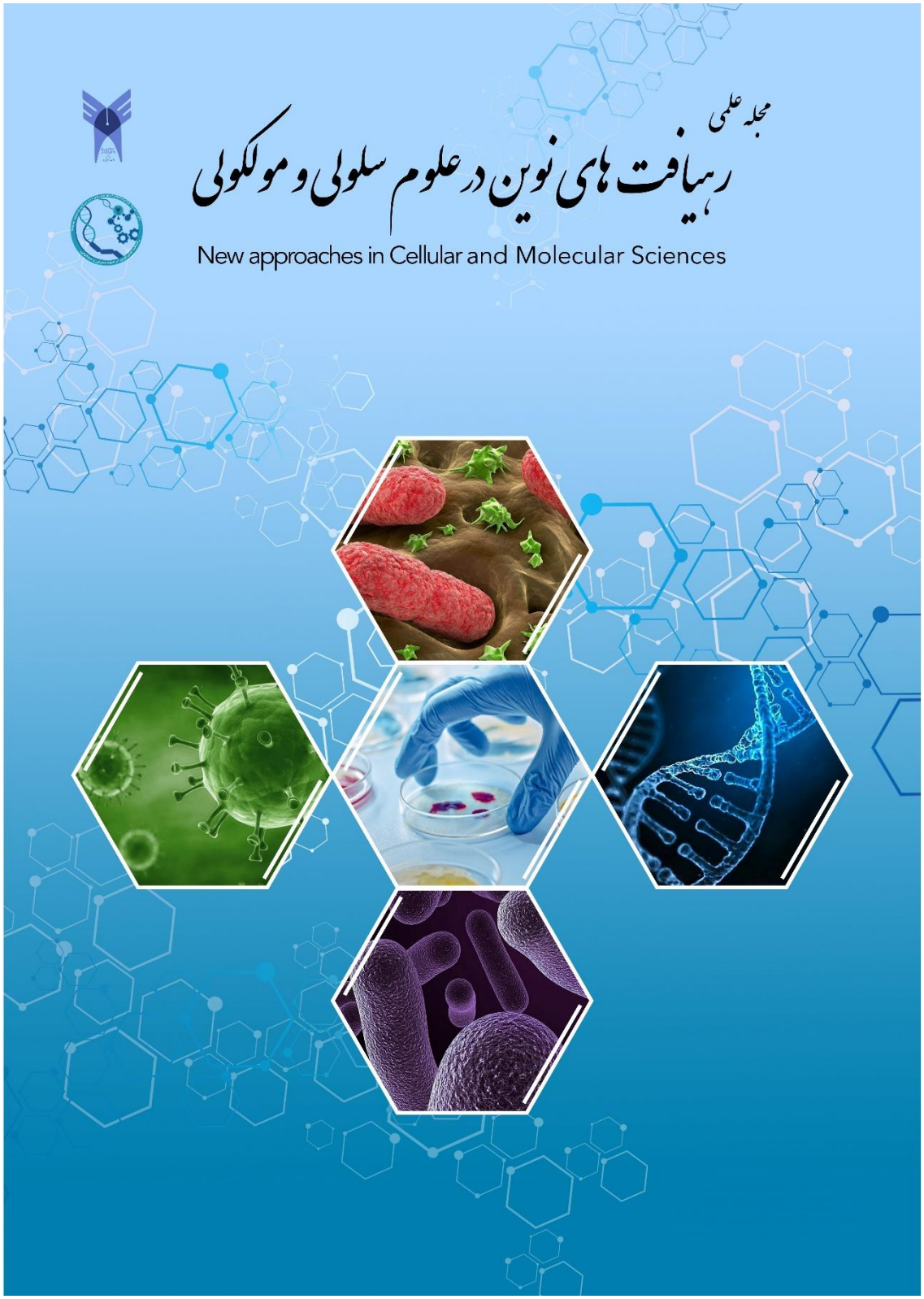

مجله علمی
رهیافت های نوین در علوم سلولی و مولکولی
New approaches in Cellular and Molecular Sciences

فهرست

بررسی فراوانی جهش در بیماران SARS-CoV-2 مثبت

مژده لشکری ، اشرف کریمی نیک ، محمد جواد سلطانی بناوندی.....۳

ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد

نجمه مولوی، منوچهر مومنی شهرکی ، حسین خدابنده ی شهرکی.....۱۳

سیانوباکتر *اسپیرولینا*: یک افزودنی فراسودمند برای مواد غذایی

فاطمه شایسته، دکتر علی شریف زاده، سارا آرتی.....۲۷

بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۸

فاطمه خداوردی پور، پریسا کریمی، نازیلا ارباب سلیمانی.....۵۳

ژنوتایپینگ ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از مواد غذایی به روش RAPD-PCR

فاطمه پارسا، منوچهر مومنی شهرکی، فاطمه خداوردی پور.....۶۴

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های کلبسیلاپنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی در شهرستان اصفهان

حسین خدابنده شهرکی، سارا باقری کاکش.....۷۶

رهیاف های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

بررسی فراوانی جهش در بیماران SARS-CoV-2 مثبت

مژده لشکری ۱، اشرف کریمی نیک*[۱،۲]، محمد جواد سلطانی بناوندی ۱
۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۲. مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

چکیده

شیوع بیماری کروناویروس ۲۰۱۹، ناشی از سندرم حاد تنفسی جدید کروناویروس (SARS-CoV-2)، به یک بحران بهداشت جهانی در حال تکامل تبدیل شده است. ژن اسپایک (*S*)، مسئول تولید پروتئین اسپایک است که به ویروس کمک می‌کند تا به سلول‌های انسانی متصل شود و وارد آن‌ها شود. جهش‌های این ژن می‌توانند تأثیرات قابل توجهی بر روی قابلیت انتقال ویروس، شدت بیماری و همچنین اثربخشی واکسن‌ها داشته باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی میزان فراوانی جهش در بیماران بستری آلوده به SARS-CoV-2 بوده است. تحقیق حاضر نوعی تحقیق توصیفی- مقطعی است و بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ بستری در بیمارستان افضلی پور شهر کرمان، انجام شد. استخراج RNA از نمونه تنفسی افراد مورد مطالعه و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت انجام شد. شناسایی ویروس، به روش ریل تایم پی سی ار سایبرگرین انجام پذیرفت. همچنین نمونه های کوید مثبت، به روش سنگر تعیین توالی شدند و فراوانی جهش در آن ها بررسی شد. کلیه نمونه های مثبت مورد بررسی SARS-CoV-2، شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S* بودند و نوکلئوتید C با T جایگزین شده بود که منجر به جایگزینی اسید آمینه هیستیدین به تیروزین شده است. تحلیل توالی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین نشان داد که این جهش‌ها باعث تغییر در سطح اسیدآمینه شده و قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نبودند. هر چند جهش های با عدم توانایی تغییر در ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها به گیرنده‌های مرتبط با سیستم ایمنی به واکنش نشان نمی‌دهند و با وجود این بررسی جهش‌های می‌تواند به توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ کمک کند.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۰۹/۲۱
پذیرش:۱۴۰۳/۱۰/۰۷
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: کووید ۱۹، ژن اسپایک، موتاسیون

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

مقدمه

کوید ۱۹، بیماری مسری است که در سال ۲۰۱۹ شناسایی و نام آن از coronavirus disease 2019 (بیماری کروناویروس ۲۰۱۹) گرفته شد. این بیماری توسط ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می‌شود و به طور عمده با عفونت ریه ها و سایر سیستم های بدن مربوط به تنفس مرتبط است (۱). کروناویروس‌ها از راستهٔ Nidovirales، خانواده Coronaviridae، زیرخانوادهٔ *Coronavirinae* بوده که بسته به سروتیپ و ژنوتیپ ویروس‌های کرونا به چهار جنس تقسیم می‌شوند و شامل: *α-coronavirus*، *β-coronavirus*، γ-*coronavirus* و δ-*coronavirus* هستند (۳, ۲). کرونا ویروس‌های انسانی (HCoVs) متعلق به دو مورد اول هستند.HCoVs عمدتاً برای این شناخته شده هستند که باعث عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی می‌شوند، ولی علائم ممکن است شامل علائم مرتبط با سیستم عصبی و گوارشی نیز باشد (۴). در حال حاضر، خانواده کروناویروس‌ها شامل چندین گونه است. از این گونه‌ها، تعدادی به انسان‌ها عفونت می‌دهند و برخی از آن‌ها می‌توانند بیماری‌های جدی به وجود آورند. گونه‌های مهم کروناویروس‌ها که بیشتر به انسان‌ها انتقال می‌یابند عبارتند از: کروناویروس سندروم تنفسی حاد شدید (SARS-CoV)، که این ویروس باعث بروز بیماری سندروم تنفسی حاد شدید (SARS) در سال ۲۰۰۳ شد. کروناویروس سندروم تنفسی خلیج فارس (MERS-CoV)، که این ویروس برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ در خلیج فارس شناسایی شد. بیماری سندروم تنفسی خلیج فارس (MERS) در برخی مناطق جهان، به ویژه منطقه خاورمیانه، منتشر شده است. کروناویروس جدید (SARS-CoV-2)، در سال ۲۰۱۹ شناسایی شد و عامل اصلی بیماری کووید-۱۹ است. ویروس کووید-۱۹ به طور گسترده در سراسر جهان منتشر گردید و منجر به شیوع جهانی و پاندمی شد (۵). ژنوم کروناویروس، یک رشته طولانی و پیچیده است که می‌تواند تا به ۳۰ کیلوبایت، طول داشته باشد. این ژنوم درون نوکلئوکپسید قرار گرفته است و توسط پروتئین نوکلئوکپسید، محافظت می‌شود (۶). مطالعه ژنوم کروناویروس و تحلیل توالی آن می‌تواند به پژوهشگران این عرصه کمک کند تا خصوصیات و عملکرد ویروس را درک بهتری داشته باشند. ژنوم کروناویروس SARS-CoV-2، حاوی حدود ۳۰,۰۰۰ نوکلئوتید است و حاوی ژن‌های مختلف است که کدگذاری برای تولید پروتئین‌های مختلف در ویروس را انجام می‌دهند. ژن‌های ساختمانی، که کدگذاری برای پروتئین‌های ساختاری مانند پروتئین اسپایک، پروتئین انولوپ، پروتئین ماتریکس و پروتئین نوکلئوکپسید را دارند. ژن‌های تنظیمی که نقش در کنترل فعالیت‌های ژنتیکی و ترجمه پروتئین‌ها را دارند و ژن‌های مربوط به آنزیم‌ها، که کدگذاری برای آنزیم‌هایی که در فرآیندهای تکثیر ویروس نقش دارند را انجام می‌دهند. ژن‌های دیگری هم شناسایی شده که وظیفه کدگذاری برای پروتئین‌های مهم در عملکرد ویروس دارند، مانند: آنزیم‌هایی که در فعالیت‌های مهار و تغییر پاسخ ایمنی میزبان نقش ایفا می کنند (۷). ژن S یا ژن اسپایک[۱] مسئول تولید پروتئین اسپایک، است. این پروتئین بر روی سطح خارجی ویروس قرار دارد و نقش کلیدی در ورود ویروس به سلول میزبان، اتصال به سلول میزبان و ایجاد پاسخ ایمنی دارد. پروتئین اسپیک، به ویروس شکل منحصر به فردی می‌دهد و می‌تواند هدف برخی واکسن‌ها و داروها باشد (۸). با مطالعه جهش در ژن های ویروس، می توان درک بهتری از نحوه تغییر ویروس پیدا کرد و پیش‌بینی کرد که آیا ممکن است ویروس به گونه‌های جدیدی تبدیل شود. همچنین توسعه واکسن‌های مؤثرتر تسهیل گردیده و استراتژی‌های بهداشتی و درمانی را بهبود بخشیده می شود (۹). بنابراین بررسی جهش در سطح تغییر

[۱] Spike protein

اسیدآمینه و پروتئین در نمونه های کوید مثبت و تحلیل جهش‌های موجود در ژن S ویروس کووید-۱۹ در جهت توسعه و بهبود واکسن‌ها برای سازگاری با نسخه‌های جدید ویروس بسیار مفید بوده و بررسی جهش‌های در ژن S با هدف توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ شامل طراحی داروهایی که قادر به تعامل موثر با نسخه‌های جدید ویروس باشند، می تواند جنبه های نوینی از تحقیق را نشان دهد.

روش کار

تحقیق حاضر نوعی تحقیق توصیفی- مقطعی است. جامعه آماری این تحقیق شامل تعداد ۷۰ نفر از بیماران بزرگسالی است که تست کوید آن ها مثبت بوده و دارای علایم بالینی حاد شامل: سرفه خشک، تب، کسلی، خستگی و بی حالی، سنگینی تنفس و کاهش اکسیژن بوده اند. سطح اکسیژن در تمامی بیماران کمتر از ۹۰ درصد بود که این بیماران از دو جنس زن و مرد در بخش بیماری های عفونی بیمارستان افضلی پور شهر کرمان بستری شده بودند. رده سنی بیماران از ۱۸ تا ۷۰ سال و از هر دو جنس زن و مرد بود. در این پژوهش برای تعیین نمونه از روش نمونه‌گیری، تصادفی ساده استفاده گردید. جهت تعیین حجم نمونه از فرمول کوکران استفاده شده است. باتوجه‌به اینکه جامعه آماری ۸۵ بیمار در رده سنی مدنظر (۱۸-۷۰ سال) در دوره زمانی تحقیق در بیمارستان بستری بودند، حجم نمونه با میزان خطای ۵ درصد ۷۰ بیمار بدست آمد و بنابراین ۷۰ بیمار جهت انجام آزمایش ها انتخاب گردید.

N= **۸۵**

d=۰/۰۵ z=۱/۹۶ q=۰/۵ p=۰/۵

$$n = \frac{\frac{z^2pq}{d^2}}{1+\frac{1}{N}\left(\frac{z^2pq}{d^2}-1\right)} = \frac{\frac{(1.96^2)*0.5*0.5}{0.5^2}}{1+\frac{1}{85}\left(\frac{(1.96^2)*0.5*0.5}{0.1^2}-1\right)} \approx 70$$

قبل از اقدام به نمونه گیری، جهت انجام این تحقیق کد کمیته اخلاق زیست پزشکی به شماره IR.IAU.KERMAN.REC.1401.052 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان اخذ گردید.

شناسایی ویروس SARS-CoV-2

از نمونه های تنفسی گرفته شده از بیماران استخراج ژنومی توسط کیت تجاری (KPG-VDREK، ایران) طبق دستورالعمل آن، انجام شد. جهت شناسایی و تشخیص ویروس از روش ریل تایم پی سی ار با استفاده از کیت تجاری (KPG-VDREK، ایران) استفاده شد. این کیت به طور اختصاصی برای تشخیص ژن ORF1، ویروس طراحی شده و قادر به تشخیص ۵ کپی بر میلی لیتر می باشد.

بررسی جهش در سویه های SARS-CoV-2

جهت بررسی موتاسیون یا جهش در ژنوم سویه های کوید مثبت، نقاط HOT SPOT با توجه به بررسی مقالات معتبر منتشر شده شناسایی گردید. لذا ژن S انتخاب گردید. ژن S از SARS-CoV-2در بازه ۲۳۲۷۴ تا ۲۳۶۴۱ با استفاده از پرایمر خاص (جدول ۱)، برای این ژن تکثیر شد. به این ترتیب، RNA ویروسی استخراج شد و سپس با استفاده از کیت‌های تجاری کارمانیا پارس ژن، سنتز cDNAانجام شد و سپس ژن SARS-CoV-2 S با استفاده از مستر میکس پی سی ار، در دستگاه ترمال سایکلر تکثیر شد. برنامه تکثیر: ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه، ۴۰ چرخه به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد، ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه. با تکثیر PCR به طول ۳۸۹ جفت بازی، محصول PCR مخصوص ژن SARS-CoV-2 S تأیید

شد. سپس محصول PCR توسط شرکت Microsynth Seqlab در سوئد با استفاده از تکنیک تعیین توالی سنگر Sanger تعیین سکانس شد. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزارهای آنلاین NCBI و UCSC Blat به ژن مرجع (NC_045512v2:23274+23662) همگام سازی شدند. تصاویر سه بعدی (3D) پروتئین‌های سویه طبیعی و جهش یافته با استفاده از نرم افزار آنلاین Swiss Model، ترسیم گردید. توالی یابی با استفاده از UCSC Blat و با استفاده از تارنمای https://genome.ucsc.edu، انجام شد. نتایج Blat با قطعه اصلی آن سویه مقایسه گردید. بازهایی در دو رشته با هم یکسان نبودند و به عبارتی جایگزین شده اند، شناسایی گردید همچنین موقعیت جهش ها بدست آمد. در توالی هایی که تغییر باز وجود داشت آن توالی در برنامه Gene runner برای تعیین تغییر اسید آمینه مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

جدول ۱- توالی ژن *S* جهت بررسی موتاسیون در نمونه های SARS-CoV-2 مثبت

طول قطعه (bp)	توالی(5'-3')	نام ژن
۳۸۹	F: ACACTACTGATGCTGTCCGT R: ACCAAGTGACATAGTGTAGGCA	*S*

نتایج

در این تحقیق بیماران SARS-CoV-2 مثبتی که در بیمارستان افضلی‌پور بستری شدند و فرم رضایت‌نامه را امضا نموده و موافقت خود را به همکاری در این پژوهش اعلام نمودند، وارد مطالعه شدند. نمونه‌ها شامل ۷۰ نمونه بیمار مبتلا به SARS-CoV-2 بود که بر اساس تست ریل تایم پی‌سی‌آر مطالعه شدند. نسبت زنان به مردان ۲/۴ بود. رده سنی آن ها از ۱۸ تا ۷۰ بود.

نتایج بررسی جهش در نمونه های Sars cov-2 مثبت

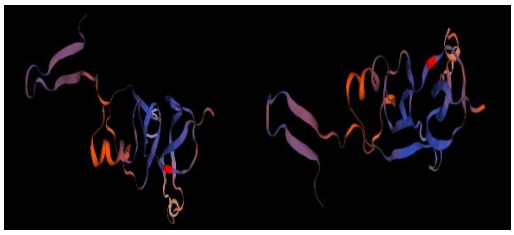
در جدول (۲)، توالی پروتئینی ژن *S* ویروس کوید ۱۹ در دو حالت وحشی (طبیعی) و جهش یافته (موتان) نشان داده شده است. اسید آمینه تغییر یافته با رنگ زرد مشخص گردیده شده است که اسید آمینه به رنگ زرد به اسید آمینه به رنگ قرمز جهش پیدا کرده است و جهش یافته محسوب می شود. یا فته ها نشان داد که کلیه ویروس‌های مورد بررسی SARS-CoV-2 شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S* هستند که نوکلئوتید C با T جایگزین شده است که منجر به جایگزینی اسید آمینه His هیستیدین به تیروزین Thy (p. His23525Thy) شده است.

جدول ۲- نمونه توالی پروتئینی ژن S ویروس کوید ۱۹ در دو حالت وحشی (طبیعی) و جهش یافته

ژن *S*	توالی اسید آمینه
Wild وحشی	TTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG
Mutated جهش یافته	TTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEYVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG

شکل (۱)، ساختار سه بعدی ژن *S* در SARS-COV-2 S در دو حالت وحشی و جهش یافته را نشان می دهد. همان طور که در شکل مشخص شده و با علامت پیکان نشان داده شده است با تغییر اسید آمینه در فرم جهش یافته، هیچ تغییری در ساختار پروتئین ایجاد نشده است. علاوه بر این، چندین جایگزینی صامت در ژن *S* ویروس SARS-CoV-2 مشاهده گردید که به تفصیل در جدول (۳)، ذکر شده است. به طور نمونه: در ردیف اول، در موقعیت ۲۳۵۹۹، تغییر باز

تیمین به جای سیتوزین به صورت جهش صامت در ۱۰۰ درصد نمونه ها یافت شده است و در مورد ردیف آخر در موقعیت ۲۳۶۵۵، تغییر باز سیتوزین به جای گوانین به صورت جهش صامت در ۱۱ درصد نمونه ها یافت شده است.



شکل ۱- ساختار سه بعدی ژن S در SARS-COV-2در دو حالت وحشی (سمت چپ) و جهش یافته (سمت راست). تصاویر سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار Swiss Model نشان داد که جایگزینی قادر به تغییر ساختار سومی ژن SARS-CoV-2 نبوده‌اند.

جدول ۳- جهش‌ها و درصد فراوانی آن ها در نمونه های SARS-COV-2 مثبت

موقعیت جهش و تغییر باز مربوطه	نوع جهش	میزان فراوانی (درصد) در کل نمونه ها
23599 T>G	جهش صامت	۱۰۰
23604 C>A	جهش صامت	۱۰۰
23427A>T	جهش صامت	۲۲
23442C>G	جهش صامت	۲۲
23473G>T	جهش صامت	۱۱
23476G>A	جهش صامت	۱۱
23466 T>A	جهش صامت	۱۱
23421 T>C	جهش صامت	۱۱
23479A>T	جهش صامت	۱۱
23480A>T	جهش صامت	۱۱
23494C>A	جهش صامت	۱۱
23391 T>G	جهش صامت	۱۱
23403 A>G	جهش صامت	۲۲
23430 C>T	جهش صامت	۲۲
23440 A>T	جهش صامت	۲۲
23441 G>C	جهش صامت	۲۲
23420 G>T	جهش صامت	۲۲
23371 T>C	جهش صامت	۱۱
23417 G>C	جهش صامت	۱۱
23487 T>G	جهش صامت	۱۱
23483 A>C	جهش صامت	۱۱
23484 A>T	جهش صامت	۱۱
23493 A<C	جهش صامت	۱۱
23520 C>T	جهش صامت	۱۱
23516 G>T	جهش صامت	۱۱
23546 T>A	جهش صامت	۱۱
23558 A>C	جهش صامت	۱۱
23563 T>G	جهش صامت	۱۱
23580 G>T	جهش صامت	۱۱
23569 T>G	جهش صامت	۱۱
23593 G>C	جهش صامت	۱۱
23628 G>T	جهش صامت	۱۱
23623 A>G	جهش صامت	۱۱
23617 T>C	جهش صامت	۱۱
23655 C>G	جهش صامت	۱۱

بحث

SARS-CoV-2، یکی از ویروس‌های کروناویروس جدید است که منجر به شیوع جهانی بیماری کووید-۱۹ گردید (۱۱). طبق داده‌های ذخیره سازمان بهداشت جهانی براساس آمار تا نوامبر ۲۰۲۳، تعداد موارد تایید شده این بیماری به تعداد ۷۷۲، ۰۵۲، ۷۵۲ مورد می‌رسد و کووید-۱۹ تاکنون منجر به ۶، ۹۸۵، ۲۷۸ مورد فوت شده است (۱۲). ویروس

کووید-۱۹، که ناشی از ویروس SARS-CoV-2 است، در طول زمان جهش‌های متعددی را تجربه کرده است (۱۳). برخی از این جهش‌ها باعث ایجاد واریانت‌های جدیدی شده‌اند که ممکن است بر روی انتقال، شدت بیماری یا اثربخشی واکسن‌ها تأثیر بگذارند. از جمله واریانت‌های شناخته شده می‌توان به آلفا، بتا، گاما و دلتا اشاره کرد (۱۴). هر یک از این واریانت‌ها ویژگی‌های خاص خود را دارند و در برخی موارد، ممکن است باعث افزایش سرعت انتشار ویروس شوند. واریانت‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا از جمله واریانت‌های شناخته شده ویروس SARS-CoV-2 هستند که باعث بیماری COVID-19 می‌شوند. واریانت آلفا (B.1.1.7)، نخستین بار در سپتامبر ۲۰۲۰ در انگلستان شناسایی شد. آلفا به دلیل افزایش قابلیت انتقال و احتمال بالاتر ابتلا به بیماری شدید، توجه زیادی را جلب کرد. واریانت بتا (B.1.351)، در مه ۲۰۲۰ در آفریقای جنوبی شناسایی شد. بتا دارای جهش‌هایی است که می‌تواند به کاهش اثر واکسن‌ها و درمان‌ها منجر شود و همچنین قابلیت انتقال بالایی دارد. واریانت گاما (P.1)، در نوامبر ۲۰۲۰ در برزیل شناسایی شد. گاما نیز به دلیل جهش‌های خاص خود، می‌تواند به فرار از سیستم ایمنی و کاهش اثر واکسن‌ها کمک کند. واریانت دلتا (B.1.617.2)، نخستین بار در اکتبر ۲۰۲۰ در هند شناسایی شد و به سرعت در سراسر جهان گسترش یافت (۱۵-۱۷). این واریانت به دلیل قابلیت انتقال بسیار بالا و شدت بیماری‌زایی بیشتر، نگرانی‌های زیادی را به وجود آورد. در تحقیق حاضر، بررسی ژن SARS-CoV-2، نشان داد که همه ویروس‌های مورد بررسی SARS-CoV-2 شامل جایگزینی در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S* هستند که نوکلئوتید C با T جایگزین شده است که منجر به جایگزینی اسید آمینه His هیستیدین به Thy (p. His23525Thy) تیروزین شده است. تحلیل توالی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (مدل Swiss) نشان داد که این جهش‌ها قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نیستند. از این رو، ممکن است فرض بر این باشد که این جهش‌ها، با وجود تغییرات در اسیدهای آمینه، تأثیر قابل توجهی بر ساختار پروتئین اسپایک نداشته باشند. این نتیجه به معنای عدم تأثیر جهش‌ها بر پاسخ‌های ایمنی مرتبط با سیستم ایمنی است، زیرا گیرنده‌های مرتبط با سیستم ایمنی به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند. به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد که جهش‌ها احتمالاً تأثیر چندانی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس نداشته و احتمالاً باعث فرار از سیستم ایمنی توسط SARS-CoV-2 نمی‌شوند. با این حال، باید توجه داشت که تعامل پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 با گیرنده‌های خود روی سلول‌های انسانی ممکن است تحت تأثیر قرار بگیرد و این موضوع نیازمند بررسی‌های بیشتر است (۱۸). به طور معمول، جهش‌ها می‌توانند تأثیر مستقیمی بر تعامل پروتئین ویروسی با گیرنده‌های سلولی داشته باشند. همچنین، درست است که مدل Swiss با استفاده از الگوهای قبلی پروتئین‌ها، ساختار سه‌بعدی آن‌ها را نشان می‌دهد، اما این روش ممکن است با برخی اشتباهات همراه باشد و نتایج آن نمی‌تواند به‌طور مطلق برای شرایط واقعی صدق کند. بنابراین، بررسی ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک با استفاده از تکنیک‌هایی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس (۱۹)، ضروری است تا تأثیر جهش‌ها در واقعیت بررسی شود. این روش‌ها به ما امکان می‌دهند تا به طور دقیق تر و جزئی‌تر به ساختار پروتئین و تغییرات ناشی از جهش‌ها در آن پی ببریم. مدل Swiss یکی از الگوریتم‌های محاسباتی است که برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در حالی که این الگوریتم مفید و قدرتمند است، اما ممکن است با برخی از اشتباهات مواجه شود.. مدل Swiss معمولاً بر اساس الگوهای قبلی پروتئین‌ها، ساختار سه‌بعدی را پیش‌بینی می‌کند. اما در برخی موارد، این پیش‌بینی ممکن است با ساختار واقعی پروتئین مطابقت نداشته باشد. به عبارتی، ممکن است به دلیل

تغییرات و تنوع زیستی، الگوهای قبلی در تمامی موارد قابل استفاده نباشند. همچنین ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مانند pH، دما، نیروی یونی، محلول، و غیره قرار می‌گیرد (۲۰). الگوریتم‌های محاسباتی مانند Swiss معمولاً این تأثیرات را در نظر نمی‌گیرند و فرض می‌کنند که ساختار پروتئین در شرایط استاندارد را نشان می‌دهند. این ممکن است با واقعیت تفاوت داشته باشد. در بعضی موارد، مدل Swiss ممکن است در جزئیات جزیره‌های آمینو اسیدی کوچک شکست بخورد و ساختار دقیق را به طور کامل پیش‌بینی نکند. این اشتباهات به خصوص در بزرگنمایی و کوچک نمایی رشته‌های پروتئینی ممکن است رخ دهند. بنابراین، برای اطمینان حاصل کردن از صحت ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، استفاده از روش‌های تجربی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس که به طور مستقیم ساختار پروتئین را تعیین می‌کند، ضروری است. نکته قابل توجه در این مطالعه تعداد نمونه‌های مورد بررسی است. در خصوص محدودیت های تحقیق حاضر، باید گفت که در این مطالعه، ۷۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس تعداد بیماران بستری در دوره زمانی تحقیق حاضر انتخاب شد. با توجه به اینکه بیماری کووید-۱۹ به طور شدید در جوامع انسانی شیوع یافته است و تقریباً اکثر افراد را آلوده کرده و در برخی موارد عفونت‌های مکرر رخ می‌دهد، بررسی ۷۰ نمونه بیمار به دلیل محدودیت‌های نمونه گیری و جامعه مبتلادر یک منطقه، قادر به درک جامعی از کل کشور نخواهد بود. اما در عین حال، بررسی جمعیت‌های کوچک می‌تواند با تعیین نقشه راه، به محققان داده‌های بیشتری برای بررسی رفتارهای سیستم ایمنی در برابر ویروس ارائه دهد و در ترسیم مطالعات با اندازه‌های بزرگتر کمک کند. بررسی جهش‌های در ژن *S* می‌تواند به توسعه داروهای جدید برای مهار ویروس و کاهش عوارض بیماری کووید-۱۹ کمک کند. این شامل طراحی داروهایی است که قادر به تعامل موثر با نسخه‌های جدید ویروس باشند. و نیز بررسی جهش‌ها در ژن *S* می‌تواند به درک بهتر از پاسخ ایمنی بدن در برابر ویروس کووید-۱۹ کمک کند (۲۱).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان می‌دهد که جهش‌های مشاهده شده در نمونه‌های مثبت SARS-CoV-2، به ویژه جایگزینی نوکلئوتید C با T در موقعیت ۲۴۵۲۵ از ژن *S*، منجر به تغییر در سطح اسید آمینه (از هیستیدین به تیروزین) شده است. با این حال، تحلیل توالی پروتئین نشان می‌دهد که این تغییرات قادر به تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین اسپایک در SARS-CoV-2 نیستند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این جهش‌ها ممکن است تأثیرات خاصی بر عملکرد ویروس داشته باشند، اما به نظر نمی‌رسد که ساختار پروتئین اسپایک را به طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهند. تحلیل جهش‌های موجود در ژن *S* ویروس کووید-۱۹ به محققین کمک می‌کند تا تغییرات و تحولات این ویروس را بهتر درک کنند. بررسی جهش‌های این ژن، نشان می دهد که چگونه ویروس ممکن است تغییر کند و به نسخه‌های جدیدی تبدیل شود و لذا این اطلاعات برای توسعه و بهبود واکسن‌ها بسیار حیاتی است. واکسن‌ها باید به گونه‌ای طراحی شوند که بتوانند با این جهش‌ها سازگار شوند و همچنان ایمنی مؤثری را فراهم کنند. به عبارت دیگر، اگر بتوان پیش‌بینی کرد که ویروس چگونه تغییر می‌کند، می‌توانیم واکسن‌هایی طراحی نمود که در برابر این تغییرات مقاوم باشند و به این ترتیب، از شیوع بیشتر بیماری جلوگیری شود.

مراجع

1. Wu Y, Ho W, Huang Y, Jin D-Y, Li S, Liu S-L, et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. The Lancet. 2020;395(10228):949-50.

2. Mavrodiev EV, Tursky ML, Mavrodiev NE, Ebach MC, Williams DM. On Classification and Taxonomy of Coronaviruses (Riboviria, Nidovirales, Coronaviridae) with special focus on severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-Cov-2). bioRxiv. 2020:2020.10. 17.343749.

3.Verma T, Sinha M, Nitin B, Yadav SR, Shah K, Chauhan NS. A review on Coronavirus Disease and potentially active drugs targeting Coronavirus. Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ). 2021;5(2):110-20.

4.Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. The Malaysian journal of pathology. 2020;42(1):3-11.

5. Rabaan AA ,Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. Infez Med. 2020;28(2):174-84.

6.Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. Science China Life Sciences. 202.۲۸۰-۹۴:(۲)۶۵;۲

7.Tam D, Lorenzo-Leal AC, Hernández LR, Bach H. Targeting SARS-coV-2 non-structural proteins. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(16):13002.

8. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. Cells. 2021;10(4):821.

9. Dong Y, Dai T, Wei Y, Zhang L, Zheng M, Zhou F. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. Signal transduction and targeted therapy. 2020;5(1):237.

10. Lehrer S, Rheinstein PH. Sars-CoV-2 *orf1b* gene sequence in the *ntng1* gene on human chromosome 1. in vivo. 2020;34(3 suppl):1629-32.

11. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. International journal of infectious diseases. 2020;94:44-8.

12. Creecy A, Awosanya OD, Harris A, Qiao X, Ozanne M, Toepp AJ, et al. COVID-19 and bone loss: a review of risk factors, mechanisms, and future directions. Current Osteoporosis Reports. 2024;22(1):122-34.

13. Yu Z, Zhang J, Zhang Y, Cong X, Li X, Mostafa AM. Mathematical modeling and simulation for COVID-19 with mutant and quarantined strategy. Chaos ,Solitons & Fractals. 2024;181:114656.

14. Sarkar M, Madabhavi I. COVID-19 mutations: An overview. World Journal of Methodology. 2024;14(3):89761

15. Vieira DFB, Bandeira DM, Silva MANd, Almeida ALTd, Araújo M, Machado AB, et al. Comparative analysis of SARS-CoV-2 variants Alpha (B. 1.1. 7), Gamma (P. 1), Zeta (P. 2) and Delta (B. 1.617. 2) in Vero-E6 cells: ultrastructural characterization of cytopathology and replication kinetics. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2024;28(1):103706.

16. Alam MM, Hannan SB, Saikat TA, Limon MBH, Topu MR, Rana MJ, et al. Beta, delta, and omicron, deadliest among SARS-CoV-2 variants: a computational repurposing approach. Evolutionary Bioinformatics. 2023;19:11769343231182258.

17. Salah KT, Fadhil HY. Clinical Characteristics of the SARS-CoV-2 Alpha, Delta, Delta plus and Omicron Variants versus the Wild Type

in Iraqi Patients. Iraqi Journal of Science. 2023:4329-39.

18. Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. Viruses. 2022;14(3):640.

19. Lee J, Kenward C, Worrall LJ, Vuckovic M, Gentile F, Ton A-T, et al. X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation .Nature Communications. 2022;13(1):5196.

20. Chu W-T, Zheng Q-C. Conformational changes of enzymes and DNA in molecular dynamics: Influenced by pH, temperature, and ligand. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. 2013;92:179-217.

21. Park T ,Hwang H, Moon S, Kang SG, Song S, Kim YH, et al. Vaccines against SARS-CoV-2 variants and future pandemics. Expert review of vaccines. 2022;21(10):1363-76.

22. ntibiotic resistance profile of bacteria isolated from the most popular street food (Phuchka) in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 8 (2023), 361-369.

Mutation investigation frequency in SARS-CoV-2 positive patients

Mojdeh Lashkari[1], Ashraf Kariminik[1,2]* Mohammad Javad Soltani-Banavandi[1]

[1]Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

[2]Food and Agricultural Safety Research Center, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

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

Abstract

The outbreak of the coronavirus disease 2019, caused by the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2), has evolved into a global health crisis. The spike gene (S) is responsible for producing the spike protein, which helps the virus attach to and enter human cells. Mutations in this gene can have significant effects on the virus's transmissibility, disease severity, and the effectiveness of vaccines. The aim of the present study was to investigate the frequency of mutations in hospitalized patients infected with SARS-CoV-2. This study is descriptive cross-sectional research conducted on 70 COVID-19 patients admitted to Afzalipour Hospital in Kerman city. RNA was extracted from the respiratory samples of the subjects, and then cDNA was synthesized using a kit. The identification of the virus was performed using Cyber Green real-time PCR. Additionally, positive COVID samples were sequenced using the Sanger method, and the frequency of mutations in them was examined. All positive samples analyzed for SARS-CoV-2 included a substitution at position 24525 of the S gene, where nucleotide C was replaced by T, resulting in the substitution of the amino acid histidine with tyrosine. Protein sequence analysis using online software showed that these mutations caused changes in the amino acid level but were unable to alter the three-dimensional structure of the spike protein in SARS-CoV-2. Although mutations that do not affect the three-dimensional structure of proteins do not elicit a response from immune system-related receptors, examining these mutations could aid in the development of new drugs to inhibit the virus and reduce the complications of COVID-19.

Keywords: COVID-19, spike gene, mutation.

رهیاف های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ بهار ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد

نجمه مولوی*[1]، منوچهر مومنی شهرکی ۲، حسین خدابنده ی شهرکی ۱
۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

یرسینیا انتروکولیتیکا یک باکتری گرم منفی می‌باشد که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. این باکتری یک باکتری پاتوژن غذایی است که به طور عمده توسط گوشت، شیر و آب آلوده منتقل می‌شود. گوشت قرمز به شکل غیر بهداشتی از منابع عمده انتقال عفونت به *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی فراوانی ژن‌های حدت و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از گوشت قرمز عرضه شده به بازار شهرکرد انجام شد. تعداد ۳۸۴ نمونه از گوشت قرمز به شکل تصادفی از فروشگاه های عرضه گوشت در شهرستان شهرکرد اخذ و به منظور شناسایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی بررسی شدند. سویه‌های میکروبی جدا شده به منظور بررسی توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی شدند و ژن‌های حدت با آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. آلودگی در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط و ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف را نشان دادند. فراوانی ژن‌های *inv*، *ail*، *A yadA, yst* و *vir F* به ترتیب: ۸۳ درصد، ۴۱/۵۳ درصد، ۴۳ درصد، ۳۳/۸۴ درصد و ۲۹/۲۳ درصد گزارش شد. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین ژن‌های حدت و واکنش بیوفیلم قوی مشاهده گردید. با توجه به اهمیت گوشت قرمز در انتقال *یرسینیا انتروکولیتیکا* به انسان رعایت اصول بهداشتی و عدم مصرف گوشت آلوده، به کارگیری آزمون PCR به منظور شناسایی دقیق آلودگی در مواد غذایی توصیه می‌شود.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۱۱/۱
پذیرش:۱۴۰۳/۱۱/۲۲
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: ژن‌های حدت، گوشت قرمز، *یرسینیا انتروکولیتیکا*

* *نویسنده مسئول:* *Email*
Molavinajmeh15@gmail.com

مقدمه

جنس یرسینیا در خانواده انتروباکتریاسه طبقه بندی شده است. باکتری‌های این جنس بی‌هوازی اختیاری میله ای شکل و گرم منفی هستند و ممکن است متحرک یا غیر متحرک باشند. در این جنس ۱۱ گونه و ۵ بیوواریته تشخیص داده شده است. گونه *یرسینیا انتروکولیتیکا* از بیشترین اهمیت در مواد غذایی بر خوردار است. این باکتری سومین عامل ایجاد کننده اسهال بعد از سالمونلا و کمپیلو باکتر در انسان می‌باشد. این ارگانیسم در دمای کمتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد متحرک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غیر متحرک می باشد. این ارگانیسم یکی از باکتری‌های بیماری زای سرمادوست می‌باشد. رشد یرسینیاها در دامنه حرارتی ۲ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است و درجه حرارت اپتی‌مم رشد آن‌ها بین ۴۲ تا ۴۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.. رشد این باکتری‌ها در شیر دردمای ۲-۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۲۰ روز و هم‌چنین در گوشت خوک و جوجه در دمای ۱-۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردیده است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* پس از ۳-۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد از بین می‌رود. این ارگانیسم در مقابل انجماد نسبتا مقاوم است. سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* در دمای ۶۲/۸ درجه سانتی‌گراد در شیر به مدت ۱۷-۱ ثانیه مقاومت می نمایند. این گونه به‌طور گسترده ای درخاک، دریاچه های اب شیرین، چاه و رودخانه ها وجود دارد.. این باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد یک انتروتوکسین پایدار در مقابل حرارت تولید می‌کند. که در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۱۰ دقیقه تحمل می‌کند (۱). در سال ۱۸۹۴ الکساندر یرسین باکتری شناس فرانسوی، این باکتری را در یک بیماری همه گیر شده در هنگ کنگ جدا نمود و به احترام پاستور آن را *پاستورلا* پستیس نامید. هم زمان با این کشف، دانشمند ژاپنی کیتازاتو نیز به این باکتری دست یافت ولی یرسین قبل از او به انتشار کشف خود دست زد و این افتخار را نصیب خود کرد (۲). بعدها به علت داشتن خواص بیوشیمیایی مشترک مانند تخمیر قند گلوکز، نیترات مثبت بودن، متحرک بودن، تحمل املاح صفراوی و شباهت ژنتیکی با خانواده‌ی انتروباکتریاسه این جنس در خانواده‌ی انتروباکتریاسه طبقه بندی شد. یرسینیاها باکتری‌های کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری میله‌ای گرم منفی، هستند. بنابراین طبقه‌بندی آن‌ها در خانواده انتروباکتریاسه تائید می‌گردد. در ابتدا این باکتری را *باکتریوم انتروکولیتیکوم* نامیدند. علت انتخاب نام انتروکولیتیکا به این دلیل است که این‌گونه در رابطه با روده و کولون می‌باشد (۲). *یرسینیا انتروکولیتیکا* از جوندگان و حیواناتی مانند گاو، گوسفند، خوک، سگ و گربه و آب‌های آلوده توسط آن‌ها، به دست آمده است. این باکتری احتمالاً از طریق خوردن غذا، آب و تماس با وسایل آلوده به انسان منتقل می‌شود. ارتباط بیماری در نتیجه خوردن غذای آلوده به *یرسینیا انتروکولیتیکا* کاملاً مشخص شده است. تمام مواد غذایی نگهداری شده در محل سرد (یخچال)، در محل تولید یا در منزل امکان ایجاد بیماری را دارا می‌باشد (۴). *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت خوک، گاو، مرغ، ماهی، صدف و هم چنین سبزیجات (از جمله کاهو، اسفناج، شاهی و کاسنی) جدا شده است. *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ارتباط با گوشت خوک می‌باشد. سروتیپ O:3 در خوک معمول می-باشد (۸-۵).

فاکتورهای بیماری‌زای یرسینیا پروتئین‌هایی هستند که موجب اتصال و داخل شدن این باکتری به سلول‌های اپیتلیال می‌شوند. *یرسینیا انتروکولیتیکا* پروتئین ۱۰۸ کیلو دالتونی را بیان می‌کند که موجب می‌شود *یرسینیا انتروکولیتیکا* توانایی تهاجم به سلول‌های میزبان را داشته باشد (۲). این پروتئین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به تعداد زیاد بیان می‌شود و احتمالا مهم‌ترین فاکتور تهاجم به پلاک های پیر می‌باشد. این باکتری هم چنین پروتئین‌های ۱۵ کیلو دالتونی را بیان

می‌کند. که به باکتری اجازه ورود به سلول‌های میزبان را می-دهد. پروتئین‌های تولید شده توسط این باکتری از جنس فیبریل هستند که توسط پلاسمید کد می‌شوند و با اتصال به فیبرونکتین وکلاژن به *یرسینیا انتروکولیتیکا* امکان تهاجم به اپیتلیوم روده را می‌دهد. این باکتری از مواد غذایی مانند: شیر، سبزیجات، گوشت‌های بسته بندی شده در خلاء و فراوردهای دریایی جدا شده است. در نمونه‌های ترشحات عفونی (رنگ-آمیزی به روش وایسون) این باکتری بیماری‌زا به صورت باکتری دو قطبی به رنگ آبی پررنگ و مرکز آن به رنگ آبی روشن دیده می‌شود که نمایی شبیه سنجاق قفلی دارد. مهم-ترین انواع بیماری‌زای این باکتری شامل: *پرسینیا پستیس*، *پرسینیا پسود و توبرکلوریس و پرسینیاانترکولیتیکا* می‌باشد (۴).

اولین مرحله عفونت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در روده کوچک اتصال به سلول‌های M پلاک‌های پیر است. دراین مرحله چندین ژن حائز اهمیت می‌باشند. یکی از آن‌ها ژنی به نام *inv* می‌باشد که پروتئین سطحی به نام Invasion را کد می‌کند. علت نامگذاری این ژن این است که که سلول‌های تولید کننده Invasion می‌توانند به سلول‌های کشت بافت متصل شده و آن را مورد تهاجم قرار دهند. هم چنین بررسی‌های اتصال و تهاجم به سلول‌های کشت بافت به وسیله‌ی لوکوس دیگری به نام *ail* (لوکوس اتصال و تهاجم) شناسایی شده است. ژن *inv* به طور ترجیحی در ۲۰ درجه سانتی گراد بیان می گردد. اما در ۳۷ درجه سانتی گراد بیان نمی‌شود. نقش اصلی این پروتئین محافظت باکتری در برابر کشته شدن توسط کمپلمان است. اثبات شده که ژن *yadA* (چسبنده A یرسینیا) مهم‌ترین شاخص بیماری‌زایی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مرحله اولیه عفونت ریه می‌باشد. فعالیت‌های *yadA* به شرح زیر است (۱۰-۸).

بیماری‌های منتقله از راه غذا یکی از مشکلات بسیار مهم در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشند. از آن‌جا که در شهرستان شهرکرد تا کنون تحقیقی در زمینه جداسازی سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت قرمز، تعیین فراوانی فاکتورهای حدت این سویه ها و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت صورت نگرفته است در این تحقیق بر آن شدیم تا میزان آلودگی به این باکتری را برآورد کنیم و ضمن تعیین میزان شیوع سروتیپ O3 فاکتورهای حدت و ارتباط بین تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت را در این سویه ها بررسی شد.

روش کار

جداسازی باکتری از گوشت

در این تحقیق به منظور جستجوی *یرسینیا انتروکولیتیکا* درگوشت قرمزعرضه شده در سطح شهرستان به روش خوشه ای- تصادفی شهرستان شهرکرد نمونه گیری صورت گرفت. نمونه ها شامل ۳۸۴ نمونه ی گوشت کاو، گوسفند و یز می-باشد که در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید..

جهت تشخیص میکروبی *یرسینیا انتروکولیتیکا* از گوشت قرمز، ۲۵ گرم نمونه گوشت، با تیغ بیستوری در شرایط کاملا استریل به لایه های بسیار نازک بریده شد و سپس به ۲۲۵ سی سی فسفات بافر سالین با pH=۷/۲ اضافه و به مدت دو هفته در دمای یخچال سرماگذاری شد. روز چهاردهم یک سی سی از سوسپانسیون غنی شده با ۹ سی سی پتاس ۲۵٪ با یک همزن برقی به مدت ۳۰ ثانیه کاملا مخلوط گردید و سپس یک لوپ از این مخلوط بر روی محیط کشت انتخابی-افتراقی CINagar (cefsulodin-Irgasan Novobiocin) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه انکوبه شد. پس از انجام رنگ آمیزی گرم روی کلنی‌های مشکوک و مشاهده باسیل‌های کوچک گرم منفی در آن‌ها، آزمایش‌های افتراقی جهت تعیین بیوتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* صورت گرفت. در محیط CIN agar کلنی باکتری‌های یرسینیا

به رنگ قرمز پر رنگ و به قطر ۴-۲ میلی متر مشاهده می-گردند (۱۱).

بررسی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

به‌منظور بررسی تولید بیوفیلم توسط باکتری از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را داشته باشند در انتها باقی مانده و به رنگ بنفش دیده می‌شوند و باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سطوح را نداشته باشند، از سطح حذف می‌شوند. جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. ایزوله‌هایی که OD مساوی یا بالاتر از ۰/۳ داشته باشند به عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که OD بین ۰/۲ تا ۰/۲۹۹ داشته باشند به‌عنوان بیوفیلم متوسط، درصورتی‌کهOD بین ۰/۱ تا ۰/۱۹۹ دارا باشند به عنوان بیوفیلم ضعیف و در صورتی‌که OD کمتر از ۰/۱ داشته باشند بیوفیلم منفی نظر گرفته می‌شوند (۱۲)

آزمایش PCR جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا*

جهت تشخیص قطعی *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر روی تمامی نمونه هایی که از نظر کشت مثبت تشخیص داده می-شوند، در حضور زوج پرایمر های طراحی شده زیر واکنش PCRانجام می‌شود. مشاهده باند ۳۶۱ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد (۱۳)

Y.ent: ACCTTTGTGATTGACGTTACTCGC
Y.ent: CAAGTCGACATCGTTTACAGCG

آزمایش PCR جهت تعیین سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا*

آزمایش PCR جهت تشخیص سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا* با استفاده از زوج پرایمرهای Yer-F و Yer-R انجام شد (۱۴).

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت سروتیپ O:3 *یرسینیا انتروکولیتیکا*

اندازه ی محصول جفت باز	توالی پرایمر	ژن
۴۰۵	Yer O3-F:CGCATCTGGGACACTAATTCG Yer O3-R:ACGAATTCCATCAAAACCACC	*rfbC*

آزمایش PCR جهت ردیابی حضـــور ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

به منظور ردیابی حضور ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز، آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول انجام می‌شود..

جدول (۲): توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سویه های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (۵′–۳′)	اندازه ی محصول جفت باز
inv	*Yc1* *Yc2*	CTGTGGGGAGAGTGGGGAA GTTTGG GAACTGCTTGAATCCCTGA AAACCG	۵۷۰
ail	*Ail1* *Ail2*	ACTCGATGATAACTGGGGA G CCCCCAGTAATCCATAAAG G	۱۷۰
ystA	*Pr2a* *Pr2c*	AATGCTGTCTTCATTTGGAG CA ATCCCAATCACTATGACTTC	۱۴۵
virf	*Virf1* *Virf2*	TCATGGCAGAACAGCAGTC AG ACTCATCTTACCATTAAGA AG	۵۹۰
yad A	yad A1 yad A2	CTTCAGATACTGGTGTGCG CTGT ATGCCTGACTAGGAGCGAT ATCC	۸۴۹

یافته ها

در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و تست‌های بیوشیمیایی از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. در محیط CIN agar کلنی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* به رنگ قرمز پر رنگ و به قطر ۴-۲ میلی متر مشاهده گردید. آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین نوع گوشت و آلودگی با *یرسینیا انتروکولیتیکا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید.

جدول (۳): فراوانی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه های گوشت قرمز

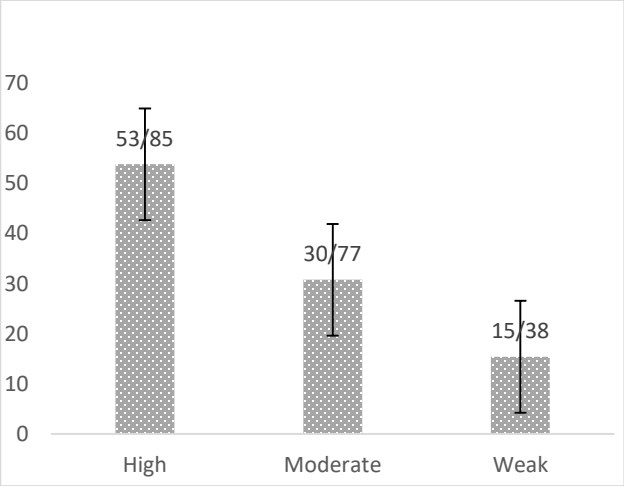
نوع نمونه	**تعداد نمونه اخذ شده**	**تعداد موارد مثبت**	**درصد**
گوشت گاو	۱۲۸	۱۸	۲۷/۶۹
گوشت گوسفند	۱۲۸	۲۲	۳۳/۸۴
گوشت گوساله	۱۲۸	۲۵	۳۸/۶۴
مجموع	۳۸۴	۶۵	۱۶/۹۲

تایید ایزوله ها با روش PCR

در آزمون PCR تمامی نمونه های مثبت شده در کشت در حضور پرایمر اختصاصی طراحی شده مورد بررسی قرار گرفتند که در تمامی موارد باند ۳۷۲ جفت بازی مشاهده گردید. سروتیپ **O:3** در ۳۰ ایزوله (۴۶/۱۵ درصد) از نمونه ها با داشتن باند ۴۰۵ جفت بازی مثبت گزارشدند.

نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

روش میکروتیتر پلیت به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم ۶۵ ایزوله *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز استفاده شد، که براساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط و ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف را نشان دادند. واکنش بیوفیلم منفی در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نگردید.



نمودار (۱): نتایج مربوط به آزمایش بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

ردیابی ژن‌های حدت

بیشترین فراوانی مربوط به ژن *inv* (۸۳ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به ژن *virF* (۲۹/۲۳ درصد) بود. نتایج در جدول (۴) نشان داده شده است.

جدول (۴) فراوانی ژن‌های حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

ژن	*inv*	*ail*	*ystA*	*yadA*	*virF*
تعداد	۵۴	۲۷	۲۸	۲۲	۱۹
درصد	۸۳	۴۱/۵۳	۴۳	۳۳/۸۴	۲۹/۲۳

فراوانی ژن‌های *inv*، *ail*، *yst A*، *yadA* و *vir F* و در ایزوله هایی که بیوفیلم قوی تولید می‌کردند به ترتیب: ۵۹/۲۵ درصد، ۷۷/۷۷ درصد، ۸۲/۱۴ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۸۷/۹۴ درصد گزارش گردید و در ایزوله هایی که بیوفیلم متوسط تولید می‌کردند به ترتیب: ۲۹/۶۲ درصد، ۱۸/۵۱ درصد، ۲۸/۱۴ درصد، ۹/۳۷ درصد و ۲۱/۰۵ درصد گزارش گردید. هم‌چنین در ایزوله هایی که بیوفیلم ضعیف تولید می‌کردند به ترتیب: ۹/۲۵ درصد، ۳/۷۰ درصد، ۳/۵۷ درصد، ۳/۱۲ درصد و ۵/۲۶ درصد گزارش گردید.

جدول (۵): فراوانی ژن‌های حدت در ایزوله های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر اساس واکنش بیوفیلم

ژن‌های ویرولانس	واکنش بیوفیلم		
	قوی	متوسط	ضعیف
Inv	۳۲	۱۶	۵
	۵۹/۲۵	۲۹/۶۲	۹/۲۵
Ail	۲۱	۵	۱
	۷۷/۷۷	۱۸/۵۱	۳/۷۰
ystA	۲۳	۴	۱
	۸۲/۱۴	۱۴/۲۸	۳/۵۷
yadA	۲۸	۳	۱
	۸۷/۵	۹/۳۷	۳/۱۲
virF	۱۵	۴	۱
	۸۷/۹۴	۲۱/۰۵	۵/۲۶

براساس آزمون کای دو بین واکنش بیوفیلم قوی و ژن-های *inv, ail, virF, yst A* و*yadA* رابطه آماری معنادار آماری گزارش گردید (p-value<0.05)

بحث

میکروب‌ها تغییرات مطلوب و نامطلوب در مواد غذایی پدید می آورند. تغییرات نامطلوب سبب آلودگی مواد غذایی و در نهایت فساد مواد غذایی می‌گردد. فساد عبارت است از هر نوع تغییر در طعم، بو، بافت یا ظاهر ماده غذایی که آن را نامطبوع و بدمزه می‌کند. فساد مواد غذایی مسئله اکولوژیک است. بسیاری از مواد غذایی تحت شرایطی که آلودگی با انواع میکروب‌ها را فراهم می‌سازد تهیه یا تولید می‌شود و رشد انواع میکروب‌ها به ترکیب مادۀ غذایی و شرایط انبار کردن بستگی دارد. میکروب‌هایی که قادر به رشد هستند ویژگی‌های متابولیکی غذا را تغییر داده و طعم، بو، بافت و ظاهر فرآورده را دگرگون می‌سازند. فرآورده های حیوانی دارای میکروب‌های درونی بوده و هم‌چنین توسط محیط و انسان آلودگی پیدا می‌کنند. هرگاه حیوان به طرز بهداشتی ذبح گردد بخش درونی گوشت آن عاری از میکروب است. سطح بدن حیوان که در معرض هوا قرار می‌گیرد به وسیله ی میکروب‌های پوست و روده، وسایل کشتن و هوای کشتارگاه آلوده می‌گردد. گوشت ماهی و مرغ نیز با انواع میکروب‌ها پوشیده شده به خصوص هنگامی‌که آن را تمیز کرده و بر روی تخته آلوده خرد می کنند آلودگی آن افزایش پیدا می‌کند. میکروب‌های مختلفی درون گوشت قادر به رشد هستند یک دسته ازاین باکتری‌ها *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشد (۴). *یرسینیا انتروکولیتیکا* یک پاتوژن گرم منفی رایج منتقله از طریق مواد غذایی که در آب، فرآورده های لبنی و گوشت یافت می‌گردد. این پاتوژن یکی از رایج‌ترین عوامل التهاب دستگاه گوارش

ناشی از مواد غذایی در غرب و اروپای شمالی است و دارای بروز فزاینده ای در ایالات متحده و کانادا است. شیوع بیماری-های منتقله از مواد غذایی توسط *یرسینیا انتروکولیتیکا* تقریباً با تمام سروتیپ‌های بیماری‌زا همراه است. سروتیپ O:8 خاصیت ذاتی عفونی فاجعه باری برای انسان به همراه دارد در حالی‌که سروتیپ‌های O:3, O:9 مرتبط با موارد خفیف‌تر هستند (۳-۱).

مطالعه ی حاضر برآوردی از شیوع *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت قرمز، شناسایی سویه های تولید کننده ی بیوفیلم و بررسی حضور ژن‌های حدت این باکتری و ارتباط بین توانایی تولید بیوفیلم و فاکتورهای حدت در این باکتری بود. با توجه به این که مسئله بهداشت غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است مشابه چنین تحقیقی در کشورهای مختلف و هم‌چنین در ایران صورت گرفته است و محققین توانسته اند باکتری‌های مختلفی که از طریق مواد غذایی انتقال می یابند همانند یرسینیا، سالمونلا و *کمپیلو باکترژژونی* را از مواد غذایی جدا نمایند (۸).

یافته‌های دیگر محققان حاکی از آن است که *یرسینیا انتروکولیتیکا* شایع‌ترین گونه ی یرسینیا در گوشت قرمز و مرغ است. سویه های پاتوژن یرسینیا حامل پلاسمید ۷۰ کیلو جفت بازی هستند که pYVنامیده می‌شود. و باعث کد شدن ژن‌های *virF, yadA, tccC, ysa* می‌گردد. یا این که با دارا بودن ژن‌های کروموزومی *inv, ail, yst* بیماری‌زایی خود را اعمال می‌کنند (۱۴).

بعضی از سویه های پاتوژن فاقد پلاسمید ویرولانس می-باشند، این دسته از باکتری‌ها با دارا بودن ژن *ystA* باعث کد شدن انتروتوکسین مقاوم به حرارت می‌گردند. درکشت‌های سلولی مشخص گردیده که این ژن در تهاجم باکتری به سلول‌های پستانداران نقش دارد. از طرف دیگر محققین نشان داده ند که علت اسهال در عفونت‌های ناشی از *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود ژن *yst* می باشد (۹)

در این تحقیق و تحقیقات مشابه ژن‌های *ail*، *yst* و *inv* که ژن‌های کروموزومی هستند و در تمامی سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* وجود دارند مورد بررسی قرار گرفتند. این نکته شایان ذکر است که ژن‌های *virF* و *yadA* از جمله ژن‌های پلاسمیدی *یرسینیا انتروکولیتیکا* می‌باشند. مشخص گردیده ژن *virF* نقش تنظیمی در پلاسمید ویرولانس دارد اگرچه ممکن است این پلاسمید در اثر کشت‌های مکرر از بین برود. بیان ژن *yadA* در باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* توانایی اتصال باکتری به سطوح سلول میزبان را افزایش می‌دهد از طرف دیگر به باکتری این امکان را می‌دهد که از دسترس سیستم کمپلمان و سایر اجزای سیستم ایمنی فرار کند (۱۳). با توجه به اهمیت این ژن‌ها در ویرولانس باکتری در این تحقیق بر آن شدیم تا به فراوانی این ژن‌ها بپردازیم.

همان‌گونه که در قسمت نتایج بیان گردید، از مجموع ۳۸۴ نمونه گوشت قرمز از در ۶۵ نمونه (۱۶/۹۲ درصد) *یرسینیا انتروکولیتیکا* جداسازی شد. آلودگی به *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت گاو (۲۷/۶۹ درصد)، در گوشت گوسفند (۳۳/۸۴ درصد) و در گوشت گوساله (۳۸/۶۴ درصد) گزارش گردید. که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین نوع گوشت و آلودگی با *یرسینیا انتروکولیتیکا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید. وجود لایه ی لزج و چسبناک سطحی به صورت کپسول در سطح سلول باکتری باعث مقاوم شدن باکتری به فاگوسیتوز می‌گردد. وجود پلی ساکارید خارج سلولی توسط باکتری باعث تشکیل بیوفیلم می‌گردد. این ساختار در ایجاد عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها بسیار مؤثر است. بیوفیلم نه تنها میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می‌کند بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است. اصولا باکتری‌ها وقتی تشکیل بیوفیلم می‌دهند مقاومت آن‌ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می‌شود و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می‌کنند و از مواد متابولیکی یکدیگر

مصرف مِی‌کنند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد هستند ولی پایداری ژنتیکی در آن‌ها بیشتر است و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر می‌باشند. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌کند. بیوفیلم باکتریایی، جامعه ای از باکتری‌های چسبنده و رشد کننده بر سطوح جاندار یا بی جان محصور در یک ماتریکس پلی ساکاریدی می‌باشد. در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک باشد. ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم متشکله دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی کننده ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم، بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. تصور می‌شود که تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم‌های متشکله دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها هم‌چنین حفظ و نگهداری محیط فیزیکوشیمیایی مناسب برای رشد و بقا، بنابراین آن‌ها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی بیوفیلم باکتری-ها نسسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد (۱۲).

در این تحقیق در روش میکروتیتر پلیت از ۶۵ ایزوله *یرسینیا انتروکولیتیکا* جدا شده از نمونه های گوشت قرمز استفاده واکنش بیوفیلم قوی در ۳۵ ایزوله (۵۳/۸۵ درصد)، واکنش بیوفیلم متوسط در ۲۰ ایزوله (۳۰/۷۷ درصد) و واکنش بیوفیلم ضعیف در ۱۰ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده گردید. فراوانی ژن‌های *inv*،*ail*، *yst A*, *yadA* و *vir F* در ایزوله هایی که بیوفیلم قوی تولید می‌کردند نسبت به ایزوله هایی که بیوفیلم متوسط و ضعیف تولید می-کردند بیشتر گزارش شد.

Thoerner و همکاران درسال ۲۰۰۳ در مطالعه ایی که بر روی ۱۴۰ سویه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از منابع مختلف انجام دادند، نشان دادند، بیوتیپ‌های **1B, 2, 3, 4** مربوط به انواع بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از انسان و حیوانات می‌باشند و بیوتیپ 1A در انواع غیربیماری‌زای انسانی *یرسینیا انتروکولیتیکا* مشاهده می‌شود. در این تحقیق از ۵۳ باکتری جدا شده از حیوانات ۴۶ مورد (۸۷ درصد) از خوک جدا شده بود که مربوط به بیوتیپ‌های بیماری‌زا بود. ۲ بیوتیپ از بز، ۴ بیوتیپ از سگ و ۵ بیوتیپ 1A از گاو و سگ جداشده بود. تحقیقات آن‌ها نشان داد، که سروتیپ‌های **O:3** و **O:9** شایع‌ترین سروتیپ‌ها در انواع بیماری‌زای انسانی می‌باشند. به طوری‌که از ۴۲ مورد *یرسینیا انتروکولیتیکای* انسانی ۱۶ مورد مربوط به سروتیپ **O:3**، ۱۱ مورد **O:9** و ۱۵ مورد سروتیپ‌های دیگر تشخیص داده شدند. جهت بررسی وجود ژن‌های ویرولانس مشخص گردید ۸۰ درصد از استرین‌های بیوتیپ 1A که با موارد غیر بیماری‌زای انسانی ارتباط دارند فقط از نظر ژن *inv* مثبت می‌باشند. در صورتی که در استرین های بیوتیپ ۲ در ۶۶ درصد موارد از نظر ژن‌های *ydA, ail* و *virF* مثبت می‌باشند. در بیوتیپ ۳، ۷۳ درصد موارد از نظر ژن در *virF* مثبت می‌باشند در صورتی‌که *yadA* در این نمونه ها منفی گزار ش گردید در استرین‌های بیوتیپ ۴، ۴۶ درصد موارد از نظر ژن‌های *ystB* و *ail* مثبت تشخیص داده شدند (۱۵).

در بررسی انجام شده توسط Zheng و همکاران در ۲۰۰۸ که بر روی ۱۶۰ نمونه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از مدفوع انسانی صورت گرفت، فراوانی ژن‌های *inv virF,*,

yadA,ystA,ail به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد، ۸۹ درصد و ۸۲ درصد گزارش گردید (۱۴).

در مطالعه انجام شده توسط Waneet و همکاران که با هدف رد یابی ژن *ail* بر روی ۲۱۵ سویه بالینی یرسینیا و ۴۰ سویه از سایر گونه های باکتریایی انجام شد، ژن *ail* در بیوتیپ‌های بیمار زای 1B, 2, 3, 4,5 مشاهده گردید و بیوتیپ‌های 1A فاقد ژن *ail* بودند (۱۶).

در مطالعه ی انجام شده توسط Niskanen و همکاران درسال ۲۰۰۳ در سوئد که بر روی ۴۶۸ نمونه مدفوع از ۵۸ گونه ی مختلف از پرندگان مهاجر انجام شد، ۱۲/۸٪ از گونه های یرسینیا از نمونه ها جداسازی شدند. بیشترین گونه ی یرسینیای جدا شده *یرسینیا انتروکولیتیکا* با ۵/۶ درصد گزارش گردید. در این بررسی ۱۰ نمونه *یرسینیا انتروکولیتیکای* جدا شده از غاز دارای سروتیپ **O:3** بودند که عامل بیماری های انسانی می‌باشند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت که وجود تمامی ژن‌های ویرولانس در سویه های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* ضروری نمی‌باشد به طوری‌که بعضی از این سویه ها ممکن است فاقد چندین ژن ویرولانس باشند و بیماری‌زایی خود را از طریق فاکتورهای ناشناخته دیگر اعمال نمایند (۱۷).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Thisted انجام شد نشان دادند که خوک‌ها به عنوان مخزن اصلی *یرسینیا انتروکولیتیکای* منتقله از غذا هستند. آن‌ها گوشت خوک را از یخچال و مغازه‌های محلی که توسط بیماران مبتلا به یرسینیوز خریداری شده بودند جمع آوری کردند و برای بررسی حضور گونه های یرسینیا مورد بررسی قرار دادند. از مجموع ۱۱۸ نمونه از محصولات گوشت خوک (۹۱ نمونه خام و ۲۷ نمونه آماده به مصرف) در ۹ مورد (۹/۸۹٪) از گوشت-های خام خوک گونه ی پاتوژن یرسینیا شناسایی شدو سروتیپ **O:3** *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۶ مورد به روش *PCR* شناسایی شد (۱۸).

از نظر تئوری چنین به نظر می‌رسد که سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* باید واجد تمامی ژن‌های ویرولانس (کروموزمی و پلاسمیدی) باشند ولی تحقیقات مختلف نشان داد که تنها ژن *inv* در تمامی سویه های پاتوژن وجود دارد و بقیه ژن‌های ویرولانس به میزان کمتری وجود دارند یا اصلا وجود ندارند. بنابراین برای ایجاد بیماری‌زایی توسط این باکتری وجود تمامی ژن‌های ویرولانس ضروری نمی‌باشد و چگونگی ایجاد بیماری توسط این باکتری به بیوتیپ و سروتیپ این باکتری بستگی دارد. بنابراین این نکته بدیهی است که سویه های پاتوژن *یرسینیا انتروکولیتیکا* دارای ژن-های ویرولانس ناشناخته دیگر باشند که بر روی پلاسمید یا کروموزم واقع شده اند. استرین‌های بیوتیپ 1A که برای انسان بیماری‌زایی ندارند. ممکن است فاقد فاکتورهای ویرولانس باشند از این رو غیر بیماری زا می‌گردند. هر چند تحقیقات دیگر انجام شده توسط محققین دیگر نشان داده که بعضی از استرین‌های بیوتیپ 1A از نظر وجود ژن *ystB* مثبت هستند.

با توجه به نتایج به دست آمده که حاکی از حضور *یرسینیا انتروکولیتیکا* در گوشت قرمز می‌باشد و نیز از آن‌جایی که این باکتری به راحتی از طریق غذا قابل انتقال بوده و به راحتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال رشد می‌کند. لذا توصیه می-گردد که مسئولین بهداشتی کشور توجه خاصی به این مسئله مبذول داشته تا از خطرات بهداشتی و اقتصادی آن جلوگیری به عمل آید.

.

.

.

مراجع

1- Alenizi D, Ringwood T, Redhwan, A, Bouraha B, Wren BW, Prentice M. All *Yersinia enterocolitica* are pathogenic: Virulence of phylogroup 1 *Y. enterocolitica* in a Galleria mellonella infection model. Microbiol. 2016; 162 (8): 1379-1387.

2- Altrock A, Seinige D, Kehrenberg C. *Yersinia enterocolitica* isolates from wild boars hunted in lower saxony, Germany. Appl and Environ Microbiol. 2015; 81(14): 4835–4840.

3- Bancerz KA, Lipczynska-Ilczuk K. Evaluation of the correlation between the mRNA expression Levels of *ystA* and *ymoA* genes in *Y. enterocolitica* strains with different enterotoxic properties. Pathogens. 2021; 10 (9): 1136. 1150.

4- Bancerz KA, Szczerba TA, Platt SA, Michalczyk M, Szweda W. Characterization of ail-positive *Yersinia enterocolitica* of different biotypes using HRMA. Int J Food Microbiol. 2018; 269: 46–51.

5- Bari ML, Hossain MA, Isshiki K. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. J Pathogens. 2011; 54 (2): 1-12.

6- Bancerz A, Szczreba A, platt A. Isolation, Biotyping and serotping of *Yersinia entercoliica*, Bull Vet Inst pulawy. 2011; 55: 39-43.

7- Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersina pseudotuberculosis* detection in food. J path. 2011; 45 (4): 56-67.

8- Juliana P, Falcao DP, Andre PS, Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol. 2006; 55 (2): 1539–1548.

9- Lambertz ST, Nilsson CH, Lindblad M. Real – time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, Applied and Environmental Microbiology. 2008. 74(19):6060-6067

10- Thisted lambertz S, Danielsson TN, Idenrification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 3674-3681.

11- Thoemer P, Kingombe C, Eissig CB. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberclosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 1810-1816.

12- Bottone EJ. *Yersina enterocolitica* overview and epidemiologic correlates, Microbes infect. 1999; 1(4): 323-30.

13- Aulisiso CC, Stanfield JT. Evaluation of virulence factor testing and Characteristics of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica* infect. 1983; Immune. 40:300-335

14- Zheng, H, Sun Y. 2008, Investigation of virulence gence in slinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. Med Microbiol. 2008; 53 (2): 368-374.

15- Thoemer P, Kingombe C, Eissig-Choisa B. PCR Detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberclosis* and investingation of virulence gene distribution. Appl Environ Microb. 2003; 69: 1810-1816.

16- Wannet WJ, Ressinj M. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2001. 39(2): 4483-7786.

17- Niskanen T, waldnstrom J, Fredriksson M. Vir F positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. Appl Environmen Microbiol. 2003; 69: 4670-4675.

18- Thisted lS, Danielsson N. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR. Appl and

Environmental Microbiology. 2005; 71: 3674-3681.

Relationship between biofilm production and virulence factors in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from red meat in Shahrekord city

Najma Molavi[1]*, Manouchehr Momeni[2], Hussein Khodabandeh[1]

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

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

Corresponding Author: Molavinajmeh15@gmail.com

Abstract

Yersinia enterocolitica is a gram-negative bacterium that belongs to the Enterobacteriaceae family. This bacterium is a food pathogenic bacterium that is mainly transmitted by contaminated meat, milk and water. Unsanitary meat is one of the main sources of *Yersinia enterocolitica* infection to humans. The present study was conducted with the aim of investigating the frequency of virulence genes and the relationship between biofilm production and virulence factors in *Yersinia enterocolitica* isolates isolated from meat supplied to Shahrekord market. 384 samples of red meat were randomly collected from meat supply stores in Shahrekord city and analyzed by biochemical and molecular methods in order to identify *Yersinia enterocolitica*. The isolated microbial strains were investigated in order to investigate the biofilm production ability by microtiter plate method and the virulence genes were investigated by PCR test. From a total of 384 red meat samples, *Yersinia enterocolitica* was isolated from 65 samples (16.92%). Contamination was reported in beef (27.69%), mutton (33.84%) and veal (38.64%). 35 isolates (53.85%) showed strong biofilm reaction, 20 isolates (30.77%) showed moderate biofilm reaction and 10 isolates (15.38%) showed weak biofilm reaction. The frequencies of *inv*, *ail*, *yadA*, *ystA* and *virF* genes were reported as: 83%, 41.53%, 43% 33.84% and 29.23%, respectively. In the statistical analysis with Chi-square test, a significant relationship was observed between virulence genes and strong biofilm reaction. Considering the importance of red meat in the transmission of *Yersinia enterocolitica* to humans, it is recommended to follow the hygiene principles and not to consume contaminated meat, to use the PCR test in order to accurately identify the contamination in food.

Key words: Meat, Virulence genes, *Yersinia enterocolitica*,.

رهیاف های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

غذایی سیانوباکتر *اسپیرولینا*: یک افزودنی فراسودمند برای مواد

فاطمه شایسته[۱]* ، دکتر علی شریف زاده[۲]، سارا آرتی[۳]

۱.- دبیر آموزش و پرورش ، وزارت آموزش و پرورش ، بروجن، ایران
۲-گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳- کارشناس امور پژوهشی ، دانشگاه علوم پزشکی، اصفهان ، ایران

چکیده

برخی از سیانوباکترها به دلیل وجود تعادل در ترکیبات شیمیایی، از منابع زیستی مهم در تولید محصولات غذایی محسوب گردیده و می‌توانند به عنوان بهبود دهنده و بالابرنده‌های ارزش تغذیه‌ای غذاها در انسان و دام مورد استفاده قرار گیرند. *اسپرولینا پلاتنسیس* غنی‌ترین افزودنی به لحاظ پروتئین، برخی ویتامین‌ها خصوصا ویتامین B12 و پیش‌ساز ویتامین A، مواد معدنی به خصوص آهن و کلسیم و دیگر ترکیبات فعال زیستی از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، رنگدانه مهم طبیعی فایکوسیانین، اسیدهای چرب ضروری مانند گامالینولینیک اسید می‌باشد. این سیانوباکتر از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان "غذای برتر" و هم‌چنین به عنوان "بهترین راه‌حل برای فردا" معرفی گردیده‌است. فواید و برتری این سیانوباکتر نسبت به سایر منابع گیاهی غذایی و دیگر جلبکها به همراه نداشتن دیواره‌سلولی سلولزی باعث گردیده که جذب مواد مغذی آن راحت‌تر صورت گرفته و در بهبود ارزش فراورده‌های غذایی سالم نقش متمایزی ایجاد نماید. در این پژوهش به بررسی خواص دارویی و نقش و اهمیت این سیانوباکتر در ارتقاء ارزش تغذیه ای غذاها پرداخته شده است.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:۱۴۰۳/۱۰/۰۶
پذیرش:۱۴۰۳/۱۱/۲۲
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: *اسپیرولینا*، ارزش تغذیه‌ای، غذای فراسودمند

* *نویسنده مسئول:* *Email*
fatemeh.shayesteh2024@gmail.com

مقدمه

گیاهان، جلبک‌ها و ترکیبات آن‌ها مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها، دارای توانایی بالقوه جهت جایگزینی به جای داروهای شیمیایی هستند و عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است. بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه جلبک‌ها می‌توانند به مواد فعال در صنایع دارویی تبدیل شوند؛ زیرا ترکیبات جلبک‌ها دارای رنگدانه‌های بتاکاروتین و فوکوگزانتین، اسیدهای حلال مواد و مواد محرک ایمنی مانند فایکوسیانین، پلی ساکارید، آهن، روی و اسیدهای‌آمینه ضروری است که سبب ارتقا ایمنی می‌گردد و با مکانیسمی مشابه با ترکیبات گیاهی اثرات ضد میکروبی را اعمال می‌کنند. امروزه بالا بردن مدت زمان نگهداری مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است. هم‌چنین استفاده از ترکیبات فراسودمند جهت بالابردن ارزش غذایی مواد از اهمیت بسیاری برخوردار است، لذا رویکرد جوامع به سوی استفاده از انواع نگهدارنده‌ها و مکمل‌ها می‌باشد. اما بسیاری از این مواد، شیمیایی و برای سلامت بشر مضر هستند. اخیرا محققین به این نتیجه رسیدند که به‌جای استفاده از این ترکیبات شیمیایی به سمت استفاده از مواد با منشأ طبیعی که ایمن‌تر هستند بروند، سیانوباکترها برای تولید محصولات سالم‌تر به‌عنوان یک رنگ طبیعی جایگزین رنگ‌های مصنوعی خطرناک مورد استفاده قرارگرفته‌اند. مطالعات متعدد نشان داده‌است که اسپیرولینا در درمان مسمومیت با فلزات سنگین مانند آرسنیک، کادمیوم، سرب، جیوه و غیره مفید است. این جلبک با اثرات پروبیوتیکی خود باعث هضم و جذب بهتر غذا در روده‌ها می‌شود. با ترکیباتی که در آن وجود دارد باعث کاهش علائمی مانند عطسه، خارش، ترشحات بینی و ... می‌شود. از منابع بیولوژیک مانند گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها به عنوان منابع رنگدانه‌های طبیعی برای رنگ‌های زیستی استفاده می‌شود. این رنگ‌ها دارای خواص مفیدی مانند خاصیت ضد سرطانی، آنتی بیوتیکی، زیست تجزیه‌پذیری بوده و کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، چاپ، صنایع نساجی و دارویی دارند، میکروارگانیسم‌ها منبع اصلی رنگدانه‌های طبیعی هستند (۱).

ریزجلبک اصطلاحی است که برای نامیدن کلیه جلبک-های میکروسکوپی اعم از پروکاریوت و یوکاریوتی به کار می‌رود و آنها را از جلبک‌های ماکروسکوپی متمایز می‌سازد. سیانوباکترها میکروارگانیسم‌های تک سلولی میکروسکوپیک هستند که در اکثر موارد به صورت کلونی رشد می‌کنند (۲). در اوایل ۱۹۵۰کمبود قابل توجهی از منابع پروتئینی در رژیم غذایی مردم دنیا مشاهده‌شد که منجر به آغاز مطالعاتی جهت یافتن منابع پروتئینی مناسب و قابل جایگزین گردید، در آن زمان توده سلولی جلبکها انتخاب مناسبی جهت دست‌یابی به این هدف به نظر رسید (۳). ریز جلبک‌ها منبع مهمی از ویتامین‌هایA ، C، E، گروهB، اسید فولیک، اسید پانتوتیک و بیوتین نیز هستند (۴). از جمله ریزجلبک‌های دارای ارزش تغذیه‌ای بالا گونه‌های اسپیرولینا، هماتوکوکوس و کلرلا می‌باشند که امروزه به صورت صنعتی تولید می‌شوند و مصارف گوناگونی دارند(۵).

در استفاده تجاری، نام محصول تجاری اسپیرولینا به توده سلولی خشک سیانوباکتری آرتروسپیرا اطلاق می‌گردد و یک محصول کاملا با منشأ زیستی می‌باشد. در استفاده علمی اسپیرولینا عنوانی است جهت توضیح دو گونه سیانوباکتری، با اسامی *آرتروسپیرا پلاتنسیس* و *آرتروسپیرا ماکسیما* استفاده می‌شود. از این دو گونه به عنوان غذا، مکمل غذایی و یا مکمل خوراک دام استفاده می‌شود (۶). *اسپیرولینا* اتوتروف و فتوسنتزکننده بوده و از طریق تقسیم دوتایی تکثیر می‌یابد (۷). یک تریکوم بالغ اسپیرولینا از طریق تشکیل سلول‌های مخصوص تحت عنوان نسریدیا تجزیه شده و به چندین قسمت شکسته می‌شود. قطعه قطعه شدن تریکوم در نسریدیا باعث تولید دو تا چهار زنجیره سلولی پیچ خورده می‌گردد (۶).

اسپیرولینا جلبکی تک‌سلولی، دارای فیلامنت‌های فنرمانند و متعلق به خانواده سیانوباکتری‌هاست که به طور طبیعی در دریاچه‌های گرمسیر و قلیایی آمریکا، مکزیک، آسیا و آفریقای مرکزی رشد می‌کند و یکی از ریز جلبک‌های غذایی پرکاربرد است که از سوی سازمان جهانی بهداشت به عنوان غذای برتر شناخته شده‌است (۸). جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* از جلبک‌های سبز آبی بوده که به ویژه در آب‌های شور یافت می‌شود (۹). ریز جلبک اسپیرولینا یک سیانوباکتر رشته‌ای و مارپیچی است که امروزه به وفور در غنی‌سازی غذای انسان و حیوان استفاده می‌شود (۱۰). از این جلبک به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان و هم‌چنین برای تقویت سیستم ایمنی و درمان چاقی استفاده می‌کنند. هم‌چنین *اسپرولینا* با مقابله با اثرات منفی رادیکال‌های ازادی که در اثر تغذیه نامناسب، استرس و بی‌تحرکی در بدن تولید می‌شوند از تخریب بافت‌های بدن جلوگیری می‌کند و اثرات پیری را به تأخیر می‌اندازد. این جلبک حاوی ترکیبات موثر در رشد و ترمیم سلول‌ها می‌باشد، هم‌چنین منبعی از امگا ۶ و ۹ نیز می‌باشد.گونه‌های *اسپیرولینا* به میزان زیادی به نور و تا حدودی به دمای بالا نیاز دارند. بنابراین تجهیزات تولید باید در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان، مهیا گردد تا تولید در سال میسرگردد. دمای اپتیمم برای رشد *اسپیرولینا* ۳۵-۳۸ درجه سانتی‌گراد است، در حالی که حداقل دمای قابل تحمل برای *اسپیرولینا* جهت رشد ۱۵ - ۲۰ درجه سانتیگراد می‌باشد. *اسپیرولینا* شرایط قلیایی را تحمل کرده و تا pH=۱۰/۵ هم رشد می‌کند. تولید تجاری *اسپیرولینا* شامل چهار مرحله است: ۱)کشت، ۲) برداشت،۳) خشک کردن، ۴) بسته بندی. تمامی این مراحل می‌تواند بازدهی نهایی یا کیفیت محصول را تحت تأثیر قراردهد. سالیانه بیش از ۳۰۰۰ تن پودر *اسپیرولینا* تولید می‌شود (۱۱).

ترکیبات شیمیایی موجود در اسپیرولینا

اسپیرولینا در بسیاری از کشورها مثل ژاپن و تایوان به شکل محصولی تجاری و به عنوان غذای عملگرا و سلامت بخش با اهداف درمانی به فروش می‌رسد. اسپیرولینا حاوی مقادیر فراوانی پروتئین‌های گیاهی (حدود۷۰ درصد وزن خشک)، کارتنوئیدها ۰۴/ درصد، اسیدهای چرب چند غیر اشباعی۱ امگا شش (مثل اسید چرب ضروری و نادر اسید گامالینولیک۲)، سولفولیپیدها، گلیکولیپیدها، پلی ساکاریدها، پیش ساز ویتامین‌ها و دیگر ترکیبات مغذی مثل ویتامین‌های A، E، و انواع ویتامین‌های B و مواد معدنی مثل کلسیم، آهن، منزیم، پتاسیم، روی و سلنیوم می‌باشد. همچنین اسپیرولینا منبع غنی و ارزانی از رنگدانه‌های مختلف مثل فایکوسیانین است. فایکوسیانین یکی از رنگدانه‌های جانبی در فتوسنتز و از خانواده فیکوبیلی پروتئین‌ها می‌باشد. کاربرد فیکوسیانین معمولا در صنایع غذایی به عنوان یک ماده رنگی، امولسیفایر، قوام دهنده و عامل ایجاد ژل می‌باشد. از فایکوسیانین هم-چنین در رنگ‌های آرایشی و شناساگرهای فلورسنت در تحقیقات زیست پزشکی نیز استفاده می‌شود. مطالعات متعددی تأیید کرده‌اند که اجزای مختلف اسپیرولینا مثل فایکوسیانین، سلنیوم، کارتنوئیدها و اسید چرب گاما لینولنیک دارای آثار آنتی‌اکسیدانی بوده و قابلیت حذف رادیکالی قابل توجهی دارند. در نتیجه، *اسپیرولینا* می‌تواند عامل بالقوه‌ای جهت درمان بیماری‌های ناشی از تنش‌های اکسیداسیونی، التهابات، آلرژی‌ها، ویروس‌ها، بیماری‌های سیستم ایمنی، بیماری‌های کبدی و حتی سرطان‌ها می‌باشد(۱۲)، در برخی مطالعات بهینه‌سازی شرایط تولید فایکوسیانین به عنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدانی که قابلیت رقابت با رنگ‌های سینیتیکی را داراست، از *اسپیرولینا پلاتنسیس* بررسی شده است(۱۳)، *اسپیرولینا* فاقد سلولز در دیواره سلولی خود می‌باشد، این ویژگی باعث شده تا ماده غذایی مناسبی برای افراد مسن و یا بیماران مبتلا به مشکلات

جذب روده‌ای باشد (۱۴). *اسپیرولینا*، سبز آبی پلانکتونی رشته‌ای است که دربسیاری از محیط‌های با آب شیرین مانند برکه‌ها، دریاچه‌ها و رودخانه‌ها یافت می‌شود. اسپیرولینا یک میکروارگانیسم فتواتوتروفیک است که به شکل در طبیعت توزیع شده و برای قرن‌ها به علت دارا بودن بالاترین ارزش غذایی شناخته شده‌اش به عنوان مکمل غذایی انسان از آن استفاده شده‌است. اسپیرولینا شامل ۷۸ درصد پروتئین، ویتامین، ۴ الی ۷ درصد چربی، مواد معدنی، کربوهیدرات‌ها(گلوکز، رامنوز، مانوز، زایلوز وگالاکتوز) و برخی ریزمغذی‌های طبیعی می‌شود؛ بنابراین حضور این ریزمغذی‌ها در اسپیرولینا دارای خواص اصلاح‌کننده‌ای علیه بیماری‌های مختلفی چون سرطان، فشارخون، چربی خون، دیابت‌ها، کم خونی و غیره می‌باشد. از اسپیرولینا به خاطر منبع پروتئینی بالا و ارزش غذایی اش، به عنوان غذای انسان استفاده شده‌است. اخیراً محققان تأثیر ارتقای رشدی باکتری‌های اسیدلاکتیک توسط اسپیرولینا را گزارش کرده است (۱۵)، در واقع جلبک‌ها نیتروژن را از محیط رشد مصرف می‌کنند و کربوهیدرات‌های برون سلولی(خارج سلولی) و سایر مواد رشدی را آزاد می‌کنند که ممکن است مسئول تحریک رشد لاکتوباسیل و سایر سویه‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک باشند (۱۶).

سیانوباکتری‌ها، منبع غنی پروبیوتیک

با گسترش دانش بهداشت عمومی، امروز اولویت اصلی در مصرف با مواد طبیعی و رنگ‌دهنده‌های طبیعی است. اگر شیرهای تخمیرشده با ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری و عناصر کمیاب با منشا طبیعی غنی شوند، مصرف کنندگان نیاز به میزان بسیار کمتری از دارو دارند و مکمل‌های ویتامینی و مواد معدنی مصنوعی تولید شده را کمتر مصرف می‌کنند (۱۷)، یک روش ساده برای دست‌یابی به این هدف استفاده از سیانوباکتری‌ها در تولید غذاهای لبنی است (۱۸)، اسپیرولینا سال‌ها است که به عنوان ماده افزودنی استفاده می‌شود، زیرا دارای پروتئین و ارزش غذایی بالایی است .یک رژیم غذایی متعادل و سالم حاوی ویتامینها، مواد معدنی و اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد(۱۶)، ریز جلبک‌ها یک منبع طبیعی غنی از ترکیبات فعال برای یک رژیم غذایی سالم هستند، آن‌ها حاوی پروتئین،کربوهیدرات، لیپید، مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای‌آمینه ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع، کاروتنوئیدها، آنزیم‌ها و فیبر هستند (۱۹).

ترکیبات جلبک *اسپیرولینا* و مواد مؤثره موجود درآن

اسپیرولینا، حاوی مقادیر قابل توجهی از ریزمغذی و درشت مغذی‌ها، اسیدهای‌آمینه ضروری، پروتئین، لیپید، ویتامین‌ها، مواد معدنی، آنتی‌اکسیدان‌ها و رنگدانه‌های زیادی از جمله کاروتنوئید، کلروفیل a و فایکوبیلی پروتئین‌ها شامل فایکوسیانین و آلوفایکوسیانین است. هم‌چنین حاوی بتاکاروتن-بتاکریپتو، زانتین-لوتئین-زآگزانتین به عنوان مهم‌ترین کاروتنوئیدها است (۲۰و۲۱). اسپیرولینا ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین دارد که ۹۰ درصد آن قابل هضم است. تمام اسیدآمینه‌های ضروری در حد بالایی در این سیانوباکتر وجود دارند اما اسیدآمینه‌های گوگردی در آن کم یافت می‌شود (۲۲)، برخلاف سیانوباکترهای دیگر اسپیرولینا به علت نداشتن دیواره سلولی قابل هضم است. هم‌چنین ترکیبات فنلی مانند سالسیلیک اسید، کلوژنیک اسید و کافئیک اسید در اسپیرولینا گزارش شده‌است (۲۳)، رنگدانه‌های موجود در جلبک علاوه بر مزایای سلامت بخشی، دارای ارزش تجاری گسترده به عنوان رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی، مواد آرایشی و دارویی هستند. در حال حاضر، افزایش آگاهی در مورد اثرات مضر ترکیبات و رنگ‌های مصنوعی و گزارش‌های اثرات سمی رنگدانه‌های سنتتیک باعث تمایل جامعه به جایگزینی رنگدانه‌های سیانوباکترها و بهره برداری از سیانوباکترها به عنوان منبع رنگدانه‌های طبیعی شده است (۲۴). کلروفیلa تنها کلروفیلی است که اسپیرولینا دارا می‌باشد. این ریز جلبک یکی از بالاترین میزان کلروفیل

موجود در طبیعت را داراست که در حدود ۱/۱۵درصد از زیست توده آن را شامل می‌شود (۲۵).

کاربردهای غذایی *اسپیرولینا*:

در میان سیانوباکترها، *اسپیرولینا* به عنوان یک غذای سودمند برای آینده معرفی شده است و با توجه به افزایش تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند و پذیرش هرچه بیشتر غذاهای حاوی ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جهان، هزینه‌های پایین تولید و ارزش تغذیه‌ای بالای این سیانوباکتر، بررسی بیشتر در زمینه‌های کشت و تولید ترکیبات زیست فعال از آن ضروری به نظر می‌رسد (۲۶). علاوه بر خواص رنگی و تغذیه‌ای، ترکیب ریز جلبک‌ها با غذاها ممکن است تغییرات معنی‌داری در خواص ریزساختاری و رئولوژیکی غذاها ایجاد کند. در کشورهای آلمان، فرانسه، ژاپن، آمریکا، چین و تایلند شرکت‌های تولید و توزیع‌کننده غذا فعالیت‌های جدی در زمینه فروش غذاهای عملگرا با ریزجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها انجام داده‌اند ، اسپیرولینا پلاتنسیس غنی از مواد مغذی است و حاوی ۱۸ نوع اسیدآمینه می‌باشد. پروتئین‌های آن کیفیت بالایی دارند و هم‌چنین شامل انواع ویتامین‌ها A ،k ،E ،B2 ،B8 ،B12 ،B 6 و عناصری مانند پتاسیم و آهن است (۲۷).

درصد بالای کورکومین و اسید آسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی در اسپیرولینا بر ارزش غذایی این سیانوباکتر، می‌افزاید. افزودن برخی ریزجلبک‌ها به بیسکویت و محصولات مشابه باعث بهبود بافت و افزایش ماندگاری آن می‌شود و در مواد غذایی مانند ژله‌ها و دسرها این رنگ‌های طبیعی باعث بهتر شدن خواص ژلی می‌شوند. سیانوباکترها به دلیل تعادل ترکیبات شیمیایی، منابع زیستی مهمی برای تولید محصولات و کاربردهای جدید بوده و می‌توانند به عنوان بهبود دهنده‌ی ارزش تغذیه‌ای غذاها وخوراک دام مورد استفاده قرار گیرند. *اسپیرولینا* به عنوان یک غذای دارای مواد مفید و مناسب برای رفع سوءتغذیه معرفی شده‌است و در بسیاری کشورها این سیانوباکتر به صورت سنتی و یک غذای رایج استفاده می‌شود (۲۸)، اسپیرولینا حاوی مواد ارزشمندی مانند اسیدهای چرب غیراشباع، رنگ دانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات دارویی و دیگر ترکیبات فعال زیستی می‌باشد. تعداد بی‌شماری از ریز جلبک‌ها را در فروشگاه‌ها به شکل‌های قرص، پودر، کپسول، پاستیل‌ها و مایعات به عنوان مکمل‌های غذایی می‌توان یافت. هم‌چنین FDA کلیه مکمل‌های سیانوباکتر *اسپیرولینا* را به عنوان کاملا امن شناخته شده تأیید کرده‌است و از این رو می‌تواند به عنوان یک منبع قابل اطمینان برای محصولات غذایی جدید در نظر گرفته شود. آن‌ها هم چنین می‌توانند با محصولات غذایی مثل پاستل، بیسکوئیت‌ها، نان، اسنک‌ها، آب نبات، ماست و نوشیدنی‌های غیر الکلی ترکیب شوند و اثرات سلامتی بخش نشان دهند. در کشورهای آلمان، فرانسه، ژاپن، آمریکا، چین و تایلند شرکتهای تولید و توزیع‌کننده غذا فعالیت‌های جدی در زمینه فروش غذاهای عمل‌گرا با ریز جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها انجام داده اند. قابلیت ترکیب توده‌ی زیستی ریز جلبک‌ها با سامانه‌های غذایی مشروط به نوع فرایند به کار برده شده و شدت آن مثل فرایندهای حرارتی و مکانیکی و طبیعت غذا مثل امولسیون، ژل، سامانه‌های خمیری هوادهی شده و هم‌چنین واکنش های بین ترکیبات غذایی پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها، لیپیدها، قند و نمک‌ها می‌باشد. علاوه بر خواص رنگی و تغذیه‌ای، ترکیب ریز جلبک‌ها با غذاها ممکن است تغییرات معنی‌داری در خواص ریز ساختاری و رئولوژیکی غذاها ایجاد کند (۲۹). غذاهای فراسودمند به محصولاتی اطلاق می‌شود که علاوه بر داشتن ارزش تغذیه‌ای، دارای اثرات درمانی و سلامت بخش برای مصرف‌کننده نیز باشند (۳۰). افزودن توده زیستی جلبک به فراورده‌های غذایی سبب فراسودمند شدن آن‌ها می‌شود. علت اصلی تحریک و تقویت رشد باکتری‌ها پس از افزودن زیست توده‌ی سیانوباکتر، غنی‌سازی تغذیه‌ای محیط پایه‌ی فراورده با اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌ها گزارش

شده‌است(۳۱)، کاربرد بالقوه اسپرولینا به عنوان اجزاء تشکیل‌دهنده‌ی غذایی برای بهبود خواص سلامتی بخش محصولاتی مانند مکمل‌های غذایی، نوشیدنی‌ها و شیرهای تخمیر شده، غلات و محصولات نانوایی، دسرها، کیک‌ها و محصولات قنادی، بیسکویت‌ها، اسنک‌ها، سوپ‌ها، سس‌های سالاد و محصولات لبنی مانند بستنی، ماست، نوشیدنی‌های بر پایه لبنی و ...به کار رفته است (۳۲)، از این جلبک به عنوان غذایی برای آینده یاد شده است زیرا قابلیت تولید مواد غذایی متراکم با کیفیت بالا در مقایسه با سایر جلبک‌ها کارآیی بیشتری دارد (۳۳). نداشتن دیواره سلولزی است که باعث می‌شود جذب مواد مغذی بسیار راحت صورت گیرد. کم بودن میزان اسید نوکلئیک (کمتر از ۴ درصد) *اسپرولینا* یکی از از برتری‌های این جلبک نسبت به سایر منابع پروتئینی مشابه می‌باشد (۳۴).

کاربردهای اسپیرولینا در حوزه سلامت

بیشتر تمرکز فعالیت‌ها و تلاش‌ها در زمینه اسپیرولینا، تولید فراورده‌های گوناگون دارویی و زیست محیطی از *اسپیرولینا* است که زمانی می‌توانند وارد بازار شوند که از لحاظ اقتصادی تولید آن‌ها به صرفه شود. از خواص سلامت‌بخشی آن می‌توان خواص آنتی‌میکروبیال، آنتی آرتروز، محافظ عصبی، محافظ قلب ، ضدسرطانی، ضدباکتریایی و مؤثر در آلرژی‌ها، زخم معده، آنمی، مسمومیت فلزات سنگین و مسمومیت ناشی از تشعشعات رادیواکتیو را نام برد (۳۵)، *اسپیرولینا* غیرسمی است و چربی‌های آن به صورت اسیدهای چرب غیراشباع است که فاقد کلسترول می باشد، به همین علت می‌توان آن را در درمان بیماری تصلب شرائین و چاقی به کار گرفت (۳۶). با توجه به عوارض کمتر ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی، این ترکیبات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک باشند (۳۷). ازجمله تأثیرات دیگر این جلبک می‌توان به پیشگیری از کبد چرب، بیماری‌های قلب و عروقی،کاهش سطح چربی سرم، افزایش سطوح هموگلوبین، افزایش آنتی‌بادی‌ها و عملکرد فاگوسیتیک ماکروفاژ و مهار پیشروی ویروس HIV اشاره کرد .اسپیرولینا در درمان افسردگی نقش دارد زیرا منبع خوبی از اسیدفولیک است که از تولید انرژی و سلول‌های خونی پشتیبانی می‌کند. با کاهش کلسترول خون جذب مواد معدنی حیاتی را افزایش می‌دهد. اسپیرولینا در پیشگیری از دیابت موثر است، چون کالری پایینی دارد و حاوی مقادیر زیادی از ویتامین B1 می‌باشد که باعث بهبود سوخت و ساز قندها در بدن می‌شود، ویتامین B2 که با کمک به سوزاندن کالری مانع از چاقی می‌شود و ویتامین B6 که در ساخت هورمون انسولین در بدن نقش دارد می‌باشد. علاوه بر این‌ها، *اسپیرولینا* یک مکمل قلیایی است که به بازگشت حالت اسیدی خون به حالت قلیایی کمک شایانی می‌کند و برای همین است که از *اسپیرولینا* به عنوان محصول غذایی ایده آل برای جلوگیری و بهبود بیماری دیابت نام برده می‌شود (۳۷).

ارزش تغذیه‌ای *اسپیرولینا* پروتئین‌ها

مطالعات متعددی بر روی ترکیبات شیمیایی توده ی سلولی *اسپیرولینا* انجام شده‌است که همگی بیانگر وجود مقادیر فراوانی پروتئین(۶۲-۶۵ درصد وزن خشک) می‌باشند. غلظت اسید نوکلئیک *اسپیرولینا*، همواره کمتر از پنج درصد وزن خشک *اسپیرولینا* بوده که این یک مزیت به شمار می‌رود. تحقیقات انجام‌گرفته بر روی *اسپیرولینا* توسط سازمان بهداشت جهانی و دانشمندان مختلف دنیا، این حقیقت را تأیید کرده‌اند که اسپیرولینا مخلوطی از ترکیبات مختلف بوده که هیچ ماده ی غذایی دیگری به تنهایی حاوی همه‌ی آن‌ها نمی‌باشد. میزان پروتئین اسپیرولینا از تمام مواد غذایی دیگر بالاتر است. *اسپیرولینا* شامل مقادیر تقریبا متعادلی پروتئین (شامل هشت اسیدآمینه اصلی) بوده، به راحتی هضم شده (بالا بودن ارزش زیستی) و به سرعت احساس گرسنگی را برطرف می‌کند. به جز متیونین و سیستئین که تا حدودی

کمتر از مقدار استاندارد هستند، دیگر اسید آمینه‌های ضروری دیگر در اسپیرولینا به مقدار کافی وجود دارند (۳۹، ۳۸،۶).

مواد معدنی

میزان مواد معدنی اسپیرولینا نیز قابل توجه می‌باشد. سطح آهن *اسپیرولینا*، ۱۲ برابر بیشتر از هر ماده غذایی دیگری است. اسپیرولینا غنی از منیزیوم، پتاسیم و دیگر عناصر کمیاب می‌باشد. آهن موجود در ریزجلبک *اسپیرولینا* در حدود ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. بیشترین میزان توصیه‌شده آهن در روز برای زنان ۱۹ تا ۵۰ ساله ۱۸ میلی‌گرم می‌باشد، در نتیجه این ریزجلبک منبع مناسبی جهت تامین آهن در زنان باردار و افراد مبتلا به کم‌خونی است (۴۰). اسپیرولینا از نظر کلسیم نیز غنی بوده و از این رو برای عملکرد سالم دندان‌ها و استخوان‌ها مناسب می‌باشد.

ویتامین ها

اسپیرولینا غنی‌ترین منبع ویتامین B12 (۱۱میلی گرم در کیلوگرم) است و مصرف روزانه یک گرم اسپیرولینا جهت رفع نیاز بدن به این ویتامین کافی می‌باشد و از این جهت این سیانوباکتر دارای ارزش فوق العاده ای برای افراد مبتلا به کم‌خونی است(۴۱). علاوه بر ویتامین B12، *اسپیرولینا* مخلوط عالی از دیگر ویتامین‌ها نظیرA، B1، B2 ، B6 و E می‌باشد. اسپیرولینا حاوی ۲۱ درصد تیامین و ریبوفلاوین است. حدود ۱ /۰ درصد وزن خشک آن را بتاکاروتن تشکیل می‌دهد که ۲۰ برابر بیش‌تر از هویج می‌باشد (۴۱)، وجود میزان قابل توجهی آهن، اسید فولیک و ویتامینB12، *اسپیرولینا* را به غذای درمانی خوبی جهت درمان کم‌خونی تبدیل کرده‌است.

چربی‌ها

سیانوباکترها حاوی مقادیر قابل توجهی چربی، با ترکیبی شبیه روغن نباتی هستند. در برخی شرایط خاص، ریزجلبک‌ها تا ۸۵ درصد وزن خشک خود، روغن دارند، اما معمولا مقدار روغن بین۲۰-۴۰ درصد وزن خشک می‌باشد. روغن سیانوباکترها معمولا استر گلیسرول و اسیدهای چرب ۱۴-۲۲ کربنی است. *اسپیرولینا* حاوی ۵-۷ درصد لیپید می‌باشد که عمدتاً از اسیدهای چرب ضروری مانند اسید لینولئیک(LA) و هم‌چنین اسیدگامالینولنیک (GLA) تشکیل شده است (۴۲)، اسپیرولینا عاری از کلسترول بوده و غنی از اسیدهای چرب چند غیراشباعی است که آن را جهت درمان و پیشگیری از تصلب شرائین، چاقی و فشار خون مناسب می‌سازد. با توجه به اثرات مستقیم اسیدگامالینولنیک روی سیستم ایمنی و درمان بسیاری از بیماری‌ها، از این رو همواره علاقه زیادی به تولید غلظت‌های بالا از اسیدگامالینولنیک وجود داشته است (۴۳).

خواص درمانی *اسپرولینا*

فایکوسیانین یکی از پروتئین‌های مهم در اسپرولینا می‌باشد، فایکوسیانین فایکوبیلی پروتئینی است که به تازگی گزارش‌های متعددی مبنی بر داشتن خواص فارماکولوژیک گوناگون از آن ارائه شده‌است. در این رابطه، اثرات آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، خواص محافظتی کبد و اعصاب فایکوسیانین طی مطالعات تجربی ذکر شده‌اند (۴۴). این ماده می‌تواند در درمان آلزایمر و پارکینسون موثر واقع شود هم چنین نقش بسیار مهمی در پیشگیری از سرطان‌های پوستی-مخاطی و لوکمی مزمن میلوئیدی در انسان دارد (۴۵). فایکوسیانین در درمان سرطان‌ها قادر به جایگزین‌شدن با داروهای شیمی درمانی دارای عوارض جانبی شدید است (۴۶) ، از این پروتئین در درمان بیماری‌های کلیه، فشار خون، بیمار یهای سیستم عصبی مرکزی و ترکیبات داروهای مراقبت‌های پوستی استفاده می‌شود و اثرات درمانی آن به خوبی اثبات شده است (۱۱). فایکوسیانین موجود در *اسپیرولینا* رادیکال آلکوکسیل، هیدروکسیل و پراکسیل را مهار کرده، تولید نیتریت را کاهش داده و پراکسیداسیون لیپید در میکروزوم‌های کبد را مهار می‌نماید؛ هم‌چنین بسیاری از مطالعات برون و درون تنی نشان می‌دهند که اسپیرولینا به

طور موثری استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (۴۷)، هم-چنین از این ماده مخاطی و لوکمی در درمان پارکینسون و آلزایمر بکار گرفته می‌شود و نقش بسیار مهمی در پیشگیری از سرطان های پوستی مزمن میلوئیدی در انسان دارد(۴۸)، *اسپیرولینا* در سلامت کبد نقش زیادی دارد،افراد دارای مشکلات کبدی معمولا از کمبود پتاسیم رنج می‌برد و این جلبک حاوی مقدار مناسبی از پتاسیم هست که میتواند به روند درمان سرعت ببخشد. فایکوسیانین می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمی درمانی با عوارض زیاد در درمان سرطان باشد. *اسپرولینا* هم‌چنین سرشار از ید است .این ترکیب برای عملکرد غده ی تیروئید ضروری است و باعث افزایش سوخت و ساز بدن می‌شود (۴۹)، *اسپرولینا* دارای دیواره نرم است که شامل ترکیبی از قندها و پروتئین می‌باشد و دارای خاصیت ضد ویروسی، ضرسرطانی و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد در حالی‌که اثر نامطلوب بر روی سلول‌های انسان ندارد. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که نوعی پلی‌ساکارید در *اسپرولینا* قادر است فعالیت آنی هسته سلول را افزایش دهد و DNA را بازسازی و اصلاح کند و در چندین مورد مشاهده شد مصرف کامل از *اسپرولینا* و یا عصاره آن تا حد زیادی از پیشرفت سرطان جلوگیری به عمل آورده است (۵۰). *اسپرولینا* غیرسمی است و چربی‌های آن به صورت اسید چرب غیر اشباع است که کلسترول ندارد به همین سبب می‌تواند برای درمان بیماری‌های تصلب شرائین و چاقی به کار رود (۵۱) از این جلبک در درمان PDS (سندروم کمبود رنگدانه) به میزان ۳۰ گرم در کیلوگرم در رژیم غذایی بعد از ظهور علایم PDS استفاده شد و بعد از یک دوره ۴ هفته‌ای، درمان صورت گرفت (۴۹)، اسپرولینا دارای مواد آنتی‌اکسیدانی است که باعث جوان ماندن بافت‌های بدن شده و اثرات پیری را به تأخیر می‌اندازد. این تأثیر مثبت در ناحیه‌ی پوست و موها بیشتر است. *اسپرولینا* با اثرات منفی رادیکال-های آزاد که باعث تخریب بافت‌های بدن و افزایش روند پیری می‌شوند مقابله می‌کند. رادیکال‌های آزاد، سلول‌هایی هستند که توسط خود بدن و در پی تغذیه‌ی نامناسب، استرس و بی‌تحرکی تولید می‌شوند. *اسپرولینا* دارای مقادیر زیادی فنیل آلانین است که اشتها را کاهش می‌دهد و این باعث می‌شود فرد بتواند میزان غذای که مصرف می‌کند را کاهش دهد و از بروز چاقی جلوگیری می‌کند. به این ترتیب نیز روند کاهش وزن با سهولت بیشتری و بدون تحمل استرس و گرسنگی کشیدن سپری می‌شود. *اسپرولینا* هم‌چنین سرشار از ید است، این ترکیب برای عملکرد غده‌ی تیروئید ضروری است و باعث کنترل و بهبود متابولیسم بدن می‌شود. زمانی که سوخت و ساز بدن با سرعت بالایی انجام شود چربی‌ها با سرعت بیشتری سوزانده شده و فرد با سرعت بیشتری لاغر می‌شود(۴۹).

تولید جهانی *اسپیرولینا* و کاربردها

اسپیرولینا برای قرن‌های متمادی به عنوان غذا مصرف شده‌است، ازمایش‌های سم‌شناسی متعددی که برای حمایت‌های مالی سازمان ملل انجام شده‌است، ایمنی آن را ثابت کرده‌اند، علاوه بر این این محصول در طول ۳۰ سال گذشته به صورت تجاری تولید و بدون هیچ مشکلی توسط هزاران نفر مصرف شده است. اخیرا دو شرکت در ایالات متحده *اسپیرولینا* را با استفاده از دستورالعمل‌های علمی و بعد از تایید سازمان غذا و دارو به عنوان GARS معرفی کرده‌اند. نتایج مطالعات مختلف بیانگر آن است که *اسپیرولینا* پروفایل تغذیه‌ای خوبی داشته و حاوی ترکیباتی است که دارای مزایای سلامت بخش بالقوه‌ای می‌باشد، طی سال‌های گذشته تکنولوژی تولید *اسپیرولینا* پیشرفت کرده و در عین کاهش قیمت افزایش کیفیت به همراه داشته است. امروزه اسپیرولینا به شکل تجاری در کشورهای مختلف تولید می‌شود. اسپیرولینا هم‌چنین دارای کاربردهای غذایی مختلفی در آب میوه‌ها، شیر، فراورده‌های قنادی، شکلات‌ها، دونات‌ها، دسرها، بیسکویت‌ها، کیک‌ها، کلوچه‌ها، ماکارانی‌ها، سس‌های سالاد، دسرهای منجمد، اسنک‌ها، چیپس ذرت، پف

فیل، کراکر، غلات صبحانه، غذاهای مایع و فوری و حتی در آبجوها می‌باشد. از *اسپیرولینا* به شکل گسترده‌ای برای اسپاگتی‌های رنگی، چیپس و خمیردندان استفاده می‌شود. برخی مواد غذایی که با رنگ‌های جذاب و دلپذیر سبز و آبی و برای کودکان تولید شده‌اند حاوی *اسپیرولینا* هستند (۱۲).

تاثیر اسپیرولینا در بهبود کیفیت برخی مواد غذایی

کاربردهای بالقوه *اسپیرولینا پلاتنسیس* به عنوان اجزا تشکیل دهنده غذایی برای بهبود خواص سلامتی بخش محصولاتی مانند مکمل‌های غذایی، نوشیدنی‌ها و شیرینی‌های تخمیر شده، غلات و محصولات نانوایی، دسرها، کیک‌ها و محصولات قنادی، بیسکویت‌ها، اسنک‌ها، سوپ‌ها، سس‌های سالاد و محصولات لبنی مانند بستنی، ماست، نوشیدنی‌های بر پایه لبنی و مانند این‌ها به کاررفته است (۵۲). در این راستا، تاهامی و همکاران درسال ۲۰۱۹ به بررسی تأثیر تغذیه‌ای اسپیرولینا بر خصوصیات پنیر فرایند شده پرداختند. نتایج نشان داد با افزایش درصد *اسپیرولینا* تا ۶ درصد خواص شیمیایی من جمله؛ پروتئین، خاکستر، فیبر، سلنیوم، روی، آهن، منیزیم وپتاسیم افزایش می‌یابد به گونه‌ای که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های حاوی اسپیورلینا بیشتر از نمونه شاهد بود. بررسی تولید دسر لبنی بر پایه فرمولاسیون عسل خرما، نشاسته ذرت و ژلاتین با کمک روش سطح پاسخ، نشان داد پارامترهای ویسکوزیته و بافت (سفتی و چسبندگی) به طور معنی‌داری با افزایش نشاسته و ژلاتین افزایش می‌یابد (۵۳)، بررسی‌های محققان نشان‌داد، افزودن *اسپیرولینا پلاتنسیس* تأثیر معنی‌داری در پروتئین، آب، چربی، بتاکاروتن و بافت(پنیر نرم) پروتئین، مواد جامدکل، چربی و قندکل، نقطه ذوب و ارزیابی حسی بستنی دارد و افزودن۱ و ۱/۲ درصد *اسپیرولینا پلاتنسیس* به عنوان بهترین غلظت برای پنیر و بستنی در نظرگرفته شد (۵۴)، هم‌چنین محققان خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی دسرلبنی فراسودمند دارای مالت جو بدون پوشینه را موردبررسی قراردادند. امینی فر و همکاران، مهرابی و همکاران در پژوهش خود نشان‌دادند که با افزایش درصد نشاسته، ژلاتین و عسل خرما، سفتی بافت و چسبندگی افزایش می‌یابد، این افزایش می‌تواند به دلیل فرایند ژلاتیناسیون نشاسته طی فرایند حرارتی و جذب آب توسط ژلاتین باشد؛ بنابراین با افزایش مقدار این هیدروکلوئیدها در محصول، بافت محصول سفت‌تر می‌گردد(۵۵ و۵۳)، به‌علاوه، بر هم کنش بین پروتئین‌های شیر و هیدروکلوئیدها هم می‌تواند بر چنین روندی تأثیرگذار باشد (۵۶). در مطالعه‌ای که ال -گاراوانی و همکاران بر روی خواص رئولوزیکی دسر لبنی حاوی پروتئین آب پنیر و نشاسته سیب‌زمینی انجام داد، نتایج بیانگر همبستگی بالا بین غلظت مواد (کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، نشاسته سیب زمینی و یوتا - کاراگینان) و استحکام دسرلبنی به گونه‌ای با افزایش غلظت مواد تشکیل دهنده، سفتی بافت افزایش می‌یابد (۵۷). بارکالا و همکارانش نشان دادند که استفاده از پودر *اسپیرولینا* در فرمولاسیون ماست منجر به کاهش میزان نرمی نمونه‌های ماست می‌شود، بیشترین میزان پارامتر نرمی را نمونه شاهد دارد (۵۸)، در واقع با افزایش میزان *اسپیرولینا*، میزان نرمی کاهش معنا دار یافته است. علت کاهش نرمی نمونه‌های ماست، تخریب شبکه ژلی ماست در حضور اسپیرولینا بیان شد. تغییر در فاکتور پیوستگی و انسجام الاستیسیته نمونه‌های ماست معنی‌دار نبوده‌است و مقادیر انسجام و الاستیسیته نمونه‌ای کنترل و نمونه‌های تلقیح شده با اسپیرولینا مشابه هم بوده‌است (۵۹). افزودن سیانوباکتر *آرتروسپیرا پلاتنسیس* به نمونه‌های لواشک کیوی، منجر به افزایش میزان آهن شد.

نتایج مطالعات انجام شده که با هدف بررسی اثر افزودن پودر ریزجلبک به دوغ پروبیوتیک حاوی پودر نعنا و کلوچه صنعتی انجام شد، نشان داد که افزودن ریزجلبک تأثیر مثبتی بر محتوای آهن تیمارها داشت و با افزایش میزان *آرتروسپیرا*،

مقدار آهن نمونه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت (۶۰،۲۷). کم‌خونی فقر آهن، یکی از مشکلات شایع در بین مردم جهان و ایران است و طبق آمار ارائه‌شده از سوی سازمان بهداشت جهانی در ایران، شیوع کم خونی فقرآهن در کودکان و زنان در سنین باروری در حد متوسط و در زنان باردار شدید گزارش شده‌است (۶۱)، بنابراین، افزایش آهن در نمونه‌های لواشک محتوی ریزجلبک می‌تواند از نظر ارزش تغذیه‌ای ارزشمند باشد. نتایج بررسی‌ها ذکر شده نشان دادند که افزودن غلظت-های مختلف صمغ دانه‌شاهی با مقادیر مختلف جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*، تاثیر معنی‌دار بر میزان اسیدیته دوغ داشتند به طوری‌که با افزودن غلظت‌های مختلف صمغ دانه‌شاهی با مقادیر مختلف جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* طی ۲۱ روز نگهداری، pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت. کاهش کند pH تیمارهای حاوی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* احتمالا به دلیل خاصیت بافری به خاطر حضور پروتئین، پپتیدها و اسیدهای آمینه موجود در ترکیب آن می‌باشد(۶۲)، نتایج مشابهی با نتایج تحقیق محمدی الستی و همکارانش به دست آمد، این محققین به بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر برخی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی ماست اسفناج پروبیوتیک پرداختند و گزارش دادند که غلظت‌های مختلف جلبک، ضمن جلوگیری از تغییرات مشخص در pH اسیدیته را افزایش دادند (۶۳). در پژوهشی که توسط فدائی نوغانی و همکارانش انجام شد، اثر غلظت‌های متفاوت ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، پروتئین و بافت) و پنیر فراپالایش حاوی پونه کوهی، مورد ارزیابی قرارگرفت نمونه‌ها به مدت 45 روز در دمای ۴. درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. نتایج این مطالعه نشان‌داد که پنیر سفید ایرانی تهیه‌شده به روش فراپالایش می‌تواند حامل خوبی برای ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس باشد. غنی‌سازی این محصول با ریزجلبک فوق منجر به افزایش میزان پروتئین گردید. برخلاف سایر میکروارگانیسم‌هایی که به عنوان منبع پروتئینی به کارمی روند، مثل مخمر، سلول‌های اسپیرولینا دیواره سلولزی ندارند. بنابراین قابلیت هضم بالایی دارند و برای قابلیت دسترسی پروتئین‌هایش نیازی به پختن و حرارت دادن ندارد (۶۴).

با استفاده از پودر اسپیرولینا و بدون استفاده از روغن، می‌توان محصولی پایدار به نام سس‌جلبک تهیه کرد. بعلاوه با توجه به این نکته که غنی‌سازی سس مایونز ممنوع است، اما با غنی‌سازی سس با آهن و روی، محصولی فراسودمند تولید گردیده و خواص فیزیکی و شیمیایی محصول در مقایسه با نمونه‌ی شاهد فاقد جلبک *اسپیرولینا* بهبود یافت، بدون این که محصول ازنظر میکروبی ناایمن باشد. نمونه‌ها از نظر pHتفاوت معنی‌دار داشته و با افزایش میزان جلبک نمونه‌های حاوی آهن و روی دارای تفاوت معنی‌دار بوده و به علت ظرفیت بافری قابل توجه *اسپیرولینا* که به علت حضور پروتئین، پپتیدها و اسیدهای آمینه موجود درترکیب آن است، روند تغییرات pH و اسیدیته آهسته بود و ازنظر میکروبی آلودگی نمونه‌ها بسیارکم و در محدوده استاندارد بوده و ویسکوزیته برخی نمونه های حاوی آهن و روی تفاوت معنی داری داشتند. با افزایش میزان سطوح جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، ویسکوزیته افزایش یافت که این افزایش می‌تواند به دلیل ساختار پروتئینی اسپیرولینا پلاتنسیس و ایجاد تعاملات بین‌سلولی باشد. هم‌چنین ویسکوزیته در طول زمان در هر تیمار با کاهش مواجه شد، که کاهش ویسکوزیته در طی ماندگاری می‌تواند در اثر عوامل مختلفی مانند جدا شدن نشاسته و صمغ یا هیدرولیز هیدروکلوئیدها و پکتین باشد(۶۵).

در پژوهشی استفاده از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به عنوان جایگزین سفیده تخم مرغ انجام شد و تاثیر آن بر ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی و حسی کیک اسفنجی در طی زمان مورد بررسی قرارگرفت. بدین منظور درصدهای وزنی

مختلف سفیده تخم مرغ در فرمولاسیون کیک اسفنجی با پودر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* جایگزین شد. نتایج نشان داد که افزودن پودر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* باعث کاهش رطوبت، حجم مخصوص، تخلخل و پیوستگی نمونه‌ها شد. میزان پروتئین، چربی، خاکستر، pH و سفتی نمونه‌های کیک‌اسفنجی با افزایش درصد پودر ریزجلبک افزایش یافت. با افزایش درصد پودر ریزجلبک، اسپیرو*لینا پلاتنسیس* پذیرش کلی نمونه‌ها کاهش پیدا کرد اما این کاهش پذیرش در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. به طور کلی استفاده از پودر ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در سطوح پایین به عنوان جایگزین جزیی سفیده تخم مرغ باعث بهبود ویژگیهای کیک اسفنجی شد (۶۶). نتایج تحقیقات نشان داد میزان پروتئین، آهن و ماده خشک نمونه‌های دسر تحت تاثیر مستقیم، میزان *اسپیرولینا پلاتنسیس* بوده است و با افزایش میزان آن، افزایش یافتند. نتایج حاصل از پژوهش نشان‌داد با ارائه فرمولاسیون مناسب جهت اصلاح طعم و رنگ احتمالی ناشی از افزودن جلبک *اسپیرولینا پلانتسیس* و با تکیه به خواص سلامتی بخش و استفاده از این ترکیب در فرمولاسیون دسر لبنی و بهبود ویژگی‌های رئولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و حسی می‌توان از آن به عنوان یک ماده افزودنی بسیار مفید و مؤثر در مواد غذایی استفاده کرد و یا نسبت به غنی‌سازی انواع محصولات غذایی توسط این ریزجلبک اقدام نمود (۶۷).

نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان داده است که افزودن مقادیر مختلف اسپیرولینا به محصولاتی همچون کلوچه صنعتی، محصولات غذایی اکسترود شده، کروسانت، دونات، دوغ، پنیر و ماست، منجر به افزایش میزان پروتئین نمونه‌ها می‌شود، در پژوهشی که با هدف تولید کیک اسفنجی غنی‌شده با ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و بررسی ویژگی-های تغذیه‌ای، فیزیکوشیمیایی و حسی این فرآورده بود اثر افزودن ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در سطوح مختلف بر ویژگی‌های تغذیه ای (پروتئین، چربی، آهن، روی و مس) ،خواص فیزیکوشیمیایی، pH، رطوبت، فنل کل، پتانسیل آنتی اکسیدانی، تخلخل، بافت، رنگ) و ویژگی‌های حسی (عطر و بو، رنگ، بافت، طعم و مزه، قابلیت جویدن و پذیرش) نمونه‌های کیک اسفنجی بررسی شد. نتایج نشان داد میزان پروتئین، چربی، مواد معدنی و دیگر ویژگی‌های تغذیه‌ای با افزایش درصد ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* افزایش یافت. میزان تخلخل نمونه‌های کیک اسفنجی با افزایش درصد ریزجلبک *اسپیرولینا* کاهش یافت و با افزایش درصد ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* پارامترهای بافتی (سفتی، پیوستگی و صمغی شدن) افزایش یافت. (۶۸).

در پژوهشی که توسط شهبازی‌زاده و همکارانش انجام شد افزودن ریزجلبک *اسپیرولینا* به ترکیب کلوچه باعث افزایش معنی‌دار میزان آهن نمونه‌های غنی‌شده در مقایسه با شاهد شد، با افزایش میزان پودر به کار رفته، میزان آهن در کلوچه‌های حاوی ریز جلبک به طور معنی داری افزایش یافت، Mamatha و همکاران با استفاده ازجلبک دریایی *انترومورفا کمپرسا* در تهیه نوعی اسنک توانستند علاوه بر افزایش آهن و کلسیم، مقدار پروتئین را درنمونه‌های غنی‌شده با جلبک افزایش دهند (۶۹). پژوهش Danesi و همکاران نیز به منظور غنی‌سازی پروتئین در محصولات نانوایی بر پایه‌ی کاساوا از *اسپیرولینا پلاتنسیس* استفاده کردند. با افزایش میزان ریزجلبک عدد پراکسید در کلوچه‌های غنی‌شده در مقایسه با کلوچه‌ی شاهد کاهش معنی‌داری یافت به صورتی که مقدار عدد پراکسید در بین نمونه‌های ریزجلبکی اختلاف معنی‌داری نداشت کاهش عدد پراکسید در کلوچه‌های ریزجلبکی به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های موجود در ریز جلبک است که به کاهش عمل اکسیداسیون بخش چربی منجرشده است .به دلیل پیچیدگی برهم‌کنش‌های مؤثر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستم‌های چندفازه مکانیسمی که عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها را در چنین سیستم‌هایی توجیه می‌کند با آن‌چه در روغن از اکسیداسیون جلوگیری می‌کند

متفاوت است .ترکیب آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در *اسپیرولینا پلاتنسیس* نظیر آلفا و بتاکاروتن، گزانتوفیل، میکسوگزانتوفیل، کریپتوگزانتین، زئاگزانتین، ویتامینC و توکوفرول، ترکیبات پلی فنلی قطبی و به خصوص رنگدانه پلی‌پپتیدی فیکوسیانین از طریق برهم‌کنشهای هم‌افزایی و با مکانیسم‌های جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کردن فلزاتی نظیر آهن از پراکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کند و روند آن را به تأخیر می‌اندازد (۷۲-۷۰). اگر چه ترکیب آپوپروتئینی فیکوسیانین در اثر حرارت ناشی از خشک‌کردن در دمای بیش از ۴۵ درجه ی سانتی‌گراد تجزیه می‌شود، اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین موجود در اسپیرولینای خشک شده به روش پاششی مشابه فیکوسیانین تازه است. زیرا فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین مربوط به فیکوسیانوبیلین یعنی گروه پروستتیک آن است در نتیجه، کلوچه‌ی غنی‌شده با *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقابل فساد اکسیداتیو پایداری بیشتری دارد و استفاده از پودر *اسپیرولینا پلاتنسیس* میتواند در کنار ایجاد رنگ، اکسیداسیون چربی‌ها را نیز به تأخیر بیندازد (۷۲).

با افزایش میزان ریزجلبک در ترکیب کلوچه، مقدار اسید-γ لینولنیک در کلوچه‌های غنی‌شده در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری پیداکرد، کلوچه‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقایسه با نمونه‌ی شاهد به دلیل افزایش اسید γ - لینولنیک ارزش تغذیه‌ای بالاتری دارند سطح ۱/۵ درصد وزنی ریزجلبک مناسب‌ترین سطح در این غنی‌سازی، است که می-تواند بخشی از عوارض ناشی از کمبود اسید γ -لینولنیک در بدن را بر طرف کند. به نظر میرسد در کلوچه‌های غنی‌شده، غشای سلولهای ریز-جلبک میتواند مولکول‌های اسید چرب را ریزپوشانی کنند و با وجود فرایند حرارتی پخت تا حدی از اسیدهای چرب موجود در ریزجلبک در برابر حرارت و اکسیداسیون محافظت کنند (۲۹). Gouveia و همکاران در تحقیق مشابهی از ریز جلبک ایزوکرایسیسگالبانو در تولید بیسکویت استفاده‌کردند. آن‌ها افزایش میزان ریزجلبک ایزوکرایسیسگالبان را موجب حضور اسیدهای چرب امگا ۳ در بیسکویت‌های غنی‌شده دانستند. این اسیدهای چرب در بیسکویت‌های شاهد وجود نداشت. Gouveia و همکاران در تحقیق مشابهی از ریزجلبکهای *اسپیرولینا ماکسیما* و *اسپرولینا دیاکرونما* در تولید دسرهای ژلی گیاهی استفاده‌کردند. افزودن این ریزجلبک‌ها علاوه بر تقویت ویژگی‌های بافتی موجب افزایش میزان اسیدهای چرب چند غیراشباع نظیر ایکوزاپنتا انوئیک و دوکوزاهگزا انوئیک وγ - لینولنیک می‌شود (۲۹).

تحقیقات دیگر نشان‌داده که می‌توان به منظور غنی‌سازی پروتئین در محصولات نانوایی از سیانوباکتر *اسپیرولینا پلاتنسیس* استفاده کرد، بدون آن‌که تغییر قابل ملاحظه‌ای در بافت، ضریب انبساط، درصد ترکیب و پذیرش حسی محصول ایجاد شود. (۵۹). بنابراین از سیانوباکتر اسپیرولینا به عنوان یک رنگ‌دهنده طبیعی که شیمیایی نیست، برای ماکارونی میتوان استفاده کرد و اینگونه نتیجه گرفت که با افزایش مقدار سیانوباکتر *اسپیرولینا* در ماکارونی، رنگ محصول از رنگ سبز کمرنگ به سمت رنگ سبز تیره تغییر رنگ پیدا نمود و رنگ سبز ریز جلبک به پاستا منتقل‌شده که دلیل آن وجود کلرفیل در ریزجلبک اسپیرولینا میباشد. مشابه همین نتایج در تحقیقی که غنی‌سازی محصولات پاستا توسط توده زنده جلبک کلرلا ولگاریس و اسپیرولینا را بررسی نمودند، ارائه شد(۷۳)، تحقیقات دیگر به نتایج مشابه دست یافتند، براساس این پژوهش افزودن پودر میکروجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌تواند ماکارونی را از نظر ویژگی‌های مورد بررسی بهبود دهد و می‌توان محصولی با کیفیت تغذیه‌ای تولیدکرد که باعث حفظ خواص فیزیکی و افزایش ارزش‌غذایی ماکارونی شود و نیز مورد رضایت و پسند مصرف‌کننده واقع گردد(۷۴،۷۵)، غنی‌سازی ماکارونی به عنوان محصولی پرمصرف بعد از نان و برنج در سبد غذای

خانواده با سیانوباکتر اسپیرولینا، می‌تواند باعث انتقال خواص ارشمند این ماده فراسودمند به سبد غذای خانواده و جامعه شود(۷۶).

امروزه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای به تأخیر انداختن و یا ممانعت از اکسیداسیون روغن‌های خوراکی استفاده می‌شود. در تحقیقی که توسط علوی و همکارانش انجام شد، از سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس به عنوان یک ترکیب طبیعی برای بهبود پایداری اکسیداتیو و افزایش زمان ماندگاری روغن زیتون بکر استفاده شد . نتایج نشان داد که *اسپیرولینا* پایداری اکسیداتیو روغن زیتون بکر را نسبت به روغن زیتون کنترل بهبود می‌دهد. در نتیجه‌گیری کلی، وجود ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی و داشتن ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال آزاد نشان داد که اسپیرولینا خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. استفاده از *اسپیرولینا* در روغن زیتون بکر با بررسی فاکتورهای پایداری اکسیداتیو اثبات کرد که اسپیرولینا پایداری اکسیداتیو روغن زیتون بکر را نسبت به روغن زیتون کنترل بهبود می‌دهد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در روغن زیتون بکر بر اساس استانداردهای موجود، مجاز نیست. درنتیجه، می‌توان برای افزایش پایداری اکسیداتیو روغن زیتون بکر، از مقدار بیشتری از اسپیرولینا به عنوان یک ترکیب طبیعی استفاده کرد. هم-چنین می‌توان از اسپیرولینا با ترکیبات طبیعی دیگر که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند، به عنوان هم افزا در روغن زیتون بکر استفاده کرد (۷۷).

تاکنون تحقیقات متعددی در زمینه غنی‌سازی و کاربرد سیانوباکترها از جمله *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مجصولات تولید شده بر پایه غلات، انجام گرفته‌است .به عنوان مثال، در مطالعه زاوو وهمکارانش، با افزودن ۳ درصد پودر *اسپیرولینا پلاتنسیس* و نیز ۳ درصد پودر پروتئین سویا به شیر خام و تلقیح آن *با استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، توانستند ماستی غنی از انواع ویتامین‌ها و ریز مغذی‌ها و نیز ۵ درصد پروتئین تولید نموده و ارزش‌های تغذیه‌ای و طعم حاصله را بهبود بخشند (۷۸). De Marco و همکارانش، اثر اختلاط زیست‌توده *اسپیرولینا* با آرد گندم، به منظور تولید پاستای خشک در سه غلظت۵، ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی را مورد بررسی قرار داده و ویژگی‌های کیفی تغذیه‌ای و تکنولوژیکی حاصله را نسبت به نمونه شاهد ارزیابی نمودند. درمجموع نشان دادند که محتوای پروتئینی افزایش یافته، و در عین حال قابلیت هضم کاهش پیدا نمود. محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی مورد سنجش قرار گرفت و نتایج دال بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار این مواد، نسبت به نمونه کنترل بود. این شواهد بیانگر ارتقاء ویژگی‌های زیستی عملکردی و تغذیه‌ای پاستای حاوی ریز جلبک *اسپیرولینا* بوده‌است (۷۹). افزودن پودر سیانوباکتر *اسپیرولینا پلاتنسیس* به فرمولاسیون ویفر روکش‌دار، باعث افزایش معنی‌دار مقدار این سه ماده مغذی، پروتئین، آهن و آلفاتوکوفرول در نمونه‌های غنی‌شده نسبت به نمونه شاهدگردیده‌است . درنتیجه می‌توان اظهار نمود که با استفاده از منبع فراسودمند *اسپیرولینا پلاتنسیس* در ترکیب و فرمولاسیون ویفر روکش‌دار، به ویژه در سطوح جایگزینی 1 درصد وزنی در کرم و 1/5 درصد وزنی در نان ویفر روکش‌دار، می‌توان محصولی با کیفیت تغذیه‌ای و حسی مطلوب تولید نمود (۸۰).

نتایج:

به دلیل تغییر عادت‌های غذایی مردم ، غذاهای فراسودمند محصولات مورد علاقه تعداد بسیار زیادی از مردم هستند. با بالا رفتن سن افراد در کشورهای توسعه یافته و افزایش نگرانی برای حفظ سلامت افراد مسن، که بیش‌تر در معرض بیماری‌ها، به خصوص بیماری‌هایی مانند سرطان، پوکی استخوان، دیابت و بیماری‌های قلبی و سکته قرار دارند، غذاهای فراسودمند بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. مسئله‌ای

که در حال حاضر بیش‌تر به آن پرداخته می‌شود، دریافت بهینه مواد مغذی، افزایش میانگین طول عمر و شناسایی اجزایی است که وقتی به رژیم غذایی اضافه می‌شوند، بتوانند موجب کاهش ابتلا به بیماری‌ها و افزایش سطح سلامت شوند (۸۱). بنابراین، *اسپیرولینا پلاتنسیس* به دلیل دارا بودن ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری و عناصر کمیاب با منشأ طبیعی فرصت‌های جدیدی را در تولید محصولات فراسودمند فراهم می‌کند. فراوانی ترکیبات زیستی مهم در جلبک‌ها عامل اهمیت و نقطه قوت آن‌ها است. به همین دلیل، توده‌های سیانوباکتریایی فرصت‌های جدیدی را در تولید محصولات لبنی فراسودمند فراهم می‌کنند. هم‌چنین با توجه به بررسی‌های انجام شده مبنی بر کمبود آهن در کشور و محبوبیت مصرف دوغ در ایران و هم‌چنین نتایج حاصل از این پژوهش، افزودن سیانوباکتر اسپی*رولینا پلاتنسیس* به فراورده‌های غذایی می‌تواند به ارتقای سطح سلامت جامعه کمک شایانی نماید. در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان اظهارکرد ، با به کارگیری منبع ارزان قیمت و فراسودمند سیانوباکتر *اسپیرولینا پلاتنسیس* در ترکیب کلوچه، میتوان محصولی با کیفیت تغذیه‌ای و حسی مطلوب تولید کرد، با توجه به افزایش تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند از جمله کولوچه، نان، دوغ، بیسکویت، پنیر و ... پذیرش هرچه بیشتر غذاهای حاوی سیانوباکتر در جهان، هزینه‌های پایین تولید و ارزش تغذیه‌ای بالای این سیانوباکتر، تحقیق و توسعه در این زمینه به منظور افزایش کاربرد آن در صنعت غذای ایران ضروری به نظر می‌رسد (۸۳).

مراجع

1- Heer K, Sharma S. Microbial pigments as a natural color: a review. Int J Pharm Sci Res. 2017; 8(5):1913-22.

2- Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological engineering. 2006; 28(1):64-70.

3- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. ommercial pplications of microalgae. Journal of bioscience and bioengineering. 2006; 101(2):87-96.

4- Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. Urological Res. 2002; 30:35-47.

5- Tietze H. Spirulina Micro Food Macro Blessings. Harald Tietze Publishing P. 1996.

6- Gershwin ME, Belay A. Spirulina in human nutrition and health CRC. Gorobests O., Blinlova L., Baturo A. 2002. Action of Spirulina platensis on bacterial viruses. Zhurnal Mikrobiol, Epidemiol, Immun. 2007; 18 (2) 40-49.

7- Vonshak A. Spirulina platensis (Arthrospira): physiology. Cell-biology and Biotechnology. 2002; 146-154.

8- Tavakoli Lahijani A. Shahidi F. Varidi M and Mohabi M, Application of Spirulina microalgae in food products, 20th National Congress of Food Science and Industry, Tehran, Sharif University of Technology. 2019; 287-298.

9- Hu Q. Industrial production of microalgal cell mass and secondary products-major industrial species. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology 2004 (264). United States: Blackwell Publishing Ltd.

10- Batista A, Nunes M, Raymundo A, Gouveia L,Sousa I, Cordobes F. Microalgae biomasss interaction in biopolymer gelled systems. Food Hydrocolloids 2010; 25: 817-825.

11- Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Biomed Pharmacol. 2005; 59: 551–560.

12- Shetty K., Paliyath G., Pometto A., and Levin R.E., Food Biotechnology, CRC Press, 2006; p. 498.

13- Sohaili, M. Optimization of phycocyanin production by spirulina algae. Master thesis of Ferdowsi Univ Mashhad .2015; 168-175.

14- Richmond, A. Mass culture of cyanobacteria. In: Mann, N., Carr, N., Eds. Photosynthetic prokaryotes. 2nd ed); Plenum Press, New York and London.1992; 181-210.

15- de Caire GZ, Parada JL, Zaccaro MC, de Cano MM. Effect of *Spirulina platensis* biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. World J Microbiol Biotechnol. 2000; 16:563-565.

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

17- Beheshtipour H, Mortazavian AM, Mohammadi R, Sohrabvandi S, Khosravi-Darani K. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2013 Mar;12(2):144-54.

18- Kavimandan, A. Incorporation of Spirulina platensis into probiotic fermented dairy products. Int. J. Dairy Sci. 2015;10: 1-11.

19- Patel AK, Singhania RR, Awasthi MK, Varjani S, Bhatia SK, Tsai ML, Hsieh SL, Chen CW, Dong CD. Emerging prospects of macro-and microalgae as prebiotic. Microbial Cell Factories. 2021. 5; 20(1):112.

20- Usharani G, Saranraj P, Kanchana D. Spirulina cultivation: a review. Int J Pharm Biol Arch. 2012; 3(6):1327-1341.

21- Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Spirulina–From growth to nutritional product: A review. Trends in food science & technology. 2017; 69:157-171.

22- Wang HY, Ni YY, Hu XS, Wu JH, Liao XJ, Chen F, Wang ZF. Kinetics of amino

pyrenoidosa) supplements. Chemosphere. 2005; 61(9):1244-1255.

31- Parada JL, de Caire GZ, de Mulé MC, de Cano MM. Lactic acid bacteria growth promoters from Spirulina platensis. International journal of food microbiology. 1998; 45(3):225-228.

32- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. J biosci Bioengin. 2006; 101(2):87-96.

33- Qaini M. Mateen Far M. Romani L. Chubkar N, chemical composition of spirulina microalgae powder. Amash Shale Biology Quarterly. 2019: 2 (1): 55 - 61.

34- Khazaipour A. Shahidi F., beneficial and brain foods to improve the nutritional value of mid-meals, the first national conference of mid-meals, Mashhad. 2013; 98-117.

35- Gupta M, Dwivedi UN, Khandelwal S. C-Phycocyanin: an effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. Toxicology letters. 2011; 204 (1):2-11.

36- Choonawala, B. Spirulina production in brine effluent from cooling towers. Durban Univ of Technol. 2007; 421-435.

37- Rakin M, Vukasinovic M, Siler-Marinkovic S, Maksimovic M. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. Food Chemistry. 2007; 100 (2):599-602.

38- Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiological reviews. 1983; 47(4):551-578.

39- Chronakis IS. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. Journal of agricultural and food chemistry. 2001; 49(2): 888-98.

40- Puyfoulhoux G, Rouanet JM, Besançon P, Baroux B, Baccou JC, Caporiccio B. Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. Journal of agricultural and food chemistry. 2001; 49(3):1625-1629.

41- Vonshak A. Mass culture of Spirulina outdoors-the earthrise farms experience. In

acid loss in carrot juice concentrates during storage. LWT-Food Science and Technology. 2007; 40 (5):785-92.

23- Salehifar M, Shahbazizadeh S, Khosravi-Darani K, Behmadi H, Ferdowsi R. Possibility of using microalgae Spirulina platensis powder in industrial production of Iranian traditional cookies. Iran J Nutrition Sci Food Technol. 2013; 7(4):63-72.

24- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. 2013. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. BioMed Res Int. 2013; 1–9.

25- Danesi ED, Rangel-Yagui CD, Carvalho JC, Sato S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. Biomass and Bioenergy. 2004; 26 (4):329-35.

26- Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat science. 200; 76 (1):138-46.

27- Eslami Meshkani A. Fadai Noghani and Khosravi Darani K. Mazinani P.investigating the effect of adding spirulina platensis microalgae powder on some physicochemical and sensory properties of probiotic buttermilk containing mint powder. Quarterly J Modern Food Sci Technol. 2013; (2): 59-70.

28- Sheehan VM, Ross P, Fitzgerald GF. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Sci Emerging Technol. 2007; 8(2): 279-84.

29- Sousa I, Gouveia L, Batista AP, Raymundo A, Bandarra NM. Microalgae in novel food products. Food chemistry research developments. 2008; 75-112.

30- Nakano S, Noguchi T, Takekoshi H, Suzuki G, Nakano M. Maternal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in Japan, and attempts to reduce maternal transfer with Chlorella (Chlorella

Spirulina platensis. Arthrospira. 1997; 21:149-176.

42- Ötleş S, Pire R. Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. Journal of AOAC international. 2001; 84 (6):1708-1714.

43- Ötleş S, Pire R. Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. Journal of AOAC international. 2001; 84(6):1708-14.

44- Romay CH, Gonzalez R, Ledon N, Remirez D, Rimbau V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Current protein and peptide science. 2003; 4(3): 207-16.

45- Chen T, Wong YS, Zheng W. Induction of G1 cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis inMCF-7 human breast carcinoma cells by seleniumenriched Spirulina extract. Biomed Pharmacy. 2010; 98-110.

46- Subhashini J, Reddanna P, Mahipal SVK, Reddy MC, Reddy MM Rachamallu A. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochem Pharm. 2004; 68:453-62.

47- Vinderola G, Matar C, Palacios J, Perdigón G. Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. Int J Food Microbiol. 2007; 115 (2):180-186.

48- Chen T, Wong YS, Zheng W. Induction of G1 cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis inMCF-7 human breast carcinoma cells by seleniumenriched Spirulina extract. Biomed Pharmacy 2010; 5 (8): 105-117.

49- Regunathan C, Wesley SG. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using Spirulina as a carotenoid source. Aquaculture Nutrition. 2006;12 (6): 425-432.

50- Tehami F. therapeutic properties of spirulina algae, special issue of the National Congress of Medicine and Sea. 2010; 4 (2): 60-68.

51- Choonawala, B. Spirulina production in brine effluent from cooling towers. 2007;Durban University of Technology. 421-437.

52- Asadi SZ, Beigmohammadi Z, Mirmajidi Hashtjin A. The Effect of Edible Coating Containing Spirulina platensis, Chitosan and Gelatin on Physicochemical, Sensory and Nutritional Properties of Dried Kiwifruit. J Food Sci Technol. 2020; 17 (102):53-67.

53- Mehrabi, Z. Goli, M. Production of dairy dessert based on formulation of date syrup, corn starch and gelatin using Response Surface Methodology (RSM). 2018; 115-125.

54- Agustini TW, Maâ WF, Widayat W, Suzery M, Hadiyanto H, Benjakul S. Application of Spirulina platensis on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. J Teknol. 2016; 78(4). 89-98.

55- Aminifar M, Miani S, Alami M, Ghaffarpoor M, Dastmalchi F, Maghsoodloo Y, Mohammadi M. Investigation on the physicochemical, textural and sensorial properties of functional dairy dessert prepared from hull-less barley malt. Iran J Biosystems Engineering. 2016; 47(3):501-509.

56- Jridi M, Souissi N, Salem MB, Ayadi MA, Nasri M, Azabou S. Tunisian date (Phoenix dactylifera L.) by-products: Characterization and potential effects on sensory, textural and antioxidant properties of dairy desserts. Food Chemist. 2015; 188: 8-15.

57- El-Garawany GA, Abd El Salam MH. Preparation and rheological properties of a dairy dessert based on whey protein/potato starch. Food Chemist. 2005; 91(2):261-267.

58- Barkallah M, Dammak M, Louati I, Hentati F, Hadrich B, Mechichi T, Ayadi MA, Fendri I, Attia H, Abdelkafi S. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. Lwt. 2017; 84:323-330.

59- Danesi ED, Navacchi MF, Takeuchi KP, Frata MT, Carvalho JC. Application of

sensory properties. Iran J food Sci Industry. 1401; 19 (127): 47-60.

68- Zanganeh, Negin, Barzegar, Hassan, Alizadeh Behbahani, Behrouz, and Mehrania, Mohammadamin. 2019; 89-98.

69- Mamatha B, Namitha K, Senthila A, Smitha J,Ravishankra G. Studies on use of Enteromorpha in snack food . J Food Chem. 2007; 101:1707-13.

70- Batista A, Nunes M, Raymundo A, Gouveia L,Sousa I, Cordobes F. Microalgae biomasss interaction in biopolymer gelled systems. Food Hydrocolloids 2010; 25: 817-825. Bioactives. 4: 134-142

71- Baky H, El baz F, El Barty. Phenolics from Spirulina maxima: Over-production and in vitro protective effect of its phenolics on CCl4 induced hepatotoxicity. J Medicinal Plants Research 2009; 3(1):24-30.

72- Belay A. New scientific developments in the health benefits of Spirulina (Arthrospira): Phycocyanin and its potential health benefits, J Nutrition Sci. 2004; 7(3):165-173.

73- Fradique M, Batista AP, Nunes MC, Gouveia L, Bandarra NM, Raymundo A. Incorporation of Chlorella vulgaris and Spirulina maxima biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010; 15;90(10):1656-1564.

74- Vinderola G, Matar C, Palacios J, Perdigón G. Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. Int J Food Microbiol. 2007; 115 (2):180-186.

75- Ouzyurt G, Uslu L, and Yuvka I, Gokdokan S, Atci G, Burcu AK, et al. Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with Spirulina platensis. J Food Qual 2015; 38(4): 268-272.

76- Mostolizadeh S, Moradi Y, Mortazavi MS, Motallebi A, Ghaeni M. Application effects of Spirulina powder on the fatty acid and amino acid composition of pasta. Iran Sci Fisheries J. 2017; 26(4):119-30.

77- Alavi N, Golmakani M, Taghi A, Lari M, Karamat M, Shakarforosh Shahram, Spirulina platensis in protein enrichment of manioc based bakery products. J Biotechnol. 2010; (150): 311-325.

60- Salehifar M, Shahbazizadeh S, Khosravi-Darani K, Behmadi H, Ferdowsi R. Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7(4): 63-72. [In Persian].

61- Geneva, Switzerland: WHO; 2008.World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005.

62- Varga, L., Monlar, N. and Szigeti, J. Manufacturing technology for a spirulina enriched mesophilic fermented milk. International. 2012; 98-110.

63- Mohammadi F, Fadaee V, Khosravi K. Influence of different concentrations of *Spirulina platensis* on some physicochemical and sensory properties of probiotic spinach yoghurt. Food Res J. 2016; 26 (2):127-43.

64- Fadai Noghani, W., Mazinani, S., Khosravi Darani, K., Islami Meshkanani, A., Mirzadeh, A. The effect of *Spirulina platensis* biomass powder on some physicochemical and sensory properties of Iranian probiotic white cheese containing oregano powder prepared by ultra-refining method. New Food Technol Quart. 2014; 7: 1-10.

65- Babakhani Zahra, Karmi Mostafa, Rezad Bari Mahmoud. The use of Spirulina platensis microalgae in the formulation of low-calorie beneficial sauce enriched with iron and zinc. Iran j food Sci Indust. 2020; 15 (84):125-136.

66- Babakhani Zahra, Karmi Mostafa, Rezad Bari Mahmoud. The use of Spirulina platensis microalgae in the formulation of low-calorie beneficial sauce enriched with iron and zinc. Iran J Food Sci Indust. 2017; 15 (84):125-136.

67- Toliti Ghazaleh, Bey Mohammadi Zahra, Labiki Ghazal. Feasibility of producing dairy dessert enriched with microalgae Spirulina platensis and stevioside and investigating its physicochemical and

80- Sozankar, R, Mohed, S, and Chaichi Nosrati, A. Enrichment of coated wafer using Arthrospira *Spirulina platensis* microalgae powder. J Nutrition Sci Food Indust. 2017; 13 (2), 51-60.
81- Heydari Vala, H. familiarity with super-beneficial foods; 2005
82- Salehifar M, Shahbazizadeh S, Khosravi-Darani K, Behmadi H, Ferdowsi R. Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. Iran J Nutr Sci Food Technol .2013; 7(4): 63-72.

Norouzi Masoud. Improving the oxidation stability of virgin olive oil using spirulina microalgae as a natural antioxidant. Nutrition Sci Food Indust. 2015; 10 (4): 63-74.
78- Zhao X, Zhao X. Study on Spirulina Platensis Nutritious Yogurt. China Dairy Indust. 1999; 27:168- 179.
79- De-Marco ER, Steffolani ME, Martínez CS, León AE.Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. Food Sci Technol. 2014; 58(1):102-108.

Cyanobacterium spirulina: a versatile food additive

Fatemeh Shayesteh [1]*, Ali Sharifzadeh [2], Sara Arti[3]
1-teacher of education department Ministry of Education, Borujen, Iran
2- Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Research expert, University of Medical Sciences, Isfahan,Iran
* Coresponding author: fatemeh.shayesteh2024@gmail.cim

Abstract

Some cyanobacteria are considered important biological resources in the production of food products due to the existence of balance in chemical compounds and can be used as improvers and enhancers of the nutritional value of foods in humans and animals. Spirulinaplatensis is the richest additive in terms of protein, some vitamins, especially vitamin B12 and the precursor of vitamin A, minerals, especially iron and calcium, and other biologically active compounds, including antioxidant compounds, the important natural pigment phycocyanin and essential fatty acids such as gammalinolinic acid. . This cyanobacterium has been introduced by the World Health Organization as "the best food" and also as "the best solution for tomorrow". The benefits and superiority of this cyanobacterium compared to other food plant sources and other algae, along with not having a cellulose cell wall, made it easier to absorb its nutrients and play a distinct role in improving the value of healthy food products. In this research, the medicinal properties and the role and importance of this nobacterium in enhancing the nutritional value of foods have been investigated.

Keyword: Beneficial Food, Nutritional Value, Spirulina

رهیاف های نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳

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

بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۸

فاطمه خداوردی پور[۱]، پریسا کریمی[۲]، نازیلا ارباب سلیمانی[۳*]

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

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

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

چکیده

عفونت‌های دستگاه ادراری (UTIs) یکی از رایج‌ترین عفونت‌های باکتریایی در کودکان هستند که بیشترین عامل آن‌ها باکتری اشریشیا کلی (Escherichia coli) است. با توجه به رشد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی درسویه‌های پاتوژن، بررسی و شناسایی ژن‌های مقاومت و ویرولانس اشریشیا کلی اهمیت ویژه‌ای دارد. این مطالعه با هدف تعیین خصوصیات مولکولی و الگوهای ژن‌های ویرولانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری در شهرستان اصفهان انجام شده است. در این پژوهش، از میان ۱۰۰ نمونه ادرار جمع‌آوری شده از کودکان مبتلا به عفونت ادراری و پس از کشت باکتری‌ها و تایید گونه اشریشیا کلی با استفاده از روش‌های کشت میکروبی و PCR، بررسی ژن‌های ویرولانس شامل fimH ، hlyA، cnf1 و سایر ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش PCR چندگانه انجام شد. از مجموع ۵۶ ایزوله اشریشیا کلی جدا شده، ژن fimH در ۱۰۰درصد ایزوله‌ها شناسایی شد که نشان‌دهنده نقش کلیدی آن در فرآیند عفونت است. ژن‌های توکسین‌ساز hlyA وcnf1 نیز به ترتیب در ۸۵/۷ درصد نمونه‌ها مشاهده شدند. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داد که توزیع ژن‌های ویرولانس و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور معناداری با شدت عفونت و وضعیت بالینی کودکان مبتلا به عفونت ادراری ارتباط دارد. به‌ویژه، ایزوله‌هایی که ژن‌های توکسین‌ساز hlyA و cnf1 را حمل می‌کردند، عفونت‌های شدیدتر و طولانی‌تری را ایجاد کردند که نیازمند مراقبت‌های درمانی بیشتری بودند. همچنین، نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که این ایزوله‌ها در برابر داروهای بتالاکتام و برخی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌های متداول، مقاومت بالایی دارند.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: :۱۴۰۳/۱۱/۲۲

پذیرش:۱۴۰۳/۱۱/۲۲

چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳

DOI:

کلمات کلیدی: عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، اشرشیا کلی

* *نویسنده مسئول:* *Email*

nazilaarbab@yahoo.co.uk

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است که عمدتاً توسط باکتری اشریشیا کلی (E. coli) ایجاد می‌شود و در ۸۰ تا ۹۰ درصد از عفونت‌های ادراری اکتسابی از جامعه و ۳۰ تا ۵۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد (۱و۲). شیوع عفونت‌های ادراری به عوامل مختلفی از جمله سن و جنس وابسته است؛ به طوری که سه تا پنج درصد از دختران و یک درصد از پسران در دوران کودکی دچار عفونت ادراری می‌شوند (۱و۳). در سال اول زندگی، این عفونت در پسران شایع‌تر از دختران است، اما در مراحل بعدی، دختران بیشتر در معرض خطر ابتلا به این عفونت قرار دارند (۴). همچنین، شیوع عفونت ادراری در پسران ختنه نشده نسبت به ختنه شده‌ها بیشتر است (۵). اشریشیا کلی که معمولاً در روده انسان و حیوان به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی یافت می‌شود، گاهی در آب، خاک و حتی گیاهان نیز یافت شده و در صورت انتقال به دستگاه ادراری، موجب بروز عفونت می‌شود (۶و۷). این باکتری که از خانواده انتروباکتریاسه و به شکل باسیل گرم منفی است، می‌تواند علاوه بر عفونت‌های ادراری، عفونت‌هایی همچون سپسیس، گاستروانتریت، مننژیت نوزادان، عفونت مجاری صفراوی و عفونت زخم ایجاد کند (۸). در کودکان، عفونت‌های ادراری ناشی از سویه

های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (UPEC) به عنوان یکی از علل مهم بستری شدن و درمان‌های طولانی مدت شناخته می‌شود (۱و۲). همچنین، این عفونت‌ها در کودکان عوارضی همچون آسیب به پارانشیم کلیه و فیبروز کلیوی ایجاد می‌کنند و به‌عنوان دومین عفونت شایع کودکان مطرح‌اند (۹و۱۰). با افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، درمان عفونت‌های اشریشیا کلی به چالشی جدی بدل شده است. علاوه بر خطر شکست درمان، این مقاومت‌ها منجر به گسترش مقاومت میان سایر باکتری‌ها و ظهور سویه‌های مقاوم‌تر می‌شوند (۲). اعضای خانواده انتروباکتریاسه به‌طورمعمول نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند و این مقاومت از مکانیسم‌های متعدد ذاتی و اکتسابی ناشی می‌شود که باعث می‌شود برای درمان این عفونت‌ها، تست‌های حساسیت میکروبی ضرورت یابد (۹). به‌ویژه، افزایش سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز، اثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را کاهش داده و محدود کرده است (۸). بنابراین، شناسایی پاتوژن‌ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها برای تجویز درمان صحیح ضروری است (۱۱و۱۲). سویه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی (UPEC) به‌دلیل برخورداری از فاکتورهای ویرولانس متعدد، بیماری‌زایی بالایی دارند. از جمله این عوامل، فیمبریه‌های نوع P و S ، فیمبریه‌های چسبندگی، همولیزین(hlyA) ، فاکتور نکروزان سایتوتوکسیک (cnf-1)، آئروباکتین(eae) و برخی دیگر از فاکتورهای بیماری‌زا همچون usp ، iroN، set-1 و astA هستند که در افزایش توان چسبندگی و تهاجم به سلول‌های میزبان نقش دارند (۱۳). حضور این ژن‌ها در UPEC باعث افزایش چسبندگی و نفوذپذیری آن‌ها به سلول‌های اپیتلیال دستگاه ادراری و تولید فاکتورهای التهابی می‌شود که در نهایت به فرار از فاگوسیتوز می‌انجامد (۱۴). بسیاری از این سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی غشاهای مخاطی مثانه را دارند که منجر به بروز عفونت‌های مقاوم و غیرقابل درمان می‌شود و همچنین باعث افزایش مقاومت چندگانه دارویی و عفونت‌های مکرر می‌گردد (۱۵). با توجه به شیوع و پیامدهای این عفونت‌ها در جامعه، غربالگری، تشخیص و درمان سریع و صحیح این بیماران ضروری است. هدف اصلی این تحقیق، بررسی خصوصیات مولکولی ایزوله‌های اشریشیا کلی جداشده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۸ است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

تعداد ۱۰۰ نمونه ادرار به حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل مخصوص نمونه‌گیری از کودکان مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های سطح شهرستان اصفهان، از دی ماه ۹۸ تا تیر ۹۹ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. کشت و جداسازی نمونه‌های ادرار ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل جهت کشت میکروبی در محیط TSB به‌منظور غنی‌سازی اولیه قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از این مرحله، رشد باکتری‌ها در محیط مک کانکی به شکل خطی کشت داده شد و سپس در محیط EMB کشت داده شد. پرگنه‌های صورتی‌رنگ لاکتوز مثبت برای تشخیص اشریشیاکلی انتخاب شدند. برای تأیید نهایی، پرگنه‌های سبز متالیک لاکتوز مثبت با انجام رنگ‌آمیزی گرم، تست IMViC و کشت در محیط سه قندی آهن‌دار(TSI) بررسی شدند. باکتری های منتخب به روش جوشاندن استخراج DNA شدند. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت یک شبه باکتری در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌عنوان منبع DNA جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده، ۵ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز ۱درصد قرار داده شد و با روش الکتروفورز بررسی گردید. نتایج الکتروفورز به‌صورت باندهای واضح و یکنواخت نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA بودند. برای تعیین غلظت و کمیتDNA ، از دستگاه بایوفوتومتر در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. نمونه‌هایی با کیفیت مناسب و غلظتی حداقل برابر با ۵۰ نانوگرم برای مرحله PCR انتخاب شدند.

تأیید شناسایی اشریشیاکلی

برای تأیید شناسایی اشریشیا کلی، از روش PCR و ردیابی ژن SrRNA ۱۶ استفاده شد. ابتدا DNA از ایزوله‌های باکتریایی رشد یافته در محیط TSB استخراج گردید. سپس، با استفاده از دو پرایمر اختصاصی AGAGTTTGATCMTGGCTCAGو CCGTCAATTCATTTGAGTTT ناحیه‌ای از ژن ۱۶SrRNA که به طور خاص به اشریشیا کلی مربوط است، تکثیر شد. در نهایت، وجود این قطعه ژنی، به عنوان تأییدی برای حضور اشریشیا کلی در نمونه‌ها محسوب شد.

ردیابی ژن‌های حدت

جهت ردیابی ژن‌های حدت اصلی داشریشیاکلی، واکنش PCRبا استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. مشخصات و توالی پرایمرهای مورداستفاده به‌صورت چندگانه در سه واکنش جداگانه تنظیم شد تا بیشترین بازده در ردیابی ژن‌ها حاصل شود.

الکتروفورز و تجزیه و تحلیل محصول PCR

برای بررسی و تأیید محصولات آگارز ۲ درصد انجام شد. به‌منظور تهیه ژل، ۰,۴ گرم پودر آگارز در ۲۰ میلی‌لیتر بافر TBE X1حل شد و در قالب مخصوص ریخته شد. پس از قرار دادن محصول PCR و مارکر DNA ، ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه اعمال شد. نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentationتجزیه و تحلیل و تصویربرداری شدند.

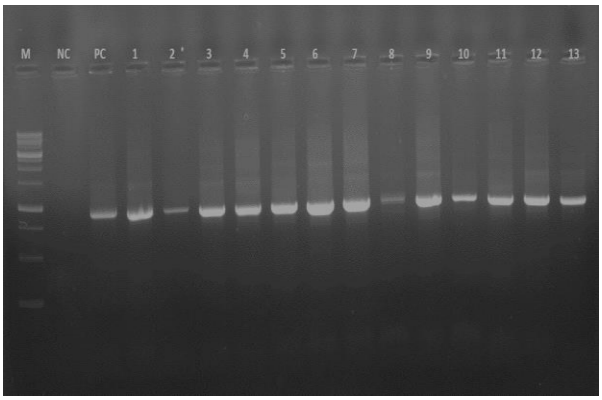
تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌های آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ استفاده شد و برای سنجش ار ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از مدل‌های آماری کای مربع و آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

آزمون های میکروبی

مطالعه حاضر با هدف بررسی خصوصیات مولکولی ایزوله‌های ایشرشیا کلی جدا شده از موارد عفونت‌های ادراری کودکان در شهرستان اصفهان در سال ۹۸ انجام شد که برای این منظور تعداد۱۰۰ نمونه عفونی مورد مطالعه تعداد ۵۶ نمونه (۵۶درصد) آلوده به اشریشیا کلی بودند ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی با ردیابی ژن 16srRNA در آن ها به روش PCR تائید شدند که ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل (۱) نشان داده شده است:



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در ایزوله‌های اشریشیاکلی (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NP= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 13-1= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن 16srRNA).

در ایزوله‌های جداشده حضور شایع ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت ارزیابی شد که نتایج در جدول (۱)، آورده شده است:

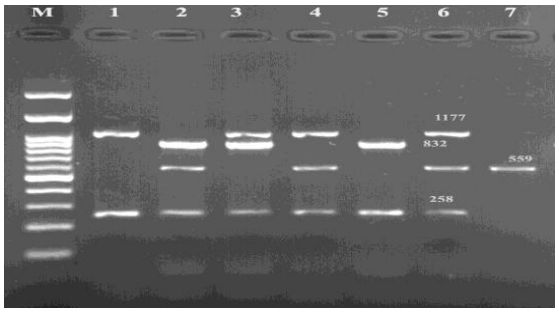
جدول ۱- شایع ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادرار

ردیف	نام ژن	تعداد و درصد	ردیف	نام ژن	تعداد و درصد
۱	set-1	(۸۷/۵۰)۴۹	۱۴	papGI	(۱۶/۵۷)۱۶
۲	sen	(۲۵)۱۴	۱۵	papGII	(۳۲/۱۸)۱۴
۳	astA	(۲۵)۱۴	۱۶	papGIII	(۷۸/۵۷)۴۴
۴	sigA	(۲۵)۱۴	۱۷	kpsMT	(۸/۹۲)۵
۵	sap	(۳۳/۹۲)۱۹	۱۸	iha	(۳۲/۱۴)۱۸
۶	Pic	(۱۷/۸۵)۱۰	۱۹	iron	(۶۴/۲۸)۳۶
۷	pap	(۸۳/۹۲)۴۷	۲۰	ompT	(۷/۱۴)۴
۸	cnf 1	(۸۵/۷۱)۴۸	۲۱	usp	(۱/۷۸)۱
۹	hlyA	(۸۵/۷۱)۴۸	۲۲	iss	(۱۲/۵۰)۷
۱۰	sfa	(۶۹/۶۴)۳۹	۲۳	irp2	(۵۱/۷۸)۲۹

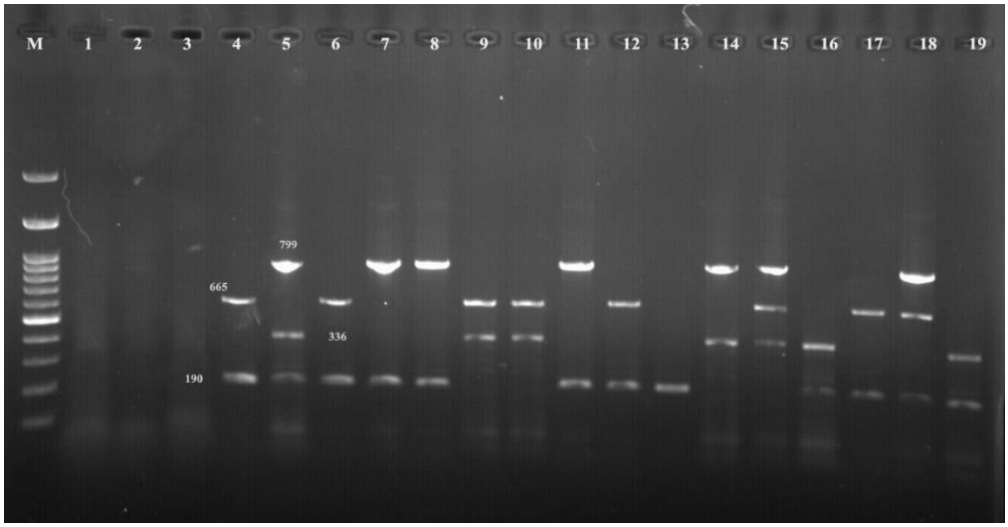
۱۱	afa	(۱۴/۲۸)۸	۲۴	tsh	(۱۲/۵۰)۷
۱۲	iuc	(۱۲/۵۰)۷	۲۵	vat	(۱۴/۲۸)۸
۱۳	fim	(۱۰۰)۵۶	۲۶	Cva	(۷/۱۴)۴

همان گونه که در جدول فوق مشهود است۵۶ ایزوله اشریشیاکلی مورد مطالعه واجد اکثر عوامل حدت بوده و در این میان ژن‌های fimH، set 1، cnf 1 وhlyA با فراوانی۱۰۰و۸۱/۷۵ درصد شایع ترین و ژنusp با فراوانی ۱/۷۸ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند. در تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی داری بین حضور ژن‌های kpsMT/ usp/ ompT/ Cva با ژن‌های fimH، cnf 1 وhlyA، papدر سطح اطمینان ۹۵ درصد (p= 0. 038) مشاهده شد.

ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت مورد مطالعه در شکل های (۲) و (۳) آورده شده است:



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری کودکان(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، قطعه ۲۵۸جفت بازی مربوط به ژنpapGIII قطعه ۵۵۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن fim قطعه ۸۳۲ جفت بازی DNA مربوط به ژنsap قطعه ۱۱۷۷ جفت بازی DNA مربوط به ژنhlyA



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری کودکان(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، قطعه ۱۹۰جفت بازی مربوط به ژن papGII قطعه ۳۳۶جفت بازی DNA مربوط به ژنpap قطعه ۶۶۵ جفت بازی DNA مربوط به ژنiron قطعه ۷۹۹ جفت بازی DNA مربوط به ژنsen

این مطالعه نشان داد که ژن‌های ویرولانس fimH، hlyA، و cnf1 نقش کلیدی در شدت عفونت‌های ادراری کودکان دارند و حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد که بسیاری از ایزوله‌ها در برابر داروهای رایج مقاوم هستند. این یافته‌ها نیاز به رویکردهای درمانی هدفمند و استفاده بهینه از آنتی‌بیوتیک‌ها را برجسته می‌کنند.

بحث

عفونت دستگاه ادراری از شایع‌ترین عفونت‌ها درزنان و کودکان است و در این میان باکتری‌های مختلف، اشریشیاکلی عامل اصلی عفونت به‌شمار می رود اشریشیاکلی به‌عنوان یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های ادراری در انسان محسوب می گردد. این باکتری قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری وسیعی از سیستیت تا پیلونفریت می باشد عفونت بستگی به حدت سویه و مقاومت میزبان دارد. شناسایی فاکتورهای ویرولانس این باکتری در پیشگویی وضعیت عفونت موثر می‌باشد. بسیاری از این عوامل حدت محصول ژن های مختلفی می باشند که قابل شناسایی هستند .از این رو مطالعات مولکولی متعددی در جهت شناسایی این عوامل حدت صورت گرفته است در بین عوامل حدت در سویه‌های بیماریزایی اشریشیاکلی از موارد عفونت های ادراری فیمبریه ها نظیر فیمبریه P و fimH از اهمیت ویژه ای برخوردارند. علاوه بر عوامل فیمبریه ای کپسول و عامل تهاجم نیز نقش مهمی در گسترش عفونت دارند .از این رو در مطالعات مختلف فاکتورهای ویرولانس باکتری اشریشیاکلی در جدایه های مربوط به عفونت های ادراری، در ایران و نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفته اند. در مطالعه ناظمی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، شیوع ژن های fim و pap در نمونه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن را مورد بررسی قرار دادند که میزان شیوع این ۲ ژن به ترتیب ۹۴درصد و ۳۵/۵د گزارش شد(۱۶). در سال ۲۰۱۲ عربی و همکاران به بررسی حضور تعدادی از ژن‌های فیمبریه ای در ۳۴۳ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری جمع آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی پرداختند .نتایج در این مطالعه میزان حاکی از شیوع ژن هایfimH و pap به میزان ۸۷/۷ درصد و ۳۰ درصد بود(۱۷). در سال ۲۰۱۲ کریمیان و همکاران به بررسی حضور ژن های ویرولانس در ۱۲۳ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده ازعفونت های ادراری پرداختند . در این مطالعه، فراوانی ژن fimH ، ۶۹/۶ درصد و فراوانی ژن pap، ۵۰/۴ درصد بود (۱۸). در مطالعه‌ای که بهالو و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، از ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی یوروپاتوژن، فراوانی ژن های fimH و pap به ترتیب ۳۰ درصد و ۴۰ درصد گزارش کردند (۱۹). در مطالعه‌ای که جلالی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری رااز لحاظ وجود تعدادی از ژن‌های حدت مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه میزان شیوع ژن های fimH و pap به ترتیب برابر ۷۳ درصد و ۴۶ درصد بود (۲۰). مطالعه‌ای که حجتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، میزان شیوع ژنfimH ، ۹۲/۸ % بود وpapEF در بین سویه های یوروپاتوژن ۱۰درصد بود (۲۱). ممتاز و همکاران به بررسی حضور ژن های ویرولانس و مقاومت دارویی در سویه های اشریشیاکلی در سال ۲۰۱۳ پرداختند. ۸۶/۶ درصد سویه ها واجد ژن fim ، ۴ درصد نمونه ها دارای ژن kpsMT بودند (۲۲). درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۵، میزان فراوانی ژن ibeA را در جدایه های اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری ۹/۴ درصد بدست آوردند (۲۳). هم‌چنین اسدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی حضور تعدادی از ژن های ویرولانس در جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن و سنجش میزان حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها پرداخته و گزارش نمودند که ۵۶/۷ درصد جدایه‌های دارای ژن fimH ۲۰ درصد واجد ژن ibeA می باشند (۲۴). Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی حضور 29 ژن ویرولانس در 75 سویه

اشریشیاکلی جداسازی شده از عفونت های ادراری پرداختند در این مطالعه فراوانی ژنfimH ۱۰۰درصد، papAH ۷۹، درصد papEF، ۷۷درصد، kpsMT ۱درصد، ibeA ۵ درصد بود(۲۵). در مطالعه Robino و همکاران سال ۲۰۱۴ میزان فراوانی ژن هایfimH ، kpsMT وpapEF به ترتیب ۸۹ و ۸۸ درصد بوده است(۲۶). در مطالعه Tiba و همکاران که سال ۲۰۰۸ انجام دادند، میزان شیوع ژن های fimH ، ۹۷/۵ درصد kpsMT ، ۵۳/۱ درصد، papEF ۳۲/۷ درصد بود(۲۷). Tramutaو همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی شیوع ژن های فیمبریه ای در سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جداسازی شده از سگ و گربه در کشور ایتالیا پرداختند. در این مطالعه ژن fim دارای بالاترین فراوانی (۸۳ درصد در سگ ها و۹۰ درصد در گربه ها) در بین این سویه ها بود(۲۸).

در مطالعه حاضر اکثر عوامل حدت در ایزوله های مورد مطالعه ردیابی شد که در این میان fimH،set 1، cnf 1 و hlyA با فراوانی۱۰۰و۸۱/۷۵ درصد شایع ترین و ژنusp با فراوانی ۱/۷۸ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان می دهد که فراوانی ژن fimH در مقایسه با سایر ژن های فیمبریه ای دخیل در ایجاد عفونت های ادراری به مراتب بیشتر بوده و سایر ژن های فیمبریه ای در مرتبه های بعدی قرار می گیرند که این امر نشان دهنده اهمیت بالای این ژن فیمبریه در بروز بیماری و بیماری زایی این باکتری متناسب با علائم بالینی در نمونه های جمع آوری شده این تحقیق می باشد که این امر می تواند با میزان شیوع ژن ها و باکتری اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری ارتباط داشته باشد .در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن های کپسولی یعنی ژن هایKspMT (۸/۹۲)، iuc (۱۲/۵)،iron (۳۲/۱۴)،iha (۶۴/۲۸ درصد) بود که در ایجاد بیماری دخیل می باشند. در مطالعات مختلف درصدهای متفاوتی از شیوع میزان این ژن به دست آمد که علت این تفاوت می‌تواند تفاوت در منبع سویه-ها یا تفاوت در منطقه جغرافیایی باشد .همان طور که از نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به دست آمد، میزان فراوانی ژن uspکمتر از سایر ژن‌هاست و در مطالعه حاضر نیز در هیچ یک ازجدایه ها این ژن شناسایی نشد .از مزایای مطالعه حاضر، استفاده از روش Multiplex-PCR بود که امکان شناسایی همزمان چند ژن ویرولانس را به طور هم‌زمان و در مدت زمان کوتاه تر امکان پذیر می سازد.

نتیجه گیری

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با دستاوردهای این پژوهش میزان ژن fimHدر همه جدایه ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده و ژن های فیمبریه pap, papGII، papGIII در رتبه های بعدی قرار گرفته اند پس این 3 ژن جزیی از فاکتورهای حدت اشریشیاکلی بوده که قادر به ایجاد عفونت ادراری می باشند، در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به پاتوتیپ های اشریشیاکلی و ژن های مربوط صورت گرفته است .حال با کمک روش Multiplex-PCR می‌توان در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن های بیماری زا پی برد و درمان مناسب و به موقع را انجام داد .بدون شک با مطالعات بیشتر اهمیت هر یک از ژن های حدت در پاتوژنز اشریشیاکلی در عفونت‌های ادراری مشخص خواهد شد که این یافته‌ها جهت طراحی معیارهای پیشگیری کننده نیاز است.

.

.

.

مراجع

1. Griebling TL.2005. Urologic diseases in America project: trends in resource use for urinary tract infections in women. Urology J.173(4):1281-7.
2. Ejrnæs K.2011. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by Escherichia coli. Dan Med Bull. 58(4):B4187.
3. Bader MS, Hawboldt J, Brooks A.2010. Management of complicated urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. Postgraduate medicine.122(6):7-15
4. Mittal S, Sharma M, Chaudhary U.2010. Study of virulence factors of uropathogenic Escherichia coli and its antibiotic susceptibility pattern. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 57(1):61.
5. Marhova M, Kostadinova S, Stoitsova S.2009. Antimicrobial resistance profiles of urinary Escherichia coli isolates. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 23(sup1):616-20.
6. Wagenlehner FM, Naber KG, Weidner W.2008. Rational antibiotic therapy of urinary tract infections. Med Monatsschr Pharm. 31(10):385-390.
7. Sanchez U M, Bello T H, Dominguez Y M, Mella M S, Zemelman Z R, Gonzalez RG.2006. Transference of extendedspectrum beta-lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae. Rev Med Chil. 134(4):415-420.
8. Hickerson AD, Carson CC. The treatment of urinary tract infections and use of ciprofloxacin extended release. Expert opinion on investigational drugs. 2006 May 1;15(5):519-32.
9. Johnson JR, Russo TA.2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. International journal of medical microbiology. 295(6-7):383-404
10. Haghgoo SM, Varshochi M, Sabour S, Askari E, et al. 2014.The Prevalence and Antibiotic Susceptibility Pattern of Isolated Microorganisms from Hospitalized Patients with Heart Diseases. J Isfahan Med Sch . 260-68. [Persian]
11. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GKM. 2010. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(4): 1089-92.
12. Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. (8): 26-38.
13. Akhi MT, Toloue Ostadgavahi A, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, Pirzadeh T. 2015. Virulence Gene Assessment and Antibiotic Resistance Pattern of O157 Enterohemorrhagic Escherichia coli in Tabriz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology.8(11): e25317.
14. Pan H, Zhang J, Kuang D, Yang X, Ju W, Huang Z, et al.2015. Molecular analysis and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic Escherichia coli from diarrheal patients. Diagnostic microbiology and infectious disease.81(2):126-31.
15. Brandon AN, Hill DR.1983. Selected list of Books and Journals for the small medical library. Bulletin of the Medical Library Association. 71(2):147.
16. Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Mirinargesi M, Sharifi S.2014. The Detection of Fimbrial Pathogenic Genes in E. coli Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection. Med Lab J.4(2): 31.
17. Arabi SH,Tohidi F, Naderi S, Nazemi A, Jafarpour M, Naghshbandi R.2012. The common fimbaria genotypeing inuropathogenic Escherichia coli:Annals Biologi Res.3(10): 4951-54.
18. Karimian A, Momtaz H, Madani M.2012. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res.6(39): 6811-6.

19. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F.2013. Detection of some virulence factors of Escherichia coli isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by multiplex PCR. Middle East J Sci Res.14(1): 29-32.
20. Jalali HR, Pourbakhsh A, Fallah F, Eslami G.2015. Genotyping of Virulence Factors of Uropathogenic Escherichia coli by PCR. Novel Biomed. 3(4): 177-81.
21. Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholipour A. 2015. The FimH gene in uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection. Jundishapur J Microbiol.8(2): e17520
22. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al.2013. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob.12: 8.
23. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi Boroojeni A, Bahadori M, Arabshahi S, et al.2015. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Lett Appl Microbiol.60(2): 148-54.
24. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S.2014. The association of virulence determinants of uropathogenic Escherichia coli with antibiotic resistance. Jundishapur J Microbiol. 7(5): e9936.
25. Johnson JR, Stell AL.2000. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis.181(1): 261-72.
26. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pirez MC, et al.2014. Intracellular bacteria in the pathogenesis of Escherichia coli urinary tract infection in children. Clin Infect Dis.59(11): e158-64.
27. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S.2008. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.50(5): 255-60.
28. Tramuta C, Nucera D, Robino P, Salvarani S, Nebbia P.2011. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs and cats in Italy. J Vet Sci. 12(1): 49-55.

Investigation of antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolates isolated from cases of urinary tract infections in children in Isfahan city in 2018

Fatemeh Khodaverdipour[1],Parisa Karimi[2], Nazila Arbab soleimani[3*]

1- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.
2- Master's degree in microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan,Iran.

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

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common bacterial infections in children, the most common cause of which is Escherichia coli. Considering the growth of antibiotic resistance in pathogen strains, investigation and identification of resistance and virulence genes of Escherichia coli is of particular importance. This study was conducted with the aim of determining the molecular characteristics and patterns of virulence and antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates isolated from children with urinary tract infections in Isfahan city. In this research, among 100 urine samples collected from children with urinary tract infection and after bacterial culture and confirmation of Escherichia coli species using microbial culture and PCR methods, virulence genes including fimH, hlyA, cnf1 and other virulence and resistance genes were examined. Antibiotic was done by multiple PCR method. From a total of 56 Escherichia coli isolates, the fimH gene was detected in 100% of the isolates, which indicates its key role in the infection process. The toxin-producing genes hlyA and cnf1 were observed in 85.7% of the samples, respectively. In addition, the studies showed that the distribution of virulence genes and the pattern of antibiotic resistance are significantly related to the severity of infection and the clinical condition of children with urinary tract infection. In particular, isolates carrying the hlyA and cnf1 toxin-producing genes caused more severe and prolonged infections that required more therapeutic care. Also, the antibiotic resistance results showed that these isolates are highly resistant to beta-lactam drugs and some other common antibiotics.

Keywords: Urinary tract infection, antibiotic resistance, Escherichia coli.

رهیاف های نوین در علوم سلولی و مولکولی
JNACMS
دوره ۲ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳
Journal homepage: https://sanad.iau.ir/journal/nacms

ژنوتایپینگ ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از مواد غذایی به روش RAPD-PCR

فاطمه پارسا[۱]، منوچهر مومنی شهرکی[۲*]، فاطمه خداوردی پور[۲]
۱.گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

چکیده

سالمونلوز بیماری مشترک در انسان و حیوانات است. یکی از سرووارهای مهم از لحاظ بیماری‌زایی در انسان، دام و طیور، *سالمونلا انتریتیدیس* است که عامل رایج بیماری‌های منتقله از طریق غذا نیز می‌باشند. روش‌های تایپینگ مولکولی نظیر RAPD-PCR الگوهای متفاوت برای تمایز گونه‌های سالمونلا ایجاد می‌کنند. هدف از این مطالعه تفریق و تمایز و تعیین قرابت بین جدایه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* به وسیله روش RAPD-PCR بود. در سال۱۳۹۷ در مجموع ۳۵۰ نمونه ماده غذایی شامل گوشت قرمز و مرغ، سبزی خوردن، سالاد ماکارونی و سالاد الویه از مراکز تولید و اغذیه فروشی‌های شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. پس از جداسازی و تأیید تشخیص به روش PCR جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* به‌روش RAPD-PCR از پرایمر P1254 با توالی CCGCAGCCAA استفاده شد. تعداد ۳۰ ایزوله *سالمونلا انتریتیدیس* جداسازی گردید. در سطح تشابه ۷۶ درصد ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ۲۱ زیرگروه بودند که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله‌های مورد مطالعه است.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت:
پذیرش:
چاپ:۱۴۰۳/۱۱/۲۳
DOI:

کلمات کلیدی: *سالمونلا انتریتیدیس*، ژنوتایپینگ، مواد غذایی، RAPD-PCR

* *نویسنده مسئول:*
Email: m.momeni@iau.ir

مقدمه

سالمونلا[2] یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه[3] می‌باشد که باسیل‌های گرم منفی، متحرک با داشتن تار لرزان یا فلاژن پیرامونی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور می‌باشند. سالمونلا دارای دو گونه مهم *سالمونلا انتریکا*[4] و *سالمونلا بونگوری*[5] است که گونه انتریکا خود دارای شش گونه می‌باشد (۱). *سالمونلا انتریکا* زیرگونه انتریکا سروتیپ *انتریتیدیس* است که به اختصار سالمونلا انتریتیدیس[6] نیز نامیده می‌شود و مهم‌ترین عامل در ابتلا به سالمونلوزیس می‌باشد. باکتری سالمونلا به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی، مسئول ایجاد بیماری در حیوان و انسان بوده و تاکنون اپیدمی‌های متعددی در دنیا ناشی از این باکتری گزارش شده است. پرندگان و دام‌ها منابع اصلی این باکتری هستند و آلودگی مواد غذایی حاصل از آن‌ها با این باکتری، باعث ایجاد بیماری گوارشی در انسان می‌شود. از مهم‌ترین عوارض گوارشی ناشی از این باکتری تب روده‌ای است که به‌عنوان یک عامل تهدیدکننده حیات مطرح بوده و سالیانه بالغ بر ۲۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می‌سازد که از بین آن‌ها حدود ۲۰۰ هزار نفر می‌میرند. بر اساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی بیش از ۹۰ درصد تب‌های روده‌ای درکشورهای آفریقایی و آسیایی بویژه آسیای جنوب شرقی رخ می‌دهد، که علت عمده آن عفونت با سویه‌های *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی و *سالمونلا انتریکا* سروار پاراتیفی A ، B و C می‌باشد (۲). وجود عفونت ناشی از سالمونلا در طیور و بررسی انتشار آن در زنجیره غذایی انسانی، شناسایی سریع این پاتوژن را در فرآورده‌های حیوان و بررسی تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی در میان جدایه‌های تهیه شده را امکان پذیر نموده است. بنابراین در اکثر کشورها بررسی آلودگی به *سالمونلا انتریتیدیس* و تشخیص به موقع ان از آزمایشات مهم در صنعت غذا و مراکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها محسوب می‌شود. با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس سالمونلا، تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری، ویرولانس و توزیع جغرافیایی وجود دارد (۳). از دست دادن و یا به‌دست آوردن برخی ژن‌ها نقش مهمی در تکامل سروتایپ‌های مختلف سالمونلا ایفا می‌کنند.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری

در سال۱۳۹۶ در مجموع ۳۵۰ نمونه ماده غذایی شامل گوشت قرمز و مرغ، سبزی خوردن، سالاد ماکارونی و سالاد الویه از مراکز تولید و اغذیه فروشی‌های شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. به‌منظور غنی سازی به محیط کشت پپتون واتر، منتقل شدند و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری انجام گردید. نمونه‌های موادغذایی کشت داده شده در مرحله بعد بر روی محیط سلنیت سیستئین کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شد و در نهایت در محیط سالمونلا- شیگلا آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه گذاری گردید. کلنی‌های رشد کرده و مشکوک با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند: TSI، اوره، اندول، MRVP، سیترات مورد شناسایی قرار گرفت (۴،۵).

تایپینگ مولکولی

به منظوراستخراج DNA سلولی، از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط پپتون واتر (محصول شرکت مرک، آلمان) به‌عنوان منبع استفاده شد. در نهایت، استخراج DNA به

[2] *Salmonella*
[3] Enterobacteriacea
[4] *Salmonella Enterica*
[5] *Salmonella* bongori
[6] *Salmonella enteritidis*

روش جوشاندن انجام گرفت، جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به‌منظور تشخیص قطعی از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن *16srRNA سالمونلا انتریتیدیس استفاده شد* که در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن 16srRNA **در ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس***

اندازه محصول(bp)	توالی پرایمر(َ۳-َ۵)	ژن
۲۵۰	S1 GCCGTACACGACCTTATAGA S4 ACCGTACACGACCTTATAGA	*16srRNA*

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از DNA استخراج شده، PCR buffer 10x، Mix dNTP (10mM)، Mgcl2 (50mM)، پرایمرهای F وR (1µM)، آنزیم Smar Taq DNA Polymerase و آب مقطر صورت گرفت. مواد مطابق با جدول (۲) مخلوط شده و واکنش PCR انجام شد. محصول PCR مربوط به هر مرحله از انجام آزمایش روی ژل آگارز الکتروفورز شده و عکس برداری با استفاده از Gel document انجام شد.

جدول ۲- ترکیب اجزایPCR جهت ردیابی ژن *16srRNA سالمونلا انتریتیدیس*

حجم نهایی	غلظت نهایی	مواد
۲/۵ میکرولیتر	X۱	X۱۰Buffer
۰/۵ میکرولیتر	۰/۲میلی مول	dNTPs (10mM)
۰/۷۵ میکرولیتر	۱/۵ میلی مول	Mgcl2 (50mM)
۱ میکرولیتر	۱ میکرومول	PrimerF (25µM)
۱ میکرولیتر	۱میکرومول	PrimerR (25µM)
۰/۲ میکرولیتر	1U	Taq DNAPolymerase (5u/µl)
۱ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم	DNA
۱۸/۰۵ میکرولیتر	-	ddH2O
۲۵ میکرولیتر	-	حجم نهایی واکنش

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌ها

به‌منظور دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* به‌روش RAPD-PCR مطابق روش پیشنهادی توسط Albufera و همکاران استفاده شد (۶).

در این روش آزمایش، PCR در واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer10x، ۴ میکرولیتر $MgCl_2$، dNTP Mix ۱/۷۵، ۶/. میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۳ میکرولیتر از پرایمر P1254 با توالی CCGCAGCCAA انجام گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیک RAPD-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های مورد بررسی به شرح زیر تنظیم گردید:

واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، چرخه‌ی *PCR* شامل ۳۰ سیکل به‌ترتیب شامل: واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود. در پایان، یک مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

محصول PCR مربوط به مرحله فوق روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد. آزمایش RAPD-PCR روی

هرکدام از ایزوله‌های مورد مطالعه ۳ نوبت انجام گرفت تا از تعداد باندهای ایجادشده توسط هر ایزوله اطمینان حاصل گردید. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های مورد مطالعه،از نرم افزار NTSYS version2.02e استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر، به‌صورت داده‌های کمی صفر و یک (وجود باند یا عدم وجود باند)، امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های صفر و یک با استفاده از ضریب جاکارد و دایس و تطابق ساده محاسبه شد. به‌منظور تعیین کارایی روشRAPD-PCR تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضرایب تشابه، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده گردید. سپس برای گروه‌بندی سویه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به‌روش (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) UPGMA بر مبنای ضریب تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را دارا بود، استفاده گردید.

نتایج

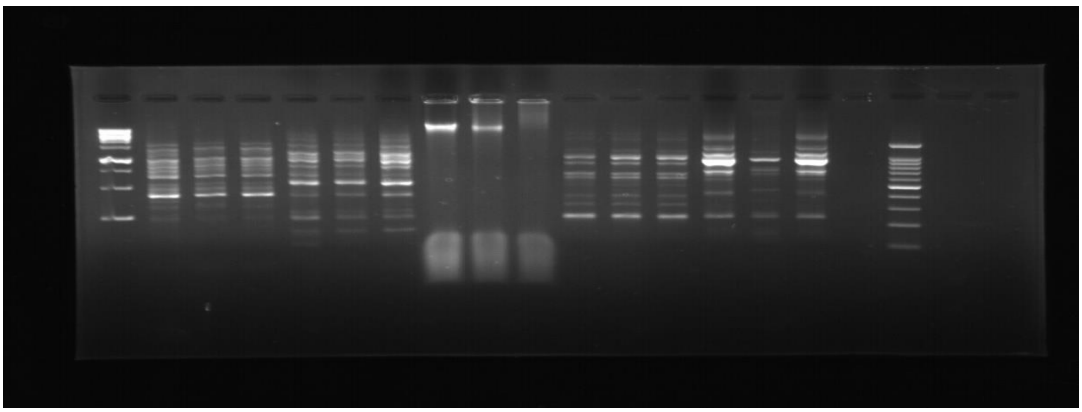
پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت DNA های استخراج شده روی ژل آگارز به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* درحضور توالی ژن *16srRNA*، باکتری‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی مولکولی تعداد ۳۰ ایزوله با داشتن باند ۲۵۰ جفت بازی *سالمونلا انتریتیدیس* تشخیص داده شدند. نتایج میزان آلودگی به *سالمونلا انتریتیدیس* در جدول (۲) نشان داده شده است. براساس آزمون دقیق فیشر بین آلودگی به سالمونلا و نوع ماده غذایی ارتباط آماری معنی داری وجود دارد(p-value<0/05).

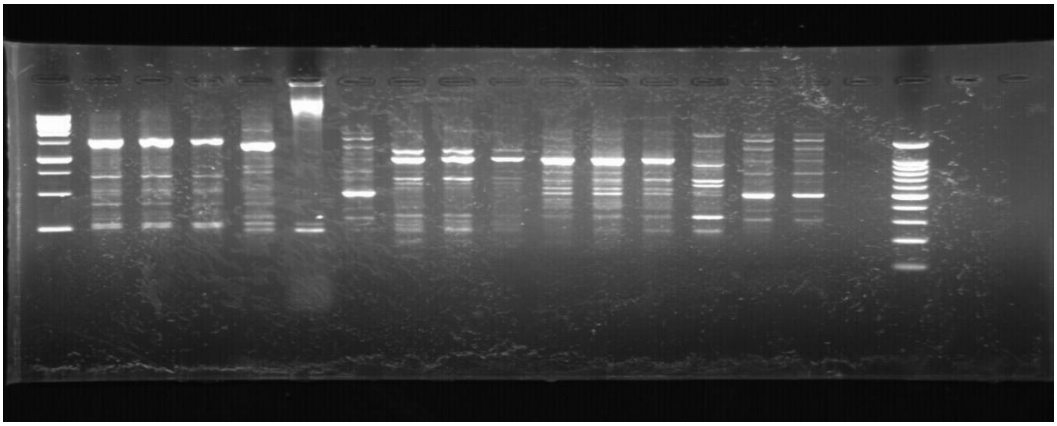
جدول۳ - میزان شیوع *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌های مواد غذایی

نمونه	تعداد نمونه	تعداد جدایه *سالمونلا انتریتیدیس*	درصد آلودگی
گوشت قرمز	۱۰۰	۱۰	٪ ۱۰
گوشت مرغ	۱۰۰	۱۱	٪ ۱۱
سبزی خوردن	۱۰۰	۵	٪ ۵
سالاد ماکارانی	۲۵	۲	٪ ۸
سالاد اولویه	۲۵	۲	٪ ۸
مجموع	۳۵۰	۳۰	٪ ۴۲

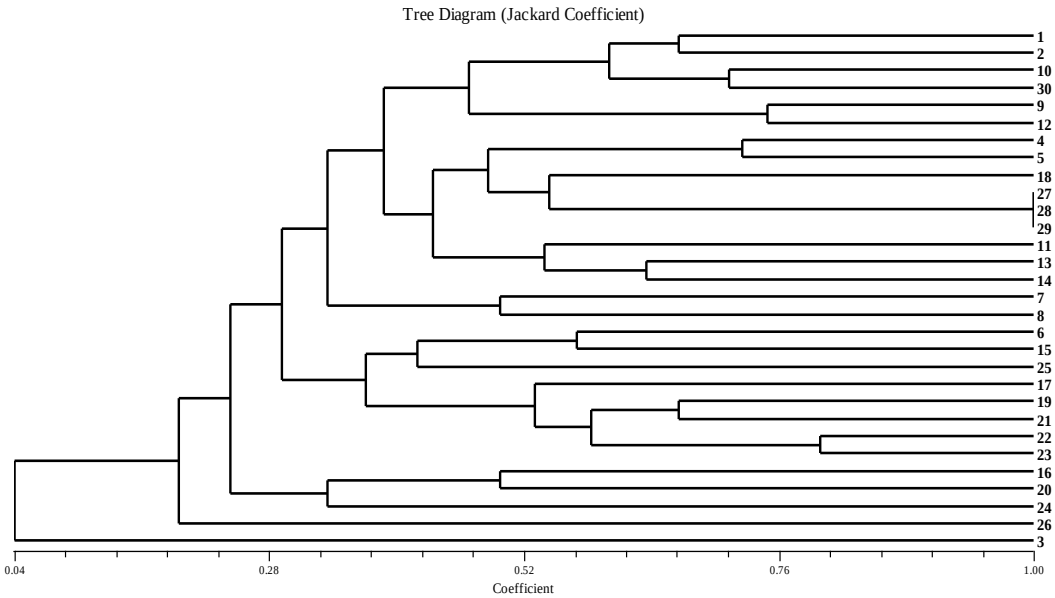
نتایج مربوط به آزمون RAPD-PCR

ایزوله‌های مورد مطالعه سه نوبت با روش RAPD-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در PCR آنالیز شدند. شکل‌های زیر ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر RAPD-PCR روی ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از مواد غذایی را نشان می‌دهد.





همان‌گونه در تصویر فوق مشهود است، ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدوده ۱۵۰ تا ۱۷۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم وجود باند) امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌ها در برنامه NTSYSآنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد که ضریب کوفنتیک محاسبه‌شده برای الگوریتم UPGMA و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول (۳) آورده شده است ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم UPGMA و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* با نشانگر RAPD-PCR.



جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از ضریب تطابق ساده استفاده شد. در نشانگر RAPD-PCR در ایزوله‌های ۲۷،۲۸ و ۲۹ قرابت ۱۰۰ درصد (ضریب شباهت) مشاهده شد. مجموع ۳۰ ایزوله مورد مطالعه در سطح تشابه ۷۶ درصد ۲۷ پروفایل قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، آن‌ها را بسیار کارآمد در تایپینگ مولکولی کرده است. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها به‌کار می‌روند عبارتند از پالس فیلد ژل الکتروفورز، روش‌های متکی بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ‌بندی براساس PCR. به‌کارگیری روش‌های مولکولی برای تیپ‌بندی پاتوژن‌ها در ارتباط دهی دقیق بین سویه‌ها و گونه‌ها بسیار اساسی می‌باشد. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی (انسان یا محیط) را پیدا کرده، سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی را متمایز نموده و در نهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نمائیم. امروزه تکنیک‌های ژنتیک مولکولی مانند PCR، انگشت نگاری اسید نوکلئیک، آنالیز سکانس DNA کرموزوم باکتری یک ابزار مهم در شناسائی باکتری‌ها می‌باشند. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع عفونت‌های بیمارستانی، شناسائی مخازن آلودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه‌های پاتوژنیک گیاهی در محیط، جداسازی ژنوتیپ خاص در کونژوگاسیون با یک باکتری خاص را مشخص کرد و هم‌چنین این روش‌ها به ما آگاهی بیشتر اصول اپیدمیولوژی و تکامل و انتشار بسیاری از بیماری‌های باکتریایی را می‌دهند. تغییرات در روش‌های تایپینگ مولکولی که روی شناسائی ژنوتیپ‌های خاص در میان سویه‌های باکتری‌ها متمرکز شده است یک انقلابی در مطالعه تنوع سویه‌ها و پایش کردن شیوع عفونت‌ها ایجاد کرده است. این روش‌ها نسبت به روش‌های کلاسیک تیپ بندی دارای چندین فایده از جمله موارد زیر می‌باشند: نیاز نداشتن به تهیه کشت تک از یک سلول باکتری، افزایش پایداری و حساسیت سنجش و انجام واکنش در زمان کمتر. در نهایت یک تیپ مولکولی که از انگشت نگاری DNA یا سکانس نوکلئوتید حاصل می‌شود دارای اطلاعات زیادی درباره سویه می‌باشد. RAPD-PCR بر اساس تکثیرتصادفی قطعات DNA ژنومی با پرایمرهای اختیاری می‌باشد. این تکنیک از روش PCR برای تکثیر قطعات DNA استفاده می‌کند. به‌جای جفت پرایمرهای معمولی که برای یک منطقه هدف طراحی می‌شوند، یک پرایمر منفرد انتخاب شده برای اتصال به چندین سایت در طول ژنوم با دماهای اتصال پایین طراحی می‌شود و سپس محصولات تکثیری بین محل‌های اتصال پرایمر به مکان‌های نزدیک به رشته مخالف تولید می‌شوند. با استفاده از پرایمرهای تقریباً ۱۰ جفت بازی، مکان‌های تکثیری درون کل ژنوم هدف‌گیری شده و تکثیر می‌شوند و سپس محصولات تکثیری روی ژل جداشده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و آشکارسازی می‌شوند. تاکنون تحقیقی در مورد ژنوتایپینگ ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از مواد غذایی صورت نگرفته است. در این تحقیق مشخص گردید که ترتیب ۲۸ ایزوله مورد مطالعه در ۲۴ پروفایل قرار می‌گیرند. به‌طور معمول مطالعات تشخیصی و اپیدمیولوژیک سویه‌های سالمونلا توسط تست‌های سرولوژیک انجام می‌شوند ولی چون نتایج حاصل از این تست‌ها اطلاعات محدودی در مورد سویه‌های باکتریایی می‌دهد بنابراین به تکنیک‌های مولکولی در مطالعات اپیدمیولوژیکی نیاز است.

سنگری و همکاران در مقاله خود این گونه نوشتند که سالمونلوزیس از مهمترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و حیوانات است که بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت، ماکیان، تخم مرغ و شیر است. هدف از این مطالعه، ارزیابی

ارتباط ژنتیکی سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش ERIC- PCR می‌باشد. در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه *سالمونلا انتریکا* سروتایپ انتریتیدیس از نمونه‌های انسانی و دامی به‌دست آمد. شناسایی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی و سروتایپینگ بر اساس روش اسلاید آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم‌های مونو و پلی والان انجام شد. سپس ERIC-PCR با استفاده از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی به منظور تعیین ارتباط مولکولی سویه‌ها انجام گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که تمامی ۶۰ سویه سالمونلا انتریکا تحت مطالعه با استفاده از جفت پرایمرهای ERIC II و ERIC I قابل تایپ بندی بودند. تعداد باندهای به‌دست آمده بین ۲-۱۱ عدد با وزن مولکولی ۲۰-۳۲۰۰ جفت باز بود. بر این اساس به‌طورکلی ۱۵ کلاستر مختلف به‌دست آمد که بیشترین تعداد (۱۳/۳ درصد، ۸سویه) با داشتن الگوی مشابه در کلاستر ۵ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های *سالمونلا انتریکا* سرووار *انتریتیدیس* از نظر ژنتیکی ناهمگون هستند. هم‌چنین روش ERIC-PCR جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های *سالمونلا* و تعیین کانون‌های شیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود (۷).

اگونرمی[۷] و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی روش‌های مختلف ژنوتایپینگ *سالمونلا انتریتیدیس* مانند پالس فیلد ژل الکتروفورز و فاژ تایپینگ نشان دادند که این روش‌ها برای *سالمونلا انتریتیدیس* نا کارآمد بوده و توانایی تفکیک دقیق ژنوتایپ‌های مختلف این باسیل را ندارند. از سوی دیگر این محققان با استفاده از SNP-PCR موفق به ارائه‌ی روشی دقیق برای تعیین ژنوتایپ‌های مختلف *سالمونلا انتریتیدس* شدند. در این تحقیقات مطالعه برروی ۵۵ نمونه‌ی ایزوله‌ی *سالمونلا انتریتیدس* نشان داد که این نمونه‌ها می‌توانند با استفاده از روش SNP-PCR در ۱۲ گروه ژنوتایپی مختلف طبقه بندی گردند. نتایج حاصل از این پژوهش قدرت تفکیک بالای روش SNP-PCR را نسبت به روش‌های PFGE و فاژ تایپینگ نشان می‌دهد (۸).

در تحقیق رنجبر و همکاران در ۵۷ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* توسط روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند ایزوله-های *سالمونلا انتریکا* را را به‌خوبی تمایز دهد، چرا که تمام ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند به‌طوری‌که این روش سویه‌ها را به ۹ الگوی متفاوت تقسیم بندی نمود. در این مطالعه مشاهده شد که برخی سویه‌هایی با الگوهای یکسان ERIC در بیمارستان‌های مختلف یافت شدند که نشان دهنده انتقال گسترده باکتری در بین بیمارستان‌ها است. انتقال باکتری می‌تواند از طریق وسایل و پرسنل بیمارستانی و اشخاص دیگری که با بیماران در تماس بوده‌اند صورت پذیرد (۱).

مطالعات مزال[۸] و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ژنوتایپینگ ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از روش‌های PFGE و MVLA انجام شد و پروفایل پلاسمیدی برای باسیل مورد نظر به دست آمد در این تحقیق بررسی تایپینگ ۶۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از روش PFGE و به وسیله‌ی آنزیم محدود کننده‌ی XbaI انجام شد که نتایج به صورت ۱۰ تا ۱۲ باند با شباهت ۹۵ تا ۸۱ درصد مشاهده گردید و نمونه‌ها به ۶ خوشه‌ی ژنی مختلف طبقه-بندی شدند. به‌علاوه در بررسی ژنوتایپینگ با روش MLVA تعداد ۱۸ آلل مختلف برای نمونه‌های ایزوله به‌دست آمد (۹).

Saxena و همکارانش در هند، ۲۴ ایزوله از سروارهای سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد تمایز قرار دادند و ۲۱ تیپ ژنتیکی به‌دست آمد و نتایج نشان داد که این روش قادر

[۷] Ogunremi

[۸] Mezal

است واریانت‌های ژنتیکی مختلفی را در *سالمونلا تایفی موریوم* را از هم تمایز دهد. در مطالعه دیگر Malalena و هم‌کارانش در سال ۲۰۰۶ در پرتغال ۶۹ سویه از سالمونلا را مورد مطالعه تایپینگ مولکولی ERIC-PCR را با روش قرار دادند و نشان دادند که این روش کاربردی می‌باشد (۱۱).

مطالعات گنگ[۹] و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ژنوتایپینگ ۳۲۳ ایزوله از *سالمونلا انتریکا* جمع اوری شده از نمونه‌های حیوانی در چین نشان داد که این نمونه‌ها در مجموع متعلق به ۲۰ سروار مختلف از *سالمونلا انتریکا* می‌باشند و بیش‌ترین حضور *سامونلا انتریتیدیس* در نمونه‌های جمع آوری شده از اردک مشاهده شد. در ادامه بررسی ژنوتایپی نمونه‌های ایزوله با استفاده از تکنیک PCR نشان داد که این نمونه‌های در ۴۱ گروه ژنوتیپی مختلف طبقه بندی می‌گردند که عمده تفاوت آن‌ها مربوط به حضور ژن‌های فیمبریال[۱۰] بود. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور و تنوع ژن‌های فیمبریال می‌تواند نقش مهمی در تنوع ژنوتایپینگ ایزوله‌های *سالمونلا انتریکا* داشته باشد (۱۲).

مطالعه‌ی چانگ[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ژنوتایپینگ *سالمونلا انتریکا* استخراج شده از دستگاه گوارش نمونه‌های انسانی و حیوانی در قطر با استفاده از روش توالی یابی چند جایگاهی MLST[۱۲] انجام شد. نتایج بررسی ژنوتایپ این باسیل گرم منفی نشان داد که بیش از ۲۷ ژنوتایپ مختلف از *سالمونلا انتریکا* در نمونه‌های اخذ شده وجود دارد. به‌علاوه در این مطالعه ۷ ژنوتایپ ST1695, ST1696, ST1697, ST1698 ST1699, ST1702 و ST1703 برای اولین بار گزارش شد. در نهایت مطالعات جمعیتی و بررسی الگوی توزیع ژنوتایپ‌های مختلف *سالمونلا انتریکا* نشان داد که ST11 و ST19 به ترتیب با حضور در بیش از ۲۹/۵ و ۱۱/۵ درصد از جمعیت نمونه‌های آلوده دارای بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی می‌باشند (۱۳).

مطالعات کانگ[۱۳] و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ژنوتایپینگ نمونه‌های ایزوله *سالمونلا انتریتیدیس* استخراج شده از نمونه‌های انسانی و ماکیان در کره جنوبی با استفاده از روش‌های PGFE و MLVA نشان داد که زنوتیپ‌های مختلف این باسیل دارای ۲۸ الگو و ۱۶ پروفایل آللی هستند. به‌علاوه بررسی پلاسمید در ژنوتایپ‌های مختلف *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد که دامنه تغییرات پروفایل پلاسمیدی در انواع مختلف *سالمونلا انتریتیدیس* بسیار گسترده می‌باشد. در نهایت نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که بیش‌تر ژنوتایپ‌های *سالمونلا انتریتیدیس* در انسان و ماکیان مشترک هستند و بنابراین ماکیان می‌توانند نقش مهمی در ابتلا انسان به عفونت‌های سالمونلوزیس داشته باشند (۱۴).

مقدم و همکاران در مقاله خود این گونه آوردند که سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می‌باشند و عمدتاً از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند. گسترش سالمونلاهای غیر تیفوئیدی یکی از مهم‌ترین موضوعات قابل بررسی در تحقیقات امروزی می‌باشد. بنابراین تشخیص و تایپینگ سریع این بیماری‌زاها اطلاعات مناسبی در ردیابی و کنترل عفونت در اختیار می‌دهد. هدف از این مطالعه تایپینگ سویه‌های بالینی *سالمونلا اینفنتیس* می‌بود. در این پژوهش از مراکز درمانی مختلف سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* جداسازی شد. تمامی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. رابطه ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های آن‌ها به این صورت بود که

[۹] Gong

[۱۰] Fimbrial

[۱۱] Chang

[۱۲] Multi-locus sequence typing

[۱۳] Kang

از مجموع ۸۴۲ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال، ۴۸ سویه مربوط به *سالمونلا اینفنتیس* جداسازی شد. جدایه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR از نظر ژنوتایپینگ به ۱۴ گروه مختلف دسته‌بندی شدند که بیشترین تعداد سویه در گروه ۵ (۲۰ درصد،۱۰ سویه) جای گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متنوع بودند که می‌تواند به علت شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های انسانی باشد. همچنین نشان داده شد که روش ERIC-PCR قدرت تمایزی بالایی را جهت تایپینگ مولکولی دارد (۱۵).

گرانمایه و همکاران به بررسی مقایسه پلی‌مورفیسم ژنومی و ارتباط ژنتیکی سویه‌های بالینی *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی موریوم در استان کرمان به روش ERIC- PCR و Box-PCR پرداختند. *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی موریوم علاوه بر انسان، میزبان‌های زیادی داشته و امکان شیوع آن در جامعه بالاست. تفکیک پلی‌مورفیسم ۶۰ ایزوله *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی موریوم با استفاده از روش‌های ERIC1، ERIC2 و BOXAIR انجام گردید. در الکتروفورز ۱۱-۲ باند با اندازه ۳۲۰۰-۲۰ باز برای ERIC-PCR و ۱۰-۲ باند با اندازه ۱۵۰۰-۲۰۰ باز برای BOX-PCR مشاهده شد، بنابراین، ۱۳ کلاستر مختلف (C1-C13) در ERIC-PCR و ۲۱ کلاستر مختلف در BOX-PCR شناسایی شد. نتایج نشان داد که گونه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم گونه‌های غیر هومولوگ بودند؛ بنابراین، روش‌های ERIC-PCR و BOX-PCR روش مناسبی برای تایپ‌بندی مولکولی سویه‌های سالمونلا و تشخیص گسترش منبع عفونت برای بررسی اپیدمیولوژیک و برنامه پیشگیری از عفونت هستند (۱۶).

الیورا[۱۴] و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ، تعداد ۱۰۲ سویه از *سالمونلا انتریتیدیس* را با روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش ERIC-PCR سویه‌ها دارای ۳ الگوی ژنتیکی هستند و اندازه باندهای ERIC-PCR بین ۱۹۰ تا ۱۴۳۰ بود و تعداد باندها بین ۱۲ تا ۱۳ تا بود (Oliveira et al,2007). مادانلا[۱۵] و همکاران در پرتغال ۶۹ سویه از سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد بررسی و مطالعه تاپینگ مولکولی قرار دادند و نشان دادند که این روش کاربردی می‌باشد (۱۱). ناس[۱۶] و همکاران در هند تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا را توسط ERIC-PCR تایپ بندی کردند. با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه‌ها شناسایی شد (۱۸).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک RAPD-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* به عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین سویه‌های میکروارگانیسم‌های پاتوژن استفاده شد و قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ باکتری می‌باشد (۱۹).

---

[۱۴] Oliviera

[۱۵] Madalena

[۱۶] Nath

مراجع

1. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, DeZutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. J Clin Microbiol .2005; 43:3615–3623.
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ. 2004; 82: 346–353.
3. Johnson JR, Clabots C, Azar M. Molecular analysis of hospital cafeteria- associated salmonellosis outbreak usingmodified repetitive lement PCR fingerprinting. J Microbiol. 2001; 39 (10):3452–3460.
4. Karns JS, Van Kessel JS, McCluskey BJ and Perdue M.L. Prevalence of *Salmonella enterica* in Bulk Tank Milk from US Dairies as Determined by Polymerase Chain Reaction. J Dairy Sci. 2005; 88: 3475–3479.
5. Lampel KA, Keasler SP, Hanes DE. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. Epidemiol Infect. 1996; 116: 137-145.
6. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. Infect. Genet Evol. 2009; 9 (3):322-327.
7. Sangari P, Amini K, Moradli GH, Evaluation of genetic diversity of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolated from human and animals samples by eric-pcr. J Urmia Univ Med Sci. 2016; 27 (5): PP. 411- 418.
8. Ogunremi D, Kelly H, Dupras AA, Belanger S, Devenish J. Development of a new molecular subtyping tool for Salmonella enterica serovar Enteritidis based on single nucleotide polymorphism genotyping using PCR. J Clin Microbiol. 2014; 52(12):4275-4285.
۹. رنجبر ر، ناغونی ع. مقاومت پادزیستی مرتبط با اینتگرون کلاس ۱ درایزوله های بالینی *سالمونلا انتریکا*. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱۳۹۲: ۷ (۴): ۲۳-۱۶.
10. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR. J Res Vet Sci. 2002; 73:313- 314.
11. Madalena VP, Mario G, Rogerio T, Concelicao M. Evaluation of PCR-based fingerprinting comparatively to the RFLP-PFGE for discrimination of Salmonella sp. Isolated from slaughtered pork polymerase chain reaction identification of Salmonella serotypes. J Food Drug Analys. 2008; 16: 88-95.
12. Gong J, Zhang J, Xu M, Zhu C, Yu Y, Liu X. Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry Salmonella isolates in China (2006 to 2012). Appl Environment Microbiol. 2014; 80(2):687-693.
13. Chang YC, Scaria J, Ibraham M, Doiphode S, Chang YF, Sultan A. Distribution and factors associated with *Salmonella enterica* genotypes in a diverse population of humans and animals in Qatar using multi-locus sequence typing (MLST). J Infect Public Health. 2016; 9(3):315-323.
14. Kang MS, Lee D.Y, Jeong OM, Choi BK. Public health significance of major genotypes of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis present in both human and chicken isolates in Korea. Res Vet Sci. 2017; 112125-112131.
15. Moghadam A, Nazarian S. Molecular Typing Isolates of Salmonella Enterica Serovar Infantis Using Eric-PCR Method. Iran South Med J. 2017; 20 (5):426-436.
16. Geranmayeh A, Hoseini F, Rafiei Tabatabaei R. Comparison of Genomic Polymorphisms and Genetic Relation of Clinical Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Isolates in Kerman Province by ERIC-PCR and Box-PCR Methods. SSU-Journals. 2017; 25(7): 564-571.
17. Oliveira SD, Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Brandelli AC, Canal CW. Phenotypic and

genotypic characterization of *Salmonella enteri*tidis isolates. Braz J Microbiol. 2007; 38:720-728.

18. Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades. Infection, genetics and evolution. 2010; 10(4): 530-536.
19. Mezal EH, Sabol A, Khan MA, Ali N. Stefanova R. Khan AA. Isolation and molecular characterization of *Salmonella ente*rica serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. Food Microbiol. 2014; 3867-3874.

Genotyping of isolated *Salmonella enteritidis* separated from foodstuffs by RAPD-PCR

Fatemeh Parsa[1], Manouchehr Momeni Shahraki[2*], Fatemeh Khodaverdipour[2]

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

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

***Corresponding author**: *m.momeni@iau.ir*

Abstract

Salmonellosis is a common disease in humans and animals. One of the most important pathogens in humans, livestock and poultry is *Salmonella enteritidis*, a common cause of foodborne diseases. Conventional culture, biochemical and serological methods have shown little value for molecular analysis and subtraction, but molecular typing techniques such as RAPD-PCR provide different patterns for differentiating Salmonella species. The purpose of this study was to differentiate and distinguish between isolates of *Salmonella enteritidis* by RAPD-PCR. In 2018, 350 samples of red meat and chicken, vegetable, salad dressing and salad dressing were collected from Shahrekord's food and grocery centers. In the shortest possible time and in sterile conditions, the microbiology laboratory of Shahrekord Islamic Azad University It was transmitted. PCR isolation and confirmation were used to genotype isolates of *Salmonella enteritidis* using RDPD-PCR primer P1254 CCGCAGCCAA primer. 28 isolates of Salmonella enteritidis were isolated. At the level of similarity, 52% of the isolates studied had 17 subtypes with a similarity level of 76%. The number of subgroups was 24 subgroups, and the number of subgroups increased 95% to 15 subgroups, indicating a high genetic diversity among the isolates studied. In this way, 30 isolates are studied in 24 profiles

Key words*: Salmonella enteritidis*, Genotyping, RAPD-PCR.

Contents

Mutation investigation frequency in SARS-CoV-2 positive patients

Mojdeh Lashkari, Ashraf Kariminik, Mohammad Javad Soltani-Banavandi.....3

***enterocolitica* strains isolated from red meat in Shahrekord city**
Najma Molavi, Manouchehr Momeni shahraki, Hussein Khodabandeh ……...……13

Cyanobacterium spirulina: a versatile food additive

Fatemeh Shayesteh , Ali Sharifzadeh , Sara Arti…….…….27

Investigation of antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolates isolated from cases of urinary tract infections in children in Isfahan city in 2018

Fatemeh Khodaverdipour,Parisa Karimi, Nazila Arbab soleimani……..…….53

Genotyping of isolated *Salmonella enteritidis* separated from foodstuffs by RAPD-PCR

Fatemeh Parsa, Manouchehr Momeni Shahraki, Fatemeh Khodaverdipour…….64

Investigation of the Antibiotic Resistance Pattern in Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated from Clinical Cases in Isfahan City
Hossein Khodabandeh Shahraki, Sara Bagheri Kakesh……...……....76

.