



مجله علمی رهیافت های نوین در علوم سلولی و مولکولی

New approaches in Cellular and Molecular Sciences



فهرست

بررسی فراوانی ژنهای اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروباتوژن جدا شده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد

نگین دلی سرراکی، فاطمه خداوردی پور، نازیلا ارباب سلیمانی ۱

اثر تمرینات هوازی بر میتوفاژی میتوکندریایی

فرانک امینی، دکتر محمد علی آذربایجانی، دکتر شاهین ریاحی، دکتر لیدا مرادی ۱۴

بررسی الگوی سرمی کوکسیلا بورنتی در نمونه‌های بالینی کارکنان کشتارگاه‌های شهرستان‌های اصفهان

فهیمة نوربخش، حسین چهارده معصومی، محمدرضا صائبی ۲۹

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

زیبا شانکی باورصاد، مریم رئیسی، حسین آقاجانی، مرضیه سلیمانیان ۴۰

بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در نمونه خون افراد سرولوژی مثبت بروسلا در شهرستان‌های شهرکرد و اصفهان

به روش Real Time PCR

حسین خدابنده، نازیلا ارباب سلیمانی، حسین آقاجانی، محمدرضا افشارزاده ۵۲

مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی

شیما شنتیانی ۶۶



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



بررسی فراوانی ژنهای اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در ایزولههای/شریشیا کلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران دیابتی در شهرستان شهرکرد

نگین دلی سرراکی^۱، فاطمه خداوردی پور^۲، نازیلا ارباب سلیمانی^{۳*} محمد رضا افشارزاده^۴

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

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

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

۴. گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲ چاپ: تابستان ۱۴۰۳ DOI: کلمات کلیدی: دیابت، اینتگرون، عفونت ادراری،/شریشیا کلی یوروپاتوژن. *نویسنده مسئول: nazilaarbab@yahoo.co.uk	سویههای/شریشیا کلی یوروپاتوژن شایعترین سویههای بیماریزا در انسان میباشند. مهمترین خصوصیت سویههای/شریشیا کلی یوروپاتوژن، توانایی کلونیزه شدن آنها در سطح سلولهای یورواپیتلیوم میزبان می باشد. مطالعه حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ مشکوک به عفونت ادراری، مراجعه کننده به آزمایشگاههای تشخیص طبی شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. ۵ تا ۱۰ سی سی نمونه ادرار بیماران دیابتی در ظروف استریل جمع آوری و با استفاده از لوپ کالیبره، ۰/۰۱ میلی لیتر از نمونه ادرار سانتریفیوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شد. در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری/شریشیا کلی، حضور توالی ژن 16srRNA تمامی نمونهها مورد بررسی قرار گرفتند و در حضور پرایمرهای اختصاصی به فراوانی ژنهای اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ پرداخته شد. از ۳۰۰ بیمار دیابتی مورد بررسی در ۱۰۰ نمونه عفونت ادراری تشخیص داده شد که در ۵۱ نمونه (۵۱ درصد) آلودگی به/شریشیا کلی گزارش شد. از ۵۱ ایزوله/شریشیا کلی مورد بررسی اینتگرون کلاس ۱ در ۳۰ ایزوله (۵۸/۸۲ درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۲۰ ایزوله (۳۹/۲۱ درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله (۹/۸۰ درصد) گزارش گردید. بیشترین مقاومت به آمپی سیلین (۶۶/۶۶ درصد) و کمترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۱/۹۶ درصد) گزارش شده است. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به جنتامایسین، امی پنم و نیتروفورانتوئین با اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$).

مقدمه

دیابت^۱ یا بیماری قند خون^۲ 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،۲). 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 (۳-۸). 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 (۹-۱۱). 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 (۱۱، ۱۲). خطر مرگ و میر زودرس، بیماری‌های قلبی، کلیوی، عصبی و نابینایی در افراد دیابتی دو برابر افراد غیردیابتی است (۱۳). 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 یوراپیتلیوم میزبان می‌باشد (۱۴، ۱۵). اینتگرون‌های کلاس ۱ اولین بار توسط استوکس^۳ و هال^۴ در سال ۱۹۸۹ کشف شدند و بیش از ۴۰ ژن مقاومتی در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، ماکرولیدها، سولفانامیدها، ضد عفونی کننده‌ها و دزانفکتان‌ها را حمل می‌نمایند (۱۶، ۱۷). متعاقب اینتگرون‌های کلاس ۱، اینتگرون‌های کلاس ۲ شیوع بالایی را در ایزوله‌های بالینی در باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند (۱۸). کاست‌های ژنی موجود در این دسته از کلاس‌ها عمدتاً در ارتباط با مقاومت‌های مختلف مثل: استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تری‌متوپریم می‌باشند. ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۲ در حدود ۴۶ درصد مشابه ژن اینتگراز در اینتگرون‌های کلاس ۱ می‌باشد (۱۹). اینتگرون‌های کلاس ۳ برای اولین بار توسط آرکاوا^۵ و

^۴- Hall

^۵- Arakawa

^۱- Diabetes

^۲- Diabetes Mellitus

^۳- Stokes

همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن شناسایی گردید. این دسته از اینتگرون‌ها به ندرت در نمونه‌های بالینی وجود دارند ولی اخیراً در نمونه‌های کلینیکی نظیر: *سودوموناس آئروژینوزا*، *سراسیا مارسنس*، *سودوموناس پوتیدا* و *کلبسیلا پنومونیه* در ژاپن، پرتغال و کانادا یافت شده است (۲۰). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند. ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولاً در عناصر ژنتیکی به نام اینتگرون‌ها وجود دارند (۴). انتقال افقی اینتگرون‌ها موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومت و پیدایش گونه‌های با مقاومت چندگانه^۶ MDR است. غالب گونه‌های جدا شده از بیماران و محیط بیمارستان با ویژگی MDR متعلق به کلاس ۱ هستند که بر روی پلاسمید یا ترانسپوزون قرار دارند (۲).

مواد و روش کار

تحقیق حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران دیابتی مشکوک به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت. نمونه ادرار توسط بیمار در ظروف استریل جمع‌آوری و بلافاصله پس از نمونه گیری، جهت انجام کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی و تشخیص نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. جهت کشت با استفاده از لوپ کالیبره، ۰/۰۱ میلی لیتر از نمونه ادرار سانتریفوژ نشده در شرایط استریل بر روی محیط مک کانکی

آگار کشت داده شدند. پس از مشخص شدن نمونه‌های UTI مثبت، تعیین هویت باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR صورت پذیرفت (۲۱،۲۲). برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی-بایر^۷ بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارایه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سوبه استاندارد /شریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (تری‌متوپریم+سولفامتوکسازول) (SXT)، آمیکاسین (AM30)، سفتریاکسون (CRO30)، نیتروفورانتوئین (FM300)، سفالوتین (CF30)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR)، تتراسایکلین (TE30)، ایمی‌پنم (IPM10)، جنتامایسین (GM10) از شرکت پادتن طب-ایران مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. DNA های دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم، جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

⁷ - Kirby Bauer

⁶ - multi-drug resistant

بعد از استخراج DNA از زوج پرایمرهای مربوط به
ردیابی ژن *16srRNA* به تایید ایزوله‌ها پرداخته شد و در
نهایت در حضور پرایمرهای اختصاصی به بررسی فراوانی ژن-
های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ پرداخته شد. توالی پرایمرها
در جدول (۱) نشان داده شده است (۲۳).

جدول ۳- نتایج مربوط به ردیابی ژن‌های اینتگرون در ایزوله‌های/شریشیا کلی

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن
۱۳۰	F: ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R: TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	<i>16srRNA</i>
۴۳۶	F: GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG R: ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	<i>Int 1</i>
۷۸۸	F: AGT GGG TGG CGA ATG AGT G R: GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	<i>Int 2</i>
۶۰۰	F: TGT TCT TGT ATCGGC AGG TG R: GGC ATC CAA GCA GCA AG	<i>Int 3</i>

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و اینتگرون
کلاس ۲ واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل
از ۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰ میکرومول Mix
dNTP، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج
پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز و ۲ میکرولیتر
DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه حرارتی برای
تکثیر ژن‌های ژن‌های اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های
/شریشیا کلی به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵
دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۶۰
درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲
دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام
شد.

جهت ردیابی ژن‌های اینتگرون کلاس ۳ واکنش PCR
در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با

واکنش PCR برای ردیابی ژن *16srRNA* در حجم
نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰
برابر (PCR buffer 10X)، ۱۰۰ میکرومول Mix dNTP
(۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم (MgCl₂)،
۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی
مراز و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت. برنامه
حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA* /شریشیا کلی به صورت
یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری
۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه،
۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه
سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام شد.

غلظت ۱۰ برابر (PCR buffer 10X)، ۱۰۰ میکرومول dNTP Mix (۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، صورت گرفت (۱۷). برنامه حرارتی برای تکثیر ژن های ژن اینتگرون کلاس ۳ در ایزوله های/شریشیا کلی به صورت: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جدول (۱) نشان داده شده است.

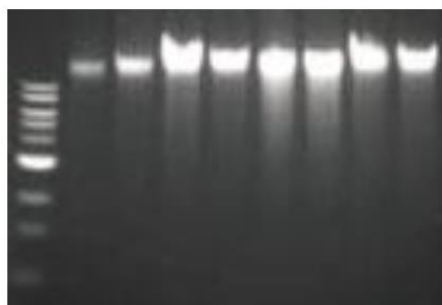
برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه Eppendorf Master cycler Gradient, Germany استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA صورت گرفت و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه تراس لومیناتور

(Uviteck, England) تصویر به دست آمده بر روی کاغذ حرارتی ثبت شد.

نتایج حاصل از ارزیابی ژن های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher Exact test) و با نرم افزار SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت.

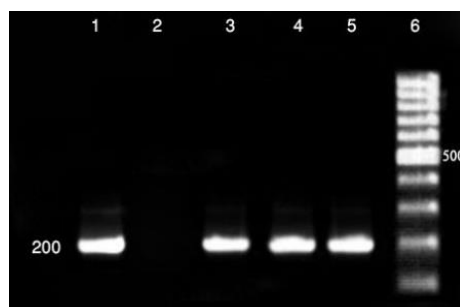
نتایج

مطالعه حاضر بر روی ۳۰۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲ مشکوک به عفونت ادراری، مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. پس از کشت نمونه های ادرار، جداسازی باکتری های عامل عفونت ادراری توسط آزمون های بیوشیمیایی صورت گرفته و به منظور تشخیص قطعی آزمون PCR تایید شد. از ۳۰۰ نمونه مورد بررسی در ۱۰۰ نمونه عفونت ادراری تشخیص داده شد. که آلودگی به/شریشیا کلی در ۵۱ مورد (۵۱ درصد) گزارش گردید. پس از استخراج DNA کیفیت DNA های مورد بررسی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. نتایج در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز DNA استخراج شده از ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری *اشریشیا کلی* و حضور توالی *16srRNA* تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز توالی ژن *16srRNA* استخراج شده از ایزوله‌های *اشریشیا کلی*

آنتی‌بیوتیک در ۴ ایزوله (۷/۸۴ درصد)، نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک در ۴ ایزوله (۹/۸۰ درصد)، نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک در ۶ ایزوله (۱۱/۷۶ درصد)، نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک در ۳ ایزوله (۵/۸۸ درصد)، نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک در ۲ ایزوله (۳/۹۲ درصد)، نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک در ۳ ایزوله (۵/۸۸ درصد)، نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک در ۲ ایزوله (۳/۹۲ درصد)، نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک در ۱ ایزوله (۱/۹۶ درصد) و نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک در ۱ ایزوله (۱/۹۶ درصد) گزارش گردید. از ۵۱ ایزوله *اشریشیا کلی* مورد بررسی در این تحقیق اینتگرون کلاس ۱ در ۳۰ ایزوله (۵۸/۸۲ درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۲۰ ایزوله (۳۹/۲۱ درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله

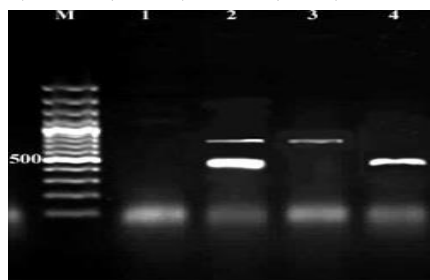
پس از تایید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی مقاومت نسبت به آمپی سیلین ۶۶/۶۶ درصد، تتراسایکلین ۵۶/۸۶ درصد، کوتریموکسازول ۵۴/۹۰ درصد، نالیدیکسیک اسید ۵۲/۹۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۳۹/۲۱ درصد، سفالوتین ۴۱/۱۸ درصد، نورفلوکساسین ۳۵/۲۹ درصد، آمیکاسین ۲۵/۴۹ درصد، سفتریکسون ۲۹/۴۱ درصد، جنتامایسین ۱۷/۶۵ درصد، ایمپنم ۲۳/۵۳ درصد و مقاومت نسبت به نیتروفوران‌توئین ۱/۹۶ درصد گزارش گردید. مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک در ۱۱ ایزوله (۲۱/۵۶ درصد)، نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک در ۹ ایزوله (۱۷/۶۴ درصد)، نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک در ۶ ایزوله (۱۱/۷۶ درصد)، نسبت به ۴

کلاس ۲ و ۳ همزمان در ۲ ایزوله (۳/۹۲ درصد) و حضور همزمان ژنهای اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ در ۳ ایزوله (۵/۸۸ درصد) گزارش گردیدند. نتایج در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

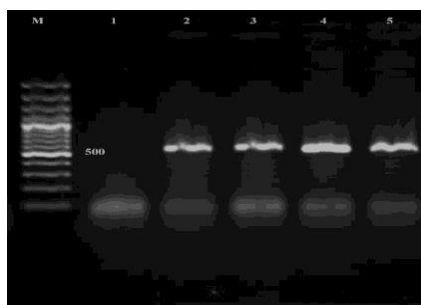
(۹/۸۰ درصد) گزارش گردید. نتایج در جدول (۳) نشان داده شده است. حضور همزمان ژنهای اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ۱۴ ایزوله (۲۷/۴۵ درصد)، ژنهای اینتگرون کلاس ۱ و ۳ در ۳ ایزوله (۵/۸۸ درصد) گزارش گردید، ژنهای اینتگرون‌های

جدول ۳- نتایج مربوط به ردیابی ژنهای اینتگرون در ایزوله‌های/شریشیا کلی

نوع اینتگرون	کلاس ۱	کلاس ۲	کلاس ۳	کلاس ۱ و ۲	کلاس ۱ و ۳	کلاس ۲ و ۳	کلاس ۱، ۲ و ۳
تعداد ایزوله	۳۰	۲۰	۵	۱۴	۳	۲	۳
	(/۵۸/۸۲)	(/۳۹/۲۱)	(/۹/۸۰)	(/۲۷/۴۵)	(/۵/۸۸)	(/۳/۹۲)	(/۵/۸۸)



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژنهای اینتگرون کلاس ۱ و ۲: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون ۲: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱ و باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۳: باند ۷۸۸ جفت بازی اینتگرون کلاس ۲، ستون ۴: باند ۴۳۶ جفت بازی اینتگرون کلاس ۱.



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

بحث

در تجزیه و تحلیل آماری براساس آزمون دقیق فیشر بین

افزایش مقاومت دارویی معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند

مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ایمی پنم و نیتروفورانتوئین و اینتگرون کلاس ۱ ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید ($p\text{-value} < 0.05$) و بین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0.05$).

(۲۶،۲۵). نقش اینتگرون‌ها در گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه از طریق انتقال افقی تا اندازه‌ای است که مقالات مختلف، نقش اینتگرون‌ها را در مقاومت چندگانه باکتری‌های گرم منفی قابل توجه می‌دانند (۲۸،۲۷). همچنین اینتگرون‌ها، به عنوان ابزاری جهت کنترل عفونت‌ها و همچنین جهت مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها شناخته می‌شوند (۲۹). با توجه به مطالب گفته شده بالا، در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های /شریشیا کلی شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲ و ۳ در آن‌ها و ارتباط اینتگرون‌ها با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که اینتگرون کلاس ۱ در ۲۰ ایزوله (۳۹/۲۱ درصد)، اینتگرون کلاس ۲ در ۱۰ ایزوله (۱۹/۶۰ درصد) و اینتگرون کلاس ۳ در ۵ ایزوله (۹/۱۸ درصد) گزارش گردید.

بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی نسبت به مطالعات صورت گرفته قبلی در ایران می‌باشد، به طوری که در مطالعه حاضر میزان مقاومت در ایزوله‌های /شریشیا کلی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفرانتوئین و آمیکاسین بسیار بالاتر از مطالعه صورت پذیرفته توسط فرشاد و همکارانش می‌باشد. همچنین میزان فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در مطالعه حاضر ۳۹/۲۱ درصد می‌باشد که از میزان فراوانی آن در مطالعه فرشاد بالاتر است (۳۲). همچنین به نظر می‌رسد که با افزایش

میزان فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه ما نسبت به ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه فرشاد و همکارانش، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز در آن‌ها افزایش یافته است. کلاس ۱ اینتگرون‌ها غالباً در سویه‌های انتروباکتریاسه گزارش شده است که یک عامل جدی برای گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. مطالعات انجام شده در مورد ایزوله‌های /شریشیا کلی جدا شده از مبتلایان به عفونت ادراری در اروپا و آسیا نشان می‌دهد که شیوع اینتگرون از ۲۲ تا ۵۹ درصد متغیر می‌باشد (۳۰). در مطالعه انجام شده توسط فلکیان و همکاران فراوانی اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری ۴۱/۹ درصد برآورد گردید که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما بیشتر می‌باشد. در این مطالعه از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین وجود اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و ازترونام مشاهده گردید که حاکی از انتقال ژن مقاومت توسط این عناصر می‌باشد (۳۱). در تحقیق انجام شده توسط رنجبران و همکاران که به منظور بررسی مولکولی اینتگرون‌ها در ایزوله‌های /شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری بیماران بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه یک بیمارستان در اراک صورت گرفت، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های /شریشیا کلی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۸۸، سفتریاکسون ۷۶، آموکسی‌کلاو ۷۴، سفنازیدیم ۷۲ و

سفوتاکسیم ۷۲ درصد بود. در حالی که در تحقیق مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول و سفتریاکسون کمتر از مطالعه رنجبران و همکاران می باشد. در تحقیق مقاومت نسبت به ایمی پنم ۲۳/۵۳ درصد گزارش گردید، در صورتی که در تحقیق رنجبران تمامی ایزوله های اشیشیاکلی نسبت به ایمی پنم حساسیت نشان دادند (۳۲). در مطالعه انجام شده توسط اسلامی و همکاران که بر روی ۲۰۰ ایزوله /شریشیا کلی صورت گرفت، ۱۷۱ نمونه به عنوان مقاوم به چند دارو گزارش گردیدند که در ۳۵ ایزوله ژن اینتگراز گزارش گردید که در ۲۵ ایزوله (۱۴/۵ درصد) ژن اینتگرون کلاس ۱ و در ۱۰ ایزوله (۵/۸ درصد) ژن اینتگرون کلاس ۲ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما مغایرت دارد. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین وجود ژن اینتگرون و مقاومت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، نوافلوکساسین، سفالوتین و نالیدیکسیک اسید گزارش گردید (۳۳).

نتیجه گیری

شیوع بالای اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله های اشیشیاکلی مقاوم به ایمی پنم، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین در تحقیق ما می تواند حاکی از وجود ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی باشد. در تحقیق رنجبران ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی کوتریموکسازول، جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و آموکسی کلاو گزارش گردید.

در تحقیق حاضر از ۵۱ ایزوله مورد بررسی در ۲۵ ایزوله (۴۹ درصد) به بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاومت داشتند و درصد بالایی از ایزوله ها فاقد مقاومت چندگانه بودند که این امر می تواند دلیلی برای کمتر بودن شیوع اینتگرون ها نسبت به تحقیقات سایر محققین باشد.

در این مطالعه بین وجود مقاومت با آنتی بیوتیک های جنتامایسین، ایمی پنم و نیتروفورانتوئین و اینتگرون کلاس ۱ ارتباط آماری معنی داری مشاهده گردید که نشان دهنده انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله ها از طریق اینتگرون کلاس ۱ می باشد و علت این مقاومت می تواند حضور کاست های ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی در ژن اینتگرون کلاس ۱ باشد. اما بین اینتگرون های کلاس ۲ و ۳ و آنتی بیوتیک های مورد نظر ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید که نشان دهنده این است که علاوه بر اینتگرون ها عوامل دیگری نظیر ترانسپوزون ها نیز می توانند در انتقال مقاومت نقش داشته باشند.

منابع

1. Melanitou E, Fain P, Eisenbarth G. Genetics of Type 1A (immune mediated) diabetes. J Auto. 2003; 21 (2): 93–98.
2. Seyedjavadi S, Eslami G, Goudarzi M, Goudarzi H, Fallah F. Integrins and multidrug resistance among *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from children with urinary tract infections. Health Med. 2013; 7(1): 243-249.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2013. Diabetes Res Clin Pract. 2013; 87 (1): 4-14.
4. Balasoiu D, van Kessel KC, Van kats-Renaud HJ, Collet J, Hoepolman AI. Granulocytes function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. Diabetes Care. 1997; 20: 393–395.
5. Bertoni AG., and Saydah S. 2001. Diabetes and the risk of infection related mortality in the US. Diabetes Care; 24: 1004–1009.
6. Pozzilli P and Lesli RDG. Infections and diabetes: Mechanisms and prospects for prevention. Diabet Med. 1994; 11: 935-941.
7. Carton JA, Maradona JA, Nuno FJ, Fernandez-Alvarez R, Perez-Gonzalez F, and et al. Diabetes mellitus and bacteremia: A comparative study between diabetic and nondiabetic patients. Eur J Med. 1992; 1: 281-287.
8. Boyko EJ, Fihn SD, Scholes D, Abraham L, and Monsey B. Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteruria among diabetes and nondiabetic postmenopausal women. J Am Epidemiol. 2005; 161: 557-564.
9. Stapleton A. Urinary tract infection in patients with diabetes. Am J Med. 2002; 113(1A): 80- 84.
10. Hosking DJ, Bennet T., and Hampton JR. 1978. Diabetic autonomic neuropathy. J Diabetes Care. 27: 1043-54.
11. Ronald A, and Ludwig E. Urinary tract infection in adults with diabete. J Antimicrobial Agent. 2001; 17: 287-289.
12. Brown JS., Wessells H., Chancellor MB., Howards SS, Stamm WE. Urologic complication of diabetes. Diabetes Care. 2005; 8(1): 177–185.
13. Thomas GN, Jiang CQ, Taheri S, Xiao ZH, Tomlinson B. A systematic review of life style modification and glucose intolerance in the prevention of type 2 diabetes. Cur Diabetes Rev. 2010; 6: 378-387.

14. Kargar M, Daneshvar M, Homayoun M. Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin purchase in Shiraz. 2011; 14: 76-83.
15. Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. 3rd ed Washington DC ASM Press. 2010; 91-111.
16. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98 (2): 652-657.
17. Stokes HT, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 2011; 3(12):1669-83.
18. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Fron Microbiol. 2012; 3 (119):1-14.
19. Barlow RS, Gobius KS. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(6): 1133-1138.
20. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS microbiology reviews. 2009; 33(4):757-784.
21. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Stards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved stated-Ninth Edition (M2-A9). Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2006.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne Pa. 2003.
23. Turton JF, Perry C, Elgohari S, CV Hampton. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific., variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010; 59(4):541-547.
24. Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. 2002; 50 (2): 513-516.
25. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Eco. 2003; 43(2): 325-335.
26. Kümmerer K. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(3): 311-320.
27. Hussein AI, Ahmed AM, Sato M, Shimamoto T. Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. Microbiol Immunol. 2009; 53 (11): 595-602.

28. Machado E, Canton R, Baquero F. Integron content of extended spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (5): 1823-1829.
29. Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski A, Iredell J. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. *J Microbiol Methods*. 2005; 62(2): 221-232.
30. Farshad Sh, Japoni A, Hosseini M. Low Distribution of Integrons among Multidrug resistant *E. coli* Strains Isolate from Children with community-Acquired urinary tract infections in Shiraz, Iran. *Polish J Microbiol*. 2008; 57 (3): 193-198.
31. Falakian Z, Nikokar I, Nafisi MR, Karimi AM V. Frequency of class 1 Integrons among *Escherichia coli* isolates of patients with urinary tract infection Iran. *J Clin Infect Dis*. 2011; 6 (4): 24-32.
32. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A., Amouzandeh Nobaveh AR, Abtahi H, Nejad M Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2013; 23 (105): 20-27.
33. Islami G, Seyed Javadi S, Fallah H. Prevalence of integrons in multidrug resistance *E. coli* and *Kelebsiella* isolated from urinary tract infections in children. *Pajohandeh*. 2011; 34(1):61-65.

The frequency of genes in integron class 1, 2 and 3 in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diabetic patients in Shahrekord city

Negin Deli Saraki¹, Fatemeh Khodaverdipour², Nazila Arbab soleimani^{3*}, Mohammad Reza Afsharzadeh⁴

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

2- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

4- Department of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: Nazilaarbab@yahoo.co.uk

Abstract

The most common uropathogenic strains of *Escherichia coli* strains are pathogenic in humans. The most important feature of uropathogenic *Escherichia coli* strains, the ability of colonization on the surface of host is the euro epithelium cells.

The present study took place on 300 urine samples of patients with diabetes mellitus type 2 suspected urinary tract infections, referred to clinical laboratories of Shahrekord city, Iran in 1394. 5 to 10 cc of urine samples from diabetic patients were collected and by calibrated loop, 0.01 ml of urine cultured in Mac kanky agar media. After performing PCR test were examined to *16srRNA Escherichia coli* gene, all samples tested for the presence of class 1, 2 and 3 integron genes at the present of specific primers.

Of 300 diabetic patients UTI diagnosed in 100 samples. In 51 patients (51%) *E.coli* was diagnosed. Results indicate that class 1 integron was seen in 30 isolations (58.82%), class 2 in 20 (39.2%) and the third class in 5 ones (9.8%). Most resistance reported to ampicillin (66.66%) and the lowest resistance reported to Nitrofurantoin (1.96%).

Based on statistical analysis had a significant relationship was observed between resistance to gentamicin, imipenem and Nitrofurantoin with class 1 integron ($p\text{-value} < 0/05$).

Keywords: Diabetic pateients, *Escherichia coli*, Integron, Urinary Tract nfection.



مجله رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



اثر تمرینات هوازی بر میتوفاژی میتوکندریایی

فرانک امینی^۱، محمد علی آذربایجانی^{۲*}، شاهین ریاحی^۳، لیدا مرادی^۱

- ۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۳- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲

چاپ: تابستان ۱۴۰۳

DOI:

کلمات کلیدی: میتوفاژی، تمرینات هوازی، فشار

اکسایشی، التهاب، آپوپتوز

* نویسنده مسئول: Email

m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

چکیده

میتوکندری یکی از اندامک‌های پویای سلولی بوده که اختلال در عملکردش موجب تضعیف عملکرد سلول و در نهایت مرگ سلولی می‌گردد. میتوفاژی اتوفاژی انتخابی میتوکندری‌های آسیب‌دهنده که به واسطه حذف میتوکندری‌های ناکارآمد موجب بهبود عملکردهای بیولوژیک سلولی می‌گردد. مسیر سیگنالینگ PINK1-Parkin از مهم‌ترین مسیرهای تنظیم میتوفاژی می‌باشد. اختلال در میتوفاژی دلیل اصلی بسیاری از بیماری‌های متابولیک، نورودژنراتیو، سرطان‌ها و سالمندی می‌باشد. شواهد به دست آمده از مطالعات انسانی و حیوانی نشان می‌دهد تمرینات هوازی به واسطه تنظیم و فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ، میتوفاژی میتوکندریایی را توسعه داده و موجب حفظ سلامتی در سطح سلول و به دنبال آن کاهش بروز بیماری‌ها می‌گردد. هرچند مکانیسم مولکولی دقیق اثر تمرینات هوازی در توسعه میتوفاژی میتوکندریایی مشخص نیست؛ اما نتایج مطالعه متعدد نشان می‌دهد کاهش فشار اکسایشی، التهاب، آپوپتوز و افزایش مایوکاین‌های ضد التهاب همراه با تمرینات هوازی منظم با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ میتوفاژیک به ویژه مسیر سیگنالینگ PINK1-Parkin، میتوفاژی را در بافت‌های گوناگون و در شرایط سالمندی، چاقی، بی‌حرکی و اختلالات متابولیک تنظیم نموده و از توسعه بیماری‌های متعدد جلوگیری می‌نماید. نقش تنظیمی تمرینات هوازی بر میتوفاژی تاکید کننده کارایی این تمرینات بر محافظت بافتی و توسعه سلامتی می‌باشد.

مقدمه

میتوکندری اندامک بسیار پویا بوده که به طور پیچیده برای برآوردن نیازهای انرژی سلولی طراحی شده‌اند، به گونه‌ای که بسیاری از بیولوژیست‌ها آن را نیروگاه سلول می‌نامند (۱). در واقعیت عملکرد سلول‌ها بسیار وابسته به سلامت و کارایی میتوکندری‌ها می‌باشد. سلامت میتوکندری یک واسطه مهم برای عملکرد سلولی در طیف وسیعی از بافت‌ها است و در نتیجه به حفظ و توسعه سلامتی و مهار توسعه بیماری‌ها کمک می‌نماید. میتوکندری‌ها برای انطباق با تغییرات در تقاضای انرژی، میتوکندری‌ها دارای درجه بالایی از انعطاف‌پذیری هستند که در پاسخ به فعال شدن گذرا مسیرهای متعدد مرتبط با استرس تغییر می‌کنند (۲). این پاسخ انطباقی به ویژه در بافت‌هایی مانند عضله اسکلتی که دارای متابولیسم بالایی می‌باشند از اهمیت ویژه‌ای برای بسیاری از فرایندهای بیولوژیک سلول مانند متابولیسم، رشد و بازسازی سلول برخوردار است (۳). به همین دلیل، حفظ عملکرد میتوکندری به تنهامتکی به تنظیم کافی عملکردهایی است که واگردش آن‌ها را کنترل می‌کنند (بیوژنز میتوکندریایی)، بلکه وابسته به میتوفاژی که میتوکندری‌های آسیب دیده یا غیر ضروری را حذف می‌کند، می‌باشد (۴). میتوفاژی ناکافی منجر به تجمع میتوکندری‌های ضعیف و آسیب‌دیده، با ظرفیت کاهش یافته برای سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP+) شده و همچنین موجب تولید سطوح بالایی از رادیکال سوپراکسید شده که می‌تواند فشار اکسایشی را در

سطح سلولی افزایش داده و موجب آسیب‌های بنیادی به سلول می‌شود (۵). اهمیت میتوکندری به اندازه‌ای است که عملکرد ضعیف میتوکندریایی یک نشانه شناخته شده از بیماری‌های متابولیک و نورودژنراتیو است که به شدت با پیشرفت‌های پاتولوژیک در ارتباط می‌باشد. به همین دلیل هر عاملی که بتواند عملکرد میتوکندریایی را بهبود بخشد، در واقعیت موجب بهبود عملکرد سلولی شده و احتمال وقوع بسیاری از بیماری‌ها را کاهش می‌دهد. یکی از مداخلاتی که می‌تواند موجب بهبود واگردش میتوکندری‌ها شده و سلامتی را در سطح سلولی توسعه دهد فعالیت‌های بدنی به ویژه تمرینات هوازی می‌باشد (۶). به خوبی مشخص شده فعالیت‌های بدنی منظم جزء جدایی‌ناپذیر زندگی انسان است که اثرات قابل توجهی بر حفظ سلامتی و پیشگیری از اختلالات مرتبط با عضله و سایر بافت‌ها دارد. سلامت و کارایی عملیاتی میتوکندری‌های عضله اسکلتی برای حفظ فعالیت بدنی بسیار مهم است زیرا آن‌ها مسئول تأمین انرژی از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو در سلول‌های عضلانی اسکلتی هستند. جدا از نقش تثبیت شده آن‌ها به عنوان اندامک‌های تولید کننده انرژی، میتوکندری‌ها همچنین نقش حیاتی در تنظیم هموستاز کلسیم، یک فرآیند حیاتی برای انقباض عضلانی، ایفا می‌کنند. علاوه بر این، میتوکندری‌ها اندامک‌های کلیدی تنظیم کننده سیگنال هستند که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را تولید می‌کنند که سیگنال‌های ردوکس را تعدیل نموده و مسیرهای حساس به

انرژی مانند AMPK را طی فعالیت تنظیم می‌نمایند. میتوکندری‌ها با تطبیق حجم، ساختار و عملکرد خود، مانند تقویت بیوژنز میتوکندری، فعال کردن میتوفاژی، تولید انرژی و کنترل تولید گونه‌های فعال اکسیژن درجه بالایی از انعطاف‌پذیری را طی تمرین از خود نشان می‌دهند (۷، ۸). بنابراین، فعالیت‌های بدنی منظم رویکرد قابل قبولی را ارائه می‌کند که پتانسیل بهبود کنترل کیفیت میتوکندریایی و مهار کاهش عملکرد سلولی گوناگون که معمولاً با افزایش سن رخ می‌دهد را القا می‌نماید (۹). هرچند اثر تمرین هوازی بر پویایی میتوکندریایی بیشتر در عضله اسکلتی و قلبی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۱۲)، اما شواهد نشان می‌دهد اثر تمرین بر کنترل کیفیت میتوکندریایی در سایر بافت‌ها نیز مشاهده می‌شود. از طرف دیگر به خوبی مشخص شده تمرینات هوازی اثر سلامتی‌افزای خود را به واسطه توسعه عملکرد میتوکندریایی اعمال می‌نماید (۱۳، ۱۴). شواهد نشان می‌دهد تمرین هوازی به واسطه کنترل میتوفاژی، موجب بهبود کنترل کیفیت میتوکندریایی می‌شود (۱۵). بسیاری از بیماری‌های مزمن مانند چاقی، دیابت نوع ۲، کبد چرب غیر الکلی، بیماری‌های قلبی عروقی ریشه در اختلال میتوفاژی میتوکندریایی دارند (۱۶). به همین دلیل از آنجایی که تمرینات هوازی می‌تواند میتوفاژی را تنظیم نماید، توجه پژوهشگران به رابطه تمرین هوازی و میتوفاژی جلب شده است. به دلیل اهمیت میتوفاژی در سلامتی و رابطه آن با تمرینات هوازی در این مطالعه مکانیسم میتوفاژی و اثر

تمرینات هوازی بر پروتئین‌های اثرگذار بر میتوفاژی مورد بررسی قرار گرفته است.

تعریف میتوفاژی

از نقطه نظر فیزیولوژیک میتوفاژی به عنوان اتوفاژی انتخابی میتوکندری‌های آسیب دیده تعریف می‌شود که برای اولین بار در مخمر مشاهده شد (۱۷). در اصل میتوفاژی یک فرآیند چند مرحله‌ای بسیار تنظیم‌شده است که مسئول تخریب انتخابی میتوکندری‌های آسیب‌دیده/ناکارآمد توسط اتوفاژی است و جنبه‌های مشترکی با سایر انواع اتوفاژی انتخابی دارد. در واقعیت ویژگی مورفولوژیکی میتوفاژی، قرار گرفتن میتوکندری در داخل یک واکوئل اتوفاژیک به نام میتوفاگوزوم می‌باشد (۱۸). مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد سه نوع میتوفاژی وجود دارد: نوع ۱، ناشی از محدودیت مواد مغذی، نوع ۲، ناشی از سیگنال‌های آسیب، و نوع ۳، میکرو میتوفاژی، مرتبط با وزیکول‌های کوچک مشتق از میتوکندری (۱۹). شواهد اخیر نشان می‌دهد میتوفاژی نقش مهمی در رشد طبیعی بازی می‌کند (۲۰). به طور کلی، میتوفاژی مکانیسم بیولوژیکی اساسی در تمام سلول‌ها یا بافت‌ها بوده و در پاسخ به نیازهای انرژی سلولی تنظیم می‌شود. برخی از بافت‌ها مانند سیستم عصبی، کلیه، عضله اسکلتی، قلب و کبد، فعالیت میتوفاژی پایه بالایی داشته، در حالی که برخی دیگر مانند طحال و تیموس، سطح میتوفاژی پایینی دارند (۲۱). مسیرهای مولکولی و بیوشیمیایی درگیر در میتوفاژی ابتدا در مدل‌های سالمندی،

بیماری‌های عصبی، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی گزارش شد (۵، ۲۲-۲۴).

حذف میتوکندری توسط پدیده میتوفاژی نقش مهمی در فرآیندهای متعددی مانند التهاب، انتقال متابولیک و برنامه‌ریزی مجدد سلولی دارد (۲۵). شواهد بیولوژیک نشان می‌دهد میتوکندری‌های آسیب دیده نه تنها توانایی تولید ATP و سایر محصولات بیوسنتزی را ندارند، بلکه سطوح بالاتری از گونه‌های فعال اکسیژن را نیز آزاد می‌کنند. اگر گونه‌های فعال اکسیژن نتواند به موقع پاک شود و در سلول‌ها تجمع یابد، منجر به آپوپتوز می‌شود (۲۶). میتوفاژی با حذف میتوکندری‌های ناکارآمد، میتوکندری‌ها را در شرایط بهینه نگه می‌دارد. هموستاز میتوکندری توسط تعادل حذف و تولید زیستی حفظ می‌شود که می‌تواند توسط میتوفاژی کنترل نشده مختل شود (۲۷).

مسیر سیگنالینگ میتوفاژی

همان‌طور که اشاره شد، حذف به موقع و دقیق میتوکندری برای بقای سلول در پاسخ به تغییرات در شرایط رشد، انرژی زیستی و محیطی حیاتی است. بنابراین، سلول‌ها مسیرهای سیگنالینگ متنوعی را برای اطمینان از فعال‌سازی سریع و دقیق میتوفاژی در پاسخ به محرک‌های مختلف ایجاد کرده‌اند. یوله و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند پروتئین پارکینسون ۲ (پارکین) به واسطه دپلاریزه کردن میتوکندری

موجب آغاز تخریب اتوفاژیک میتوکندری می‌گردد (۲۸). از آن زمان به بعد، تحقیقات در مورد میتوفاژی در حال توسعه است و مسیرهای سیگنالینگ میتوفاژی متعددی کشف شده است، با این وجود اصلی‌ترین و شناخته‌شده‌ترین مسیر سیگنالینگ میتوفاژی محور PINK1-Parkin می‌باشد (۲۹). فعال شدن مسیر PINK1-Parkin موجب دپلاریزاسیون میتوکندری و آغاز القای میتوفاژی می‌گردد (۳۰). بررسی مطالعات نشان می‌دهد بسیاری از ترکیبات شیمیایی سنتتیک مانند عوامل جدید جداکننده میتوکندری^۱ القاکننده‌های استرس اکسیداتیو، شل‌کننده‌های آهن^۲، پیش‌سازهای NAD⁺، آنزیم‌های deubiquitinating و بازدارنده‌های p53 و همچنین مواد شیمیایی با منشأ طبیعی مانند اسپرمیدین^۳، رسوراترول A^۱، اورولیتین^۲ A و آنتی‌بیوتیک‌ها پاسخ‌های میتوفاژیک قوی را به واسطه فعال شدن مسیر سیگنالینگ PINK1-Parkin القا می‌کنند (۳۱). شناخته‌شده‌ترین مسیر سیگنال دهی میتوفاژی میتوکندریایی، مسیر سیگنالینگ PINK1-Parkin است که با به کارگیری پروتئین‌های اتوفاژیک، یوبیکوئیتیناسیون خاص، حذف میتوکندری‌های ناکارآمد یا آسیب دیده را میانجی‌گری می‌نماید (۳۲). Ser/Thr PINK1 و لیگاز هیبریدی RING/HECT سیتوزولی پارکین عوامل حیاتی این مکانیسم‌های مولکولی هستند. به طور کلی، مسیر

^۱ - resveratrol A

^۲ - urolithin A

^۱

^۲

^۸ - novel mitochondrial uncoupling agents

^۹ - iron chelators

^۱ - spermidine

0

PINK1-Parkin مستلزم تثبیت PINK1 بر روی غشای خارجی میتوکندری (OMM)، به دنبال جذب و فعال‌سازی پارکین است (۳۴،۳۳). به نوبه خود، پارکین فعال باعث افزایش یوبیکوئیتیناسیون گروهی از پروتئین‌های غشای خارجی میتوکندری و همچنین جذب آداپتورهای اتوفاژی، از جمله (optineurin) OPTN و NDP52 (پروتئین نقطه هسته‌ای ۵۲ کیلو دالتونی) به میتوکندری آسیب‌دیده می‌شود (۳۵، ۳۶). فعالیت کاتالیزوری گسترده محور PINK1-Parkin نشان دهنده دخالت این مسیر در چندین فرآیند سلولی است. بنابراین، تعامل عملکردی بین دینامیک میتوکندری و سیستم PINK/Parkin برای پاک‌سازی میتوکندری‌های آسیب‌دیده و ناکارآمد ضروری می‌باشد. در واقع، Mfn2 و Miro (یک ترکیب کمپلکس موتور/آداپتور میتوکندری) توسط PINK1 و پارکین هدف قرار می‌گیرند (۳۷، ۳۸). فعال شدن Mfn2 توسط PINK1 سرانجام روند میتوفاژی میتوکندریایی را منجر می‌گردد.

نقش میتوفاژی در بیماری‌ها:

چاقی

چاقی یک بیماری متابولیک است که با گسترش و تجمع غیرطبیعی سلول‌های چربی مشخص می‌شود. در چاقی، عملکرد میتوکندری بافت چربی غیر طبیعی شده، که به اختلالات تمایز و تولید چربی، اختلال در متابولیسم چربی، التهاب بیش از حد و مقاومت به انسولین منجر شده و به نوبه خود باعث تشدید چاقی می‌شود (۳۹). توسعه میتوفاژی باعث

مهار لیپوژنز و کاهش چاقی می‌شود. شواهد نشان می‌دهد فعال شدن مسیر PINK/Parkin در سلول‌های بافت چربی هایپرتروفی شده سطح میتوفاژی را افزایش داده، تولید قطرات چربی را کاهش می‌دهد و در نتیجه موجب کاهش چاقی می‌گردد. علاوه بر این تنظیم میتوفاژی می‌تواند به طور قابل توجهی آپوپتوز بافت چربی را مهار کند، لیپوژنز را کاهش داده و قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید را برای کاهش چاقی بیش از حد افزایش دهد (۴۰).

دیابت نوع ۲

دیابت نوعی بیماری متابولیک است که به دلیل اختلال در عملکرد انسولین در بافت‌های محیطی به ویژه بافت عضله اسکلتی ایجاد شده و موجب افزایش قابل ملاحظه گلوکز خون می‌گردد. افزایش مزمن مداوم گلوکز خون و اختلالات متابولیک طولانی‌مدت می‌تواند در بافت‌ها و اندام‌های بدن آسیب‌های جدی ایجاد نماید (۴۱). در شرایط بالا بودن گلوکز خون، در زنجیره تنفسی میتوکندری گونه‌های فعال اکسیژن بیشتری تولید شده و از میتوکندری به فضای سیتوزول وارد می‌شود و باعث آسیب دیپلاریزاسیون میتوکندری گشته و فعالیت زنجیره تنفسی و میتوفاژی را مهار می‌کند و باعث آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های β جزایر پانکراس می‌شود که منجر به افزایش مقاومت به انسولین می‌شود (۴۲). شواهد نشان می‌دهد فعال‌سازی میتوفاژی از طریق مسیر PINK/Parkin می‌تواند آپوپتوز و پاسخ‌های التهابی را مهار کرده و بروز و توسعه عوارض دیابت

را به تأخیر بیندازد. توسعه میتوفاژی به طور قابل توجهی استرس شبکه آندوپلاسمی را مهار می‌کند و عملکرد سلول‌های β پانکراس را بهبود بخشیده و از توسعه دیابت و عوارض ناشی از آن جلوگیری می‌نماید.

کبد چرب غیر الکلی

بیماری کبد چرب غیر الکلی به مجموعه‌ای از بیماری‌های ناشی از اختلال عملکرد متابولیک چند سیستمی که منجر به آسیب مزمن کبدی از جمله استئاتوز کبدی، فیبروز کبدی، سیروز کبدی، کارسینوم کبدی و غیره می‌شود (۴۳). پس از ابتلا به کبد چرب غیر الکلی، میتوفاژی کبدی غیرطبیعی شده و گونه‌های فعال اکسیژن در بافت کبد افزایش یافته که منجر به عدم تعادل متابولیسم چربی-انرژی کبدی شده و بیشتر باعث ایجاد التهاب و فیبروز کبدی بیشتر می‌گردد (۴۴). مطالعات تأیید کرده‌اند که بهبود میتوفاژی، التهاب کبد و فشار اکسایشی را کاهش داده و از تشدید پاتولوژیک کبد چرب غیر الکلی جلوگیری می‌کند.

بیماری‌های قلبی عروقی

بیماری‌های قلبی عروقی تهدید اصلی برای سلامت انسان است و باعث مرگ و میر ناشی از بیماری‌های غیر عفونی در سراسر جهان می‌شود. اختلال عملکرد میتوکندری می‌تواند باعث جدا شدن زنجیره‌های تنفسی میتوکندری شده که منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش سنتز ATP شده و منجر به آسیب کاردیومیوسیت، القای آپوپتوز یا نکروز می‌شود و آسیب بافت میوکارد را تشدید می‌کند (۴۵).

مطالعات نشان داده‌اند که افزایش میتوفاژی پاسخ‌های التهابی و فشار اکسایشی را سرکوب می‌کند، که متعاقباً باعث کاهش ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود.

بیماری‌های نورودژنراتیو

بیماری تخریب عصبی یک اصطلاح کلی برای مجموعه‌ای از بیماری‌های ناشی از انحطاط پیش‌رونده مزمن بافت عصبی است که شایع‌ترین اختلال سیستم عصبی در سالمندان است و با انحطاط انتخابی و از دست دادن نورون‌های مرکزی مشخص می‌شود. اغلب بیماران علائمی از جمله زوال شناختی، از دست دادن حافظه و اختلالات گفتار و فعالیت روزانه دارند. بیماری‌های نورودژنراتیو رایج شامل بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر، بیماری هانتینگتون و اسکروز جانبی آمیوتروفیک می‌باشند. نورون‌ها به انرژی زیادی نیاز دارند و ناهنجاری در ساختار و عملکرد میتوکندری می‌تواند باعث انحطاط عصبی شود. تحقیقات نوظهور نشان می‌دهد که اختلال در میتوفاژی میتوکندریایی ارتباط نزدیکی با بیماری‌های نورودژنراتیو دارد (۴۶، ۴۷).

نقش میتوفاژی در سالمندی:

پیری یک فرآیند بیولوژیکی چند عاملی پیچیده است که تقریباً تمام سلول‌ها و بافت‌های بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به اختلال در عملکرد و از دست دادن هموستاز می‌شود. شواهدی وجود دارد که آسیب ژنتیکی در بافت‌های بدنی در طول پیری پستانداران انباشته می‌شود (۴۸). در واقع، افزایش وابسته به سن در گونه‌های فعال اکسیژن مسئول

فرآیند پیری در نظر گرفته می‌شود، در حالی که اختلال عملکرد میتوکندری به عنوان مشخصه پیری در نظر گرفته می‌شود (۴۹). در طول پیری، میتوفاژی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و منجر به تجمع میتوکندری‌های ناکارآمد می‌شود که خود موجب تضعیف سلولی ناشی از سالمندی می‌گردد. به همین دلیل افزایش میتوفاژی می‌تواند روند پیری را کند نموده و به کیفیت عمر منجر گردد.

اثر تمرینات هوازی بر میتوفاژی

همان‌طور که اشاره شد میتوفاژی یکی از مکانیسم‌های اساسی برای حفظ کیفیت میتوکندری و هموستاز سلولی بوده و می‌تواند به طور انتخابی میتوکندری‌های آسیب دیده را حذف کند و نقش مفیدی در بسیاری از بیماری‌های ایفا نماید. فعالیت بدنی منظم اساس پیشگیری و درمان بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های متابولیک در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند با تنظیم میتوفاژی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک بیماری‌های متابولیک مداخله کند (۱۵). از آنجایی که انواع برنامه‌های تمرینی مسیرهای گوناگون سیگنالینگ را فعال می‌کنند، این احتمال وجود دارد که اثر تمرینات بدنی متفاوت اثرات یکسانی بر میتوفاژی میتوکندریایی و به دنبال آن سلامتی نداشته باشند. با این وجود نتایج مطالعات بر این نکته توافق دارند که فعالیت‌های بدنی اثرات مثبتی بر سلامتی به واسطه تنظیم میتوفاژی دارند، اما میزان اثرگذاری آن‌ها به یک اندازه نمی‌باشد.

تمرینات هوازی پیوسته

تمرینات هوازی پیوسته یکی از قدیمی‌ترین و پرکاربردترین شکل تمرینات هوازی می‌باشد. این تمرینات معمولاً در زمان‌های طولانی و با شدت‌های زیر بیشینه انجام می‌شوند. اثر این نوع تمرینات بر میتوفاژی میتوکندریایی به دفعات توسط پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است. دورنمای مطالعات انجام شده نشان می‌دهد تمرینات هوازی پیوسته میتوفاژی را در بافت‌های گوناگون تنظیم می‌کند. گزارش شده چهار هفته تمرین دویدن روی چرخ گردان پروتئین‌های مسیر میتوفاژی به ویژه Parkin را در قلب رت‌ها افزایش داد. این افزایش با افزایش تعداد میتوکندری‌های قلبی و واگردش میتوکندریایی همراه بود (۵۰). همسو با این نتایج فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PINK/Parkin همراه با توسعه اتوفاژی و میتوفاژی و بهبود توده عضلانی در موش‌های مسن پس از شانزده هفته دویدن روی چرخ گردان گزارش شده است (۵۱). شش هفته تمرین هوازی روی نوار گردان با افزایش بیان پروتئین PINK/Parkin، افزایش سطح میتوفاژی عضله اسکلتی رت همراه بود. این تغییرات با بهبود عملکرد میتوکندریایی شامل بهبود سنتز ATP و فعالیت سیتрат سنتاز و افزایش حجم و تعداد میتوکندری و عملکرد هوازی همراه بود (۵۲). در رت‌های پیر هشت هفته تمرین هوازی روی نوار گردان موجب بهبود پویایی و عملکرد میتوکندریایی و کاهش آپوپتوز بافت میوکارد شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد تمرینات هوازی منظم از آسیب ناشی از سالمندی در عملکرد میتوکندری و آپوپتوز با واسطه

میتوکندری در عضلات قلب جلوگیری می‌کند (۵۳). تمرین هوازی روی نوار گردان در رت‌های مبتلا به آسیب ایسکمیک مغزی موجب بهبود عملکرد میتوکندریایی، کاهش حجم انفارکتوس مغزی، بهبود مورفولوژی بافت، کاهش از دست دادن نورون، مهار نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری ف مهار آپوپتوز و آسیب میتوکندریایی شد که نشان می‌دهد تمرین هوازی می‌تواند به واسطه حفظ یکپارچگی میتوکندریایی آسیب ناشی از ایسکمیک مغزی را کاهش دهد (۵۴). حتی یک جلسه فعالیت هوازی موجب افزایش بیان پروتئین‌های تنظیم کننده میتوفاژی عضله اسکلتی در بافت عضله اسکلتی رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ همراه با افزایش اتوفاژی و میتوفاژی بیوژنز میتوکندری شد. این یافته هانشان می‌دهد اثر مثبت فعالیت‌های هوازی با یک جلسه فعالیت آغاز شده و می‌تواند پس از تکرار آن به صورت سازگاری‌های با ثبات مشاهده گردد (۵۵).

تمرینات هوازی تناوبی

در سال‌های اخیر استفاده از تمرینات هوازی تناوبی به ویژه تمرینات تناوبی پر شدت جهت توسعه سلامتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گزارش شده تمرین تناوبی با شدت بالا سطوح میتوفاژی را ارتقا می‌دهد. چهار هفته تمرین تناوبی با شدت بالا سطوح PGC-1 α به عنوان پروتئین تنظیم‌گر بیوژنز میتوکندریایی، PINK/Parkin به عنوان تنظیم‌کننده‌ای میتوفاژی به طور قابل توجهی در عضله اسکلتی رت افزایش داده و هم‌زمان به طور قابل توجهی از

بیان پروتئین‌های التهابی و نشانگر فشار اکسایشی جلوگیری نمود. این تغییرات به بهبود عملکرد عضله اسکلتی (افزایش زمان رسیدن به خستگی) همراه بود (۵۶). در مطالعه دیگر دوازده هفته تمرین تناوبی با شدت بالا، سطوح پروتئین‌های درگیر در روند بیوژنز میتوکندریایی (TFAM) و میتوفاژی (Parkin) را در عضله اسکلتی افراد مسن چاق همراه با محتوای میتوکندری عضله اسکلتی و کنترل توده عضلانی را بهبود بخشید که این تغییرات با بهبود عملکرد عضله اسکلتی همراه بود. این یافته‌ها نشان دهنده نقش تنظیمی میتوکندری در بهبود عملکرد عضله اسکلتی می‌باشد (۵۷). این یافته‌ها (افزایش پروتئین‌های بیوژنز میتوکندریایی و میتوفاژی به همراه بهبود توده عضلانی و بهبود عملکرد عضلانی) در مطالعه دیگری که توسط Marcangeli و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد در عضله اسکلتی افراد سالمند مورد تأیید قرار گرفته است (۵۸). در مطالعه دیگری هشت ماه تمرین تناوبی با شدت بالا در مقایسه با تمرین تداومی با شدت متوسط در رت‌های ماده سالمند موجب افزایش قابل ملاحظه در پروتئین‌های مرتبط با بیوژنز و میتوفاژی میتوکندری را تنظیم نموده و موجب بهبود عملکرد میتوکندریایی عضله اسکلتی در شرایط سالمندی شد (۵۹).

مکانیسم مولکولی تمرینات هوازی بر

میتوفاژی

مکانیسم‌های مولکولی متعددی برای بهبود میتوفاژی میتوکندریایی پس از تمرینات هوازی پیشنهاد شده است.

فشار اکسایشی فرآیندی است که در آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن در یک ارگانیزم از ظرفیت مهار سیستم آنتی‌اکسیدانی فراتر می‌رود و در نتیجه به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب می‌رساند (۶۰). کاهش فشار اکسایشی ناشی از تمرین که بیشتر به واسطه افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌گردد یکی از مکانیسم‌های مولکولی برای توجیه افزایش میتوفاژی می‌باشد. زیرا افزایش گونه‌های فعال اکسیژن روند میتوفاژی را مهار می‌نماید. از آنجایی که در اثر تمرینات هوازی ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی هم در سطح بافت و هم در گردش خون افزایش می‌یابد، توانایی بافتی برای خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافته و به دنبال آن بیان پروتئین‌های مسیر PINK/Parkin افزایش یافته و موجب بهبود میتوفاژی می‌گردد (۶۱). مکانیسم دیگر افزایش مایوکاین آزاد شده از عضله اسکلتی به ویژه آیرزین در پاسخ به تمرینات هوازی می‌باشد. شواهد نشان می‌دهد افزایش آیرزین با افزایش بیان پروتئین‌های PINK/Parkin همراه بوده که موجب افزایش میتوفاژی در بسیاری از سلول‌ها به ویژه سلول‌های عضله اسکلتی و عضله قلبی می‌شوند (۶۲). اثر تمرین هوازی بر بهبود میتوفاژی همراه با افزایش مسیر PGC1a/FNDC5/irisin در مطالعه دیگر نیز در رت‌های سالمند گزارش شده که نشان می‌دهد تمرین هوازی به واسطه توسعه مایوکاین‌ها روند میتوفاژی میتوکندریایی را توسعه می‌دهد (۶). مکانیسم دیگری که تمرینات هوازی به واسطه آن موجب تنظیم و توسعه میتوفاژی می‌شود، مهار آپوپتوز

می‌باشد. آپوپتوز یکی از اشکال ضروری مرگ سلولی است و مهار آپوپتوز می‌تواند بروز و توسعه بیماری‌های متابولیک را کند نماید (۶۳). گزارش شده تمرین شنا به واسطه کاهش سطوح گلوکز، کاهش فشار اکسایشی و آپوپتوز موجب افزایش میتوفاژی در بافت قلب رت‌های چاق شد (۶۴). مکانیسم پیشنهادی دیگری که برای بهبود میتوفاژی ناشی از تمرین هوازی پیشنهاد شده است، کاهش التهاب می‌باشد (۶۵). گزارش شده تمرین هوازی به مدت ۱۶ هفته به طور قابل توجهی التهاب ناشی از پرفشار خونی را کاهش داده که این کاهش التهاب با بهبود میتوفاژی و بهبود عملکرد میتوکندریایی همراه بوده است (۶۶).

نتیجه‌گیری

در مجموع بررسی مطالعات انجام شده نشان می‌دهد میتوفاژی یکی از مکانیسم‌های تنظیمی میتوکندری بوده که به واسطه حذف میتوکندری‌های ناکارآمد و آسیب دیده موجب بهبود عملکردهای سلولی می‌گردد. اختلال در میتوفاژی میتوکندریایی از دلایل پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌های متابولیک، نورودیژنراتیو، سرطان‌ها و سالمندی می‌باشد. فعالیت‌های بدنی به ویژه تمرینات هوازی به واسطه کاهش فشار اکسایشی، التهاب، آپوپتوز و تولید و آزادسازی مایوکاین‌ها به ویژه آیرزین موجب بهبود میتوفاژی میتوکندریایی، بهبود عملکرد سلولی و کاهش خطر ابتلا به بسیاری از بیماری‌های می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی می باشد که در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به تصویب رسیده است. نویسندگان این مقاله از مسئولین دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تربیت بدنی جهت مساعدت هایشان تشکر و قدردانی می نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله عدم تضاد منافع را اعلام می نمایند.

منابع

1. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature communications*. 2020; 11(1):102.
2. Smith RL, Soeters MR, Wüst RC, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine reviews*. 2018; 39 (4):489-517.
3. Doblado L, Lueck C, Rey C, Samhan-Arias AK, Prieto I, Stacchiotti A, et al. Mitophagy in human diseases. *Intjournal of Mol Sci*. 2021; 22(8):3903.
4. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochemistry and Biophysics*. 2007; 462(2):245-53.
5. Bakula D, Scheibye-Knudsen M. MitophAging: mitophagy in aging and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8:239.
6. He W, Wang P, Chen Q, Li C. Exercise enhances mitochondrial fission and mitophagy to improve myopathy following critical limb ischemia in elderly mice via the PGC1a/FNDC5/irisin pathway. *Skeletal muscle*. 2020; 10:1-14.
7. Zhang Y, Oliveira AN, Hood DA. The intersection of exercise and aging on mitochondrial protein quality control. *Experimental Gerontology*. 2020; 131:110824.
8. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M. Maintenance of skeletal muscle mitochondria in health, exercise, and aging. *Annual Review of Physiology*. 2019; 81(1):19-41.
9. Wang Y, Li J, Zhang Z, Wang R, Bo H, Zhang Y. Exercise improves the coordination of the mitochondrial unfolded protein response and mitophagy in aging skeletal muscle. *Life*. 2023; 13(4):1006.
10. Guan Y, Drake JC, Yan Z. Exercise-induced mitophagy in skeletal muscle and heart. *Exercise and Sport Sci reviews*. 2019; 47(3):151-6.
11. Sanchez AM, Candau R, Bernardi H. Recent data on cellular component turnover: focus on adaptations to physical exercise. *Cells*. 2019; 8(6):542.
12. Balan E, Schwalm C, Naslain D, Nielens H, Francaux M, Deldicque L. Regular endurance exercise promotes fission, mitophagy, and oxidative phosphorylation in human skeletal muscle independently of age. *Frontiers in Physiology*. 2019; 10:1088.
13. Delaney NF, Sharma R, Tadvalkar L, Clish CB, Haller RG, Mootha VK. Metabolic profiles of exercise in patients with McArdle disease or mitochondrial myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114(31):8402-7.
14. Liang J, Wang C, Zhang H, Huang J, Xie J, Chen N. Exercise-induced benefits for Alzheimer's disease by stimulating mitophagy and improving mitochondrial function. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2021; 13:755665.
15. Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA. Exercise and mitochondrial health. *The J Physiology*. 2021; 599 (3):803-17.
16. Tang S, Geng Y, Lin Q. The role of mitophagy in metabolic diseases and its exercise intervention. *Frontiers in Physiology*. 2024; 15:1339128.
17. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature cell biology*. 2018; 20(9):1013-22.
18. Zachari M, Ktistakis NT. Mammalian mitophagosome formation: a focus on the early signals and steps. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8:171.
19. Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biology*. 2017; 2:749-54.
20. Um J-H, Kim YY, Finkel T, Yun J. Sensitive measurement of mitophagy by flow cytometry using the pH-dependent fluorescent reporter mt-Keima. *J Visualized Experiments*. 2018; (138).
21. Cummins N, Götz J. Shedding light on mitophagy in neurons: what is the evidence for PINK1/Parkin mitophagy in vivo? *Cellular and Mol Life Sci*. 2018; 75(7):1151-1162.
22. Zhang Y, Zhang M, Zhu W, Yu J, Wang Q, Zhang J, et al. Succinate accumulation induces mitochondrial reactive oxygen species generation

and promotes status epilepticus in the kainic acid rat model. *Redox Biology*. 2020; 28:101365.

23. Bernardini J, Lazarou M, Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene*. 2017; 36 (10):1315-27.

24. Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease. *Circulation research*. 2017; 120 (11):1812-1824.

25. Gustafsson ÅB, Dorn GW. Evolving and expanding the roles of mitophagy as a homeostatic and pathogenic process. *Physiological reviews*. 2019; 99 (1):853-892.

26. Cadenas E, Davies KJ. 2009. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology and medicine*. 29(3-4):222-30.

27. Ashrafi G, Schwarz T. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2013; 20(1):31-42.

28. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biology*. 2008; 183 (5):795-803.

29. Iorio R, Celenza G, Petricca S. Mitophagy: molecular mechanisms, new concepts on parkin activation and the emerging role of AMPK/ULK1 axis. *Cells*. 2021; 11(1):30.

30. Georgakopoulos ND, Wells G, Campanella M. The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nature chemical biology*. 2017; 13(2):136-146.

31. Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biology*. 2020; 219 (11):e202004029.

32. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature Rev Mol Cell Biology*. 2011; 12(1):9-14.

33. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biology*. 2010; 189(2):211-21.

34. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, De Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107 (1):378-83.

35. Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, et al. Spatiotemporal control of ULK1 activation by NDP52 and TBK1 during selective autophagy. *Molecular cell*. 2019; 74(2):347-62. e6.

36. Yamano K, Kikuchi R, Kojima W, Hayashida R, Koyano F, Kawawaki J, et al. Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN-ATG9A axis in mitophagy. *Journal of Cell Biology*. 2020; 219(9):178- 189.

37. Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, Selkoe D, et al. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*. 2011; 147(4):893-906.

38. Chen Y, Dorn GW. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*. 2013; 340(6131):471-475.

39. Wu H, Wang Y, Li W, Chen H, Du L, Liu D, et al. Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome. *Autophagy*. 2019; 15 (11):1882-1898.

40. Wang S, Zhao H, Lin S, Lv Y, Lin Y, Liu Y, et al. New therapeutic directions in type II diabetes and its complications: mitochondrial dynamics. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; 14:1230168.

41. Wen W, Wei Y, Gao S. Functional nucleic acids for the treatment of diabetic complications. *Nanoscale Advances*. 2023; 5(20):5426-34.

42. Čater M, Bombek LK. Protective role of mitochondrial uncoupling proteins against age-related oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Antioxidants*. 2022;11(8):1473.

43. Boeckmans J, Rombaut M, Demuyser T, Declerck B, Piérard D, Rogiers V, et al. Infections at the nexus of metabolic-associated fatty liver disease. *Arch Toxicol*. 2021; 95:2235-53.

44. Clare K, Dillon JF, Brennan PN. Reactive oxygen species and oxidative stress in the pathogenesis of MAFLD. *J Clin Trans Hepato*. 2022; 10(5):939.

45. Li A-l, Lian L, Chen X-n, Cai W-h, Fan X-b, Fan Y-j, et al. The role of mitochondria in myocardial damage caused by energy metabolism disorders: From mechanisms to

- therapeutics. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023; 12 (1): 85-94
46. Hwang S, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease. *EMBO Molecular Medicine*. 2015; 7(10):1307-1326.
47. Palomo G, Granatiero V, Kawamata H. Parkin is a disease modifier in the mutant SOD1 mouse model of ALS. *EMBO Mol Med*. 2018; 10 (10): e8888.
48. Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*. 120(4):497-512.
49. Scialo F, Sriram A, Fernandez-Ayala D, Gubina N, Lohmus M, Nelson G, et al. 2016. Mitochondrial ROS produced via reverse electron transport extend animal lifespan. *Cell metabolism*. 23(4):725-34.
50. Nijholt KT, Sánchez-Aguilera PI, Mahmoud B, Gerding A, Wolters JC, Wolters AH, et al. A Kinase Interacting Protein 1 regulates mitochondrial protein levels in energy metabolism and promotes mitochondrial turnover after exercise. *Scientific Reports*. 2023; 13 (1):18822.
51. Chen YL, Ma YC, Tang J, Zhang D, Zhao Q, Liu JJ, et al. Physical exercise attenuates age-related muscle atrophy and exhibits anti-ageing effects via the adiponectin receptor 1 signalling. *J Cachexia Sarcopenia and Muscle*. 2023; 14(4):1789-801.
52. Ma C, Zhao Y, Ding X, Gao B. The role of Sirt3 in the changes of skeletal muscle mitophagy induced by hypoxic training. *General Physiology & Biophysics*. 2022; 41(5). 75-90.
53. No M-H, Heo J-W, Yoo S-Z, Kim C-J, Park D-H, Kang J-H, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2020; 472:179-93.
54. Pan G, Zhang H, Zhu A, Lin Y, Zhang L, Ye B, et al. Treadmill exercise attenuates cerebral ischaemic injury in rats by protecting mitochondrial function via enhancement of caveolin-1. *Life Sci*. 2021; 264:118634.
55. Mikhail AI, Manta A, Ng SY, Osborne AK, Mattina SR, Mackie MR, et al. A single dose of exercise stimulates skeletal muscle mitochondrial plasticity in myotonic dystrophy type 1. *Acta Physiologica*. 2023; 237 (4):e13943.
56. Yamauchi N, Tamai K, Kimura I, Naito A, Tokuda N, Ashida Y, et al. High-intensity interval training in the form of isometric contraction improves fatigue resistance in dystrophin-deficient muscle. *The Journal of Physiology*. 2023; 601 (14): 2917-2933.
57. Youssef L, Granet J, Marcangeli V, Dulac M, Hajj-Boutros G, Reynaud O, et al., editors. Clinical and biological adaptations in obese older adults following 12-weeks of high-intensity interval training or moderate-intensity continuous training. 2022;
58. Marcangeli V, Youssef L, Dulac M, Carvalho LP, Hajj-Boutros G, Reynaud O, et al. Impact of high-intensity interval training with or without l-citrulline on physical performance, skeletal muscle, and adipose tissue in obese older adults. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2022; 13(3):1526-1540.
59. Han C, Lu P, Yan S-z. Effects of high-intensity interval training on mitochondrial supercomplex assembly and biogenesis, mitophagy, and the AMP-activated protein kinase pathway in the soleus muscle of aged female rats. *Experimental Gerontology*. 2022;158:111648.
60. Stavely R, Ott LC, Sahakian L, Rashidi N, Sakkal S, Nurgali K. Oxidative stress and neural dysfunction in gastrointestinal diseases: can stem cells offer a solution? *Stem Cells Translational Medicine*. 2023;12(12): 801-810.
61. Zhao D, Sun Y, Tan Y, Zhang Z, Hou Z, Gao C, et al. Short-duration swimming exercise after myocardial infarction attenuates cardiac dysfunction and regulates mitochondrial quality control in aged mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018; (1): 4079041.
62. Li H, Qin S, Liang Q, Xi Y, Bo W, Cai M, et al. Exercise training enhances myocardial mitophagy and improves cardiac function via Irisin/FNDC5-PINK1/Parkin pathway in MI mice. *Biomedicines*. 2021; 9(6):701-708.
63. Kaur B, Sharma PK, Chatterjee B, Bissa B, Nattarayan V, Ramasamy S, et al. Defective quality control autophagy in Hyperhomocysteinemia promotes ER stress and consequent neuronal apoptosis through proteotoxicity. *Cell Communication and Signaling*. 21(1):258.

64. Dun Y, Hu Z, You B, Du Y, Zeng L, Zhao Y, et al. Exercise prevents fatal stress-induced myocardial injury in obese mice. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; 14:1223423.
65. Ma L, Li K, Wei W, Zhou J, Li Z, Zhang T, et al. Exercise protects aged mice against coronary endothelial senescence via FUNDC1-dependent mitophagy. *Redox Biology*. 2023; 62:102693.
66. Bal NB, Bostanci A, Sadi G, Dönmez MO, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Resveratrol and regular exercise may attenuate hypertension-induced cardiac dysfunction through modulation of cellular stress responses. *Life Sciences*. 2022; 296:120424.

The effect of aerobic exercise on mitochondrial mitophagy

Farank Amini¹, Mohammad Ali Azarbayjani², Shahin Riyahi Malayeri³, Lida Moradi

- 1- Department of exercise physiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran.Iran
- 2- Department of exercise physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran.Iran
- 3- Department of exercise physiology, East, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran.Iran

Abstract

Mitochondria is one of the dynamic organelles in the cell, the dysfunction of which weakens the function of the cell and ultimately causes cell death. Mitophagy is the selective autophagy of damaged mitochondria, which improves cell biological functions by removing dysfunctional mitochondria. The PINK1-Parkin signaling pathway is one of the most important mitophagy regulation pathways. The PINK1-Parkin signaling pathway is one of the most important mitophagy regulation pathways. Disruption of mitophagy is the main cause of many metabolic, neurodegenerative diseases, cancers and aging. The evidence obtained from human and animal studies shows that aerobic exercise develops mitochondrial mitophagy by regulating and activating signaling pathways and maintains health at the cell level, thereby reducing the incidence of diseases. Although the exact molecular mechanism of the effect of aerobic exercise on the development of mitochondrial mitophagy is not known, the results of several studies show a reduction in oxidative stress, inflammation, apoptosis, and an increase in anti-inflammatory myokines along with regular aerobic exercise by activating mitophagic signaling pathways, especially the PINK1 signaling pathway. -Parkin regulates mitophagy in various tissues and in the conditions of old age, obesity, inactivity and metabolic disorders and prevents the development of many diseases. The regulatory role of aerobic exercises on mitophagy emphasizes the effectiveness of these exercises on tissue protection and health development.

Keywords: Mitophagy, aerobic exercise, oxidative stress, inflammation, apoptosis



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



بررسی الگوی سرمی کوکسیلا بورتی در نمونه های بالینی کارکنان کشتارگاه های شهرستان های اصفهان

فهیمة نوربخش^{۱*}، حسین چهارده معصومی^۲، محمدرضا صائبی^۳

۱. دکتری تخصصی سم شناسی، کارشناس معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان-ایران.

۲. دکتری دامپزشکی، کارشناس معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان-ایران.

۳. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد-ایران.

چکیده	اطلاعات مقاله
تب کیو به عنوان یک بیماری نو پدید در بسیاری از کشورها از جمله ایران مطرح است. تعیین میزان شیوع آلودگی و فاکتورهای خطر باعث می شود که اهمیت عفونت برای مسئولین بهداشتی نمایان گردد. و امکانات و تجهیزات لازم جهت کنترل و پیش گیری و نیز، اولویت های پژوهشی مشخص شود. در این بررسی که به مدت یک سال از شهریور ماه سال ۱۴۰۲ تا شهریور ماه ۱۴۰۳ در کشتارگاه های شهرستان اصفهان انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه های سطح اصفهان جداسازی و اطلاعات آن تهیه و تنظیم گردید. نتایج حاصل از این بررسی پس از آنالیز ارئه گردیده است. ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه، ۳۳ درصد از موارد بعنوان مثبت گزارش شدند. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در این ۳۳ درصد نمونه مورد مطالعه مثبت، از روش مولکولی استفاده گردید. از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۲ مورد کارکنان بخش دام های زنده، ۲۰ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۱ مورد کارکنان بخش اداری بودند. در روش مولکولی ژن های گروه OMP جداسازی گردیدند. در این میان ژن های گروه ۱۰ مورد از نمونه های مورد بررسی واجد ژن COM1 بودند. نتایج مطالعات نشان می دهد که روش واکنش زنجیره ی پلی مراز تک مرحله ای جهت تشخیص کوکسیلا بورتی دارای حساسیت کافی نمی باشد و پیشنهاد می شود که از روش واکنش زنجیره ی پلی مراز آشیانه ای استفاده گردد. این روش نسبت به روش های کلاسیک از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است.	تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۸ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲ چاپ: تابستان ۱۴۰۳ DOI: کلمات کلیدی: کوکسیلا بورتی، تب کیو، کشتارگاه های اصفهان
* نویسنده مسئول: Email: Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com	

مقدمه

کوکسیلا بورنتی^۱ انگل اجباری درون یاخته می‌باشد. بنابر این در محیط کشت غیر زنده رشد نمی‌کند. کشت آن در رویان جوجه و در زرده تخم مرغ و در حرارت ۳۵ درجه بهتر است. و حداکثر رشد و نمو هنگامی است که مرگ رویان نزدیک می‌شود. این باکتری ارگانیسم مقاومی است، به طوری که به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد در پشم گوسفندان و به مدت بیش از یک ماه در گوشت تازه و به مدت ۴۰ ماه در سر شیر، زنده می‌ماند (۱). احتمالا شایع‌ترین چهره بالینی تب Q را تشکیل می‌دهد. به طوری که در سرم ۱۱-۱۲ درصد ساکنین مناطق بومی بیماری، آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی یافت شده است. در حالی که اغلب آن‌ها سابقه واضحی از ابتلاء به این بیماری را ذکر نمی‌کنند. به نظر می‌رسد عواملی نظیر سن ابتلاء و تعداد میکروارگانیسمی که وارد بدن می‌شود در میزان بروز این چهره بیماری دخیل باشد. ضمناً ممکن است عفونت مزبور، کاملاً بدون علامت باشد (۲-۴).

حساسیت به این بیماری عمومیت دارد. احتمالاً مصونیتی که بعد از بهبودی حاصل می‌شود تا پایان عمر، ادامه خواهد یافت و در این حالت دوام ایمنی سلولی بیشتر از ایمنی هومورال است. به طوری که آنتی بادی‌های فیکساسیون کمپلمان به مدت ۳-۵ سال و آنتی بادی‌های قابل کشف با تست فلورسنت غیر مستقیم به مدت ۱۰-۱۵ سال دوام خواهد یافت. تست الیزا به عنوان یک روش مناسب و عمومی در بیوشیمی غربالگری است. که در این مطالعه با بهره گیری از این روش به مطالعه سرم‌های مشکوک از نظر حضور آنتی بادی‌های ضد کوکسیلا بورنتی پرداختیم.

مطالعات در زمینه‌ی آزمایش‌های ایمنی‌شناسی نشان می‌دهد که کوکسیلا بورنتی تنها جرمی است در بین ریکتزیا ها که تغییرات فاز نشان می‌دهد. به عبارت دیگر از نظر ساختمانی دو فاز موجود است: فاز یک: که در حقیقت نخستین مرحله‌ای است که آن را در روی حیوان بیمار و یا در اثر گذراندن در روی حیوان آزمایشگاهی می‌یابند و شکل توکسیک و خطرناک برای انسان نیز محسوب می‌شود و کپسول پلی ساکارید دارد. فاز دو: خاصیت توکسیک کمتری دارد و سویه‌هایی در این فاز هستند که در تخم مرغ کشت داده و از این رو پادگن پوششی را از دست داده‌اند. در آزمایشگاه کار کردن با این سویه‌ها برای کارکنان خطر کمتری دارد. در این بررسی که به مدت یک سال در کشتارگاه‌های اصفهان انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه-های سطح اصفهان جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید.

کلیه مراحل جداسازی و تشخیص آنتی بادی IgM با استفاده از کیت Virion/Serion مورد تایید قرار گرفت. مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه انجام شد. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در نمونه‌های واجد آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی، از آزمون Nested-PCR استفاده شد (۵).

گر چه تشخیص با روش‌های سرولوژی راحت انجام می‌شود، حضور آنتی بادی‌های غالب بعد از دو یا سه هفته از شروع بیماری در انسان قابل پیگیری هستند. تست الیزا^۱ نسبت به سایر تست‌های مورد بررسی مثل تثبیت کمپلمان و بررسی آنتی بادی‌های کمپلمان از دقت و سهولت بیشتری برخوردار است. از این جهت این مطالعه با هدف بررسی حضور آنتی بادی‌های تولید شده علیه کوکسیلا بورنتی با روش الیزا در سرم‌های مشکوک جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه‌ها انجام شد.

^۱ - ELIZA

^۱ - Coxiella burnetii

روش کار

در این بررسی که به مدت یک سال در کشتارگاه‌های اصفهان انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه‌های سطح اصفهان جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید. پرسشنامه شامل اطلاعات سن، جنس، سابقه ارتباط با احشام و هم‌چنین رسیدگی‌های بهداشتی از جمله واکسیناسیون می‌باشد. از هر کدام از کارکنان ۵ سی سی نمونه خون وریدی اخذ و پس سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم بیمار جداسازی شد (۶). نمونه‌های جداسازی شده در فریزر ۲۰- درجه تا انجام مراحل بعدی نگهداری شد. جهت بررسی حضور آنتی بادی‌های ضد کوکسیلا بورنتی، نمونه‌های سرمی با استفاده از آزمایش الایزا مورد بررسی قرار گرفت (۷-۹).

کلیه مراحل جداسازی و تشخیص آنتی بادی IgM با استفاده از کیت Virion/Serion مورد تایید قرار گرفت. مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل کیت Serion-Rhumatoin Factor انجام شد (۱۰). با توجه به این‌که آنتی بادی‌های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید)^۵ در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می‌کنند، باید قبل از تشخیص IgM، این فاکتور حذف شود. محلول جاذب روماتوئید به صورت 4 ± 1 رقیق شدند. در مرحله بعد هر کدام از این نمونه‌ها به صورت 10 ± 1 رقیق شدند. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو با محلول شستشوی داخل کیت، به مدت ۳۰ دقیقه محلول کنتره کیت اضافه شد. در مرحله بعد محلول سوبسترا اضافه گردید و در مرحله آخر محلول متوقف کننده اضافه گردید. جهت قرائت چاهک‌های

میکروپلیت از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد (۱۱).

در نهایت اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در نمونه‌های واجد آنتی بادی ضد کوکسیلا بورنتی، از آزمون Nested-PCR^۶ استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت استخراج سیناژن^۷ ساخت ایران استفاده شد و تمام مراحل کار مطابق با کیت مربوطه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص نهایی کوکسیلا بورنتی در جدول زیر ارائه شده است (۱۲).

^۱ - Cinnagen

^۵ - RF

^۱ - Polymerase Chain Reaction

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده

اندازه قطعه (bp)	توالی پرایمرها	پرایمرها
۵۰۱	AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG	مرحله اول
	TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG	OMP1
۴۳۸		OMP2
	GAAGCGCAACAAGAAGAACAC	مرحله دوم
	TTGGAAGTTATCACGCAGTTG	OMP3
		OMP4

نتایج بررسی الکتروفورز محصولات مرحله ی دوم PCR در ژل آگارز ارائه گردید. نتایج نهایی در نهایت با نرم افزار های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

در این بررسی که به مدت یک سال از شهریور ماه سال ۱۴۰۲ تا شهریور ماه ۱۴۰۳ در کشتارگاه های شهرستان اصفهان انجام شد، ۱۰۰ نمونه سرمی از کارکنان کشتارگاه- های سطح اصفهان جداسازی و اطلاعات هر یک طی پرسش نامه ای مجزا تهیه و تنظیم گردید. از هر کدام از کارکنان ۵ سی سی نمونه خون وریدی اخذ و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم بیمار جداسازی شد.

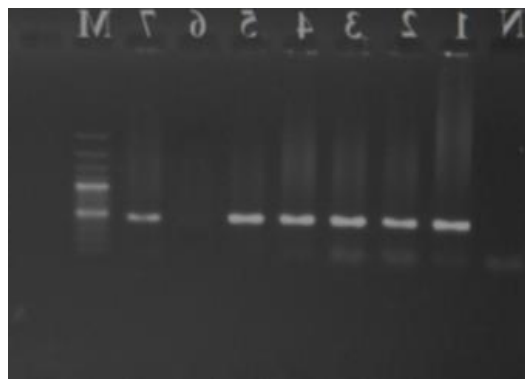
در این مطالعه مقطعی- توصیفی همه شرکت کنندگان مورد مطالعه در کشتارگاه های اصفهان و مرد بودند. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین کارکنان مورد مطالعه در بازه سنی ۲۰-۳۰ سال بودند. از این میزان بیشترین میزان آلودگی در کارکنان با همین میزان سن گزارش گردید. جدول (۲) مربوط به فراوانی سن کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه ارائه شده است.

جدول (۲): فراوانی عفونت کوکسیلا بر اساس سن

کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه

سن (سال)	تعداد کل	تعداد موارد مثبت	درصد موارد مثبت
۲۰-۳۰	۵۰	۲۳	۴۶٪
۳۱-۴۰	۳۵	۲۷	۷۷٪
۴۱-۵۰	۱۵	۹	۶۰٪
جمع	۱۰۰	۵۹	۵۹٪

پرسش نامه شامل اطلاعات سن، جنس، سابقه ارتباط با احشام و همچنین رسیدگی های بهداشتی از جمله واکسیناسیون می باشد. بر ارسال پرسشنامه های مورد بررسی تنها ۲۳ درصد از کارکنان مورد واکسیناسیون قرار گرفته بودند. براین اساس اقدامات لازم جهت پیشگیری از ابتلا کارکنان و همچنین در نظر گرفتن واکسیناسیون اقدامی اساسی به نظر می رسد. طبق بررسی های انجام شده در این پژوهش، بیشترین ابتلا در کارکنان با میزان سابقه کار بین ۱۰-۶ سال سابقه کار بوده است. جدول مربوط به فراوانی عفونت کوکسیلا بورنتی در کارکنان کشتارگاه های مورد



تصویر (۱): تصویر حاصل از الکتروفورز در نمونه های

واجد ژن OMP

بحث

تب کیو به عنوان یک بیماری نو پدید و باز پدید در بسیاری از کشورها از جمله ایران مطرح است. تعیین میزان شیوع آلودگی و فاکتورهای خطر باعث می شود که اهمیت عفونت برای مسئولین بهداشتی نمایان گردد و امکانات و تجهیزات لازم جهت کنترل و پیش گیری و نیز، اولویت های پژوهشی مشخص شود (۱۳).

مطالعه حاضر نخستین مطالعه در شهرستان اصفهان می باشد. تعیین میزان شیوع بیماری و فاکتورهای خطر باعث می شود که اهمیت این بیماری در جمعیت، برای مسئولین بهداشتی نمایان گردیده و امکانات و تجهیزات لازم کنترل و پیش گیری و نیز اولویت های پژوهشی مشخص شود. مطالعه حاضر، نشان داد که عفونت کوکسیلوزیس در سرم کارکنان شهرستان اصفهان وجود دارد و شیوع آن در ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه، ۵۹ درصد گزارش مثبت است (۱۴). در این مطالعه جهت تایید نهایی از روش مولکولی استفاده گردید. در روش مولکولی ژن های گروه OMP جداسازی گردید. در این میان ۱۰ مورد از نمونه های مورد بررسی واجد ژن OMP بودند. نتایج مطالعات نشان می دهد که روش واکنش زنجیره ی پلی مراز تک مرحله ای جهت تشخیص کوکسیلا بورنتی دارای حساسیت کافی نمی باشد و پیشنهاد می شود که از روش

مطالعه بر اساس سابقه کار نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین نمونه های سرم مورد مطالعه، ۵۹ نمونه سرم (۵۹ درصد) از نظر حضور آنتی بادی IgM مثبت بودند. با توجه به این که آنتی بادی های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید) در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می کنند، قبل از تشخیص IgM، این فاکتور حذف گردید.

محلول جاذب روماتوئید به صورت 4 ± 1 رقیق شد. در مرحله بعد هر کدام از این نمونه ها به صورت 100 ± 1 رقیق شدند. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های میکروپلیت افزوده شد و پلیت ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو با محلول شستشوی داخل کیت، به مدت ۳۰ دقیقه محلول کنژوگه کیت اضافه شد. در مرحله بعد محلول سوبسترا اضافه گردید و در مرحله آخر محلول متوقف کننده اضافه شد. در این مطالعه جهت قرائت چاهک های میکروپلیت از دستگاه قرائت کننده الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد.

از ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه، ۵۹ درصد از موارد به عنوان مثبت گزارش شدند. جهت تایید نهایی از حضور باکتری در این ۵۹ درصد نمونه مورد مطالعه مثبت، از روش مولکولی استفاده گردید. از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۲ مورد کارکنان بخش دام های زنده، ۲۰ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۱ مورد کارکنان بخش اداری بودند. در روش مولکولی ژن های گروه OMP جداسازی گردیدند. در این میان ژن های گروه ۱۰ مورد از نمونه های مورد بررسی واجد ژن COM1 بودند. تصویر حاصل از الکتروفورز در نمونه های واجد ژن OMP در زیر ارائه شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای استفاده گردد. این روش نسبت به روش‌های کلاسیک از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است (۱۵).

تب کیو یک بیماری شغلی در افرادی همچون دامپزشکان، کارگران کشتارگاه‌ها، دامداران و کارکنان آزمایشگاهی است. گسترش تب کیو به علت تماس افراد مستعد با دام آلوده اتفاق می‌افتد. در مطالعه حاضر از بین ۱۰۰ نمونه جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه‌های اصفهان ۳۳ ایزوله کوکسیلا بورنتی جداسازی گردید (۱۶). گرچه هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین سابقه کاری کارکنان و آنتی‌بادی جداسازی شده پیدا نشد، اما بیشترین میزان نمونه جداسازی شده در بین کارکنان کمتر از ۳۰ سال با سابقه کاری بالا مشاهده گردید. این مساله نشان دهنده فراوانی ایزوله در کارکنانی است که با عدم واکسیناسیون در معرض نمونه‌های دامی آلوده قرار گرفته‌اند. از بین نمونه‌های سرم مورد مطالعه، تنها ۵۹ نمونه سرم (۵۹ درصد) از نظر حضور آنتی‌بادی‌های IgM مثبت بودند. با توجه به این که آنتی‌بادی‌های IgM غیر اختصاصی (فاکتور روماتوئید) در روال آزمایش مثبت کاذب ایجاد می‌کنند، قبل از تشخیص IgM، این فاکتور حذف گردید. با توجه به این که حضور آنتی‌بادی‌های IgM نشان دهنده‌ی فاز حاد بیماری است، می‌توان نتیجه گرفت که بیشتر کارکنان با سابقه کاری و سن بالای ۳۵ سال زمان لازم برای مقاومت در برابر محیط‌های آلوده به کوکسیلا داشته‌اند. از این جهت بیشترین میزان کوکسیلا بورنتی جداسازی شده از کارکنان کشتارگاه‌ها با سن کمتر می‌باشد (۱۷).

در سال ۲۰۱۱ ترینیداد و همکاران مطالعه‌ای در بین کارکنان کشتارگاه‌های مورد مطالعه خود انجام دادند که از ۴۵۵ مورد کارگر مورد مطالعه ۲۰ مورد (۴/۴ درصد) واجد IgM در سرم خون خود بودند. که با توجه به جامعه آماری مورد مطالعه ما نسبت متناسبی را نشان می‌دهد (۱۸). از بین

موارد مثبت جداسازی شده، ۱۳ مورد کارکنان بخش دام‌های زنده، ۴ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۳ مورد کارکنان بخش اداری بودند که مشابه به نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر از بین موارد مثبت جداسازی شده، ۱۲ مورد کارکنان بخش دام‌های زنده، ۲۰ مورد کارکنان بخش کشتارگاه و ۱ مورد کارکنان بخش اداری بودند. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۸۸ در آدیس آبابا انجام شد، شیوع تب کیو در ۴۶۵ کارگر بررسی شد که از این میان ۶/۵٪ شیوع کوکسیلا بورنتی سرمی گزارش شد (۱۹).

در مطالعه‌ای مشابه در ترکیه در سال ۲۰۰۰ نشان دهنده‌ی شیوع ۱۲ درصد کوکسیلا بورنتی از سرم کارکنان بخش کشتارگاه‌های مورد مطالعه بود (۲۰). نتایج مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده اخیر مطابقت دارد. و نشان دهنده شیوع کوکسیلا بورنتی در سرم کارکنان کشتارگاه‌ها می‌باشد. با توجه به این که ایران در مرزهای شرقی با کشور افغانستان و پاکستان قرار دارد، و کنترل ورود دام‌های آلوده از این مرزها با عدم رعایت موازین بهداشتی انجام می‌شود، کنترل شیوع کوکسیلا بورنتی مساله‌ای دشوار به نظر می‌رسد. در مناطق مختلف ایران نیز مطالعات سرولوژیک انجام شده و نتایج مختلفی از شیوع کوکسیلا بورنتی گزارش می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط اسدی و همکاران انجام شد ۱۰۰ درصد شیوع سرمی کوکسیلا بورنتی گزارش گردید (۲۱). در این مطالعه ۱۱۳۷ نمونه سرمی از ۴۳ گله دامی جداسازی گردید. در شرق ایران خلیلی و سخایی شیوع کوکسیلا بورنتی را ۶۵/۷۸ درصد و ۱۰/۷۵ درصد گزارش کردند (۲۲).

هم‌چنین در مطالعه دیگری که توسط خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۰، شیوع سرمی کوکسیلا بورنتی ۲۹/۴۲ درصد برآورد شد. متأسفانه کشتارگاه‌ها اطلاعات کافی راجع به کوکسیلا بورنتی و راه‌های انتقال آن ندارند و هیچ‌گونه اقدام پیشگیری از طرف مسئولین انجام نشده است (۲۳). تب کیو

که به واسطه ی کوکسیلا بورتی است، یک بیماری مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است که در نواحی جغرافیایی با آب و هوای متفاوت گزارش شده است. عامل بیماری یک میکروارگانیسم ریکتزیا مانند و دارای زندگی داخل سلولی اجباری به نام می باشد که طیف وسیعی از حیوانات از قبیل گاو، گوسفند، بز، سگ، گربه، و ماهی ها را آلوده می کند. از بین حیوانات اهلی، گاو های شیری، گوسفند و بز بزرگترین مخازن این باکتری هستند. رحم و غدد پستانی حیوان اولین محل جایگزینی عامل بیماری در فاز مزمن آلودگی باکوکسیلا بورتی هستند. حیوانات آلوده این میکروارگانیسم را از طریق ترشحات دفعی، ترشحات رحمی و قطعاتی از جفت در طی زایمان، به میزان زیاد به محیط دفع می کنند. یکی دیگر از مهم ترین راه های دفع کوکسیلا بورتی به محیط شیر دام های آلوده می باشد. شواهد سرولوژیکی در شرق ایران در مطالعه اسماعیلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دهنده ی آنتی بادی های فاز ۱ و ۲ در سرم کارکنان کشتارگاه های مورد مطالعه است. بیشترین میزان آنتی بادی گزارش شده در این کارکنان با مقادیر ۱/ درصد گزارش شده است (۲۵-۲۴). در نهایت به نظر می رسد استفاده از روش های مولکولی همچون PCR از دقت بالاتری برای بررسی حضور کوکسیلا بورتی برخوردار باشد.

نتیجه گیری

در نهایت به نظر می رسد استفاده از روش های مولکولی همچون PCR از دقت بالاتری برای بررسی حضور کوکسیلا بورتی برخوردار باشد. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که اگر کوکسیلا بورتی در یک شهر که دارای حدود ۵ میلیون نفر جمعیت است به صورت اسپری پخش کنند. ۱۲۵،۰۰۰ نفر بیمار و ۱۵۰ مورد مرگ و میر رخ می دهد. همچنین این سازمان تخمین زده است که عامل می تواند تا شعاع ۲۰ کیلومتر در مسیر باد منتقل شود. عوامل میکروبی این گروه پاتوژن هایی می باشند که بیماری های آشکار ایجاد

کرده و با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک می توانند سرایت پذیری بسیار بالا و خطرناکی به علت در دسترس بودن، سهولیت در امر تولید و انتشار داشته باشند، این در حالی است که این میکروارگانیسم ها دارای آمار مرگ و میر بسیار بالا و همچنین تاثیرات چشمگیری بر روی سلامت هستند. از این رو بررسی حضور کوکسیلا در سرم کارکنان و کنترل ورود و خروج دام های آلوده ضروری به نظر می رسد.

منابع

1. Doosti A, Arshi A, Sadeghi M. Investigation of *Coxiella burnetii* in Iranian Camels. J Med Microbiol. 2012; 6: 56-62.
2. Dupuis G, Petite J, Peter O. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine Valley. Int J of Epidemiol. 1987; 16: 282-287.
3. Fretz R, Schaeren W, Tanner M. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Int J Food Microbiol. 2007; 116: 414-418.
4. Guatteo R, Beaudeau F. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy Cows: implications for detection and control. J Vet Res. 2006; 37: 827-833.
5. Gyuranecz M, Hornok S, Viktor J. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: Screening of Dairy Cows, Sheep, Commercial Milk Samples, and Ticks. Vector-borne and Zoonotic Dis, 2012; 12: 650-653.
6. Hirai A, Nakama A, Chiba T. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in Cheese samples. J Vet Med Sci. 2011; 74: 175-180.
7. Hendrik JR. *Coxiella burnetii* in pregnant goats. GVO Drukkers Vormgevers. 2013; 1: 10-21.
8. Howe GB, Loveless BM, Nonwood D, Craw P. Real-time PCR for the early detection and Quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. J Mol Cell Probes. 2009; 23: 127-31.
9. James H. Steele (Edit.) CRC Handbook Series in Zoonoses, Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases, 2nd edition. 2000; Volume 2, pp. 507-528.
10. Khalili M, Sakhaee E. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. Am J Trop Med Hyg. 2009; 80(6): 1031-1032.
11. Khalili M, Sakhaee E, Golchin M, Q fever serology in febrile patients in Southeast Iran. Trans Royal Society Trop Med Hygiene. 2010; 104(9): 623-4.
12. Kim S, Kim E, Lafferty C. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Em Infect Dis. 2005; 11: 619-621.
13. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, et al. Q fever: a biological weapon in your backyard. 2003; 3(11): 709-21.
14. Maurin M, Q fever. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 518-553.18-22.
15. Motohiko O, Agus S, Kozue S. Evaluation of PCR and Nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. National Institute Infect Dis. 2004; 35: 852-855.
16. Niemczuk K, Szymańska M. Epidemiology, Zoonotic Aspect and Current Epidemiological Situation of Q fever in Poland. National Vet Res Institute. 2012; 51: 380-392.
17. Rodolakis A. Q fever, state of: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. J Small Rum Res. 2006; 62(1): 121-124.
18. Rudolf R, Rebecca M, Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a Dairy Goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. Res Vet Sci. 2012; 93:1217-1224.

18. Trinidad A, Dookeran S, Stewart-Johnson A. Frequency of Seropositivity for *Coxiella burnetii* immunoglobulins in livestock and abattoir workers in Trinidad. J New Microbiol. 2011; 34 (2): 219-24.
19. Abebe A. Prevalence of Q fever infection in the Addis Ababa abattoir. Ethiop Med J. 1990; 28(3): 119-122.
20. Cetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurçay M. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. Vet Rec. 2000; 146 (5): 131-136.
21. Asadi J, Khalili M, Kafi M, Ansari-Lari M, Hosseini SM. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. Comp Clin Pathol. 2012; 1 (12)-1661-1669.
22. Khalili M, Sakhaee E. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. Am J Trop Med Hyg. 2009; 80(6): 1031–1039.
23. Khalili M, Shahabi-Nejad N, Golchin M. Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010; 104(9): 623-624.
24. Esmaili S, Gooya MM, Shirzadi MR, Esfandiari B, Amini FB, Behzadi MY. Seroepidemiological Survey of tularemia among different groups in western Iran. Int J Infect Dis 2014; 18: 27-31.
25. Kirkan S, Kaya O, Tekbiyik S, Parin U. Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. Turk J Vet Anim Sci. 2008; 32(3): 215-20.

Study of *Coxiella burnetii* serotype in clinical samples of slaughterhouse workers in Isfahan cities

Fahimeh Nourbakhsh^{*1}, Hossein Chahardeh Masoumi², Mohammadreza Saebi³

1. PhD in Toxicology, Expert in the Deputy of Food and Drug Administration, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan-Iran.
2. PhD in Veterinary Medicine, Expert in the Deputy of Food and Drug Administration, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan-Iran.
3. PhD student in Food Hygiene, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord-Iran.

Abstract

Q fever is a newly emerging disease in many countries including Iran. Determining the prevalence of contamination and risk factors makes the importance of infection visible to health officials and the necessary facilities and equipment for control and prevention, as well as research priorities.

In this study, which was conducted for one year September 1402 to September 1403 in the slaughterhouses of Isfahan city, 100 serum samples were isolated from the employees of the slaughterhouses in Isfahan, and their information was prepared and adjusted. The results of this study have been presented after analysis.

100 samples isolated from the workers of the studied slaughterhouses, 33% of the cases were reported as positive. In order to finally confirm the presence of bacteria in these 33% positive samples, a molecular method was used. Among the isolated positive cases, 12 cases were employees of the live livestock department, 20 cases were employees of the slaughterhouse department and 1 case were employees of the administrative department. In the molecular method, the genes of the OMP group were isolated. Among these, the genes of 10 of the analyzed samples had the *COM₁* gene.

Conclusion: The results of the studies show that the one-step polymerase chain reaction method is not sensitive enough to detect *Coxiella burnetii* and it is suggested to use the nested polymerase chain reaction method. This method has high speed, accuracy, specificity and sensitivity compared to classical methods.

Key words: *Coxiella burnetii*, Q fever, Isfahan Slaughterhouses



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های /استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز
 زیبا شانکی باورصاد^{*}، مریم رئیسی^۱، حسین آقاجانی^۱، مرضیه سلیمانیان^۱
 ۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> از عوامل مهم عفونت های کسب شده از بیمارستان ها و اجتماع می باشد. ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ مترشح از این باکتری، از دسته فاکتورهای ویروالانس بسیار مهم و جز سوپر آنتی ژن های توکسین پیروژنیک می باشد. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز می باشد. در این تحقیق ۱۳۳ ایزوله <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> از نمونه های مختلف بیمارستانی به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن <i>tsst-1</i> مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA تشخیص قطعی باکتری انجام شد سپس فراوانی ژن <i>tsst-1</i> در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار تعیین شد. پس از انجام آزمون PCR و تشخیص قطعی باکتری، از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی توالی ژن <i>tsst-1</i> در ۶ ایزوله مشاهده گردید. در تست آنتی بیوگرام بیشترین مقاومت نسبت به سفازولین (۸۳/۳ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانیتین و وانکومایسین (۰ درصد) مشاهده گردید. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها و اهمیت بالینی ژن <i>tsst-1</i> شناسایی به موقع و به کارگیری راه کارهای مناسب درمانی در کنترل عفونت امری ضروری به نظر می رسد.	تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۲۰ چاپ: ۱۴۰۳/۶/۳۰ DOI: کلمات کلیدی: <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>، توکسین سندروم شوک توکسیک-۱، مقاومت آنتی بیوتیکی * نویسنده مسئول: Email: zibashanaki91@gmail.com

مقدمه

کلونیزاسیون و بیماری‌زایی باکتری می‌شود (۴،۳). این توکسین یک پروتئین ۲۴ کیلودالتونی است که اساساً به وسیله سویه‌هایی از استافیلوکوکوس تولید می‌شود که نسبت به یک یا دو باکتریوفاژ اختصاصی (باکتریوفاژهای ۵۲، ۲۹ و یا هر دو) حساس هستند و دارای مقاومت کروموزومی نسبت به کادمیوم، آرسنات و پنی سیلین G را نشان می‌دهند. *TSST-1* یک سوپر آنتی ژن است که باعث بیان انتخابی رده‌هایی از سلول‌های T همراه با ازدیاد ترشح سایتوکین‌ها، مونوکاین‌ها و اوتاکوئیدها می‌گردند. این توکسین هم‌چنین منجر به نشت وسیع مویرگ‌ها می‌شود که منجر به کاهش حجم خون شده و مستقیماً برای میوکارد، کلیه‌ها، کبد، ریه‌ها، بافت‌های لنفوئیدی، CNS و اعصاب محیطی توکسیک می‌باشد (۱). این سم با اتصال هم‌زمان به ناحیه $V\beta$ در پذیرنده آنتی ژنی لنفوسیت‌های T و مولکول‌های MHC کلاس II فعالیت خود را انجام می‌دهد و منجر به فعال شدن ۳۰-۵ درصد همه لنفوسیت‌های T کمکی بیان کننده CD4 می‌شود (۵). فاکتورهای مناسب برای رشد استافیلوکوکوس/اورئوس تولید کننده *TSST-1* عبارتند از وجود اکسیژن، pH خنثی، میزان پروتئین بالا، گلوکز کم، منیزیم پایین تا نرمال و دی‌کسید کربن زیاد در محیط‌های آزمایشگاهی، این شرایط به طور قابل توجهی موجب افزایش تولید *TSST-1* و پروتئاز می‌شود (۶). این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله‌های استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت.

(۴ نمونه)، بینی (۲ نمونه)، مایع پریکارد (۱ نمونه)، مایع پلور (۲ نمونه)، زخم بستر (۱ نمونه)، ترشح چرکی (۱ نمونه)، مایع نخاع (۱ نمونه)، پوست (۴۸ نمونه)، زخم جراحی (۱۶ نمونه)، تراشه (۱ نمونه)، ادرار (۵ نمونه) و زخم استرنال (عمل قلب) (۱ نمونه) مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمان شهرستان اهواز صورت گرفت.

استافیلوکوکوس/اورئوس به طور مداوم یکی از چهار عامل عفونت‌های بیمارستانی (همراه با/شریشیا کلی، انتروکوکوس فکالیس و پseudomonas آئروژینوزا) می‌باشد. تاکنون استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) محدود به بیمارستان بوده ولی به واسطه افزایش عفونت‌های پوست و بافت‌های نرم و پنومونی نکروز دهنده در بیماران جوان‌تر، استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین در جامعه (CA-MRSA) در سراسر دنیا گسترش یافت. اگرچه استافیلوکوکوس/اورئوس یکی از اعضا فلور نرمال بینی و روده در ۵۰-۳۰ درصد از جمعیت جامعه می‌باشد، اما این ارگانیزم در ۹۰ درصد از کارکنان بالینی بیمارستان‌ها حمل می‌شود. این باکتری به طور غیرمعمول نسبت به خشکی مقاوم است، به طوری که سریعاً و به آسانی از طریق دست‌های پرسنل درمانی و از طریق وسایلی مثل لباس‌ها، ملحفه‌ها و دستگاه‌ها به بیماران انتقال پیدا می‌کنند. گونه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس به طور تیپیک نسبت به تعداد زیادی از داروها مقاومند و قادرند از مرگ به وسیله اکثر ضد عفونی کننده‌ها فرار نمایند. لذا این باکتری‌ها قادر به پایداری و رشد مناسب در محیط بیمارستان هستند و در نتیجه می‌توانند به اشخاصی که حساسیت بالایی به عفونت‌های استافیلوکوکی دارند مانند نوزادان تازه به دنیا آمده، بیماری دارای ضعف ایمنی، سوختگی‌ها و بیماران دارای وسایلی مثل کاتتر منتقل شوند (۲،۱). استافیلوکوکوس/اورئوس دارای فاکتورهای ویروالانس متعددی از جمله ژن *tst-1* است که منجر به

مواد و روش‌ها

۱. نمونه گیری و جداسازی باکتری

استافیلوکوکوس/اورئوس

در این مطالعه به منظور تشخیص استافیلوکوکوس/اورئوس تعداد ۱۳۳ نمونه کلینیکی از قبیل مایع شکمی (آسیت) (۳ نمونه)، آیسه (۷ نمونه)، خون (۲۷ نمونه)، کاتتر (۴ نمونه)، مایع دیالیز (۱ نمونه)، چشم (ملتحمه، قرنیه، جسم خارجی مانند لنز) (۸ نمونه)، مایع مفصل

۲. آزمایش آنتی بیوگرام

ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کربی-بائر (دیسک دیفیوژن آگار) بر اساس رهنمودهای CLSI (پادتن طب) انجام شد. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه شامل آمیکاسین (AN 30)، سفازولین (30 CZ)، سفکسیم (CFM 5)، سفوکسیتین (CFO 30) (شرکت ROSCO، دانمارک)، سفتریاکسون (CRO 30)، سیپروفلوکساسین (CP 5)، کلیندامایسین (2 CC)، اریترومایسین (E 15)، جنتامایسین (GM 10)، ایمی پنم (IMP 10)، نالیدیکسیک اسید (NA 30)، نیتروفورانتین (FM 300)، تتراسایکلین (TE 30)، کوتریموکسازول (SXT 25)، وانکومایسین (V 30) (پادتن طب، ایران) بود (۸،۷).

۳. آزمایشات مولکولی

به منظور تأیید قطعی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* ردیابی ژن *aroA* در ایزوله ها، از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد (۹). در این تحقیق از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری های رشد یافته در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران)، استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت:

در مرحله اول حضور قطعی *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایزوله ها با ردیابی ژن *aroA* با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت.

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

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

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

فیشر و نرم افزار آماری SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

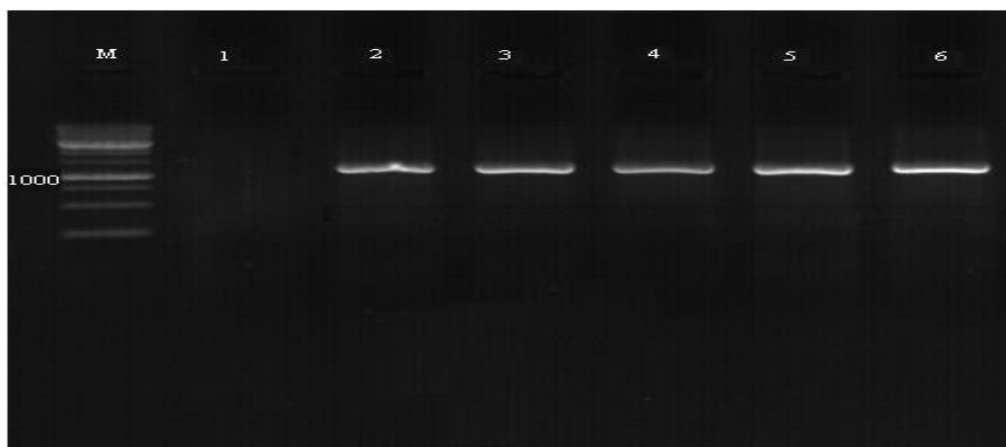
نتایج

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

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

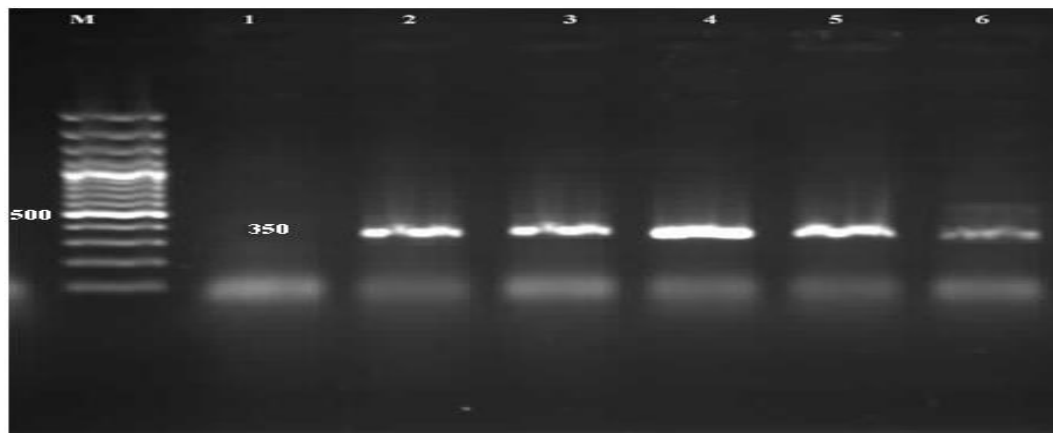
۴. آنالیز آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *aroA* / *استافیلوکوکوس اورئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون‌های ۳-۶ نمونه‌های مثبت واجد باند ۱۱۵۳ جفت بازی

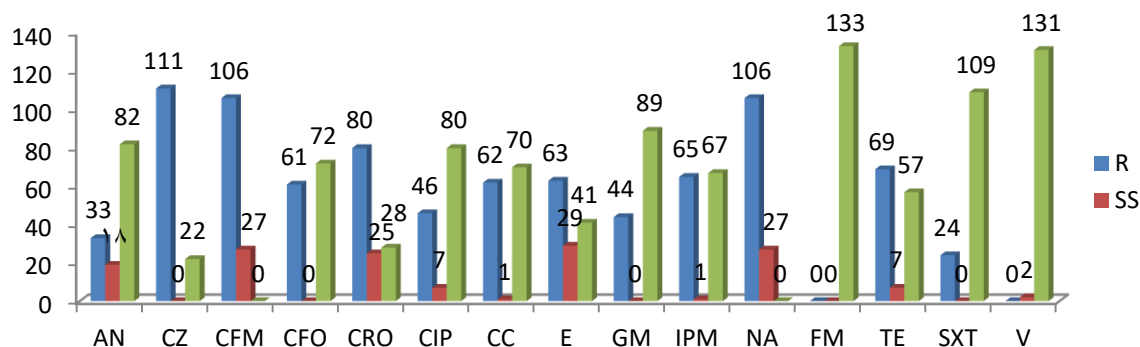
با انجام آزمون PCR به منظور ردیابی ژن *tsst-1* از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی در ۶ ایزوله توالی ژن *tsst-1* مشاهده گردید. مشاهده باند ۳۵۰ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد. نتایج در شکل (۲) نشان داده شده است.



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *tsst-1* / *استافیلوکوکوس اورئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های ۲-۵ نمونه‌های مثبت

کمترین مقاومت نسبت به وانکومايسين و نیتروفرانتین (۰ درصد) مشاهده شد. نتایج در نمودار (۱) نشان داده شده است.

پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمونهای میکروبیولوژی و مولکولی، بیشترین مقاومت باکتری های ایزوله شده نسبت به سفتریاکسون (۶۰/۱۵ درصد) و



نمودار ۱: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های مختلف

بیوتیکی بر حسب جنسیت در جدول (۲) نشان داده شده است.

در این تحقیق از ۱۳۳ نمونه مورد بررسی ۷۶ نمونه متعلق به جنس زن (۵۷ درصد) و ۵۷ نمونه متعلق به جنس مرد (۴۳ درصد) می باشد. نتایج مقاومت آنتی

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

آنتی بیوتیک	جنسیت						p-value
	زن			مرد			
	R	I	S	R	I	S	
AN			(/۵۶/۲)				*./۰.۲۲
	۲۵ (/۳۲/۸)	۸ (/۱۰/۹)	۴۳	۷ (/۱۳/۲)	۹ (/۸/۶۱)	۴۱ (/۷۱/۷)	
CZ	(/۵۰)	.	(/۵۰)		.	.	*./۰.۸۷۶
	۳۸		۳۸	۵۷ (/۱۰۰)			
CFM	(/۷۵)	(/۲۵)	.		.	.	*./۰.۰۰۰
	۵۷	۱۹		۵۷ (/۱۰۰)			
CFO		.			.		*./۰.۴۴
	۴۰ (/۵۲/۴)		۳۶ (/۴۷/۶)	۲۰ (/۳۵/۸)		۳۷ (/۶۴/۲)	
CRO			(/۲۲/۷)				*./۰.۹۹
	۵۰ (/۶۵/۲)	۹ (/۱۲/۱)	۱۷	۳۱ (/۵۳/۸)	۱۵ (/۲۶/۹)	۱۱ (/۱۹/۲)	
CP			(/۵۷/۶)				*./۰.۴۱۲
	۲۹ (/۳۷/۹)	۳ (/۴/۵)	۴۴	۱۶ (/۲۷/۸)	۴ (/۷/۴)	۳۷ (/۶۴/۸)	
CC		.					*./۰.۲۹۲
	۳۹ (/۵۰/۸)		۳۷ (/۴۹/۲)	۲۳ (/۳۹/۶)	۱ (/۱/۹)	۳۳ (/۵۸/۵)	

E			(/۳۰/۸)				*./۸۷۶
	۳۶ (/۴۷/۷)	۱۶ (/۲۱/۵)	۲۴	۲۵ (/۴۳/۴)	۱۴ (/۲۴/۵)	۱۸ (/۳۲/۱)	
GM	(/۲۰)	۰	(/۸۰)		۰	۰	*./۰۰۰
	۱۵		۶۱	۵۷ (/۱۰۰)			
IPM		۰	(/۴۵/۳)				*./۰۸۹
	۴۲ (/۵۴/۷)		۳۴	۲۲ (/۳۸/۹)	۱ (/۱/۹)	۳۴ (/۵۹/۳)	
NA	(/۷۵)	(/۲۵)	۰		۰	۰	*./۰۰۰
	۵۷	۱۹		۵۷ (/۱۰۰)			
FM	۰	۰	(/۱۰۰)	۰	۰		-
			۷۶			۵۷ (/۱۰۰)	
TE	(/۵۰)	۰	(/۵۰)				*./۰۸۶
	۳۸		۳۸	۳۱ (/۵۳/۶)	۶ (/۱۰/۷)	۲۰ (/۳۵/۷)	
SXT		۰	(/۷۸/۳)		۰		*./۴۴۲
	۱۶ (/۲۱/۷)		۶۰	۹ (/۱۵/۴)		۴۸ (/۸۴/۶)	
V	۰		(/۹۸/۵)	۰			**./۰۰
		۱ (/۱/۵)	۷۵		۱ (/۱/۹)	۵۶ (/۹۸/۱)	

نسبت به کلیندامایسین حساس باشد ولی نسبت به اریتروماایسن مقاوم باشد و این مقاومت را به کلیندامایسین القا کند به طوری که هاله عدم رشد به شکل حرف D مشخص شود، این پدیده را D می گویند و به صورت کلیندامایسین مقاوم و اریتروماایسن مقاوم گزارش می شود (۱۰).



شکل ۳: پدیده D در استافیلوکوکوس اورئوس

1 گزارش گردید. نتایج به تفکیک در جدول ۳-۴ و شکل ۳-۵ نشان داده شده است.

در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو، بین جنسیت و آنتی بیوتیک های سفازولین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، اریتروماایسن، ایمی پنم، تتراسیکلین و کوتریموکسازول رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P\text{-value} > 0/05$). اما بین جنسیت و آنتی بیوتیک های آمیکاسین، سفکسیم، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید ($P\text{-value} < 0/05$). هم-چنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آنتی بیوتیک وانکوماایسن رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P\text{-value} > 0/05$).

در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۰ ایزوله (/۷/۵۱) DTest مثبت دیده شد (مقاومت القایی کلیندامایسین). نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. این پدیده به این صورت اتفاق می افتد که اگر در شرایط آزمایشگاهی /استافیلوکوکوس اورئوس

در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (/۴/۵۱) ژن *tsst*-

جدول ۳: فراوانی ژن *tsst-1* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب جنسیت، نوع نمونه و مقاومت آنتی بیوتیکی

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

مقاومت نسبت به نیترو فورانتئین و وانکومایسین (۰ درصد) گزارش گردید است.

در مطالعه انجام شده توسط رئیسی و همکاران که بر روی ۶۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت های فوقانی دستگاه تنفسی در سال ۱۳۹۳ در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، مقاومت نسبت به اریترومایسین ۵ درصد و مقاومت نسبت به وانکومایسین ۵٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می باشد. در مطالعه دیگر که توسط رشیدیان و همکاران در بیمارستان بعثت سنندج انجام شد حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده را به اریترومایسین ۵۹٪ و در مطالعه انجام شده توسط قاسمیان و همکاران حساسیت ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به وانکومایسین ۴/۴۴ درصد برآورد گردید (۲، ۱۵، ۱۶). اختلافات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها می تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه، روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و غیره... باشد (۲).

در قسمت دیگر از این تحقیق به فراوانی ژن *tsst-1* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته شد عامل اصلی ایجاد سندرم شوک توکسیک، ترشح توکسین TSST-1 ترشح شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. بروز این سندرم در ایالات متحده، در حدود ۰/۵ در صد هزار است. اغلب سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران مبتلا به شوک سمی جدا شده اند، سم ایجاد کننده شوک سمی (TSST-1) را تولید می کنند که این توکسین موجب تب، کاهش فشار خون، علائم گرفتاری اندام های مختلف و بثورات پوستی می شود. در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله

از ۶ ایزوله واجد ژن *tsst1*، ۳ ایزوله مربوط به جنسیت زن (۵۰ درصد) و ۳ ایزوله مربوط به جنسیت مرد (۵۰ درصد) بود که در جنسیت مرد ۲ ایزوله (۶۶/۶۶ درصد) از ضایعات پوست و ۱ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) از خون جدا شده بود. در صورتی که در جنسیت زن ۱ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) از خون، ۱ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) از ضایعات پوست و ۱ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) از مایع مفصل جدا شده بود.

از ۶ ایزوله واجد ژن *tsst1* مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۳ ایزوله (۵۰ درصد)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین و متی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) و مقاومت نسبت به ایمی پنم، سفتریاکسون، اریترومایسین و آمیکاسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶ درصد) مشاهده گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و ژن *tsst1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

افزایش مقاومت دارویی معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی رویه آنتی بیوتیک ها می باشد. مطالعات نشان می دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها، ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می توانند در ایجاد مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها نقش داشته باشند (۱۱). برای نخستین بار در سال ۱۹۶۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد (۱۲-۱۴). مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف براساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ما بیشترین مقاومت نسبت به سفتریاکسون (۶۰ درصد) و کمترین

ایزوله (۱/۳۷٪) از نظر ژن *tsst-1* مثبت گزارش شدند که ۱۵ ایزوله (۷۵ درصد) دارای مقاومت نسبت به متی سیلین بودند. در مطالعه حاضر از ۶ ایزوله واجد ژن مورد نظر مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۴ ایزوله (۶/۶۶٪)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین و سفوکسیتین - متی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳ درصد) و مقاومت نسبت به ایمی پنم، سفتریاکسون، اریترومیسین و آمیکاسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶ درصد) مشاهده گردید (۴).

در تحقیق انجام شده توسط نوروزی و همکاران که با عنوان شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن انتروتوکسین A-E و TSST-1 توسط روش PCR، فراوانی ژن *tsst-1* ۲۶/۴۱٪ گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر می باشد. در این تحقیق ۷۵/۴۷٪ ایزوله ها ژن های انتروتوکسین به همراه ژن *tsst-1* گزارش گردیدند (۲۳). در صورتی که در مطالعه بکر و همکاران در سال ۱۹۹۸ از ۵۰ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها در ۱ ایزوله (۲ درصد) به طور مشترک ژن های *tsst-1* و *entC* گزارش گردید (۲۴). عموم افراد دارای آنتی بادی ضد توکسین TSST-1 می باشند و به نظر می رسد این افراد نسبت به سایرین، خطر کمتری برای ابتلا به سندرم شوک توکسیک دارند. کودکان و افراد جوان به دلیل عدم مواجهه قبلی با توکسین و پایین بودن سطح آنتی بادی، خطر بالاتری برای ابتلا به این سندرم را دارند (۲۷-۲۵).

به طوری که در مطالعه ای که در سال های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ با هدف تعیین تیتراژ آنتی بادی سرمی ضد توکسین TSST-1 در کودکان ژاپنی انجام شد، ۱۱۹ بیمار بستری در بخش جراحی پلاستیک و ترمیمی، تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گروه سنی ۷ ماهه تا دو ساله، دارای کمترین تیتراژ آنتی بادی بودند، به نحوی که میزان تیتراژ آنتی بادی در دو گروه ۷ تا ۱۲ ماهه و ۱۲ تا ۲۴ ماهه ۳۰/۸ درصد و ۳۳/۳ درصد گزارش شد. این دو گروه سنی دارای بیشترین موارد بستری به دلیل علائم بالینی بودند که این امر استعداد بالای ابتلا به سندرم شوک توکسیک را در این کودکان نشان می دهد. ۷۸/۶ درصد کودکان با سن کمتر از شش ماه دارای تیتراژ مثبت آنتی بادی TSST-1 بودند که بالاترین میزان

استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (۴/۵۱ درصد) ژن *tsst-1* گزارش گردید. مطالعات محققان دیگر تفاوت ها و تشابهاتی را با تحقیق ما نشان می دهد که در زیر به پاره ایی از تحقیقات انجام شده اشاره می کنیم.

با توجه به اهمیت بررسی وجود ژن *tsst1*، جوهانسون در سال ۱۹۹۱ نشان داد که استفاده از روش PCR برای شناسایی این ژن نسبت به سایر روش ها مثل روش های ایمونولوژیک، روشی مناسب، حساس سریع و ارزان می باشد (۱۷). تا کنون روش های متعددی برای شناسایی توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده است. روش هایی که براساس واکنش های ایمونولوژی مانند الایزا طراحی شده اند، زمان بر و غیر اختصاصی بوده و اغلب با واکنش متقاطع نیز همراه می باشد. اما در روش PCR که اساس آن شناسایی ژن های تولید کننده توکسین است از سرعت، حساسیت و ویژگی قابل توجهی نسبت به سایر روش ها برخوردار است. لذا اخیراً محققین از این روش جهت شناسایی ژن های کد کننده توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می کنند (۱۹، ۱۸). در تحقیق انجام شده توسط درنبرگ و همکاران در ۲۰۰۵ که بر روی ۱۰۳ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز فراوانی ژن *tsst-1* در سویه های جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز به ترتیب ۲۳/۵۲ درصد، ۱۳/۸۸ درصد و ۱۴ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار زیادتر می باشد (۲۰). در سال ۲۰۰۷، اسلام و همکاران، از ۳۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت، یک سویه (۳/۳٪) واجد ژن *tsst-1* را شناسایی کردند که فراوانی این ژن نسبت به تحقیق ما کمتر می باشد (۲۱).

در مطالعه پارسونت و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۵۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند. ۱۴ سویه (۸/۸ درصد) از نظر ژن *tsst-1* مثبت گزارش شدند. که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بیشتری برخوردار می باشد (۲۲). در مطالعه ای که تیهو و همکاران در ۱۳۹۰-۱۳۸۹ بر روی ۱۴۵۴ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان انجام دادند ۲۰

تیتتر مثبت بود. این امر به دلیل دریافت سطح آنتی بادی ضد TSST-1 از مادر است. تیتتر آنتی بادی بعد از سن سه سالگی، بالا رفته و تا سن شش سالگی، ۵۴/۵٪ کودکان دارای تیتتر مثبت آنتی بادی بودند (۲۷). در مطالعات متعددی نقش توکسین‌های /استافیلوکوکی در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه در کودکان مطرح شده است. توکسین TSST-1 می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد نماید. بر پایه پژوهش‌ها، بیش از نیمی از کودکان حتی در نوزادی، دارای آنتی بادی ضد انترتوکسین‌های /استافیلوکوکوس /اورئوس و به ویژه TSST-1 می‌باشند. اثر حفاظتی آنتی بادی ضد توکسین TSST-1، با افزایش سن بالا می‌رود و تا سن ۱۰ سالگی که آنتی بادی در مقادیر لازم برای مقابله با عفونت کسب می‌شود، استعداد ابتلا به عفونت ادامه دارد. ۹۵ درصد بالغین تا سن ۳۰ سالگی دارای آنتی بادی می‌شوند (۲۸). در مطالعه‌ای که جوادی نیا و همکاران در سال ۹۲ بر روی زخم سوختگی ۹۰ کودک بستری در بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران در دو گروه ۴۵ نفره تب دار دار (گروه مورد) و بدون تب (گروه کنترل) مورد بررسی قرار دادند، نشان دادند که بین دو گروه تب دار و بدون تب از لحاظ بروز توکسین TSST-1 تفاوت معنادار وجود داشت. به طوری که در گروه مورد (تب دار)، ۱۷ مورد از ۴۵ مورد (۳۷/۷۷ درصد) دارای توکسین TSST-1 بودند در حالی که در گروه کنترل (بدون تب)، فقط ۵ مورد از ۴۵ مورد (۱۱/۱۱ درصد) دارای توکسین TSST-1 بودند. اما در میانگین سنی و جنس کودکان ارتباط معنا داری وجود نداشت (۲۹).

گردش این ایزوله‌ها در اجتماع به ویژه برای افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی‌دهند دارای اهمیت است. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰-۵۰ درصد در ناحیه فارنکس و ۳۰-۵ درصد در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی ۲۰-۱۰ درصد می‌رسد، اهمیت بیشتری می‌یابد. مانیتورینگ این ایزوله‌ها در بیمارست می‌تواند در کنترل موارد خطرناک در افراد در معرض خطر مؤثر باشد. چه بسا که تا به امروز

تدابیر و چاره‌اندیشی در این حیطة محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش‌های گذشته و حال خود آگاهی دارند. بدین ترتیب نتایج به دست آمده از نقاط دیگر دنیا نمی‌تواند به طور مؤثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان روشن کند و بدون شک جهت نیل به این اهداف نیاز به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و شناخت سویه‌های غالب با تکنیک‌های حساس تایپینگ ژنوتیپی و فنوتیپی در کشور ما احساس می‌شود.

با توجه به اهمیت بالینی و پتانسیل بالای سویه‌های /استافیلوکوکوس /اورئوس مولد توکسین از نظر ایجاد بیماری‌های مهمی از جمله سندرم شوک سمی، شناسایی و لزوم توجه بیشتر به با به کارگیری راهکارهای مناسب درمانی و ابزارهای مناسب کنترل عفونت ضروری است. با مطالعات انجام شده مشخص گردید که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تشخیص وجود توکسین سندروم شوک توکسیک در ایزوله‌های /استافیلوکوکوس /اورئوس روشی مناسب می‌باشد.

..

منابع

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

poisoning cases hn Taiwan. Int Food Microbiol. 2008; 121: 66-73.

19. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1032-1038.

20. Deurenberg H, Nieuwenhuis F, Driessen C, London N, Frank R, Ellen E. The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community and hospital acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. FEMS. Microbiology. Letters. 1: 185-189.

21. Islam M.J., Uddin M.S., Nasrin M.S., Nazir K.H.M., Rahman M.T. and Alam MM. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 producing coagulase positive *Staphylococcus aureus* in human and their characterization. Bangl J Vet Med. 2007; 5(1): 115-119.

22. Parsonnet J, Goering R, Hansmann M, Jones M, Ohtagaki K., Davis C. and Tutsuka K. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxine-1 (TSST-1) Producing strains of *Staphylococcus aureus* and Antibody to TSST-I among Healthy Japanese Women. J Clin Microbiol. 2008; 48: 2731-2738.

23. Kaufmann SHE, Steward MW. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th edition, Hodder Arnold Ltd, London 2005; pp.577-632.

24. Becker K Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2548-2553.

25. Bacha EA, Sheridan RL, Donohue GA. and Tompkins RG. Staphylococcal toxic shock syndrome in pediatric burn unit. Burns: 1994; 20: 499-502.

26. Childs C, Edwards JV, Heathcote DM, Dawson M, Davenport PJ. Patterns of *Staphylococcus aureus* colonization, toxin

production, immunity and illness in burned children. Burns. 1994; 20:514-521.

27. Quan L., Morita R. and Kawakami S. 2010. Toxic shock syndrome toxin 1. Japan child Burns. 2009; 36: 716-721.

28. White MC, Thornton K, Young AE. Early diagnosis and treatment of toxic shock syndrome in paediatric burns. Burns. 2005: 193-197.

29. Javadi niya SH, Asqarian pour R, Noorbakhsh S, Soboti B, Shokrollahi M, Tabatabaei A. Comparison Level Toxin TSST-1 in children with fever and without fever burn wounds. Tehran Med Univ J. 2014; 72: 113-120.

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

Ziba Shanaki Bavarsad¹, Maryam Reisi¹, Hossein Aghajani¹, Marzeyeh Soleymanian¹

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

***Corresponding author:** zibashanaki91@gmail.com

Abstract

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

In this study, 133 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different samples to determine antibiotic resistance and frequency *tsst-1* gene were studied. After genomic DNA extraction using DNA extraction kit was performed the definitive diagnosis of bacteria, Then the gene *tsst-1* frequency done in the presence of specific primers and antibiotic resistance was determined by agar disk diffusion method. After PCR amplification and detection of the bacterium, Of 133 isolates sequence *tsst-1* gene was observed in 6 strains. In antibiogram test the greatest resistance to cefazolin (3.83%) and the lowest resistance to nitrofurantoin and vancomycin (0%) were observed.

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

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



بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در نمونه خون افراد سرولوژی مثبت بروسلا در شهرستان های

شهرکرد و اصفهان به روش Real Time PCR

حسین خداپنده^۱، نازیلا ارباب سلیمانی^{۲*}، حسین آقاجانی^۱، محمدرضا افشارزاده^۳

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

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

۳. گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۲/۲۰

پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۵

چاپ: ۱۴۰۶/۳۰

DOI:

کلمات کلیدی: بروسلا

آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس،

سرولوژی، Real Time PCR

* نویسنده مسئول: Email

nazilaarbab@yahoo.co.uk

مقدمه

بروسلوز یکی از پنج بیماری مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به وجود می‌آید (۱). بعضی از انواع بروسلا مثل بروسلا *آبورتوس*، بروسلا *ملی* تنسیس و بروسلا *سوئیس* دارای میزبان‌های ویژه می‌باشند، بروسلاها باکتری‌های کوکوباسیل گرم منفی، کوچک، باریک و کوتاهی هستند، که گاهی به شکل باسیل و یا کوکسی نیز مشاهده می‌شوند طول متغیری حدود ۰/۶-۱/۵ میکرومتر و عرض ۰/۵-۰/۷ دارد. غیر متحرک بوده و اسپور تولید نمی‌کند. از منابع طبیعی شکل L-Form باکتری نیز جداسازی شده است. مقاومت در برابر رنگ بری به وسیله محلول‌های رقیق اسیدی و قلیای امکان به کارگیری رنگ آمیزی‌های متفاوت و غیر اختصاصی را در بافت‌های آلوده، از قبیل زیل نیلسون اصلاح شده، ماشیالو و روش کوستر فراهم کرده است (۲،۳).

بروسلوز در تمام مناطق دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورها محسوب می‌گردد. به طور تقریبی بروسلا *آبورتوس* و بروسلا *ملی* تنسیس مسئول تمامی موارد بروسلوز در انسان و دام کشور ما هستند. در ایران بروسلوز یک بیماری اندمیک در تمام قسمت‌های کشور می‌باشد (۴). علائم بالینی بروسلوز بسیار غیر اختصاصی است. این بیماری به اشکال مختلف نمایان می‌گردد. علائم این بیماری شامل: تب، تعریق، لرز، سردرد، درد عضلانی، خستگی، بی‌اشتهائی، درد مفاصل، کمر درد، کاهش وزن، یبوست، درد گلو، سرفه خشک، علائم شبیه سرماخوردگی، التهاب مفاصل، بزرگ شدن غدد لنفاوی، افسردگی (درگیری عصبی مرکزی)، درگیری قرنیه چشم و ضایعات پوستی، کاهش وزن، درد شکم، اختلال خواب، بزرگ شدن کبد و طحال، رنگ پریدگی و درد ستون فقرات می‌باشد. البته گاهی بیماری بروسلوز

مزمین می‌شود که در این حالت علائم خفیف‌تر ولی مداوم و یا مکرر شده و این افراد مثلاً با تب مکرر ولی خفیف، درد مفاصل و یا خستگی مراجعه می‌کنند. گاهی نیز در عفونت‌های شدید، دستگاه عصبی مرکزی و یا گاهی لایه داخلی قلب گرفتار می‌شود که در این موارد، بیماری عوارض خطرناکی می‌تواند داشته باشد (۵). سالانه ۵۰۰ هزار مورد جدید درگیری با بروسلوز در جهان گزارش می‌شود که طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت این تعداد در برابر شیوع واقعی آن ناچیز می‌باشد، زیرا این بیماری علائم بالینی متفاوتی دارد. تنوع، غیراختصاصی و غیر تیپیک بودن علائم بالینی بروسلوز ضرورت تشخیص بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی را روشن می‌سازد (۶). به طور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بروسلوز نیازمند شناخت سریع و صحیح فراوانی و توزیع مکانی و زمانی آن است. کشت‌های باکتریولوژیکی و آزمایش‌های سرولوژیکی متکی بر آگلوتیناسیون شایع‌ترین آزمون‌های مورد استفاده در تشخیص عفونت‌های انسانی و حیوانی بروسلوز هستند (۷). در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی زیادی برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. روش Real Time PCR از این نظر که نیازمند صرف زمان کم و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشد، در تشخیص این بیماری بسیار مفید می‌باشد (۸).

این روش تلفیقی از تکنیک PCR و تکنیک کاربرد پروب‌های فلورسنس است که هر دو در یک واکنش جمع گردیده‌اند به طور کلی در این روش نوین واکنش PCR و شناسایی قطعه تکثیر یافته در یک ساعت یا کمتر انجام می‌شود که این امر باعث افزایش سرعت و صرفه جویی در زمان نسبت به سیستم‌های رایج PCR گردیده است. مزیت دیگر این تکنیک نسبت به PCR این است که مراحل Post PCR که شامل ژل الکتروفورز، رنگ آمیزی با ماده سرطان‌زای اتیدیوم

بروماید و تفسیر ژل با نور ماورای بنفش می باشد، حذف گردیده و آلودگی محیط آزمایشگاه به اتیدیوم بروماید و قطعات DNA تکثیر یافته به روش PCR نیز به حداقل می رسد. کار با تجهیزات و دستگاه های به کار گرفته شده در Real Time PCR به طور قابل ملاحظه ای نسبت به PCR ساده تر بوده و مجموعه مزایای نظیر ترکیب حساسیت و ویژگی بالا، خطر آلودگی پایین، ساده بودن کارکرد و سرعت بالا، باعث شده است تا فناوری Real Time PCR جذاب تر از روش های رایج بر پایه کشت یا تست های ایمونولوژیکی در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی برای تشخیص عوامل عفونی گردد (۹).

با توجه به قرار گرفتن ایران در منطقه شایع بروسلاز و همچنین عوارض و خطرات بالقوه بروسلاز و هزینه هایی که بر اقتصاد تحمیل می کند، اهمیت لزوم تحقیق در مورد میزان شیوع واقعی و همچنین استفاده از بهترین، دقیق ترین و به صرفه ترین روش برای تشخیص این شیوع لازم به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی روش Real Time PCR برای تشخیص بروسلاز پس در نمونه های سرم مثبت بروسلا به عنوان ابزار تشخیصی کارآمد در تشخیص افراد آلوده حقیقی و بررسی گونه های درگیر کننده بروسلا در این افراد است.

مواد و روش کار

نمونه گیری

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

استخراج DNA

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

واکنش Taq-Man Real Time PCR

به منظور انجام واکنش Taq-Man Real Time PCR پرایمر مورد استفاده برای تشخیص جنس بروسلا و گونه های آبورتوس و ملی تنسیس و هم چنین توالی پروب مورد استفاده جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan مطابق دستورالعمل کارخانه رقیق سازی گردید. توالی پرایمرهای و پروب های مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۱) نشان داده شده است (۱۰). جهت رقیق سازی پروب مطابق دستورالعمل شرکت

سازنده در تاریکی و تحت شرایط استریل ۱۰۰۰ میکرولیتر آب Nuclease free بدون عمل پیپتینگ به ویال حاوی پروب افزوده و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. سپس ۵۰ میکرولیتر از پروب را برداشتیم و با ۲۰۰ میکرولیتر آب Nuclease free مخلوط نمودیم. واکنش Real Time PCR جهت تشخیص جنس بروسلا و گونه های آبورتوس و ملی تنسیس در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۶۲۵ F، ۰/۶۲۵ R، ۰/۳ میکرولیتر پروب، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۴۳ میکرولیتر آب مقطر، به صورت جداگانه برای هر

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

جدول ۱- توالی آغازگرها و پروبها

توالی پروب (۵'→۳')	توالی پرایمر (۵'→۳')	توالی هدف
FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA	GCTTGAAGCTTGCGGACA GT GGCCTACCGCTGCGAAT	IS711
Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2	TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	BMEII0466
FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1	GCACACTCACCTTCCACA ACAA/ CCCCGTTCTGCACCAGACT	BruAb2_0168

آنالیز آماری

در نهایت ارتباط آماری (جهت تجزیه و تحلیل داده ها) حاصل از نتایج به دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت. در نتیجه به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آمار استنباطی (آزمون های دقیق فیشر و مربع کای) با استفاده از نرم افزار SPSS20 استفاده گردید و ارتباط آماری حاصل از نتایج به دست آمده

مورد بررسی آماری قرار گرفت و در این بررسی $P < 0.05$ به عنوان معنی دار، معرفی شد.

نتایج

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

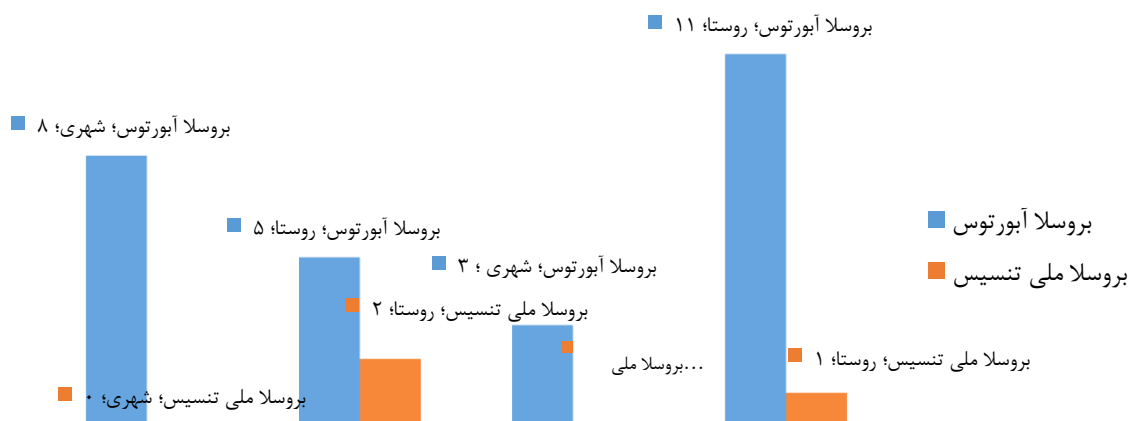


شکل ۱- تصویر الکتروفور DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

آبورتوس و ۲ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) بروسلا ملی تنسیس تشخیص داده شدند.

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

در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه سرم مثبت به منظور ردیابی ژنوم باکتری بروسلا، مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار ۱). ۱۵ مورد مربوط به شهرستان اصفهان و ۱۵ مورد (۵۰ درصد) مربوط به شهرستان شهرکرد بودند. از ۱۵ نمونه مورد بررسی در شهرستان اصفهان، ۸ مورد در شهرها (۵۳/۳ درصد) و ۷ مورد (۴۶/۷ درصد) در روستاها اقامت داشتند (جدول ۲). بیشترین میزان ابتلا در شهر اصفهان مربوط به ساکنین شهرها (۵۳/۳ درصد) می باشد در حالی که ۷ مورد از روستاییان اصفهان (۴۶/۷ درصد) به بروسلاز مبتلا بودند. از ۸ مورد آلودگی به بروسلا در شهرستان اصفهان ۸ مورد (۱۰۰ درصد) بروسلا آبورتوس تشخیص داده شدند و بروسلا ملی تنسیس در هیچ نمونه ایی یافت نشد. در صورتی که از ۷ نمونه آلوده به بروسلا در روستاهای اصفهان ۵ نمونه (۷۱/۴۳ درصد) بروسلا فراوانی را در مناطق روستایی شهرکرد دارد (نمودار ۱).



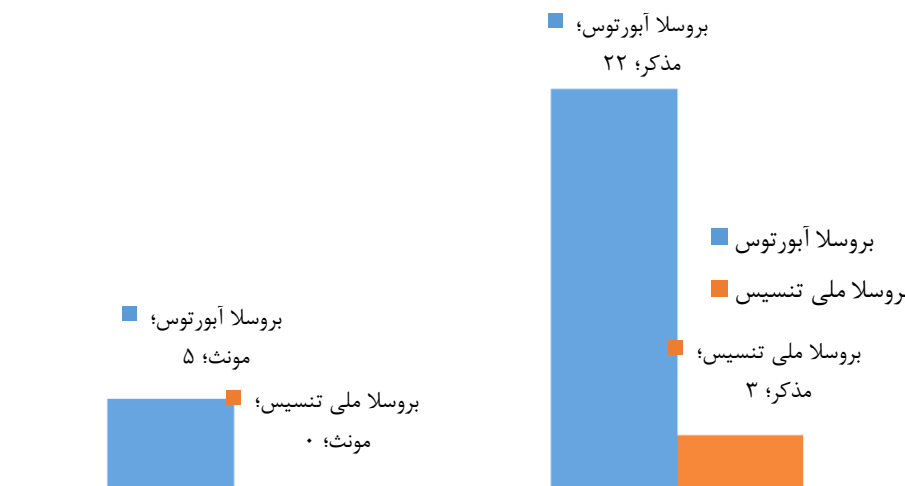
نمودار ۱- فراوانی بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس در شهرستان های اصفهان و شهرکرد

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

p-value	شهرکرد		اصفهان		شهر و محل سکونت	
	روستا (۴)	شهر (۱۱)	روستا (۷)	شهر (۸)		
	۲۶٪/۷	۷۳٪/۳	۴۶٪/۷	۵۳٪/۷		
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد
	۱۰	۴	۱	۱	۷	۸
۰/۲۵۱	۰	۰۰	۰۰	۰۰	۰۰	۰۰
	۷۵	۳	۱	۱	۴	۵
			۰۰	۱	۷۱/۳	۰۰
	۲۵	۱	۰	۰	۵	۲
					۲۸/۷	

بودند. که در جنس مونث پس از انجام آزمون Real Time PCR فقط باکتری بروسلا آبورتوس تشخیص داده شد در حالی که در جنس مذکر ۲۲ مورد (۷۳/۳۳ درصد) بروسلا آبورتوس و ۳ مورد (۱۰ درصد) بروسلا ملی تنسیس شناسایی گردید (جدول ۳).

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین منطقه (شهر و روستا) و آلودگی بروسلا ارتباط معنی داری مشاهده نگردید ($p\text{-value} > 0/05$). از ۳۰ نمونه مورد بررسی ۲۵ مورد (۸۳/۳ درصد) مربوط به جنس مذکر و ۵ مورد (۱۶/۷ درصد) مربوط به جنس مونث



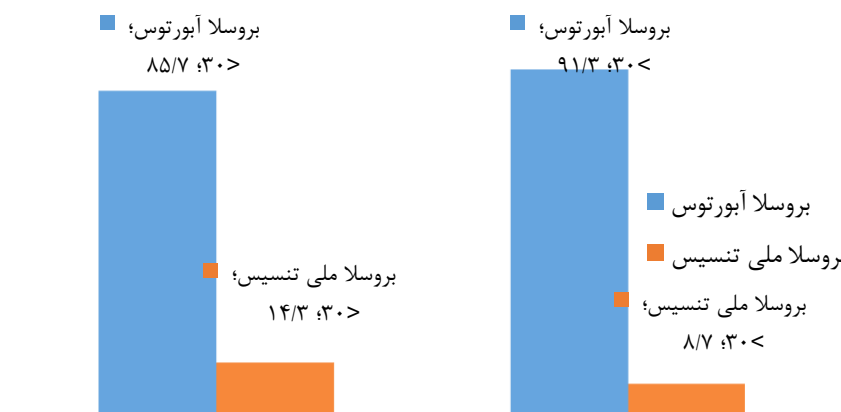
نمودار ۲- فراوانی بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس در دو جنس مذکر و مونث

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

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

مورد آلودگی به بروسلاز در گروه سنی زیر ۳۰ سال، ۶ مورد (۸۵/۷ درصد) بروسلا آبورتوس و ۱ مورد (۱۴/۳ درصد) بروسلا ملی تنسیس تشخیص داده شدند. در صورتی که از ۲۳ مورد آلودگی به بروسلاز در گروه سنی بالای ۳۰ سال، ۲۱ مورد (۹۱/۳ درصد) بروسلا آبورتوس و ۲ مورد (۸/۷ درصد) بروسلا ملی تنسیس تشخیص داده شدند (جدول ۵).

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آلودگی به بروسلا ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید ($P\text{-Value}=1/00>0/05$). از نظر گروه های سنی، افراد مورد مطالعه به دو گروه زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال طبقه بندی شدند. ۷ مورد (۲۳/۳۳ درصد) مربوط به افراد زیر ۳۰ سال و ۲۳ مورد (۷۶/۶۷ درصد) مربوط به افراد بالای ۳۰ سال می باشد (نمودار ۴). از ۷



نمودار ۴- درصد آلودگی به در گروه های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال

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

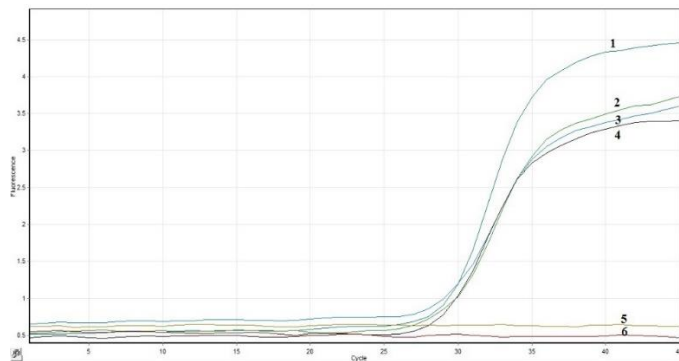
p-value	>۳۰		<۳۰		سن
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱/۰۰	۱۰۰	۲۳	۱۰۰	۷	جنس بروسلا
	۹۱/۳	۲۱	۸۵/۷	۶	بروسلا آبورتوس
	۸/۷	۲	۱۴/۳	۱	بروسلا ملی تنسیس

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

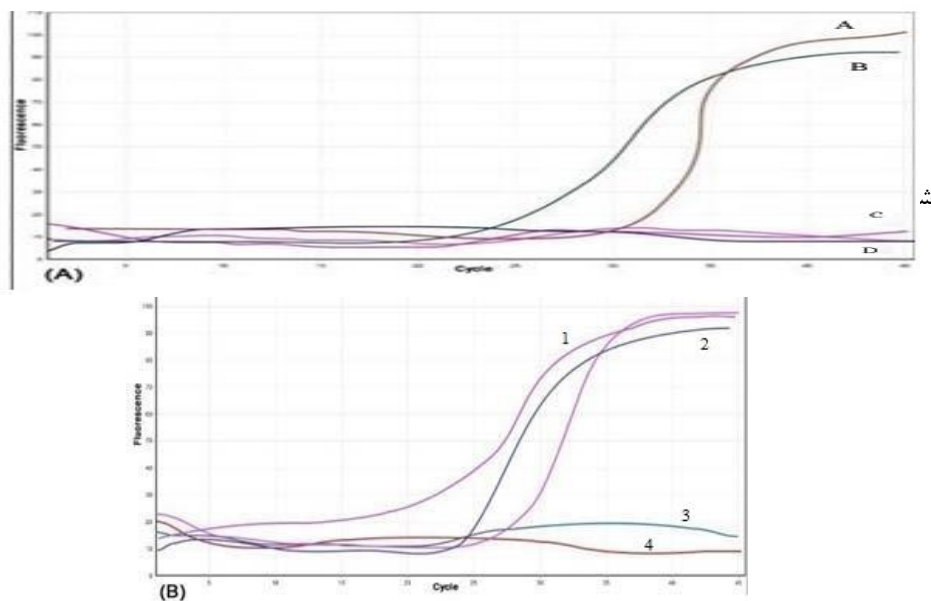
نتایج Real Time PCR

در مرحله اول ابتدا از طریق روش Real Time PCR به تشخیص بروسلا پرداخته شد. در مرحله بعدی

بر اساس آنالیز منحنی ذوب ایجاد شده از واکنش Real Time PCR می توان به تشخیص گونه های بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس پی برد. در شکل های ۱، ۲ و ۳ مراحل پروفایل حرارتی برای جنس بروسلا و گونه های بروسلا در دستگاه Real Time PCR نشان داده شده است. CT کمتر از ۴۰ مثبت در نظر گرفته شد.



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



شکل ۴- آنالیز منحنی ذوب برای گونه بروسلا ملی تنسیس. خط ۱: کنترل مثبت. خط ۲: نمونه مثبت. خط ۳: کنترل منفی. خط ۴: نمونه منفی برای واکنش است.

بحث

پراکندگی بیماری در ایران در استان چهارمحال و بختیاری نسبت به استان اصفهان بیشتر است که بر این اساس استان چهارمحال و بختیاری جز استان های با

طبق آخرین گزارش های وزارت بهداشت و کتاب راهنمای کشوری مبارزه با بروسلاز (تب مالت)

آلودگی متوسط (میزان بروز ۲۰-۱۱ درصد) است و استان اصفهان جز استان های با آلودگی پایین (میزان بروز ۱۰-۰ درصد) است. در تحقیق ما آلودگی به بروسلا در ساکنین شهرها نسبت به روستاها بیشتر می باشد که می تواند به علت عواملی از قبیل توزیع لبنیات غیر پاستوریزه (خامه و پنیر محلی) و ارتباط تنگاتنگ ساکنین شهرها با روستاها باشد. بیماری در تمامی سنین وجود دارد ولی وفور آن در سن ۳۰-۲۰ سالگی است، یعنی نیروی فعال و کارآمد کشور در معرض خطر این بیماری هستند. در مطالعه حاضر بیماری بروسلاز در گروه سنی بالای ۳۰ سال شیوع بیشتری دارد در حالی که در تحقیق انجام شده توسط زینلی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۳۰-۲۰ سال و در تحقیق قاسمی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۱۹-۱۵ برآورد گردید (۱۱،۱۲). با توجه به شیوع بالاتر بیماری بروسلاز در گروه سنی بالای ۳۰ سال در تحقیق ما می توان نتیجه گیری کرد که آگاهی این گروه نسبت به راه های انتقال بیماری به اندازه کافی نیست و جا دارد که با آموزش بیشتر و تأکید بر راه های انتقال بیماری میزان آگاهی را نسبت به این بیماری بالا برد. بیماری در هر دو جنس دیده می شود تحقیقات متعدد انجام شده حاکی از آن است که میزان آلودگی به بروسلاز در جنسیت مرد نسبت به جنسیت زن بیشتر می باشد که در تحقیق ما نیز چنین نتیجه ای به دست آمد. بیماری را انحصاراً نمی توان یک بیماری شغلی محسوب نمود ولی شغل به عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری مطرح است به خصوص نزد خانم های خانه دار (خانم های خانه دار عمدتاً به عنوان دامدار و کشاورز دوشادوش همسرانشان در مناطق روستایی به فعالیت می پردازند)، دامداران، کشاورزان. بیماری در تمام فصول وجود دارد ولی در فصل بهار و تابستان هم

زمان با فصل زایش و شیردهی دامها بیش تر دیده می شود. در تحقیق حاضر تمامی نمونه های سرم مثبت در آزمون Real Time PCR مثبت تشخیص داده شدند که یکی از دلایل اختلاف با تحقیق دل بیشه می تواند متفاوت بودن تیتراژ واکنش رایت لوله ای باشد. در تحقیق دیگری که توسط سهرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ نمونه سرم مثبت و ۲۵ نمونه سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به بروسلا تشخیص داده نشد ولی آلودگی بروسلا در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده و هم چنین نمونه های سرم مثبت را مورد تأیید قرار داد (۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری بروسلا آبورتوس بر روی سویه استاندارد و واکسن بروسلا آبورتوس، ملی تنسیس، سوئیس، نتوتومه و ۱۵ ایزوله بروسلا آبورتوس جدا شده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملاً اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری بروسلا آبورتوس به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد (۱۳). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیتراژ برابر و بالای ۱۶۰ داشتند، جهت گونه بروسلا ملی تنسیس به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد بروسلا ملی تنسیس گزارش گردید (۱۴). در صورتی که در تحقیق ما بروسلا آبورتوس از فراوانی بالاتری برخوردار می باشد. در تحقیق انجام شده توسط دل

بیشه و همکاران که در سال ۱۳۹۱ که بر روی ۴۵ نمونه ی مثبت خون گوسفند از نظر تست های سرولوژیکی در چندین شهرستان استان مازندران صورت گرفت، تنها ۲۰ نمونه از نظر حضور باکتری های جنس بروسلا با استفاده از روش Real Time PCR TaqMan مثبت تشخیص داده شدند (۱۵). Newby و همکاران در سال ۲۰۰۳ تشخیص بروسلا/بورتوس به روش Real Time PCR انجام گرفت که مقایسه ای را بین سه تکنیک SYBR Green، ۱ و ۵ اگزونوکلئازی و پروب های هیبرید شونده انجام دادند. در این سه روش از همان پرایمر تقویت شده برای تولید یک قطعه ی یکسان استفاده شده است این قطعه محدوده های یک منطقه از ژنوم بروسلا/بورتوس که شامل بخش هایی از ژن *Alk* و عنصر *IS711* الحاق شده است هر سه روش دارای حساسیت قابل ملاحظه ای بوده است با این حال بیش ترین ویژگی را با استفاده از روش پروب هیبریداسیون به دست آوردند (۱۶). در مطالعه انجام شده توسط Jolie و همکاران در سال ۲۰۰۷ تعیین سریع جدایه های در مرحله تشخیص گونه با روش Multiplex-PCR بر پایه SNP صورت گرفت که در آن سه ژن *omp25*، *glk* و *trpE* هدف بودند (۱۷). در ایران توسط مالک نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۷ برای تعیین گونه های بروسلا در مناطق مرکزی کشور با تکنیک PCR-RLFP روی ژن های *Omp2a* و *Omp2b* پروتئین های غشای خارجی مطالعه شد که اختلاف بین انواع بروسلا های بیماری زا و برخی بیوتا پ های آن را مشخص کرد (۱۸). در سال ۲۰۰۹ Hinic و همکاران روش Real Time PCR مبتنی بر پایه ی *IS711* به توصیف ارزیابی روش بر پایه سکونس درج شده روی بروسلا/بورتوس با نمونه های خون ۱۹۹ گراز نر و نمونه ی بافت ۵۳ گراز نر وحشی جمع آوری شده از سوئیس پرداختند بروسلا در ۱۱/۱ درصد از نمونه ی خون ۱۹۹

نر وحشی با روش *IS711* Real Time PCR که تست سرولوژی آن ها منفی بود تشخیص داده شد (۱۹). در سال ۲۰۱۰ توسط Bertu و همکاران روی نمونه های شیر از گله های فاقد واکسیناسیون و گاو های بدون علایم آبسه ی غده ی پستانی مطالعه شد. در این بررسی آنتی بادی های ضد بروسلا به عنوان ملاک تشخیصی به کار گرفته شد (۲۰). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیترا برابر و بالای ۱۶۰ داشتند، جهت گونه بروسلا ملی تنسیس به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد بروسلا ملی تنسیس گزارش گردید (۱۴). در تحقیق انجام شده توسط سهرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ سرم مثبت و ۲۵ سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به بروسلا تشخیص داده نشد ولی آلودگی بروسلا در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده مورد تأیید قرار گرفت (۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری بروسلا/بورتوس بر روی سویه استاندارد و واکسن بروسلا/بورتوس، ملی تنسیس، سوئیس، نتوتومه و ۱۵ ایزوله بروسلا/بورتوس جدا شده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملاً اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری بروسلا گونه /بورتوس به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد (۱۳).

نتیجه گیری کلی

با توجه به محدودیت‌های کشت های باکتریولوژیکی و آزمایش های سرولوژیک و فقدان حساسیت لازم چنین تست‌هایی در بیمارانی که به بروسلاز مزمن مبتلا هستند، از طرف دیگر وجود واکنش متقاطع با دیگر باکتری‌های گرم منفی که منجر به نتایج مثبت کاذب می‌گردد، به منظور تسهیل در این مشکلات و با وجود درجه ی بالایی از شباهت ژنتیکی بین گونه های بروسلا روش های مولکولی از قبیل PCR و Real time PCR که آسان‌تر، سریع‌تر، امن‌تر، راحت‌تر و دقیق‌تر از روش های سنتی هستند مناسب به نظر می‌رسند.

منابع

1. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2007; 7(12): 775-786.
۲. جاوز ا، ملنیک ج، آدلبرگ ا. (۱۳۷۸)، هموفیلوس، بوردتلا، بروسلا، میکروبیولوژی جاوز، نوروزی ج، چاپ اول، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی حیان، تهران، ۳۰۰-۳۰۳.
3. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(1): 65-78.
4. Pakzad I, Rezaee A, Emaneini M, Hosseini AZ, Tabbaraee B, Taherikalani M. Expression of Human Serum Albumin - L 7/L 12 (*Brucella abortus* Ribosomal Protein) Fusion Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Pol J Microbiol. 2009; 58(2): 99-104.
5. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Grave MH. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella spp*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. J Clin Microbiol. 2003; 42(3): 1290-1293.
۶. ناصری ز، یوسف علیخانی م، هاشمی ح، عربستانی م. (۱۳۹۳). تعیین گونه های بروسلا ایزوله شده از نمونه های خون بیماران مشکوک به بروسلوزیس با روش PCR. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۱۷(۵): ۵۲-۵۹.
۷. جعفرپور م، کترا ابراهیمی ن، ناظمی ع، آسمار م، خاتمی نژاد م. (۱۳۸۹). مقایسه آزمایش های سرولوژیک (رزینگال، رایت لوله های و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز گوسفند و بز. پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی پژوهشی. ۷(۴): ۳۳۷-۳۴۲.
8. Sohrabi M, Mohabati Mobarez A, Behmanesh M, Khoramabadi N, Hosseini Dous R. Evaluation of a new set of Real-Time PCR for *Brucella* detection within human and animal samples. J Pharma Health Sci. 2011; 1(2): 14-17.
۹. دوستی ع، کارگر م، قربانی دالینی ص، سرشار م. (۱۳۹۱). مبانی Real Time PCR و تکنیک FRET در تشخیص بیماری های عفونی. دنیای میکروب ها. ۴(۱۴): ۴۱-۴۵.
10. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya PV, Frey J, Abril C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and Real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 75(2): 375-378.
۱۱. زینلی م، شیرزادی م ر. (۱۳۸۷). عوامل مؤثر در افزایش و کاهش بروز بروسلوز (تب مالت) در انسان در کشور از سال ۶۵ لغایت ۸۵، پانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، جامعه دامپزشکان ایران. سال ۱۳۸۷، ۲۰۰-۲۰۱.
12. Ghasemi B, Mohammadian B, Majidpour M. Epidemiology of human and animal brucellosis in Kurdistan province in 1997-2001. Kurdistan Uni Med Sci. 2004; 8(30): 23-32.
۱۳. زهرایی صالحی ت، آقایی پور خ، عالمیان س، اکبری الف، اسماعیل زاد م، نیری فسایی ب، صفویه ص، اعتمادی الف. (۱۳۹۲). پنجمین کنگره ی بروسلوزیز بین المللی ایرانیان. سال ۱۳۹۲، ۳۱-۲۹.
۱۴. محمدزاده ر، یوسفزاده ر. (۱۳۹۰). تشخیص بروسلا ملی تنسیس به روش Real Time PCR. اولین کنگره بین المللی باکتریولوژی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز. سال ۱۳۹۰، ۲۴۵۹.
۱۵. دل بیشه م، ناظمی ع، جعفرپور م. (۱۳۹۱). راه اندازی روش حساس و اختصاصی Real-Time PCR

به منظور تشخیص گونه های بروسلا. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. ۴ (۱): ۱۱۰.

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

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

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

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

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

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

Hossein Khodabandeh¹, Nazila Arbab Soleimani^{2*}, Hossein Aghajani¹, Mohammad Reza

Afsharzadeh³

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

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

Abstract

Brucellosis is one of the most common bacterial diseases in both humans and animals. It causes human to suffer from Malta fever and has highly economic losses in livestock. Bacteriological culture and serological tests for the diagnosis of chronic cases are insensitive. Therefore, the use of Real Time PCR is a great help to evaluate the frequency of types of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in serum of people with positive serology. Serum samples of 30 cases with right positive test (over 1/160) were collected from DNA clinical laboratories in the cities of Shahrekord and Esfahan and they were extracted with the use of signagen DNA extraction kit. In order to identify the genus and the types of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Real Time PCR reaction was carried out on the samples. In this study, all 30 samples were confirmed with the use of Real Time PCR. *Brucella abortus* was detected in all samples in the cities of Esfahan and Shahrekord. After Real Time PCR test was run on females, *brucella abortus* was just detected, While in males, 22 (%73.33) cases suffered from *Brucella abortus* and 3 (%10) suffered from *brucella melitensis*. From the total of 7 cases with brucellosis infection in the age group below 30 years old, 6 (%85.7) cases suffered from *brucella abortus* and 1 (%14/3) suffered from *brucella melitensis*, While from the 23 cases with brucellosis in the age group over 30 years old, 21 (%91.3) had *Brucella abortus* and 2 (% 8.7) had *Brucella melitensis*. In recent years many molecular methods have been used for the detection of this bacteria. Real Time PCR method in the sense that it requires less time and has high sensitivity and specificity is very useful in the diagnosis of the disease.

Keywords: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, Serology, Real Time PCR



رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی

شیمیا شنتیائی^{*۱}

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

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۲۵ چاپ: ۱۴۰۳/۶/۳۰ DOI: کلمات کلیدی: دیابت، زخم پای دیابتی، مقاومت آنتی بیوتیکی، درمان ضد میکروبی * نویسنده مسئول: Email: shantiaee.s@gmail.com	بیماری دیابت یک مشکل در حال پیشرفت جوامع مدرن امروزی است. برآورد تعداد کل افرادی که از این بیماری رنج می برند مشکل است. تقریباً ۲۰ درصد بیماران دیابتی در طول حیات خویش مبتلا به عفونت زخم پا می شوند که در صورت عدم درمان مؤثر می تواند کیفیت زندگی این افراد را مختل سازد. از طرف دیگر درمان این عارضه بسیار پر هزینه می باشد. عفونت پای دیابتی یکی از مسائل مهم بهداشت عمومی است و شناسایی میکروارگانیسم هایی که باعث ایجاد عفونت های مضر چند میکروبی می شود برای یافتن درمان مناسب آنتی بیوتیک مفید است. در همین حال، گزارش های بسیاری نشان داده است که مقاومت آنتی بیوتیکی به طور چشمگیری در حال افزایش است. بنابراین تشخیص زود هنگام ضایعات و شروع سریع درمان ضد میکروبی مناسب برای کنترل عفونت و جلوگیری از عوارض و بهبود کیفیت زندگی ضروری است. آزمون حساسیت آنتی بیوتیک مورد نیاز برای مدیریت عفونت است که می تواند به انتخاب گزینه های درمانی بهتر کمک کند.

مقدمه

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

دیابت

دیابت یکی از بیماری‌های مزمن و بسیار با اهمیت و یک مشکل بزرگ بهداشتی است. طبق تعریف انجمن دیابت آمریکا، دیابت شیرین به گروهی از بیماری‌های متابولیک گفته می‌شود که ویژگی مشترک آن‌ها افزایش سطح قند خون به علت نقص در ترشح انسولین، یا نقص در عملکرد آن‌ها و یا هر دو می‌باشد. دیابت و عوارض ناشی از آن جمعیت زیادی را در سراسر دنیا مبتلا کرده است و به سرعت در حال گسترش می‌باشد. به گونه‌ای که تخمین زده می‌شود شیوع آن در تمامی گروه‌های سنی در سراسر دنیا از ۲/۸ درصد در سال ۲۰۰۰ به ۴/۴ درصد در سال ۲۰۳۰ برسد (۴). به طوری که شیوع آن در سال ۱۹۸۵، ۳۰ میلیون نفر، در سال ۲۰۱۰، ۲۸۵ میلیون نفر بوده و در ۲۰۳۰ میلادی این آمار ۴۳۹ میلیون نفر افزایش خواهد یافت. با توجه به آمار تزايد بیماری دیابت در جهان، سازمان

بهداشت جهانی آن را به عنوان یک اپیدمی نهفته اعلام کرد. این بیماری پنجمین علت مرگ و میر و اولین علت نارسایی مزمن کلیه، قطع پای غیر تروماتیک و نابینایی در بسیاری از جوامع است (۵).

زخم پای دیابتی

زخم پا یک عارضه شایع در بیماران دیابتی است که شیوع آن بیش از ۲۵ درصد است سالانه بیش از ۱ میلیون نفر از افراد دیابتی پای خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند یعنی هر ۳۰ ثانیه یک قطع ناشی از دیابت اتفاق می‌افتد (۶). بیش از ۷۰ درصد قطع پا در دنیا در افراد دیابتی دیده می‌شود. تعداد موارد سالانه بستری ناشی از پای دیابتی رو به افزایش بوده که در اکثر موارد ناشی از بیماری‌های عروقی محیطی است. ریسک فاکتورهای اصلی مستعد کننده زخم پای دیابتی عبارتند از: نوروپاتی، اسکلوپاتی و اختلال در سیستم ایمنی. اصطلاح پای دیابتی، شامل طیفی از ناهنجاری‌هاست که پای در معرض زخم (پای نوروپاتیک و پای دارای اختلال عروق محیطی) و پای زخم شده و پای شارکوت^{۱۸} را شامل می‌شود. در کشورهای پیشرفته بیش از ۵ درصد افراد مبتلا به دیابت دچار مشکلات و عوارض پا هستند. تشکیل زخم‌های عفونی مهم ترین علت بستری شدن این بیماران در بیمارستان است. مهم‌ترین فاکتور مستعدکننده ابتلا به عفونت در بیماران دیابتی، زخم پا است که اغلب مرتبط با نوروپاتی محیطی است. بیماری عروقی محیطی و اختلالات ایمنی در درجه دوم اهمیت قرار دارند. بیماران مبتلا به ملیتوس به علت نوروپاتی، اختلال عروقی و کاهش عملکرد نوتروفیل‌ها در معرض عفونت‌های شدید می‌باشند. از میان این اختلالات فوق، نوروپاتی اهمیت زیادی دارد زیرا این بیماران ممکن است درجه حرارت و درد را حس نکنند و حتی اگر جسم خارجی به کف پای آن‌ها فرو رود متوجه نشوند. حتی می‌تواند باعث تغییر شکل انگشتان پا شود به علت این‌که بیماران متوجه فشار کفش بر روی انگشتان نمی‌شوند. در نهایت پای بیماران در ناحیه کف پا زخم شده که در صورت عدم تشخیص و درمان صحیح عمیق تر شده و می‌تواند تا استخوان هم پیشرفت کند (۴). اغلب زخم‌ها عفونی می‌شوند و پیشرفت عفونت به سمت بافت نرم استخوان عمدتاً

¹⁸ Charcot

یک فاکتور مهم برای قطع اندام تحتانی است (۷). زخم پای دیابتی بیماران دیابتی می تواند خود را به شکل سلولیت، میوزیت، آبسه، فاشییت نکروزان، آرتریت عفونی، تندینیت و استئومیلیت نشان دهد و سرانجام منجر به آمپوتاسیون اندام تحتانی می شود (۶). تقریباً ۲۰ درصد بیماران دیابتی در طول حیات خود مبتلا به عفونت زخم پا می شوند که در صورت عدم درمان مؤثر می تواند کیفیت زندگی را مختل سازد. از طرف دیگر درمان این عارضه بسیار پرهزینه می باشد با توجه به افزایش میزان قطع عضو اندام تحتانی و از طرفی مشکلات روحی و حرکتی که در زندگی افراد بخاطر از دست دادن اندام ایجاد می شود انجام مطالعه ای دقیق، جهت پیشنهاد روش های پیشگیری و درمان قابل انجام و کم هزینه را لازم می نماید و در این راستا شناخت میکروارگانیسم های مسئول عفونت برای انتخاب مناسب ترین رژیم درمانی ضرورت دارد (۸). اولین قدم پیشگیری از زخم پا شامل کنترل دیابت، ورزش، اجتناب از سیگار کشیدن و حفظ بدن است. ضمناً معاینه پا از لحاظ بریدگی ها، تاول ها، قرمزی، تورم، ناخن های سیاه شده ی عفونی، میخچه و هر گونه بریدگی لازم می باشد. در این بیماران عواملی نظیر جنسیت (مردها)، قطع قبلی عضو، زخم قبلی، وجود پینه، دفورمیت مفصلی ناشی از اختلال حرکتی و مشکل بینایی و حرکتی به عنوان عوامل خطر قطع عضو شناخته شده اند که بر روی هم اثرات تشدید کننده نیز دارند (۹). اکثریت محققین زخم های پای بیماران دیابتی را ناشی از عوارض نوروپاتی، تروما و دفورمیتی می دانند (۱۰). به طور کلی عفونت های تهدید کننده اندام را می توان به صورت سلولیت با گسترش بیش از ۲ سانتی متر از محیط زخم، آبسه عمقی، استئومیلیت یا ایسکمی تعریف کرد. در این عفونت ها مخلوطی از کوکسی های گرم مثبت هوازی، باسیل های گرم منفی هوازی و انواع ارگانیسم های بی هوازی دیده می شوند (۱۱). هنگامی که عفونت وجود داشته باشد باید های هوازی بی هوازی درخواست گردد و پس از آن درمان مناسب با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف آغاز گردد. علاوه بر آنتی بیوتیک، برش و تخلیه، برداشت جراحی بافت نرم استخوان و مفصل و در نهایت در صورت لزوم قطع عضو انجام می گردد. در مورد عفونت عمقی، آبسه، سلولیت، کانگرن یا استئومیلیت، بستری نمودن بیمار و درناژ فوری

جراحی لازم است. عفونت ممکن است با افزایش ترشحات اغزودایی یا درد موضعی مشخص شود عامل تسریع کننده کانگرن موضعی انگشت ها معمولاً عفونت است. تشخیص بالینی سلولیت منتشر با آزمایش های میکروبیولوژیک تکمیل می گردد و معمولاً بیش از یک ارگانیسم در بروز آن نقش دارد (۲).

آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک که داروی ضد میکروب هم نامیده می شود. دارویی است که با عفونت های باکتریایی مبارزه می کند. اولین آنتی بیوتیک یعنی پنی سلین را الکساندر فلمینگ کشف کرد. پس از استفاده از آنتی بیوتیک ها در دهه ۱۹۴۰، بیماری ها و مرگ و میر ناشی از عفونت ها به وضوح کاهش پیدا کرد.

مقاومت آنتی بیوتیکی

در مورد منشأ پیدایش مقاومت ابتدا به سال های ابتدایی قرن بیستم بازگردیم یعنی زمانی که آنتی بیوتیک ها کشف شدند و عوامل عفونت را از بین بردند و پس از آن در اواسط قرن بیستم، مصرف کلینیکی آنتی بیوتیک ها شروع شد. در همین حال دانشمندان سعی کردند آنتی بیوتیک های جدیدی را به وجود آورند. این مسأله منجر به شروع تولید آنتی بیوتیک های جدید و ظهور میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک ها شد و تا به امروز ادامه دارد (۱۲). باکتری ها موجودات هوشمند زنده ای هستند که وقتی مقابل ناسازگاری محیطی قرار می گیرند، عکس العمل نشان می دهند. به بیان دیگر تغییرات ژنتیکی که در باکتری ها رخ می دهد منجر به مقاوم شدن آن ها و ظهور اشکال مقاوم به آنتی بیوتیک ها می شود. بیشتر باکتری ها به طور ذاتی حساسند. به عنوان مثال استافیلوکوک ها باکتری هایی هستند که ذاتاً در ۵۰ سال قبل حتی به پنی سیلین جواب می دادند و لیکن الان استافیلوکوک را که بتواند به پنی سیلین حساس باشد به ندرت پیدا می کنیم. به طور کلی مکانیسم های مقاومت مختلفی وجود دارد، وقتی باکتری در معرض آنتی بیوتیک قرار می گیرد امکان بروز جهش در آن وجود دارد یعنی تغییر در اطلاعات ژنتیکی باکتری، توانایی مقاومت به پنی سیلین را به باکتری می دهد. مقاومت میکروبی نوعی مقاومت دارویی است که در طی آن یک

یا جهش وجود دارند (۱۵،۱۶). مقاومت به آنتی بیوتیک، یعنی میکروب‌های بیماری‌زا که برای مبارزه با آنان آنتی بیوتیک استفاده می‌شود، با جهش ژنی نسبت به این داروها مقاومت پیدا کنند و نسل‌های جدیدی بوجود بیاید که نتوان با آن‌ها مبارزه کرد. از مهم‌ترین عوامل این مقاومت مصرف خودسرانه ی یا بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها است. مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها یکی از بزرگ‌ترین چالش‌هایی است که سلامت انسان عصر مدرن را تهدید می‌کند. در دهه های اخیر مصرف آنتی بیوتیک‌ها علاوه بر پزشکی در کشاورزی هم افزایش چشمگیری داشته و آنتی بیوتیک‌ها در دامداری، پرورش مرغ و طیور، پرورش ماهی و آبزیان، تولید محصولات کشاورزی و در باغ‌های میوه استفاده می‌شود، بنابراین مقاومت به آنتی بیوتیک، کشاورزی و محیط زیست را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد. توانایی میکروب‌ها در تغییر تنها به دلیل مقاومت به آنتی بیوتیک نیست. از سال ۱۹۸۷ هیچ رده آنتی بیوتیک تازه ای تولید نشده و در خط تولید شرکت‌های داروسازی بزرگ تقریباً هیچ آنتی بیوتیکی نیست. برای تولید آنتی بیوتیک جدید، انگیزه ی اقتصادی کافی وجود ندارد چرا که آنتی بیوتیک‌ها فقط در صورت لزوم برای یک یا دو هفته مصرف می‌شوند و به دلیل خطر مقاومت میکروب‌ها، مدت استفاده از آن‌ها محدود است، در حالی که داروهایی مثل داروی فشار خون یا داروی کاهنده برای تمام عمر مصرف می‌شوند (۱۳).

تست‌های حساسیت آنتی بیوتیک

نمونه گیری در شرایط آسپتیک با برداشت یک سواب از ترشحات چرک و عفونت قسمت زخم پا، به منظور غنی سازی از کشت بلاد آگار و مک کانکی کشت و برای خالص سازی از یک محیط کشت اختصاصی بر اساس نوع باکتری جدا شده، استفاده می‌شود. و در صورت رشد میکروب‌ها و ایجاد کلنی اقدامات تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم و آزمایشات تشخیص افتراقی نوع باکتری (تست‌های بیوشیمیایی) انجام می‌گردد. همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین می‌شود و قطر هاله عدم رشد اطراف هر یک از دیسک‌ها بر اساس جدول استاندارد^۱ CSLI و بروشور کیت پادتن طب تفسیر و نتایج به صورت مقاوم و حساس

میکروارگانسیم علی‌رغم وجود آنتی‌بیوتیک در محیط می‌تواند زنده بماند. توانایی آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت، بستگی به قدرت آن‌ها در از بین بردن یا توقف رشد باکتری‌ها دارد. برخی باکتری‌ها نسبت به بعضی آنتی بیوتیک‌ها مقاومت طبیعی دارند، به این معنا که با توجه به طیف اثر آنتی بیوتیک‌ها، برخی آنتی بیوتیک‌ها روی یکسری از باکتری‌ها اثری ندارند. یک نوع دیگر از مقاومت میکروبی اکتسابی است که باکتری‌ها هنگامی که در مقابل ناسازگاری محیطی قرار می‌گیرند آن را کسب می‌کنند. باکتری‌ها موجودات زنده هوشمندی هستند که در مقابل ناسازگاری‌های محیطی مانند قرار گرفتن در معرض آنتی بیوتیک‌ها از خود عکس‌العمل نشان می‌دهند. به بیان دیگر تغییرات ژنتیکی از جمله جهش که در باکتری رخ می‌دهد منجر به مقاوم شدن آن‌ها و ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. در واقع مصرف بی رویه، نامناسب یا بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها سبب گسترش مقاومت میکروبی می‌شود. میکروب‌ها با ایجاد ژن مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها، این مقاومت را از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌کنند و حتی این ژن مقاومت می‌تواند از یک گونه ی میکروبی به گونه دیگر انتقال یابد. اینجاست که با وجود تجویز آنتی‌بیوتیک در مقادیر بالا نه تنها نتیجه ای حاصل نمی‌شود بلکه عوارض جانبی بیشتری به جای گذاشته و عفونت پایدار می‌ماند (۱۳). حال سوال مطرح شده این است که آنتی‌بیوتیک‌ها چگونه بر فعالیت میکروب‌ها جهت مقاومت زایی تأثیر می‌گذارند؟ چنان‌چه مصرف آنتی‌بیوتیک از میزان تجویز شده توسط پزشک کمتر باشد احتمال بروز مقاومت میکروبی افزایش می‌یابد چرا که غلظت‌های میکروبی زیر حد مؤثر سبب افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم می‌شود. کامل نکردن دوره درمان نیز ممکن است در بروز مقاومت میکروبی مؤثر باشد (۱۴،۱۲). یکی از مکانیسم‌هایی که منجر به مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک می‌شود، قابلیت تولید آنزیم است. ساده ترین مکانیسم آن تولید آنزیم پنیسیلیناز است که باعث هیدرولیز یا از بین بردن آنتی بیوتیک پنی سیلین می‌شود. باکتری‌هایی که دچار جهش ژنتیکی شده اند، به محض قرار گرفتن در برابر پنی‌سیلین تولید آنزیم می‌کنند. عوامل مختلفی به عنوان عوامل متاژن

^۱Clinical and Laboratory Standards Institute

گزارش می‌شود. در این روش دیسک‌های ضد میکروبی که استفاده می‌شود عبارتند از: آمپی سیلین، آزترنوم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفازولین، سلفورکسیم، تتراسید، تری پیراسیلین/تازوبکتام، مروپنم، پلی میکسین و کولیسیتین برای باسیل‌های گرم منفی. و پنی سیلین، آمپی سیلین، آزیترومایسین، سفوکسیتین، سفتازیدیم، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، اریترومایسین، وانکومایسین، تیکوپلاتین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، لاین زولید و تتراسایکلین برای مطالعه الگوی حساسیت کوکسی‌های گرم مثبت استفاده می‌شود (۱۷). آنتی بیوگرام از روش‌های معمول آزمایشگاهی و تشخیصی بوده که شامل سنجش میزان توانایی یک آنتی بیوتیک برای ممانعت از رشد باکتری‌ها در آزمایشگاه می‌باشد این توانایی را می‌توان با استفاده از روش‌های رقیق سازی در لوله و یا کشت میکروارگانیسم‌ها در پلیت اندازه گیری نمود. تداخل هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیکی، یکی از مشکلات روش‌های انتشار در آگار می‌باشد. امروزه از تعیین تایپ مولکولی به روش Multiplex PCR به منظور ردیابی همزمان ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها بویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود. این روش می‌تواند کاهش دهنده و جلوگیری کننده از حالت اپیدمیک عفونت‌های بیمارستانی بوده و در ردیابی منبع عفونت و یا شیوع آن کمک مهمی نماید. در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف‌های مختلف استفاده می‌شود. در میکروب شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه به طور هم‌زمان وجود دارد و می‌توان عفونت‌های مخلوط را تشخیص داد (۱۸).

میکروارگانیسم‌های دخیل در عفونت زخم پای

دیابتی:

در عفونت پای دیابتی مخلوطی از کوکسی‌های گرم مثبت هوازی و باسیل‌های گرم منفی هوازی و انواع میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی دیده می‌شوند (۲). از جمله میکروارگانیسم‌هایی که در عفونت پای دیابتی دخالت دارند می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *پروتئوس*، *کلبسیلا* و *انتروباکتر* و غیره اشاره کرد.

استافیلوکوکوس اورئوس این میکروارگانیسم کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است و به شکل خوشه در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود. کاتالاز مثبت و کواگولاز منفی است. شایع‌ترین میکروارگانیسم جدا شده از عفونت پای دیابتی *استافیلوکوکوس اورئوس* است. مهم‌ترین گونه در جنس *استافیلوکوکوس* از نظر پزشکی محسوب می‌شود. گاهی اوقات به این باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌گویند. *اورئوس* در لاتین به معنای طلایی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یا MSRA سویه‌ی خاصی از این باکتری‌ها هستند که به بیشترین آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند. مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* به واسطه‌ی کروموزوم و پلاسمید کنترل می‌شود. مصرف بیش از حد و بدون نسخه آنتی بیوتیک‌ها با گذشت زمان افزایش مقاومت و کاهش میزان حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک‌های مختلف را به دنبال دارد (۱۸).

همانطور که گفته شد امروزه از تعیین تایپ مولکولی Multiplex_PCR به منظور ردیابی همزمان ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود (۱۸). و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC می‌باشد. قبل از سال ۱۹۴۰ پنی سیلین به عنوان داروی خط اول در درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مطرح بود، اما به دلیل مصرف بی‌رویه آن، سویه‌های مقاوم به پنی سیلین به سرعت طی دو سال افزایش یافتند (۱۹). ژن مقاومت به آنتی بیوتیک پنی سیلین، ژن *blaz* می‌باشد که آنزیمی خارج سلولی به نام بتالاکتاماز را به منظور هیدرولیز حلقه بتالاکتام کد می‌نماید. در سال ۱۹۵۹ متی سیلین به عنوان یک آنتی بیوتیک مطرح شد. ۲ سال بعد اولین *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بریتانیا گزارش گردید. ژن *mecA* بر روی یک قطعه ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن مجموعه کروموزومی *mec* استافیلوکوکی (*SCCmec*) می‌گویند (۱۸). مقاومت دارویی ایجاد شده در سویه‌های MRSA ناشی از این عناصر متحرک ژنتیکی می‌باشد. ژن *mecA* دارای کدهایی برای تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP2a) بود که باعث ایجاد میل ترکیبی

دارای بافت های تخریب شده با ترشحات فراوان بودند انجام دادند، ۴۶ درصد از موارد زخم دارای چند میکروارگانیسم بودند که به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس پیدرمیس* شایع ترین میکروارگانیسم های جدا شده بودند که در ۶۵ درصد موارد به آنتی بیوتیک های رایج مقاومت نشان دادند (۲). در مطالعه ای Sotto و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در کشور فرانسه پتانسیل بیماری زایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زخم پای دیابتی را به منظور تشخیص زخم های عفونی از غیر عفونی بررسی کردند. آن ها گزارش دادند، که از میان ژن های ویروانس مناسب ترین ترکیب به دست آمده از رگرسیون لجستیک ترکیب ۵ ژن *LukED sei sea*، *Cap8*، *hlgV* است. این نشاگرها برای تشخیص زخم ها غیر عفونی درجه ۱ از زخم های عفونی درجه ۲ تا ۴ مفید بوده و وضعیت زخم ها را در مراحل پیگیری پیش بینی می کردند. به طوری که از این ترکیب، ۴ ژن *sei*، *LukED*، *hlgV* و *sea* در زخم های عفونی با درجه ۲ تا ۴ واگنر در سویه های MRSA و ژن های *cap8* در زخم های با درجه ۱ در سویه های MRSA شناسایی شدند (۲۵).

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

کمتر در اتصال به حلقه بتالاکتام می شود (۲۰، ۲۱). اولین مورد مقاومت به متی سیلین در بیمارستان مشاهده شد و همچنان در جامعه در حال افزایش می باشد بنابراین خطر جدی برای سلامت عمومی در سرتاسر جهان محسوب می گردد (۱۲). بیمارانی که با سویه MRSA عفونی شده اند بالاترین خطر برای گسترش عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* در جامعه را دارا می باشند. زیرا این سویه ها دارای ماهیتی چند مقاومتی بوده و باعث ایجاد مقاومت هم زمان به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها می شوند. برای مثال آنتی بیوتیک ونکومایسین داروی انتخاب شده برای درمان عفونت های ناشی از MRSA بود اما در جولای ۲۰۰۲ مرکز کنترل بیماری ها در ایالات متحده آمریکا اولین گزارش مقاومت نسبت به ونکومایسین را در سویه های MRSA منتشر نمود. کاهش حساسیت به ونکومایسین به علت ضخیم شدن دیواره سلولی در اثر وجود ژن *VanA* است که برای تغییر مکان هدف و عدم اتصال به ونکومایسین کد می شود (۱۸). آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به عنوان یک عامل مهارکننده رشد باکتریایی، با داشتن طیف اثر وسیع برای درمان عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می شود. سه مکانیسم ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مطرح شده است که عبارتند از: ۱) آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ۲) موتاسیون ریبوزومی ۳) فعالیت افلوکس باکتری. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری سویه های مقاوم به آمینوگلیکوزید ارتباط نزدیکی با سویه های MSRA دارند (۲۳، ۲۴). فلورکینولون ها در سال ۱۹۸۰ ابتدا برای درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی و سپس برای درمان عفونت های پنهان و *استافیلوکوکوس* مورد استفاده قرار گرفتند اما مقاومت به آن ها در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به ویژه سویه های MSRA برای اولین بار ایجاد شد این مقاومت به طور معمول در نتیجه موتاسیون خود به خودی کروموزومی در مکان های کلیدی DNA ژیراز و توپوایزومراز IV ایجاد می شود (۱۸).

در مطالعه ای که سید محمد علوی و همکاران در سال ۱۳۸۳-۸۴ در بیمارستان رازی اهواز با بررسی توصیفی مقطعی تمامی بیماران با زخم پای دیابتی پیشرفته که

مقاومت آنتی بیوتیکی شامل مقاومت به کاربامپنم و MDR وابسته است. سودوموناس دارای غشاء خارجی با نفوذپذیری پایین، پمپ‌های خارج کننده ی چند دارویی، لاکتاماز و تنظیم کاهش پورین های غشاء خارجی می باشد که می-توانند دلیلی برای مقاومت این میکروارگانیسم باشد و در حین درمان، میکروارگانیسم می‌تواند مقاومت کسب کند (۲۹). متأسفانه پیشرفت های حاصل شده در زمینه تولید آنتی بیوتیک‌های ضد سودوموناس مرگ و میر ناشی از این باکتری، قابل چشم پوشی نمی‌باشد (۳۱). این موضوع به عللی همچون، خصوصیات ذاتی خود باکتری در تولید آنزیم‌های مختلف پاتوژن، ایجاد مقاومت سریع نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و استفاده ی بی رویه از آنتی بیوتیک‌های جدید بر می‌گردد (۲۹). تأمیل سوی و همکاران در مطالعه خود که در سال ۲۰۱۱ انجام شد گزارش کردند که سویه های سودوموناس *آئروژینوزا* به آمپی سیلین ۱۰۰ درصد و ۸۳/۳ درصد نیز به فلوکساسین مقاومت دارند. شانکر و همکاران گزارش کردند ۴۴ درصد از جدایه های سودوموناس *آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو هستند (۳۲).

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

لوکسیدین‌ها به ترتیب ۳۴/۷ درصد *lukS*، ۴۴ درصد *lukD*، ۶۴ درصد *lukE*، ۷۷/۳ درصد *lukF* ارزیابی و در ۵۵ ایزوله ژن *mesA* شناسایی شد (۲۸).

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

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

مهم‌ترین نگرانی این است که تعداد عوامل آنتی سودوموناس *آئروژینوزا* مؤثر که در درمان استفاده می‌شوند به دلیل مقاومت‌های ایجاد شده به وسیله ی چندین عامل با مکانیسم‌های گوناگون محدود شده است و احتمالاً با افزایش مقاومت آنتی بیوتیک‌ها در ارتباط است. شیوع عفونت‌های بیمارستانی سودوموناس *آئروژینوزا* به افزایش

های بیماری‌زای/شریشیا کلی در مطالعات متعددی در ایران گزارش شده است (۳۶).

در مطالعات بسیاری که انجام شد گزارش گردید که در میان پاتوژن‌های جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی باکتری‌های گرم منفی شایع‌تر از باکتری‌های گرم مثبت بودند و شایع‌ترین آن‌ها به ترتیب سودوموناس و پس از آن شریشیا کلی بوده است (۳۲). زیبر و همکاران در مطالعه ای دیگر/شریشیا کلی را به عنوان جدایه غالب گرم منفی گزارش دادند (۳۲).

بحث

عصر آنتی بیوتیک‌ها با یک مقاله خلاصه با عنوان "پنی سیلین یک عامل شیمی درمانی" توسط Chain و همکارانش در سال ۱۹۰۴ آغاز شد. از آن زمان آنتی بیوتیک‌ها جان میلیون‌ها انسان را نجات دادند که بیشتر از هر داروی دیگری در تاریخ بشریت بوده است. به همین دلیل توسط بسیاری از افراد آنتی بیوتیک‌ها به عنوان داروی جادویی اسم برده می‌شوند (۳۲). با این حال شبکه ایمنی آنتی بیوتیک‌ها در مقابل عفونت باکتریایی به دلیل ظهور مقاومت بسیار شکننده شده است. هم‌چنین تولید آنتی بیوتیک‌های جدید به طور کلی کاهش یافته است و فقط ۲ آنتی بیوتیک از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ توسط FDA^۲ تایید شده است که مکانیسم عمل جدیدی داشته اند. داشتن مکانیسم جدید برای یک آنتی بیوتیک یک ملاحظه ی حیاتی در نبرد علیه مقاومت آنتی بیوتیکی است (۳۷). در قرن بیست و یکم مقاومت باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های در دسترس به عنوان مشکلی جدی در درمان عفونت‌های باکتریایی مبدل شده است. بازگشت به عصر قبل از آنتی بیوتیک‌ها و مرگ و میر ناشی از باکتری‌های پاتوژن عامل نگرانی‌های جدی است (۳۲). و از آنجایی که سالانه تعداد موارد بستری ناشی از پای دیابتی رو به افزایش بوده که در اکثر موارد ناشی از بیماری‌های عروق محیطی است. ریسک فاکتورهای اصلی مستعد کننده زخم پای دیابتی عبارتند از: نوروپاتی، واسکولوپاتی و اختلال در سیستم ایمنی. بیشتر عفونت‌های پای دیابتی پلی میکروبیال بوده و/استافیلوکوکوس/اورئوس شایع‌ترین ارگانیسم عامل می باشد. دو نوع طبقه بندی برای عفونت پای دیابتی IDSA،

WAGNER این تقسیم بندی همرا با ارزیابی نیاز به بستری بیماران، انجام تصویر برداری‌های اختصاصی، مداخله جراحی و یا آمپوتاسیون و به طور کلی پیامد بیماران را مشخص می‌نماید. درگیری‌های عمقی‌تر (فاشیت، میوزیت و استئومیلیت) احتمال مداخله جراحی را افزایش داده و مدت درمان را طولانی‌تر می‌کند. استئومیلیت احتمال آمپوتاسیون را افزایش داده، هم‌چنین بهبود زخم را به تأخیر انداخته و به عنوان کانونی برای عود عفونت عمل می‌نماید. و اسکولوپاتی در ۲۰ تا ۳۰ درصد بیماران دیابتی وجود داشته و بیش از ۴۰ درصد افراد با اسکولوپاتی دچار زخم پا هستند. استئومیلیت عامل اصلی آمپوتاسیون اندام تحتانی بوده و به همین دلیل نیاز به تشخیص زودرس و درمان مناسب مورد توجه می‌باشد. وجود علائم سیستمیک به عنوان فاکتورهای پیشگویی کننده وضعیت بد بیمار و پیامد بالینی نامطلوب وی می‌باشد. بنابراین دانستن شیوع آن در هر منطقه و نیاز به پرداختن به پیشگیری و درمان به موقع آن حائز اهمیت است. به علت آنکه زخم‌های عفونی پای دیابتی شایع‌ترین علت بستری شدن بیماران دیابتی است و به طور شایع منجر به آمپوتاسیون می‌شود و درمان باید بر اساس کشت‌های بافتی و الگوی مقاومت میکروبی باشد دانستن علل باکتریولوژیک ایجاد کننده آن نیز می‌تواند روند درمان بیماری و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب را تسهیل کند (۴).

عوامل خطر ایجاد کننده زخم پای دیابتی را براساس قابلیت کنترل به دو گروه می‌توان تقسیم کرد: عوامل خارجی شامل ترومای کوچک و بزرگ حرارتی، مصرف سیگار و الکل، کنترل ناکافی قند خون، چاقی، عدم همکاری بیمار و کفش نامناسب، عوامل داخلی شامل جنسیت، نوروپاتی، اسکولوپاتی، ایمونوپاتی، سن، طول مدت دیابت، سابقه قبلی زخم و دفورمیتی که عوامل خارجی قابل کنترل بوده و با تمرکز بر روی آن‌ها می‌توان تا حدی از پیدایش زخم پا جلوگیری کرد. در مطالعه ای که توسط Mohamad Alsadig, Fatma Almaskari در سال ۲۰۰۷ جهت تعیین شیوع دیسک فاکتورهای عوارض پای دیابتی بر روی ۵۱۳ بیمار با میانگین ۵۳ سال در بیمارستان العین انجام شد، به این نتیجه رسیدند که جنس، تحصیلات

²Food and Drug Administration

پایین، دیابت تیپ ۲ و وجود آلبومینوری و هایپرنتشن ریسک‌های مهم پای دیابتی‌اند (۳۸). بنابراین تشخیص زود هنگام ضایعات و شروع سریع درمان ضد میکروبی مناسب برای کنترل عفونت و جلوگیری از عوارض آن، برای بهبود زندگی ضروری است. آزمون حساسیت میکروبی نیز برای مدیریت عفونت مورد نیاز است که می‌تواند به انتخاب گزینه درمانی بهتر کمک کند (۱۷). در جهان زخم پای دیابتی یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت عمومی است که منجر به تحمل مشکلات بهداشت اجتماعی و اقتصادی برای افراد مبتلا می‌شود. در حدود ۱۵ درصد از بیماران دیابتی زخم پا ایجاد می‌شود که در برخی از زمان‌های زندگی بسیار آسیب‌پذیر است. عفونت‌های زخم پا معمولاً به علت رشد چند میکروبی یا پلی میکروبی به طور عمده شامل ارگانیسم‌های هوازی گرم مثبت و گرم منفی ایجاد می‌شوند. در سال‌های اخیر، تعداد حوادث و عوارض ناشی از عفونت‌های زخم پای دیابتی به علت شیوع ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو افزایش چشمگیری داشته است (۳۹). در اکثر مطالعات انجام شده مشخص گردید که در بین جدایه‌های میکروبی جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی، باکتری‌های گرم منفی شایع‌تر از کوکسی‌های گرم مثبت می‌باشد. که حساسیت آنتی بیوتیکی هر یک از جدایه‌ها با جدایه دیگر متفاوت می‌باشد.

پایین، دیابت تیپ ۲ و وجود آلبومینوری و هایپرنتشن ریسک‌های مهم پای دیابتی‌اند (۳۸). بنابراین تشخیص زود هنگام ضایعات و شروع سریع درمان ضد میکروبی مناسب برای کنترل عفونت و جلوگیری از عوارض آن، برای بهبود زندگی ضروری است. آزمون حساسیت میکروبی نیز برای مدیریت عفونت مورد نیاز است که می‌تواند به انتخاب گزینه درمانی بهتر کمک کند (۱۷). در جهان زخم پای دیابتی یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت عمومی است که منجر به تحمل مشکلات بهداشت اجتماعی و اقتصادی برای افراد مبتلا می‌شود. در حدود ۱۵ درصد از بیماران دیابتی زخم پا ایجاد می‌شود که در برخی از زمان‌های زندگی بسیار آسیب‌پذیر است. عفونت‌های زخم پا معمولاً به علت رشد چند میکروبی یا پلی میکروبی به طور عمده شامل ارگانیسم‌های هوازی گرم مثبت و گرم منفی ایجاد می‌شوند. در سال‌های اخیر، تعداد حوادث و عوارض ناشی از عفونت‌های زخم پای دیابتی به علت شیوع ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو افزایش چشمگیری داشته است (۳۹). در اکثر مطالعات انجام شده مشخص گردید که در بین جدایه‌های میکروبی جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی، باکتری‌های گرم منفی شایع‌تر از کوکسی‌های گرم مثبت می‌باشد. که حساسیت آنتی بیوتیکی هر یک از جدایه‌ها با جدایه دیگر متفاوت می‌باشد.

Shankar و همکاران در سال ۲۰۰۵ در جنوب هند یک مطالعه توصیفی برای تجزیه و تحلیل جدایه‌های باکتری هوازی و بی‌هوازی همه‌ی بیماران بستری شده با عفونت زخم پای دیابتی که از زخم‌های درجه ۲-۵ واکنر گزارش شد، انجام دادند. باکتری‌های گرم منفی جدا شده بیشتر از گرم مثبت‌ها بود، که شایع‌ترین آن‌ها شامل سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی و باکترئیدس بودند. و تعدادی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به چندین دارو مقاومت نشان دادند (۴۰). در مطالعه‌ای دیگر اسمعیل

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات نشان داده که هر دو کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم منفی باعث عفونت زخم پای دیابتی شده و این در حالی است که مطالعات انجام شده، برتری باکتری‌های گرم منفی را در ایجاد این عارضه نشان می‌دهد. تغییر در علل باکتریایی عفونت زخم پای دیابتی براساس موقعیت جغرافیایی بود و هم‌چنین آگاهی از الگوی حساسیت آنتی بیوتیک جدایه‌ها از عفونت پای دیابتی برای پیشگیری از درمان مناسب در این موارد، قبل از دریافت گزارش‌های حساس از آزمایشگاه بسیار مهم است.

منابع

1. Aghili R, Malek M, Baradaran H., Peyvandi AA, Ebrahim Valojerdi A, Khamseh ME., General Practitioners' Knowledge and Clinical Practice in Management of People with Type 2 Diabetes in Iran; The Impact of Continuous Medical Education Programs. Arch Iran Med 2015;18(9):582-5.
2. Alavi SM, Sadami A, Khosravi A, Dasht Bozorg A, Abbasi E, Latifi M. Bacteriology of foot ulcer in diabetic patients hospitalized in Ahvaz Razi hospital; J Infect Dis and Trop Med. 2015; 2(4): 45-56.
3. Shanmugam P, Jeya M, Linda Susan S. The Bacteriology of Diabetic Foot Ulcers, with a Special Reference to Multidrug Resistant Strains 2013;7(3): 441-445.
4. Bahramian S. Prevalence of osteomyelitis and bacteriological causes in diabetic foot ulcer patients referring to Imam Hossein Shahroud Hospital. Trop Med. 2017; 23 (2) 73-85.
5. Shaw J.E, Sicree P.Z. and P.Z Zimmet, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 2010; 87(1): 4-14.
6. Rasouli H, Ghorbanalinezhad A. Isolation and Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* based on *hla*, *lukED*, *sei*, and *hlg* Virulence Genes in Patients with Diabetic Foot Infection in Mazandaran Province. Iran J Med Microbiol. 2017; 11(6):191-202.
7. Lipsky B, Peters E, Senneville E, Berendt A, Embil J, Lavery L, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev. 2012; 28(S1):163-178.
8. Sarkar P, Balantyne S, Management of Diabetic leg Ulcer. Postgrad Med J. 2000; 76 (901): 674-682.
9. Fahey T, Sadaty A, Jones W, Et AL. Diabetic Impairs the Late Inflammatory response to Wound healing. J Surg Res. 1991; 50(4): 308-313.
10. S Pinzur M, Diabetic Foot . E Medicine Last updated. 2004; 25(8):545-9.
11. Mandell G, Bennet J, Dolin R. Cellulitis and soft tissue infection. Principles and Practice of infectious diseases. Sixth edition, Pennsylvania, Churchill living stone 2005; 2(86):1046-1047.
12. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front Microbiol 2013; 4:47-58.
13. Nazer M, Darvishi M. Study on the prescription and use of antibiotics and its role in microbial resistance and its effects on resistance economy. J of Res Lorestan Univ of Med Sci. 2017; 19(3): 98-110.
14. Nazer E, A Akhavaneseapahi, B Yakhchaly, Nazer MR. Degradation of toluene by highly efficient indigenous isolate. Adv Environment Bio. 2014; 8(6):1830-1833.
15. Nazer MR, Obeidavi Z, Garmsiri M., Darvishi M, Taherian P, Nouruzi S. The Prevalence Rate of HIV co-Infection in HBV and HCV Positive Patients in Lorestan. Province. Iioab J. 2016; 7(8): 221-225.
16. Mokhayeri H, Nazer MR, Nabavi M. Seroprevalence of Hepatitis B and C in Clinical Staffs (Doctor and Nurse) of the Hospitals in Khorramabad City, West Iran Int J Med Res Health Sci. 2016;11(5):68-72.
17. Avarinjad M, Pouladfar Gh, Bolandparvaz Sh, Satiary Z, Abbasi P and Mardaneh J. Isolation and Antibiotic Susceptibility from Diabetic Foot Infections in Namazee Hospital Southera IRAN. Journal of Pathogens 2015.
18. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalized in iman reza hospital, kermanshah. J Microbial world. 2014; 6(4):209-311.
19. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents. 2000;16 (1):S3-10.
20. de Carvalho MJ, Pimenta FC, Hayashida M, Gir E, da Silva AM, Barbosa CP, Canini SR, Santiago S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. Clinics (Sao Paulo). 2009; 64(4): 295-302.
21. Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

- Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 2155-2161.
22. Goetghebeur M, Landry PA, Han D, Vicente C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2007;18(1):27-34.
 23. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside- resistance mechanisms in multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Curr Microbiol. 2008; 56(6):558-562.
 24. Perez-Vazquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene ant (4')-Ia and the efflux pump genes *msrA/msrB*. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(1):21-31.
 25. Richard JL1, Sotto A, Jourdan N, Combescure C, Vannereau D, Rodier M, Lavigne JP. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. 2008; 34(4):363-369.
 26. Al Benwan K, Al Mulla A, Rotimi VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. J Infect Public Health. 2012; 5:1-8.
 27. Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Jundi J Microbiol. 2014; 7 (6): 89-103.
 28. Abdel-hamed A-HA, Abdel-Rhman SH, El-Sokkary MA. Studies on leukocidins toxins and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical sources. Afr J Microbiol Res. 2016;10 (17):591-599.
 29. kanani M, khadiri T, khazaei S, madani S H, malekianzadeh E. Study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to Ceftizidim and Imipenem in Kermanshah Imam reza hospital during. 2006-2011. Yafte. 2014; 15(4):52-60.
 30. Sanchez-Romero I, Cercenado E, Cuevas O, Garcia-Martinez J, Bouza E. Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: second national study. Rev Esp Quimioterap. 2007; 20 (2): 222-229.
 31. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:109-117.
 32. Zare L, Shenagari M, Khan Mirzaei M, Mojtahed A. Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabetic ulcers. Iran J Med Microbiol. 2017;11(2):34-41.
 33. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. Crit Care Med. 2015;43(6):190-198.
 34. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. Bacteriophage 2011;1(2):66-85.
 35. Boykoe EJ, Lipsky BA. In: Diabetes in America. Harris MI, editor. Washington DC: National Institutes of Health. Infection and diabetes mellitus. 1995; 485-496.
 36. Haghighatpanah M, Mozaffari Nejad AS, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmid-borne *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. J Glob Antimicrob Resist. 2016; 7:110-113.
 37. Sulakvelidze A, The challenges of bacteriophage therapy Eur Ind Pharm. 2010; 10:14-18.
 38. Sshahrad bejestani H, Motabar A. Assessment of Diabetic Foot Ulcer's Predisposing Factors and its Outcomes in Patients with Diabetic Foot Syndrome Hospitalized in Hazrat Rasoul-e-Akram Hospital in Tehran During 1996-2001. J Iran Univ of Med Sci. 2004; 11(9):77-84.
 39. SM Sekhar, N Vyas,1 MK Unnikrishnan, GS Rodrigues,2 and C Mukhopadhyay. Antimicrobial Susceptibility Pattern in Diabetic Foot Ulcer: A Pilot Study. Health. 2014; 4(5):742-745.
 40. Shanker EM, Mohan V, Premalatha G, Srinivasan RS, Usha AR. Bacterial etiology of diabetic foot infection in south India. Eur J Int Med. 2005; 16:567-570.

Antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcers
Shima Shantiae^{1*}

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

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

Abstract

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

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

Contents

The frequency of genes in integron class 1, 2 and 3 in uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains city diabetic patients in Shahrekord isolated from	
Negin Deli Sarraki, Fatemeh Khodaverdipour, Nazila Arbab soleimani.....	1
The effect of aerobic exercise on mitochondrial mitophagy	
Farank Amini ,Mohammad Ali Azarbayjani , Shahin Riyahi Malayeri, Lida Moradi	14
Study of <i>Coxiella burnetii</i> serotype in clinical samples of slaughterhouse workers in Isfahan cities	
Fahimeh Nourbakhsh , Hossein Chahardeh Masoumi , Mohammadreza Saebi.....	29
Determine the antibiotic resistance patterns and <i>tsst-1</i> gene frequency in <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz	
Ziba Shanaki Bavarsad, Maryam Reisi, Hossein Aghajani, Marzeyeh Soleymanian.....	51
Contamination of brucellosis in blood samples of seropositive patients for <i>Brucella</i> in the Shahr-e Kord and Isfahan city by Real Time PCR method	
Hossein Khodabandeh, Nazila Arbab Soleimani, Hossein Aghajani, Mohammad Reza Afsharzadeh.....	65
Antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcers	
Shima Shantiaei.....	77



