

تأثیر آنزیم گلوکز اکسیداز بر عوامل ایجادکننده عفونت ثانویه در زخم‌های لیشمانيوز جلدی

شکیبا فیروزی^۱، کهن شاهانی پور^۲، منیر دودی^۳

دریافت مقاله: ۹۱/۳/۲۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۶/۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۱/۹/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سالک (لیشمانيوز جلدی) یک عفونت پروتوزوئری است که به وسیله گونه‌های مختلفی از جنس لیشمانيا ایجاد می‌شود. زخم‌های ناشی از لیشمانيوز جلدی مرطوب اکثراً دارای ترشح بوده و به همین دلیل محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که سبب عفونت ثانویه زخم می‌گردد. در این بررسی از آنزیم گلوکز اکسیداز جهت تخریب باکتری‌های جدا شده از زخم‌های لیشمانيوز جلدی استفاده شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه آزمایشگاهی بر روی باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های ثانویه زخم‌های لیشمانيوز جلدی ۵۰ بیمار مراجعه‌کننده به مرکز پوست صدیقه طاهره اصفهان انجام گرفت. در این تحقیق از آنزیم گلوکز اکسیداز ۱۰ کیلوگرم بر میلی‌لیتر در رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی به کمک تکنیک‌های تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد باکتری [Minimum Inhibitory Concentration (MIC)] و انتشار دیسک استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد بررسی جدا شده از زخم‌ها (شریشیا کلای، پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروچینوزا، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گزروزیس) نسبت به آنزیم گلوکز اکسیداز در رقت‌های مختلف حساسیت زیادی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: آنزیم گلوکز اکسیداز اثر مهار بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی جدا شده از زخم‌های لیشمانيوز دارد. بنابراین، ممکن است بتوان از این آنزیم در درمان عفونت‌های ثانویه باکتریایی زخم‌های لیشمانيوز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: لیشمانيوز جلدی، عفونت‌های ثانویه، آنزیم گلوکز اکسیداز، MIC، انتشار دیسک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

۲- استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

(نویسنده مسئول) تلفن: ۰۳۱۱-۷۷۲۵۵۸۵، دورنگار: ۰۳۱۱-۷۷۲۵۵۸۵، پست الکترونیکی: shahanipur_k@yahoo.com

۳- استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

مقدمه

سالک (لیشمانیوز جلدی) یکی از بیماریهای پوستی است که پزشکان ایرانی از دیر باز آن را می‌شناختند. این بیماری یک عفونت پروتوزوئری است که به وسیله گونه‌های مختلفی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود [۱]. لیشمانیا دارای دو شکل ظاهری است یکی نوع متحرک و تاژک‌دار به نام پروماستیگوت و دیگری که کوچک‌تر و بدون تاژک (تاژک مختصر) می‌باشد و داخل سلولی بوده و آماستیگوت نام دارد. عامل لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب یا روستایی لیشمانیا ماژور است که دارای شدت بیماری‌زایی بیشتری در مقایسه با لیشمانیا تروپیکا عامل لیشمانیوز جلدی نوع خشک می‌باشد. این بیماری بیشتر در مناطق روستایی، حاشیه بیابان‌ها و حاشیه شهرها مشاهده می‌شود. لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب اغلب به صورت فصلی و بیشتر در فصول تابستان و پاییز بروز می‌کند و وقوع آن بیشتر به صورت اپیدمیک است [۳-۱].

دوره کمون بیماری سالک نسبتاً کوتاه از چند روز (۲۸-۱ روز) تا حداکثر دو ماه طول می‌کشد. دوره کمون بستگی به تعداد انگل تلقیح شده و قدرت بیماری‌زایی آن دارد. ضایعات پوستی به صورت یک پاپول نرم تقریباً بدون درد و خارش ظاهر می‌شوند که اندازه آن به اندازه سرسنجاق بوده که تدریجاً بر آمده شده و سطح آن زخم می‌شود [۲-۱].

عفونت چرکی موضعی در هر منطقه یا اندام بدن می‌تواند ایجاد شود و ممکن است با یک صدمه، آلودگی ثانویه باکتریایی و یا با تغییر در شرایط موضعی که بافت را حساس به عفونت با ارگانسیم‌های احتمالی می‌کند که تا پیش از این تحت عنوان فلور نرمال نسبت به آن‌ها مقاوم

بوده، با انتشار مجاورتی توسط جریان خون یا لنف آغاز گردد. زخم‌های ناشی از لیشمانیوز جلدی مرطوب اکثراً دارای ترشح بوده و به همین دلیل محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر میکروارگانسیم‌ها می‌باشد که سبب ایجاد عفونت ثانویه می‌شود. عفونت ثانویه میکروبی در لیشمانیوز جلدی مرطوب احتمالاً نقش مهمی در شکل و اندازه زخم دارد [۴]. باکتری‌های ایجادکننده این عفونت ثانویه می‌توانند چند منشا متفاوت داشته باشند. باکتری‌ها از نظر بیماری‌زایی دارای ویژگی‌های مختلفی هستند به طوری که بعضی با مقاومت در برابر عمل فاگوسیتوز و بعضی با تولید توکسین عمل می‌کنند. توانایی ایجاد عفونت به توکسین‌های تولید شده و تخریب داخل سلولی باکتری و عمل متقابل انگل لیشمانیا و باکتری بستگی دارد [۵]. کشت‌های انجام شده از ترشحات لیشمانیوز جلدی مرطوب در زمان‌های مختلف، در بیشتر موارد وجود یک یا چند باکتری را نشان داده است [۶-۷، ۴].

در این تحقیق سعی شد برای از بین بردن باکتری‌های ایجادکننده عفونت ثانویه در زخم‌های لیشمانیوز جلدی به ویژه باکتری‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی از ماده‌ای استفاده شود که جانشین آنتی‌بیوتیک‌ها شود تا عوارض ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به حداقل برسد.

آنزیم گلوکز اکسیداز (E.C. 1. 1.3.4) یکی از محصولات زنبور عسل بوده و در عسل یافت می‌شود. این آنزیم در حضور اکسیژن گلوکز را به گلوکونولاکتون و اسید گلورونیک تبدیل کرده و ایجاد پراکسید هیدروژن می‌کند [۸]. این آنزیم در برخی از قارچ‌ها و باکتری‌ها یافت شده است و اغلب از قارچ آسپرژیلوس نایجر تخلیص شده و

آغشته به الکل اتیلیک ۷۰٪ کاملاً تمیز گردید. البته دقت شد که پنبه آغشته به ماده آنتی‌سپتیک بر روی زخم کشیده نشود، سپس به کمک یک اسکاپل استریل زخم را اگر بسته بود و یا اصطلاحاً دارای دلمه بود باز کرده و دقت شد که زخم خونریزی نکند و از کناره‌های زخم تراشه‌ها را برداشته و بر روی یک یا دو لام گسترش تهیه گردید. باید توجه داشت که اسمیر باید از فاصله‌ی بین زخم و پوست سالم برداشته شود، زیرا در این منطقه اجسام لیژمن بیشتری وجود دارند [۸، ۴].

روش مستقیم تشخیص انگل لیژمانیا: گسترش تهیه شده به طریقه‌ی فوق، پس از خشک شدن به مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک قرار داده شد. سپس بر روی لام رنگ گیمسای رقیق شده (۰/۱) ریخته شد و پس از گذشت حدود بیست دقیقه الی نیم ساعت، لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و بعد از خشک شدن، در صورت مشاهده‌ی جسم لیژمن توسط میکروسکوپ نتیجه‌ی آزمایش از نظر لیژمانیوز مثبت تلقی گردید.

بررسی ضایعات پوستی ناشی از لیژمانیوز جلدی از نظر باکتری شناسی: در این بررسی پس از این که توسط اسکاپل استریل روی زخم لیژمانیوز باز شد، در همان موقع فشار آهسته‌ای که به زخم وارد گردید، باعث شد ترشح چرکینی، که از تجمع لکوسیت‌ها و باکتری‌ها در زیر زخم جمع شده بود، خارج شود و در همین موقع توسط سه سوآب استریل از ترشحات زخم بیماران برداشت شد. این سه سوآب را به ترتیب روی محیط نوترینت آگار، بلادآگار و EMB آگار کشت داده و سپس در گرم‌خانه‌ی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از گرماگذاری کشت‌ها، در صورت مشاهده‌ی رشد، تعداد کلنی و انواع آن یادداشت گردید سپس از کلنی‌های

تغلیظ آنزیم با استفاده از روش اولترافیلتراسیون از نوع جداسازی غشایی صورت می‌گیرد. دمای مطلوب جهت فعالیت آنزیم ۴۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده و pH مطلوب آن معادل ۵ می‌باشد. فعالیت این آنزیم در عسل هم مشاهده شده است و مقدار فعالیت آن به منبع عسل بستگی دارد. گرما، نور و امواج مایکروویو فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند [۹-۱۰].

آنزیم گلوکز اکسیداز با تولید پراکسید هیدروژن، بر روی زخم‌ها، ضمن جلوگیری از تهاجم و تخریب میکروب‌ها، هیچ‌گونه آسیب بافتی به جا نمی‌گذارد [۱۱]. علاوه بر این، همین طور که پراکسید هیدروژن تجزیه می‌شود، گلوکز اکسیداز با ساخت آن از گلوکز پیوسته آن را جایگزین می‌سازد. فعالیت ضد باکتریایی عسل و آنزیم در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است [۱۰-۱۳].

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر به صورت آزمایشگاهی بر روی نمونه‌های بر گرفته از عفونت‌های ثانویه باکتریایی لیژمانیوز جلدی مراجعه‌کنندگان به مرکز تحقیقات پوست و سالک صدیقه طاهره (اصفهان) انجام شده است، این مرکز در حال حاضر یکی از مهم‌ترین مراکز تشخیص و درمان لیژمانیوز جلدی منطقه می‌باشد. نمونه‌گیری از نیمه فروردین ماه سال ۱۳۹۰ شروع شد و تا آخر خرداد ماه همان سال ادامه داشت. در این پژوهش از ۵۰ بیمار مبتلا به لیژمانیوز جلدی که دارای زخم‌های عفونی بودند و از طرف پزشکان معالج به این مرکز درمانی معرفی گردیدند، نمونه‌گیری به عمل آمد.

روش کلی نمونه‌برداری و کشت از ضایعات پوستی ناشی از لیژمانیوز جلدی: ابتدا اطراف زخم با پنبه‌ی

گرماگذاری، غلظتی که باکتری روی محیط رشد کرد، MIC یا حداقل تراکم متوقف کننده رشد باکتری (باکتریواستاتیک) گزارش شد و غلظتی که باکتری در آن رشدی نشان نداد را [Minimum Bacteriocid (MBC) Concentration] یا حداقل تراکم کشنده باکتری (باکتریوسید) معرفی کردیم [۲۷،۱۰].

لازم به ذکر است که آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده شده در این پژوهش از شرکت پارس آزمون تهیه شده و دارای فعالیت ۱۰ کیلو واحد آنزیمی در میلی لیتر بود.

تأثیر آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی باکتری‌ها به روش انتشار دیسک در آگار: ابتدا به کمک آنزیم گلوکز اکسیداز و آب مقطر رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ از آنزیم گلوکز اکسیداز تهیه شد. سپس بلانک دیسک‌ها با قطر ۶/۴ میلی لیتر به هر یک از رقت‌های تهیه شده آنزیم آغشته شد، به طوری که ۲۰ میکرولیتر از هر رقت بلانک دیسک را آغشته نمود. باکتری‌های مقاوم که کشت ۲۴ ساعته آن‌ها مهیا بود را در محیط TSB معادل ۰/۵ مک‌فارلند رقیق‌سازی کرده و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل را به محیط مولر هینتون آگار تلقیح کرده و به طور کامل کشت چمنی داده و با پنس استریل، دیسک‌های آغشته به رقت‌های مختلف آنزیم با فواصل معین بر روی محیط قرار داده شد و در هر پلیت باکتری یک دیسک آغشته به آنزیم و یک دیسک آغشته به آب مقطر تزریقی به عنوان شاهد استفاده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از آن‌هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید. معیار حساس بودن باکتری‌ها حداقل قطر هاله عدم رشد ۸ میلی متر در نظر گرفته شد.

یکسان و مشابه یکی را انتخاب و گسترشی بر روی لام تهیه شد و گسترش را به روش گرم رنگ‌آمیزی کرده تا گرم مثبت یا منفی بودن باکتری مزبور مشخص گردد. سپس کلنی باکتری‌ها، به محیط‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص انتقال داده شد.

بررسی اثر مهارى آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی باکتری‌های آلوده‌کننده زخم‌های لیشمانيوز به دو روش انتشار دیسک و MIC انجام گرفت.

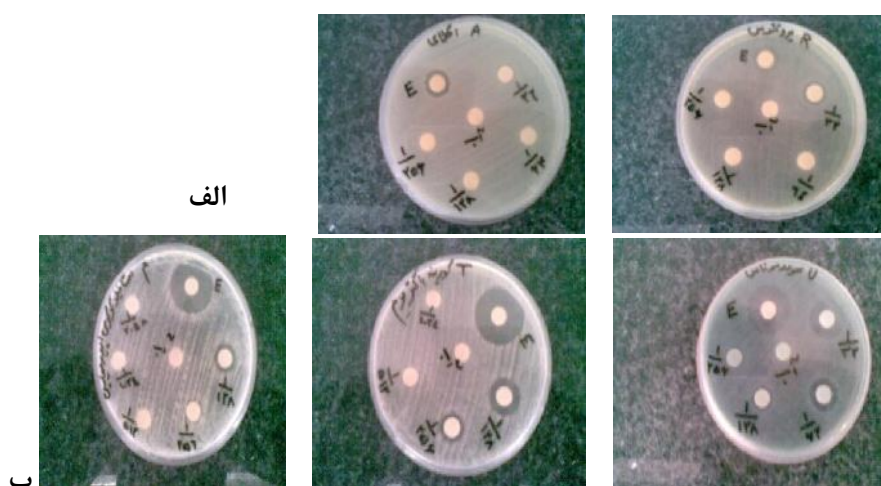
تأثیر آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی باکتری‌های جدا شده از زخم‌ها به روش MIC: برای هر نمونه باکتری جداسازی شده از عفونت‌های ثانویه لیشمانيوز جلدی ۱۲ لوله اختیار کرده و در هر یک از لوله‌ها ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت [Trypticase Soy Broth (TSB)] ریخته شد. پس از آن به لوله اول ۰/۵ میلی لیتر آنزیم گلوکز اکسیداز اضافه شد و پس از مخلوط کردن آن با محیط کشت، ۰/۵ میلی لیتر از لوله اول به لوله دوم اضافه شد و این کار تا لوله یازدهم همچنان ادامه داشت و در لوله آخر هم به عنوان شاهد به جای آنزیم، ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر تزریقی اضافه شد که جهت ثابت بودن حجم در تمام لوله‌ها ۰/۵ میلی لیتر از آن دور ریخته شد، تا حجم همه لوله‌ها یکسان و ۰/۵ میلی لیتر باشد. پس از آن از سوسپانسیون باکتری که با ۰/۵ مک فارلند رقیق‌سازی شده، ۰/۵ میلی لیتر به هر یک از لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها را به ترتیب رقت‌هایشان مرتب کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. پس از آن کدورت لوله‌ها با کدورت لوله شاهد مقایسه شد و از لوله با پایین ترین رقت آنزیم که هیچ کدورتی نداشت و یک یا دو لوله قبل و بعد از آن به میزان ۲۰ میکرولیتر از هر کدام، به محیط کشت نوترینت آگار تلقیح و کشت داده شد، بعد از

رقت‌های ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ مقاومت نشان دادند. سودوموناس آئروجینوزا نسبت به رقت‌های ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ و باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، کورینه باکتریوم گزروزیس به رقت ۰/۰۰۱ مقاوم بودند. در بررسی تأثیر رقت‌های مختلف آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی باکتری‌ها به روش انتشار دیسک در آگار نتایج زیر حاصل شد: کلیه باکتری‌های جدا شده از زخم‌ها در روش انتشار دیسک، نسبت به رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱ حساس بودند و موردی از مقاومت مشاهده نشد. باکتری‌های اشیریشیا کلای و پروتئوس و لگاریس نسبت به رقت‌های ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷ مقاومت نشان دادند. در رقت ۰/۰۰۳ فقط کورینه باکتریوم گزروزیس حساس بود و بقیه باکتری‌ها مقاومت نشان دادند و در رقت ۰/۰۰۱ همه باکتری‌های مورد مطالعه مقاومت نشان دادند. قطراله عدم رشد در باکتری‌های کورینه باکتریوم گزروزیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروجینوزا، اشیریشیا کلای و پروتئوس و لگاریس به ترتیب ۲۲، ۲۱، ۲۰، ۱۱ و ۱۱ میلی‌متر بود (شکل ۱).

آزمون آماری مورد استفاده در بررسی: برای سنجش آماری داده‌ها، از برنامه نرم افزاری SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون Anova و Tukey استفاده شد. حد معنی‌دار بودن تفاوت بین داده‌ها مقدار P برابر یا کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در مطالعه حاضر، باکتری‌های شایع جداسازی شده از ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیوز جلدی به ترتیب میزان شیوع عبارت بودند از: اشیریشیا کلای (۳۲٪)، پروتئوس و لگاریس (۲۸٪)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۲۶٪)، سودوموناس آئروجینوزا (۸٪)، کورینه باکتریوم گزروزیس (۶٪). ایجاد کدورت در رقت‌های مختلف در روش MIC و قطراله‌های عدم رشد در اطراف بلانک دیسک آغشته به آنزیم در باکتری‌های مختلف، متفاوت بود. کلیه باکتری‌های جدا شده از زخم‌ها در روش MIC، نسبت به رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱ و ۰/۰۱۵ حساس بودند و موردی از مقاومت مشاهده نشد. باکتری‌های اشیریشیا کلای و پروتئوس و لگاریس نسبت به



شکل ۱- الف: هاله عدم رشد به ترتیب در محیط کشت باکتری‌های پروتئوس و لگاریس (۱۱ میلی‌متر) و اشیریشیا کلای (۱۱ میلی‌متر) ب: هاله عدم رشد به ترتیب در محیط کشت باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا (۲۰ میلی‌متر)، کورینه باکتریوم گزروزیس (۲۲ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۲۱ میلی‌متر).

بحث

هنگامی که سدهای مخاطی یا پوست به هر علتی از جمله حضور یک انگل، آسیب ببینند، به طوری که پتانسیل اکسیداسیون و احیاء موضعی بافت کاهش یابد، در هر محلی از بدن احتمال ایجاد عفونت با میکروفلور طبیعی پوست وجود خواهد داشت [۴]. امروزه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های متعدد به علت عدم تشخیص صحیح، باعث پیدایش بیش از حد گونه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک در بیمار می‌شود. نتایج آزمون حساسیت میکروبی در این بررسی درصد بالای مقاومت باکتری‌های جدا شده از ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیوز جلدی را به حداکثر آنتی‌بیوتیک‌ها بیان می‌کند. از طرف دیگر باید توجه نمود که مدت زمان محدودی یک آنتی‌بیوتیک می‌تواند به عنوان داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از باکترهای مقاوم به کار گرفته شود و پس از این مدت الگوی حساسیت و مقاومت ممکن است تغییر کند که باید مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

با گذشت زمان باکتری‌ها، مقاومت خود را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهند که این مسئله سبب وقوع افزایش عفونت و افزایش قابل توجه در توانایی انتقال بیماری از شخصی به شخص دیگر می‌شود و در نهایت یک عفونت کوچک دارای پتانسیل کشندگی بالا می‌گردد. از طرفی دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی قطعاً متضاد عمل می‌نمایند و آن‌ها باکتری‌های مفید دستگاه گوارش را که بدن از آن‌ها برای ساختن ویتامین‌های K و B استفاده می‌کند، از بین می‌برند و در نهایت سبب کمبود شدید آن‌ها می‌گردند.

تفاوت زیادی بین داروهای طبیعی و غیر طبیعی وجود دارد. درمان طبیعی بیشتر از آنکه به از بین بردن بیماری بپردازد، به حفظ تعادل و اکولوژی بدن کمک می‌کند. یک

سیستم ایمنی قوی بین نیروهای مخرب و مولد تعادل برقرار می‌کند نه اینکه یکی را بر دیگری غالب نماید. به همین علت در این بررسی سعی شد برای از بین بردن عفونت‌های ثانویه باکتریایی جدا شده از ضایعات پوستی لیشمانیوز جلدی در شرایط آزمایشگاهی از یک داروی طبیعی استفاده شود.

در مطالعه حاضر، باکتری‌های شایع جداسازی شده از ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیوز جلدی به ترتیب میزان شیوع عبارت بودند از: *اشریشیا کلای*، *پروتئوس ولگاریس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سودوموناس آئروجینوزا*، *کورینه باکتریوم گزروزیس*. در بخشی از مطالعه‌ای که در آمریکا انجام شده، از ضایعات پوستی لیشمانیوز جلدی آمریکایی ناشی از لیشمانیا مکزیکانا کامپلکس، شایع‌ترین عامل پاتوژن باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، گزارش گردید [۱۵]. در حالی که در بررسی حاضر شایع‌ترین عامل پاتوژن باکتریایی، *اشریشیا کلای* بود و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نیز در عفونت‌های زخم‌ها موجود بود. در مطالعه دیگری که در ایران انجام شده، شایع‌ترین باکتری جدا شده از ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیوز جلدی، *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده ولی *استرپتوکوکوس پایوژنز* را در مقام دوم، از نظر شیوع گزارش نموده‌اند [۶]. در صورتی که در بررسی حاضر، این باکتری‌ها در نمونه‌های مورد بررسی وجود نداشت.

در بررسی که در کشور ایران بر روی زخم‌های ناشی از لیشمانیوز جلدی انجام دادند، در ۷۶/۴٪ زخم‌ها عفونت‌های ثانویه باکتریایی منفی گزارش شد در حالی که ۲۳/۶٪ آنها آلوده به عفونت باکتریایی ثانویه بودند [۴].

در ایران با مطالعاتی که بر روی عوامل باکتریایی ایجاد شده روی زخم‌های لیشمانیوز جلدی انجام دادند،

بورخولدريا سپاسيا و قارچ‌ها و مخمرها گزارش نمودند [۲۶].

در این تحقیق در روش MIC دو نوع باکتری کورینه باکتریوم گزروزیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از رقت ۰/۰۰۱ به پایین به اثر آنزیم مقاومت نشان دادند و حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به اثر آنزیم بودند و سودوموناس آئروجینوزا از رقت ۰/۰۰۳ به پایین مقاومت نشان داد. پروتئوس ولگاریس و اشیریشیا کلای نیز هر دو از رقت ۰/۰۰۷ مقاومت نشان دادند و در واقع مقاوم‌ترین باکتری‌های آلوده‌کننده زخم‌ها به اثر آنزیم بودند.

هنگام تأثیر آنزیم گلوکزآکسیداز در روش انتشار دیسک در آگار کورینه باکتریوم گزروزیس حساس‌ترین باکتری بود و در پایین‌ترین رقت یعنی ۰/۰۰۱ مقاومت نشان داد، در حالی که در روش MIC علاوه بر کورینه باکتریوم گزروزیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نیز حساسیت خوبی به اثر آنزیم نشان داد.

در روش انتشار دیسک در آگار، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروجینوزا تا رقت ۰/۰۰۷ آنزیم حساس بودند که این نتیجه در مورد سودوموناس آئروجینوزا مشابه نتیجه به دست آمده از روش MIC است. در تحقیقات دیگری تأثیر آنزیم گلوکزآکسیداز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس بررسی و اثبات شد [۲۷-۲۸].

همچنین آنزیم گلوکزآکسیداز علیه سودوموناس آئروجینوزا، اشیریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکوماپسین مؤثر بوده است [۳۱-۲۹]. همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج تحقیق حاضر با نتایج محققین دیگر همخوانی دارد.

معمول‌ترین باکتری جدا شده از این زخم‌ها را استافیلوکوکوس اورئوس با فراوانی ۶۹/۴٪ گزارش کردند و سایر باکتری‌های مسبب عفونت‌های ثانویه این زخم‌ها را استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی (۲۳/۱٪)، اشیریشیا کلای (۳/۹٪) و پروتئوس (۱/۷٪) گزارش نمودند [۸].

گزارش اخیر نیز از نظر نوع باکتری‌های شناسایی شده با بررسی حاضر تقریباً مشابهت دارد اما نسبت فراوانی آن‌ها متفاوت است.

به نظر می‌رسد به دلیل یکسان نبودن وضعیت بهداشتی و اقتصادی در شهرهای مختلف، آداب و رسوم اجتماعی، اختلاف در جمعیت مورد بررسی، الگوی نامشابه عفونت در شهرهای مختلف، توزیع عوامل باکتریال در بین جمعیت‌های مختلف و تفاوت آب و هوایی و جغرافیایی منطقه و زمان‌های متفاوت همه می‌توانند، احتمالاً از علل این اختلاف در میزان شیوع نوع آلودگی باکتریایی محسوب شوند.

در مقالات زیادی به خواص ضد باکتریایی آنزیم گلوکزآکسیداز اشاره شده است [۱۶-۱۸]. همچنین، به وجود این آنزیم در عسل و تولید پراکسید هیدروژن حاصل از آن اشاره شده و گزارش نمودند که پراکسید هیدروژن موجود در عسل در بهبود زخم‌ها نقش مؤثری دارد [۲۱-۱۹].

در بسیاری از مطالعات از عسل به دلیل داشتن آنزیم گلوکزآکسیداز و اثرات آنتی‌باکتریال استفاده‌های بالینی شده است [۲۲-۲۵].

در مطالعه دیگری به وجود آنزیم گلوکزآکسیداز در عسل اشاره نمودند و تأثیر پراکسید هیدروژن حاصل از این آنزیم را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس مقاوم به ونکوماپسین،

نتیجه گیری

از مطالعات قبلی و نتایج تحقیق حاضر نتیجه می شود که آنزیم گلوکز اکسیداز در شرایط آزمایشگاهی هم بر روی باکتری های گرم منفی و هم بر روی باکتری های گرم مثبت جدا شده از عفونت های ثانویه زخم های لیشمانیوز جلدی مؤثر می باشد.

همچنین، با توجه به نتایج به دست آمده از روش MIC و انتشار دیسک در آگار، به نظر می آید که باکتری های گرم مثبت یعنی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه

باکتریوم گزروزیس، در حضور آنزیم گلوکز اکسیداز حساسیت نسبتاً بیشتری نشان می دهند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و بیماران شرکت کننده در مطالعه، مرکز صدیقه طاهره اصفهان به دلیل همکاری در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می گردد.

References

- [1] Mozafari GH, Bakhshizadeh F. Analysis of bioclima factors on the Leishmaniasis diseases in yazd-ardakan plain. *Geography and Develop* 2011; 9(23): 185-202. [Farsi]
- [2] Saki J, Khademvatan SH. A molecular study on cutaneous Leishmaniasis lesions in khuzestan province. *Jundishapur J Microbiol (JJM)* 2011; 4 (14): 283-8. [Farsi]
- [3] Ebrahimian S, Asilian A, Faghihi G. A Comparetaive study on glucantime and oral terbinafine along with systemic on glucantime on cutaneous Leishmaniasis. *J Isfahan Med School* 2011; 28(118): 1246-52. [Farsi]
- [4] Sadeghian G, Ziaei H, Bidabadi LS, Baghbaderani AZ. Decreased effect of glucantime in cutaneous Leishmaniasis complicated with secondary bacterial infection. *Indian J Dermatol* 2011; 56: 37-9.
- [5] Solbach W, Laskay T. The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol* 2000; 74: 275-317.
- [6] Edrissian GH, Mohammadi M, Kanani A, Afshar, A Hafezi R. Bacterial infections in suspected cutaneous Leishmaniasis lesions. *WHO* 1990; 68: 4-10. [Farsi]
- [7] Korting HC, Neubert H, Abeck D. Current antimicrobial susceptibility of cutaneous bacteria on first line antibiotics. *Int J Anti Agent* 1998; 10: 165-8.
- [8] Ziaie H, Sadeghian G. Isolation of bacteria causing secondary bacterial infection in the lesions of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol* 2008; 53: 129-31.
- [9] Schepartz AI, Subers MH. The glucose-oxidase of honey: I. Purification and some general properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1964; 85: 228-37.
- [10] White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochim Biophys Acta* 1963; 73: 57-70.
- [11] Arrais-Silva WW, Colhone MC, Ayres DC, Souto PS, Giorgio S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Int* 2005; 54: 1-7.

- [12] Bang LM, Bunting C, Molan PC. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J Altern Compl Med* 2003; 9(2): 267-73.
- [13] Tiina M, Sandholm M. Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *Int J Food Microbiol* 1989; 8(2): 74-165.
- [14] Eron LJ, Lipsky BA, Low DE, Nathwani D, Tice AD, Volturo GA. Managing skin and soft tissue infections: expert panel recommendations on key decision points. *J Anti Chem* 2003; 52 (suppl 1): 13-17.
- [15] Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardia ME and et al. Immunotherapy of localized and diffuse forms of American cutaneous Leishmaniasis. *J Infect* 1989; 160: 104-14.
- [16] Edward G. The Health Benefits of Glucose Oxidase. 2011; [105-107]. Available at: Natural Health. 21, 2011.
- [17] Cooper RA, Molan PC. Honey in wound care. *J Wound Care* 1999; 8: 340.
- [18] Kingsley A. The use of honey in the treatment of infected wounds: case studies. *Br J Nurs* 2001; 10(22): 13-20.
- [19] Molan PC, Brett M. Honey has potential as a dressing for wounds infected with MRSA. The Second Australian Wound Management Association Conference. Mel-bourne, Victoria, Australia. 1994; March, 100-4.
- [20] Lynne M, Bang M, Peter M. The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxid Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *J Alternative Complementary Med* 2003; 2: 267-73.
- [21] Dunford CE, Cooper RA, Molan PC. Using honey as a dressing for infected skin lesions. *Nurs Times (NT Plus)* 2000; 96: 7-9.
- [22] Lay- Flurrie K. Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit. *Br J Nurs* 2008; 17(11): 32-6.
- [23] Hern T Tan, Rosliza A Rahman, Siew H Gan, Ahmad S Halim, Siti A Hassan and et al. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to Manuka honey. *J Complementary Alternative Med* 2009; 9: 34.
- [24] Robson V, Dodd S, Thomas S. Standardized antibacterial honey (Medi honey) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *JAN* 2009; 65(3): 565-75.
- [25] Pieper B. Honey- based dressing and wound care: an option for care in the United States. *J Wound, Ostomy & Continence Nurs* 2009; 36(1): 60-6.
- [26] Cooper RA, Molan PC, Harding KG. The effectiveness of the antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from infected wounds. *J R Soc Med* 1999; 92: 283-5.
- [27] Vilma B Petras R Violeta C. Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin Against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Cruz* 2006; 10: 215-20.
- [28] Baltru V. Antibacterial Activity of Honey and Beebread. *Food Technol. Biotechnol* 2007; 45 (2): 201-8.
- [29] Paulus HS, Anje A, Christina M. How honey kills bacteria. *J E Vandenbroucke-Grauls* 2010; 30: 12-15.
- [30] Molan PC. The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; 73: 5-28.
- [31] Willix DJ, Molan PC, Harfoot CJ. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 388-94.

The Effect of Glucose Oxidase on Bacterial Secondary Infections of Cutaneous Leishmaniasis

Sh. Frozi¹, K. Shahani pour², M. Doodi³

Received: 16/06/2012 Sent for Revision: 29/08/2012 Received Revised Manuscript: 19/11/2012 Accepted: 30/12/2012

Background and Objective: Coetaneous leishmaniasis is a protozoan infection which is caused by different species belonging to the genus *Leishmania*. Cutaneous leishmania have mostly wet and secretory sores so they create suitable environment for the growth of bacteria, fungi and other microorganisms, which results in secondary infections. In this study glucose oxidase has been used for the treatment of the bacterial strains isolated from coetaneous leishmaniasis sores. Isolated bacteria were *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis* and *Corynebacterium xerosis*.

Materials and Methods: This laboratory study was performed on secondary bacterial infections of coetaneous leishmaniasis of 50 patients admitted to Sedighe Tahere hospital- Isfahan. In this research various dilution of glucose oxidase 10Ku/ml (0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003, 0.001) were used for assessing antibacterial effects by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and agar disk diffusion methods.

Results: Based on the results, isolated bacteria from the sores (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Corynebacterium xerosis*) showed great sensitivity to the glucose oxidase at various dilutions.

Conclusion: Glucose oxidase, had inhibitory activity against the gram-positive and the gram-negative bacteria, thus this enzyme can be used for the treatment of the bacterial secondary infections of the sores of leishmaniasis.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, Secondary Infections, Glucose Oxidase, MIC, Disk Diffusion

Funding: This research was funded by Islamic Azad University of Falavarjan.

Conflict of Interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Falavarjan approved the study.

How to cite this article: Frozi Sh, Shahani pour K, Doodi M. The Effect of Glucose Oxidase on Bacterial Secondary Infections of Cutaneous Leishmaniasis. *J Rafsanjan Univ Med Scie* 2013; 12(9): 621-30. [Farsi]

1- MSc Student, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Biochemistry, Flavarjan Branch, Islamic Azad University, Flavarjan, Iran
(Corresponding author) Tel: (0311) 7725585, Fax: (0311) 7725585, E- mail: shahanipur_k@yahoo.com

3- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Flavarjan Branch, Islamic Azad University, Flavarjan, Iran