت با ایزوله‌های ایتالیایی نوع I (۹۲/۶ درصد)، وجود دارد که نشان دهنده روابط تکاملی میان این دو ایزوله می‌باشد، در حالی که کمترین شباهت با ایزوله‌های پرو نوع III وجود داشت (۱۱). در تحقیق انجام شده توسط اسماعیلی^{۱۷} و همکاران در سال ۲۰۰۹ که بر روی ۲۶ بیمار مبتلا به هپاتیت دلتا در تهران صورت گرفت، همه نمونه‌ها متعلق به ژنوتیپ I تشخیص داده شدند (۱۲). محبی^{۱۸} و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به هپاتیت دلتا انجام دادند که پس از بررسی فیلوژنتیکی

³ - Le Gal

³² Kim

³³ Foupouapouognigni

³⁴ Celik

² - Behzadian

²⁷ Esmaeili

²⁸ Mohebbi

²⁹ Attaran

³⁰ Mansour

مبتلا به هپاتیت مزمن کبدی صورت گرفت، RNA HDV از هر ۶ نفر جدا گردید که پس از بررسی فیلوژنتیکی مشخص شد که ژنوتیپ II b این ویروس در منطقه اوکیناوا، ژاپن غالب است (۲۴).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنتی ژن دلتا از ۲ نمونه سرمی مثبت شده در شهرستان شهرکرد تعیین و قرابت فیلوژنی توالی تعیین شده با توالی‌های مثبت شده این ویروس در بانک ژنی مقایسه گردید که همان گونه که در قسمت نتایج آورده شده نمونه‌های مورد مطالعه دارای ۹۹/۷- ۹۹/۱ درصد قرابت با توالی‌های این ویروس از کشورهای جنوب شرقی آسیا (چین و تایوان) بودند که بر پایه مطالعات قبلی می‌توان این ویروس‌ها را در شاخه ی ژنوتیپ II ویروس HDV قرار داد. اما شاید بتوان این تنوع ژنتیکی را بر اساس گسترش جغرافیایی ویروس توجیه کرد. از آنجایی که در ایران خصوصاً پس از پیروزی انقلاب اسلامی میزان مسافرت‌های خارجی به کشورهای آمریکایی و اروپایی در مقایسه با کشورهای آسیایی محدودتر شده است لذا به نظر می‌رسد که آلودگی با این ویروس در منطقه مورد مطالعه (شهرکرد) از کشورهای جنوب شرقی آسیا (که بیشتر مردها جهت کار به این کشورها خصوصاً ژاپن و کره وارد می‌شوند) آورده شده باشد در مجموع پیشنهاد می‌گردد که با نمونه گیری وسیع تر از قسمت‌های مختلف استان چهارمحال و بختیاری و استان‌های همجوار (اصفهان و خوزستان) و تعیین توالی تعداد بیشتری از نمونه‌های مثبت و انجام روش‌های مولکولار بیولوژی نظیر RFLF و دیگر روش‌های ژنوتایپینگ، ژنوتیپ دقیق ویروس HDV در حال گردش در این منطقه تعیین گردد.

بیمار ترکیه‌ای آلوده به HDV انجام شد. مشخص گردید که تمام نمونه‌ها متعلق به ژنوتیپ I هستند (۱۸). در تحقیق انجام شده توسط باروس^{۳۵} همکاران که در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۱۳۳ برزیلی ناقل HBsAg مزمن انجام گرفت، پس از تعیین توالی مشخص گردید که ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ شایع می‌باشند (۱۹). در تحقیق انجام شده توسط گومز- گوا^{۳۶} همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۱۴ برزیلی مبتلا به هپاتیت برق آسا مشخص گردید تمام این بیماران از لحاظ داشتن HBV DNA و HDV RNA مثبت بودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی HDV نشان داد که همه موارد مثبت متعلق به ژنوتیپ III می‌باشند (۲۰). تحقیقی توسط موریاما^{۳۷} همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۳ ژاپنی مبتلا به هپاتیت B مزمن صورت گرفت. RNA ویروس HDV از سرم این افراد جدا گردید. پس از مقایسه توالی ژنومی HDV جدا شده از این منطقه با مناطق جغرافیایی هم جوار مشخص شد که ۸۰ درصد نمونه‌های Miyako، ژاپن متعلق به ژنوتیپ II b می‌باشند (۲۱). سئودی^{۳۸} و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۳ تحقیقی بر روی ۱۰۵ بیمار HBsAg مثبت انجام دادند که ۹ بیمار از نظر HDV-Ag مثبت گزارش شد که پس از استخراج RNA نوکلئوتیدهای ۸۵۳ تا ۱۲۶۵ سکانس شدند. در بررسی آنالیز فیلوژنتیک مشخص گردید که ۹ ایزوله HDV متعلق به ژنوتیپ I می‌باشند (۲۲). در تحقیق انجام شده توسط اوانیوشینا^{۳۹} و همکاران در سال ۲۰۰۱ که بر روی ۲۹ بیمار روسیه‌ای HBsAg مثبت صورت گرفت، ۱۴ بیمار از نظر HDV-Ag مثبت تشخیص داده شدند که پس از بررسی آنالیز فیلوژنتیک مشخص گردید که ۱۴ ایزوله HDV متعلق به ژنوتیپ I و II می‌باشند (۲۳). تحقیق انجام شده توسط ساکواگاوا^{۴۰} و همکاران که در سال ۱۹۹۹ بر روی ۶ ژاپنی

³ - Saady

³⁹ Ivaniushina

⁴⁰ Sakugawa

³ - Barros

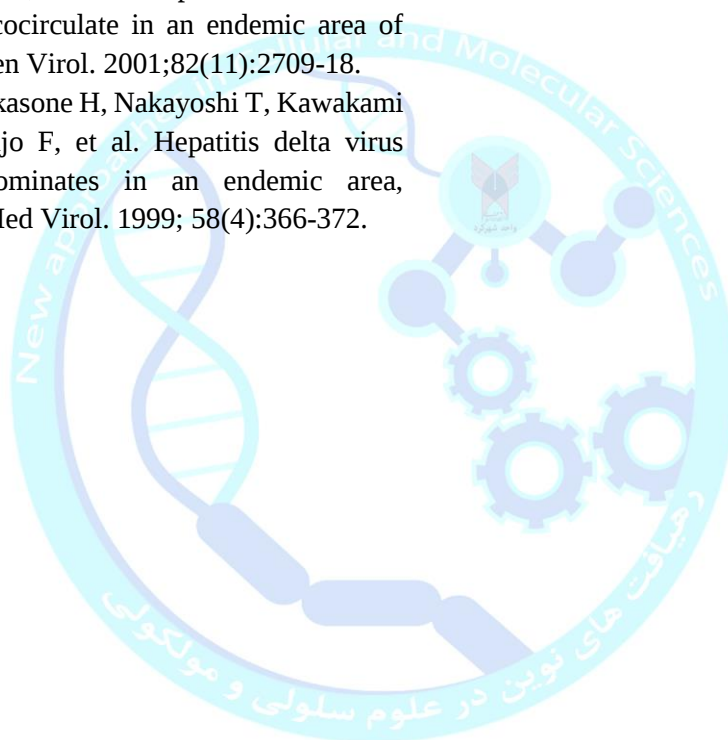
³⁶ Gomes-Gouvêa

³⁷ Moriyama

منابع

- 1- Tassopoulos NC, Papaevangelous GJ, Sjogern MH. Roumeliotou- Karayannis A. natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterol.* 1987; 92(6): 1844-1850.
- 2- Pastore G, Santantonio T, Milella M. Anti-HBe-positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum; response to a 6. Month course of lymphoblastoid interferon. *J Hepatol.* 1992; 14(2): 221-225.
- 3- Taghvaei T, Khanlor Pour M, Mahdavi M, Tirgar Fakheri H, Maleki E, Khalilian A. Prevalence of Hepatitis Delta Virus in HBsAg-positive patients and to investigate the factors associated with it in the years 2007-8. *J Mazandaran Uni of Med Sci.* 2008; 67(10):102-106.
- 4- Gerin JL, Casey JL, Purcell RH. Fields – virology Hepatitis. Delta Virus; 2001; 4(2): 2458-2469.
- 5- Mohebbi SR, Zali N, Derakhshan F, Tahami A, Mashayekhi R, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Molecular Epidemiology of Hepatitis Delta Virus (HDV) in Iran: A Preliminary Report. *J Med Virol.* 2008; 80(12):2092–2099.
- 6- Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald EB. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. 2005: 1050-1100.
- 7- Panahi, M. Hepatitis delta Virus. *Med J Mashhad Univ Med Sci.* 2010; 53(2):117-122.
- 8- Rezvan H, Forouzandeh B, Taroyan S. A study on delta virus infection and its clinical Impact in Iran. *Infect.* 1990; 18(1): 26-28.
- 9- Alavian SM and Alavian SH. Hepatitis D Virus Infection; Iran, Middle East and Central Asia. *Hepaiteist Montaly.* 2005; 5(4):137-143.
- 10- Amini Kafi-abad S. Viral hepatitis diagnosis by laboratory methods. *Iranian Blood Transfus Organs;* 2007; 4(5): 23-112.
- 11- Behzadian F, Sabahi F, Karimi M, Sadeghizadeh M, Maghsoudi N, Forooshani RS, et al.. Molecular phylogenetic analysis of Iranian HDV completes genome. *Virus Genes.* 2005; 30(3):383-393.
- 12- Esmaeili R., Alavian SM, Hajibeigi B, Sabouri E, Edalat R., Adeli A. Phylogenetic Analysis of Twenty-Six Cases of Hepatitis Delta Virus Isolates in Tehran, Iran. *Hepat Mon.* 2009; 9(3):196-200.
- 13- Attaran MS, SharifiZ, Hosseini SM, Samei S, Ataee Z. Prevalence of hepatitis B and hepatitis D coinfection in asymptomatic blood donors in Iran. *APMIS;* 2014. 122 (3):243-247.
- 14- Mansour W, Bollahi MA, Hamed CT, Brichler S, Le Gal F, Ducancelle A, et al.. Virological and epidemiological features of hepatitis delta infection among blood donors in Nouakchott, Mauritania. *J Clin Virol.* 2012; 55(1):12-16.
- 15- Le Gal F, Badur S, Hawajri NA, Akyüz F, Kaymakoglu S, Brichler S, et al. Current hepatitis delta virus type 1 (HDV1) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different HDV1 origins. *Arch Virol.* 2012; 157(4):647-659.
- 16- Kim HS, Kim SJ, Park HW, Shin WG, Kim KH, Lee JH, et al. Prevalence and clinical significance of hepatitis D virus co-infection in patients with chronic hepatitis B in Korea. *J Med Virol.* 2011; 83(7):1172-1177.
- 17- Foupouapouognigni Y, Noah Noah D, Sartre MT, Njouom R. High Prevalence and Predominance of Hepatitis Delta Virus Genotype 1 Infection in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3):1162-1164.
- 18- Celik I, Karatayli E, Cevik E, Kabakçi SG, Karatayli SC, Dinç B, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients. *Arch Virol.* 2011; 156 (12):2215-2220.
- 19- Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Corrêa MC, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus Research;* 2011; 160(1-2):333-339.
- 20- Gomes-Gouvêa MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, BritoEM, SouzaOS, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Virol.* 2009; 90(11):2638-2643.

- 21- Moriyama M, Taira M, Matsumura H, Aoki H, Arakawa Y, Kaneko M, et al. Full genomic analysis of hepatitis delta virus prevalent on Miyako Island, Japan. *Intervirology*. 2005; 48(4):246-254.
- 22- Saady N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Abdel Aal A, Zaid M, et al. Genotypes and Phylogenetic Characterization of Hepatitis B and Delta Viruses in Egypt. *J Med Virol*. 2003; 70(4):529-536.
- 23- Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol*. 2001;82(11):2709-18.
- 24- Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, et al. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol*. 1999; 58(4):366-372.



Molecular analysis of Hepatitis delta virus

Elahe Tajbakhsh^{1*}, Fatemeh Khodaverdipour¹, Naghmeh Mirabolghasemi¹

1. Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Hepatitis Delta Virus (HDV) is a defective RNA virus that requires the presence of Hepatitis B Virus (HBV) for its replication and function. HDV infection can result in both acute and chronic liver disease. HDV strains have been classified into seven genotypes and eight clades. The prevalence of HDV infection among blood donors in Iran ranges from 2.4% to 10%. The objective of this study was to perform a phylogenetic analysis of HDV isolates obtained from HBsAg-positive patients in Shahrekord, Iran, in comparison with isolates from other regions of the world. In this study, 350 serum samples were collected from HBV-infected individuals referred to the Blood Transfusion Organization in Shahrekord. HDV RNA was extracted using the RNX Plus kit (SinaClon, Iran). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the RT PreMix kit (Bioneer, Germany). PCR-positive samples were subsequently purified using the PCR Purification Kit (Roche, Germany), and a 421 base pair fragment was submitted for sequencing to Macrogen (South Korea). The sequences of two positive samples were aligned using ClustalX software and compared with reference sequences available in the NCBI GenBank database. Based on sequence similarity, a phylogenetic tree was constructed using the NJPlot software. The HDV antigen (HDVAg) sequences obtained from the Iranian isolates were compared with 15 representative HDV sequences from various countries. The studied isolates showed a high sequence similarity (99.1%–99.7%) with HDV strains reported from Southeast Asian countries, including China and Taiwan. Based on previous studies, these isolates can be classified within genotype II of HDV.

Keywords: genotype II HDV, Hepatitis Delta Virus, Similarity genetic.

Contents**Population frequency of Bifidobacterium longum and Bifidobacterium bifidum in the intestine of obese patients before and after gastric surgery**

Kimia Golstanfar, Laya Takbiri Osgoei, Elham Siasi Torbati.....3

Prevalence of antibiotic resistance and enterotoxin genes in Staphylococcus aureus producing biofilm isolated from meat and meat products Antibiotic resistance and enterotoxin genes in Staphylococcus aureus

Kobra Abbasi, Manochehr Momeni Shahraki.....18

Identification of bacteria causing urinary tract infections in diabetic patients in Shahrekord city

Mohammad Rajabi, Payam Raeghi Tehrani.....42

Molecular detection of bacteria causing diarrhea in children with diarrhea

Zeynab Marzat, Mohammad Rajabi, Payam Razeghi Tehrani.....56

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

Mehran Khalili Dehkordi, Fereshte Salehian Dehkordi, Majid Esmaili.....63

Molecular analysis of Hepatitis delta virus

Elahe Tajbakhsh, Fatemeh Khodaverdipour, Naghmeh Mirabolghasemi.....72



