Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2024; Vol. 48; No. 3

Species- Level Analysis of Blood Microbiota in Healthy Volunteers at the Pasteur Institute of Tehran Using 16S rRNA Sequencing

Javad Raeisi[1], Mohammad Reza Zolfaghari[1*], Mana Oloomi[2*], Seyed Davar Siadat[3], Mohsen Zargar[1], Zahra Salehi[4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4. Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: May 25, 2024; Accepted: August 21, 2024

Abstract

Background and Aim: The significance of the microbiota as an ecosystem in our bodies has been well established. Recent studies have reported the presence of bacteria in the blood of healthy individuals. Our study aims to characterize the bacterial microbiota in human blood through 16S rRNA region sequencing. This study highlights the importance of method selection by focusing on the strains cultured in growth media.

Methods: This descriptive study collected 50 blood samples from healthy volunteers, following previous research protocols. In this study, a healthy individual is defined as someone who meets the following criteria: absence of chronic diseases or active infections. Blood samples were cultured in the Brain Heart Infusion (BHI) broth medium under controlled conditions. DNA was extracted from the resulting colonies. The 16S rRNA region was amplified, and amplicons were sequenced in both directions.

Results: Five out of fifty (10%) blood samples exhibited bacterial growth. All samples with bacterial growth were from females aged 25-43 years. BLAST analysis of the bacterial isolates revealed Staphylococcus epidermidis was identified in two samples with similarity percentages of 97.7% and 97.78%, respectively. Staphylococcus hominis was detected in one sample with a similarity of 99.05%. Additionally, a Bacillus species was found in one sample with a similarity of 98.62%, and Bacillus subtilis was identified in one sample with a similarity of 91.28%. Statistical analysis using Fisher's exact test did not reveal a significant relationship between age and the isolated bacterial strains (P-value > 0.05).

Conclusion: It seems that this species identification method can be used for diagnosis purposes. It recommends further research.

Keywords: Blood Microbiota; Bacterial Diversity; Iran; Staphylococcus epidermidis; Blood Transfusion

Please cite this article as: Raeisi J, Zolfaghari MR, Oloomi M, Siadat SD, Zargar M, Salehi Z. Species- Level Analysis of Blood Microbiota in Healthy Volunteers at the Pasteur Institute of Tehran Using 16S rRNA Sequencing. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(3):21-29.

[*] **First Corresponding Author:** Mohammad Reza Zolfaghari; **Email:** mreza.zolfaghary@gmail.com
Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[*] **Second Corresponding Author:** Mana Oloomi; Email: manaoloomi@yahoo.com
Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۳، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۲۱ تا ۲۹

تجزیه و تحلیل میکروبیوتای خون در سطح گونه در داوطلبان سالم در انستیتو پاستور تهران با استفاده از توالی یابی 16S rRNA

جواد رییسی[۱]، محمدرضا ذوالفقاری[۱*]، مانا علومی[۲*]، سید داور سیادت[۳]، محسن زرگر[۱]، زهرا صالحی[۴]

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۲- بخش بیولوژی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.
۴- بخش قارچ‌شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱

چکیده

سابقه و هدف: در مطالعه‌های پیشین اهمیت نقش میکروبیوتا به عنوان یک اکوسیستم در بدن انسان نشان داده شده است. مطالعه‌های اخیر وجود باکتری در خون افراد سالم را ارائه کرده است. مطالعه ما میکروبیوتای باکتریایی در خون انسان را از طریق توالی یابی ژن 16S rRNA مشخص می‌کند. این مطالعه با برجسته کردن سویه‌های رشد یافته در محیط کشت، اهمیت انتخاب روش مطالعه را نشان می‌دهد.

روش کار: مطالعه مورد نظر توصیفی بوده و براساس مطالعه‌های پیشین انجام شده، ۵۰ نمونه خون از داوطلبان سالم برای این مطالعه جمع‌آوری شد. در این مطالعه منظور از انسان سالم، فردی است که شرایط زیر را دارا باشد: نبود بیماری‌های مزمن یا عفونت فعال. نمونه‌های خون در محیط مایع Brain Heart Infusion (BHI) تحت شرایط کنترل شده کشت داده شدند. DNA از کلنی‌های به دست آمده استخراج شد. ژن 16S rRNA تکثیر و نتایج تکثیر در هر دو جهت توالی‌یابی شدند.

یافته‌ها: از ۵۰ نمونه خون (۱۰درصد)، ۵ نمونه رشد باکتریایی را نشان دادند. تمامی نمونه‌های دارای رشد باکتری از بین زنان ۴۳-۲۵ ساله بودند. تجزیه و تحلیل BLAST ایزوله‌های باکتریایی، وجود استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۲ عدد) به ترتیب با درصد شباهت ۹۷/۷درصد و ۹۷/۷۸درصد، استافیلوکوکوس هومینیس (یک عدد) با ۹۹/۰۵درصد، گونه باسیلوس (یک عدد) با ۹۸/۶۲درصد، و باسیلوس سوبتلیس (یک عدد) با ۹۱/۲۸درصد شباهت را نشان داد (P-value > ۰/۰۵). تجزیه و تحلیل آماری (آزمون دقیق فیشر) رابطه معناداری بین سن و سویه‌های باکتریایی جدا شده نشان نداد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که این روش شناسایی گونه‌ها می‌تواند در اهداف تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد. تحقیق‌های بیشتر را توصیه می‌کند.

واژگان کلیدی: میکروبیوتای خون؛ تنوع باکتریایی؛ ایران؛ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس؛ انتقال خون

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Raeisi J, Zolfaghari MR, Oloomi M, Siadat SD, Zargar M, Salehi Z. Species- Level Analysis of Blood Microbiota in Healthy Volunteers at the Pasteur Institute of Tehran Using 16S rRNA Sequencing. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(3):21-29.

[*] **اولین نویسنده مسئول مکاتبات:** محمدرضا ذوالفقاری؛ **آدرس پست الکترونیکی:** mreza.zolfaghary@gmail.com
گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

[*] **دومین نویسنده مسئول مکاتبات:** مانا علومی؛ **آدرس پست الکترونیکی:** manaoloomi@yahoo.com
بخش بیولوژی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

مقدمه

انسان‌ها دارای مجموعه وسیع و متنوعی از میکروارگانیسم‌ها در بدن خود هستند که در مجموع به عنوان میکروبیوتا شناخته می‌شود (۱). این میکروبیوتا، به عنوان یک اکوسیستم در بدن ما، در تعدیل سیستم ایمنی نقش مهمی دارند، این فرآیندی است که از دوران نوزادی شروع می‌شود و در طول زندگی ادامه می‌یابد. این میکروارگانیسم‌ها، به ویژه در داخل روده، عملکردهای متعددی مانند هضم، متابولیسم، تقویت عملکرد سیستم ایمنی و دفاع در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را به عهده دارند. علاوه بر این، شواهد نشان می‌دهد که میکروبیوتا بر رفتار میزبان و حالت‌های عاطفی تأثیر می‌گذارد و در روند پیری نقش دارد (۲، ۳). عوامل متعددی می‌تواند در تفاوت میکروبیوم در محیط‌ها و جوامع مختلف مؤثر باشند. مانند: رژیم غذایی، جغرافیا/ اقلیم، اقدام‌های بهداشتی، مصرف آنتی‌بیوتیک و عوامل ژنتیکی (۴). تحقیق‌ها در این زمینه برای کشف تعامل پیچیده بین ژنتیک، محیط و فرهنگ در شکل دادن به جوامع میکروبی در بدن انسان ادامه دارد.

برخلاف نظریه‌های پیشین مبنی بر استریل بودن خون انسان، گزارشی در سال ۱۹۶۹ نشان داد که میکروارگانیسم‌هایی مشابه مایکوپلاسما در جریان خون افراد سالم قابل شناسایی هستند (۵). این مشاهده آغازگر مطالعه حضور باکتری در خون انسان بود و در سال‌های اخیر تحقیق‌ها در این زمینه افزایش یافته است. علاوه بر این، پیشرفت‌های اخیر در میکروسکوپ الکترونی و تکنیک‌های مولکولی شواهدی مبنی بر وجود باکتری در خون اهداکنندگان سالم را ارائه کرده است (۶-۱۲).

میکروبیوتا با دو عملکرد بر سلامت انسان تاثیرگذار هستند. از یک سو، از طریق تعامل با سیستم ایمنی میزبان و تقویت سیستم دفاعی، آن را در برابر بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا حفاظت می‌کند و نقش حیاتی در حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی ایفا می‌کند (۱۳). از سوی دیگر، دیس بیوز در میکروبیوم خون ممکن است منجر به واکنش‌های التهابی نابجا شود. علاوه بر این، اختلال در عملکرد ایمونولوژیک یا اختلال در فرآیندهای متابولیک خون م تواند ناشی از اختلال در میکروبیوم خون باشد. دیس بیوز همچنین ممکن است به ظهور یا سیر بیماری‌های خاص کمک کند (۶). توجه به این نکته ضروری است که تحقیق‌ها روی میکروبیوم خون در مراحل اولیه است و برای تأیید وجود و درک نقش عملکردی آن به شواهد بیشتری نیاز است.

تکنیک‌های مولکولی پیشرفته مانند توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) و qPCR درک ما را از گونه‌های باکتریایی در خون افزایش داده‌اند (۹، ۱۴). علاوه بر این، در میان روش‌های مولکولی، توالی‌یابی ناحیه *16S rRNA* شناسایی و تعیین پروفایل دقیق را ممکن کرده است (۱۵). این مطالعه با برجسته کردن سویه‌های رشد یافته در محیط کشت، اهمیت انتخاب روش مطالعه را نشان می‌دهد. هدف این مطالعه بررسی میکروبیوتای باکتریایی در خون افراد سالم مراجعه‌کننده به انستیتو پاستور تهران (سال ۱۴۰۰)، با استفاده از تعیین توالی ناحیه ژنی *16S rRNA* است.

روش کار

جمعیت مورد مطالعه

در مطالعه توصیفی حاضر نمونه‌گیری از افراد سالم مراجعه‌کننده به انستیتو پاستور تهران با رضایت کامل بر اساس معیارهای ورود و خروج انجام شد. تعداد نمونه جمع‌آوری شده مطابق با مطالعه Whittle و همکاران، ۵۰ نمونه در نظر گرفته شد (۱۶). سن داوطلبان از ۲۵ تا ۶۰ سال متغیر بود. همه شرکت‌کنندگان رضایت آگاهانه کتبی را ارائه کردند که مشارکت داوطلبانه و درک آنها از مطالعه را تأیید کرد. شرکت‌کنندگان بر اساس معیارهای ورود و خروج تعریف شده انتخاب شدند. معیارهای ورود شامل موارد زیر بود: افراد از هیچ آنتی‌بیوتیکی استفاده نکرده باشند یا تحت هیچ گونه روش جراحی قرار نگرفته باشند، همچنین افراد شرکت‌کننده حداقل یک ماه قبل از شروع مطالعه فاقد هرگونه علایم بالینی عفونت بوده باشند. معیارهای خروج برای حذف شرکت‌کنندگان با شرایطی که می‌تواند نتایج مطالعه را مخدوش کند، اعمال شد که شامل افراد دارای HIV، HBV، HCV یا CMV می‌شود. همچنین افرادی که سرطان داشته یا تحت درمان سرطان هستند، افرادی که گلوکوکورتیکواستروئید

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

مصرف می‌کنند و هر گونه بیماری حاد یا سرماخوردگی در زمان جمع‌آوری نمونه داشته‌اند، از مطالعه کنار گذاشته شدند. تمام داده‌های پردازش شده بر اساس اطلاعات خود گزارشی ارائه شده توسط شرکت‌کنندگان بود.

جمع‌آوری نمونه‌های خون و جداسازی باکتری

برای جمع‌آوری خون و جداسازی باکتری‌ها از شرکت‌کنندگان در مطالعه با استفاده از پروتکل کنترل عفونت، که شامل بهداشت دست و استفاده از دستکش مناسب بود، استفاده شد. محل رگ‌گیری با ۷۰ درصد الکل تمیز شد، برای چرخش از مرکز به سمت بیرون بود. محل نمونه‌گیری به مدت ۳۰ ثانیه در هوا خشک شد و پس از ضدعفونی لمس نشد.

مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از طریق رگ از هر شرکت‌کننده جمع‌آوری شد و به بطری‌های کشت خون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. درب بطری کشت خون با استفاده از الکل ۷۰ درصد قبل از انتقال نمونه ضد عفونی شد. بطری‌های کشت خون حاوی محیط BHI بودند (۱۷). پس از اضافه شدن نمونه خون به محیط کشت BHI، بطری‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند تا امکان رشد باکتری فراهم شود (۸).

شناسایی مولکولی گونه‌های باکتری

DNA از کلنی‌های تازه و منفرد با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Roche، آلمان) طبق پروتکل سازنده، استخراج شد. ناحیه V3-V4 ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگرهای 27F (5'-TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') و 1492R (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') تکثیر شدند (۱۲). واکنش‌های PCR شامل ۰/۵ µl از هر آغازگر (10 pmol)، ۱۲/۵ µl Master Mix (Amplicon، دانمارک)، ۱ µl DNA الگوی (۱۰۰-۱۵۰ ng) و ۱۰/۵ µl آب مقطر بود. برای اطمینان از اختصاصی بودن آزمون، یک کنترل منفی در تمام واکنش‌ها گنجانده شد. برنامه ترموسایکلر شامل: یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه بود، پس از آن ۳۵ سیکل واسرشت ثانویه در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، انلینگ در دمای ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. ناحیه تکثیر شده روی ژل‌های آگارز یک درصد رنگ‌آمیزی شده با Gel red مشاهده شدند و با استفاده از یک ترنسلومیناتور (Gel doc Biorad) عکس‌برداری شدند. ناحیه تکثیر شده در هر دو جهت با روش سانگر با استفاده از ابزار ABI (PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing) توالی‌یابی شدند. توالی‌های رو به جلو و معکوس با استفاده از نرم‌افزار MEGA10 در معرض هم‌ترازی ClustalW قرار گرفتند تا توالی‌های اجماع به دست آید. توالی‌ها از طریق BLAST در برابر پایگاه داده GenBank تجزیه و تحلیل و شناسایی شدند.

یافته‌ها

کشت

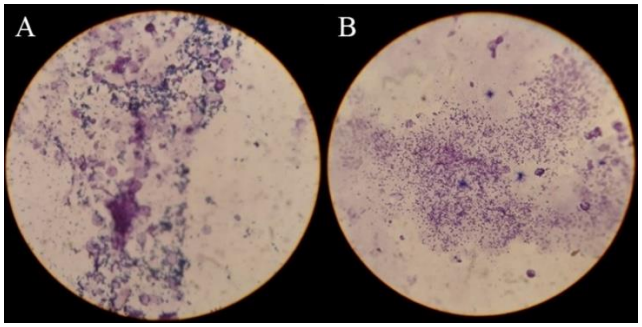
در این مطالعه ۵۰ داوطلب سالم شامل ۳۰ زن و ۲۰ مرد با میانگین سنی ۳۷ سال بررسی شد. نمونه خون این افراد تحت شرایط هوازی کشت داده شد. پنج نمونه از ۵۰ نمونه خون از شرکت‌کنندگان زن، رشد باکتری را در شرایط هوازی نشان دادند (شکل ۱).

آنالیز PCR و BLAST

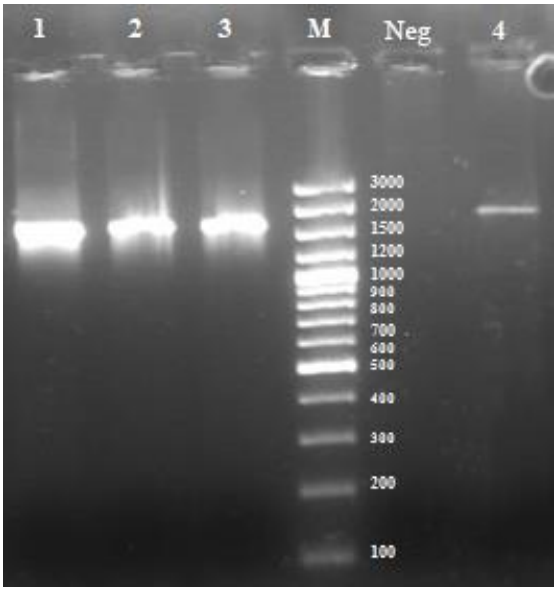
پس از PCR هر پنج نمونه تکثیر ۱۵۲۰ جفت باز را نشان دادند (شکل ۲). در تجزیه و تحلیل BLAST، دو ایزوله به ترتیب ۹۷/۷درصد و ۹۷/۷۸درصد شباهت با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (شماره دسترسی MZ027352 و CP133663) را نشان دادند. یک ایزوله ۹۹/۰۵ درصد شباهت با استافیلوکوکوس هومینیس (شماره دسترسی OP491985)، و گونه دیگر با ۹۸/۶۲درصد شباهت با گونه ناشناس از جنس Bacillus (شماره دسترسی OM912977) و دیگری با ۹۱/۲۸ درصد شبیه به گونه باسیلوس سوبتیلیس (شماره دسترسی MK726359) شناسایی شدند. گونه‌های میکرو بیوتای باکتری در نمونه‌ها ۹۳/۴ بود و میزان واقعی آن(C.I) با اطمینان ۹۵درصد از حداقل ۸۷/۳ تا ۹۵/۲ درصد برآورد می‌شود و در مورد استافیلوکوکوس هومینیس از حداقل ۹۷/۲ تا ۱۰۰ در صد برآورد می‌شود.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

تجزیه و تحلیل آماری (آزمون دقیق فیشر) رابطه معناداری بین سن و سویه‌های باکتریایی جدا شده نشان نداد (P-value > ۰/۰۵).



شکل ۱- الف، ب) رنگ‌آمیزی گرمی میکروبیوتای خون افراد سالم که در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت با بزرگنمایی ۱۰۰۰ × کشت داده شدند.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ناحیه *16S rRNA*: ۱، ۲) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۳) استافیلوکوکوس هومینیس، ۴) باسیلوس سوبتیلیس، M) نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت باز، Neg) کنترل منفی

بحث

در مطالعه حاضر ۵ سویه شامل دو سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، یک سویه استافیلوکوکوس هومینیس، یک سویه باسیلوس سوبتیلیس و یک گونه باسیلوس شناسایی شد. تمامی سویه از داوطلبان خانم جدا شده بود، ولی رابطه معناداری بین سن و سویه‌های باکتریایی جدا شده دیده نشد.

میکروبیوم بدن انسان ذاتاً متنوع است و در افراد و نقاط مختلف بدن نیز دارای تفاوت است. عواملی مانند ژنتیک، رژیم غذایی، شیوه زندگی، مصرف آنتی‌بیوتیک، جغرافیا و استرس بر ترکیب میکروبیوم تأثیر می‌گذارد (۱۸). مطالعه‌های مختلف نشان داده است که هر فرد مشخصات میکروبی منحصر به فردی دارد و حفظ تعادل در میکروبیوم برای سلامت کلی بدن بسیار مهم است. بررسی میکروبیوم انسان در نقاط مختلف بدن، از جمله روده، پوست، واژن، ریه‌ها، چشم‌ها و دهان به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۱-۱۹). در گذشته، خون با توجه به عملکرد مهم آن در توزیع اکسیژن و مواد مغذی، یک محیط استریل در نظر گرفته می‌شد. با این حال، یافته‌های اخیر این دیدگاه را به چالش می‌کشد (۱۲، ۱۶، ۲۲). از سوی دیگر، وجود میکروبیوتا در خون افراد سالم لزوماً نشان‌دهنده عفونت یا بیماری مداوم نیست. با این حال، انتقال خون یک روش پزشکی ضروری است، اما با خطرهایی از جمله انتقال احتمالی عفونت همراه است. مطالعه میکروبیوم خون می‌تواند به شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌هایی که ممکن است در خون وجود داشته باشند کمک کند و امکان ارزیابی بهتر ایمنی روش‌های انتقال خون را فراهم کند.

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های مولکولی و ظهور توالی‌یابی متاژنومی، گونه‌های باکتریایی متنوعی را در خون افراد سالم با ارزیابی‌های بالینی مرسوم نشان داده است (۹، ۱۰، ۲۵-۲۳). در حالی که این باکتری‌ها اغلب حالت زنده اما غیرقابل کشت (VBNC) را نشان می‌دهند (۱۲)، تشخیص DNA باکتری از طریق ابزارهای مولکولی وجود آنها را تأیید می‌کند و درک ما از میکروبیوتا در خون را به طور قابل توجهی تغییر می‌دهد. در حالی که توالی *16S rRNA* برای پروفایل جوامع میکروبی ارزشمند است، تکنیک‌های NGS رویکرد دقیق‌تر و جامع‌تری را در درک ساختار ژنتیکی و پتانسیل عملکردی جمعیت‌های میکروبی ارائه می‌کنند (۲۶). در کل، انتخاب بین این روش‌ها به

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

اهداف خاص تحقیق بستگی دارد.

در مطالعه حاضر، از ۱۰ درصد نمونه‌های خون افراد سالم شرکت‌کننده، گونه‌های استافیلوکوک و باسیلوس جدا شد. این یافته‌ها نتایج مطالعه‌های پیشین را تأیید می‌کند (۱۶، ۲۷)، درحالی که مطالعه‌هایی وجود دارد که گونه‌های باکتریایی جدا شده با این مطالعه متفاوت است (۲۳). چنین اختلافی ممکن است از تنوع ذاتی در میکروبیوتای انسان، که خود با عواملی مانند قومیت، رژیم غذایی، موقعیت جغرافیایی و مهاجرت مرتبط است، ناشی شود (۲۸). تا آنجا که ما می‌دانیم، تحقیق‌های کمی در مورد میکروبیوتای باکتریایی در نمونه‌های خون افراد سالم در ایران انجام شده است. قائمی و همکاران میکروبیوتای خون در بیماران دیابتی را با افراد سالم مقایسه کرد و نشان داد که لاکتوباسیلوس و اشریشیا کلی در بیماران دیابتی نسبت به داوطلبان عادی بیشتر است (۲۹). همچنین سیادت و همکاران با بررسی نقش میکروبیوتا و متابولیت‌های آنها نشان داده‌اند که اختلال در ترکیب طبیعی باکتری‌های روده می‌تواند به توسعه سرطان کولورکتال کمک کند (۳۰). رئیسی و همکاران در مطالعه پیشین خود با استفاده از تکنیک NGS نشان دادند که رومبوتسیا، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوک، باکتریوئید و استافیلوکوک میکروبیوم غالب در گردش خون هستند (۱۴). تفاوت در روش و استفاده از نمونه مستقیم خون می‌تواند دلیل تفاوت گونه‌های باکتری شناسایی شده باشد.

گونه‌های باکتریایی استافیلوکوک به دلیل پتانسیل آنها برای ایجاد عفونت در زمینه انتقال خون و سایر روش‌های پزشکی نگران‌کننده هستند. با این حال، برخی از گونه‌های باسیلوس دارای پتانسیل پروبیوتیک هستند، در حالی که برخی دیگر می‌توانند سبب عفونت شوند. شیوع و تأثیر گونه‌های استافیلوکوک و باسیلوس در جمعیت ایران به عوامل مختلفی از جمله بهداشت، جغرافیا، شیوه زندگی، اقدام‌های بهداشتی و مصرف آنتی‌بیوتیک بستگی دارد (۳۱، ۳۲). از سوی دیگر، غلبه کشت‌های مثبت در بین زنان ۴۳-۲۵ ساله اهمیت در نظر گرفتن جنسیت و سن را به عنوان عوامل کلیدی در روشن کردن الگوهای کلونیزاسیون باکتریایی نشان می‌دهد. درک الگوی کلونیزاسیون باکتری‌ها در جمعیت‌های مختلف، ممکن است به درک عمیق‌تر از نحوه تأثیر سبک زندگی، تغییرهای هورمونی و عوامل محیطی بر جوامع میکروبی کمک کند و راه‌هایی را برای مداخله‌های مراقبت‌های بهداشتی دقیق‌تر و مؤثرتر ارائه دهد.

روش تعیین توالی 16S rRNA به دلیل تمرکز بر ناحیه‌ای خاص از ژنوم باکتری‌ها قادر به شناسایی دقیق و حساس گونه‌های باکتریایی است. از محدودیت‌های این روش می‌توان به شناسایی باکتری‌هایی که توالی‌های 16S rRNA آنها در پایگاه‌های داده موجود نیست، اشاره کرد. روش‌های سنتی مانند کشت میکروبی تعداد معدودی از باکتری‌ها را شناسایی می‌کند، چرا که بسیاری از میکروب‌ها قابل کشت در شرایط آزمایشگاهی نیستند. این روش معمولاً نتایج محدودتری ارائه می‌دهد و ممکن است نتواند باکتری‌های زنده اما غیرقابل کشت را شناسایی کند. همچنین دقت این روش‌ها نسبت به روش‌های مولکولی پایین‌تر است و تنوع میکروبی کامل را نشان نمی‌دهند. در مقابل روش NGS توانایی شناسایی جامع‌تری از تمامی موجودات میکروبی موجود در نمونه را دارد، ازجمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها. این روش می‌تواند پروفایل کامل‌تری از میکروبیوم را ارائه دهد و به درک بهتری از تنوع ژنتیکی و پتانسیل عملکردی جمعیت‌های میکروبی کمک کند. این روش محدودیت‌هایی هم دارد از قبیل: پیچیدگی و هزینه بالا و نیازمند بودن به تحلیل‌های بیوانفورماتیکی پیشرفته. با این حال، نتایج آن بسیار جامع و دقیق‌تر هستند.

علاوه بر این، نتایج این مطالعه از طریق تدوین پروتکل‌های دقیق‌تر برای پیشگیری از عفونت‌های منتقله از طریق انتقال خون، ارزیابی دقیق‌تر ایمنی روش‌های انتقال خون و توسعه ابزارهای تشخیصی پیشرفته‌تر برای شناسایی میکروبیوم خون، می‌توانند به بهبود پروتکل‌های بهداشتی و درمانی کمک کنند.

در این مطالعه چندین محدودیت وجود داشت. دامنه مطالعه ما تجزیه و تحلیل باکتری‌های بی‌هوازی و باکتری‌های غیرقابل کشت را شامل نمی‌شود. حجم نمونه پایین ۵۰ شرکت‌کننده در این مطالعه ممکن است تعمیم‌پذیری نتیجه‌گیری‌های ما را محدود کند. با این حال، شناسایی تنوع میکروبیوم خون در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

جمعیت ایرانی، حتی با حجم نمونه کوچک، مهم است. ما پیشنهاد می‌کنیم که مطالعه‌های آینده با تمرکز بر گروه‌های بزرگ‌تر، امکان استفاده از تنوع میکروبی، خون را به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای پاسخ به درمان، پیشرفت بیماری یا خطر ایجاد بیماری انجام شود. علاوه بر این، بررسی تأثیر عوامل مختلف مانند: رژیم غذایی، جغرافیا، شیوه زندگی و ژنتیک بر میکروبیوم خون و همچنین استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های خون برای شناسایی باکتری‌های L فرم و غیرقابل کشت و باکتری‌های خفته را توصیه می‌کنیم. همچنین، به نظر می‌رسد تحقیق در مورد ارتباط بین میکروبیوم خون و بیماری‌های مزمن و حاد نتایج جالبی را ارائه دهد.

مطالعه ما و سایر تحقیق‌ها در این زمینه نشان دادند که خون انسان که قبلاً به عنوان مایع استریل در نظر گرفته می شد، میکروبیوت های متنوعی را در خود جای داده است (۳۳). با توجه به خطر آلودگی و وجود میکروبیوم خون، پروتکل های مناسب در شیوه های انتقال خون بسیار مهم هستند. مطالعه ما نشان می‌دهد که روش تعیین توالی ناحیه 16S rRNA به عنوان یک تکنیک دقیق و حساس می‌تواند به شناسایی و تحلیل میکروبیوم خون کمک کند. بنابراین انجام مطالعه‌های مشابه در جوامع مختلف برای به ددست آمدن این الگو ضروری است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که این روش (توالی‌یابی) می‌تواند در شناسایی گونه‌های میکروبیوتای باکتریایی مفید باشد. تحقیق‌های بیشتر توصیه می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.QOM.REC.1398.019 ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره IR.IAU.QOM.REC.1398.019 آقای جواد رئیسی برای دریافت درجه دکتری در رشته زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم بود.

از انستیتو پاستور ایران و گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم برای حمایت‌های خود در این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم. تأمین منابع، تخصص و همکاری بی‌نظیر این مؤسسه‌ها در اجرای موفقیت‌آمیز این پژوهش نقش اساسی داشت.

ما همچنین از فداکاری مداوم و کار دقیق محققان و کارکنان فنی در طول پروژه قدردانی می‌کنیم. از جمع‌آوری نمونه تا تجزیه و تحلیل داده‌ها و پیش‌نویس نسخه‌های خطی، مشارکت قابل‌توجه هر فرد در به ثمر رساندن این مطالعه بسیار مهم بود.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

References

1. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, De Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes and Nutrition. 2011; 6 (3): 209-40.

2. Castanys-Muñoz E, Martin MJ, Vazquez E. Building a beneficial microbiome from birth. Advances in Nutrition. 2016; 7 (2): 323-30.

3. Zhao M, Chu J, Feng S, Guo C, Xue B, He K, et al. Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. Biomedicine Pharmacotherapy. 2023; 164: 114985.

4. Dong TS, Gupta A. Influence of early life, diet, and the environment on the microbiome. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2019; 17 (2): 231-242.

5. Tedeschi G, Amici D, Paparelli MJN. Incorporation of nucleosides and amino-acids in human erythrocyte suspensions: possible relation with a diffuse infection of mycoplasms or bacteria in the L form. Nature.1969; 222 (5200): 1285-6.

6. Grasset E, Pue A, Charpentier J, Collet X, Christensen JE, Terce F, Burcelin R. A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces glp-1 resistance through an enteric no-dependent and gut-brain axis mechanism. Cell Metabolism. 2017; 25: 1075-1090.

7. Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M, Sivakumar R, Gunasekaran P, Rajendhran J. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. PLoS One. 2014; 9 (8): e105221.

8. Damgaard C, Magnussen K, Enevold C, Nilsson M, Tolker-Nielsen T, Holmstrup P, et al. Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations. PLoS One. 2015; 10 (3): e0120826.

9. Païssé S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. Transfusion. 2016; 56 (5): 1138-47.

10. Gosiewski T, Ludwig-Galezowska A, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method-the observation of DNAemia. European journal of clinical microbiology and infectious diseases. 2017; 36 (2): 329-36.

11. Traykova D, Schneider B, Chojkier M, Buck M. Blood microbiome quantity and the hyperdynamic circulation in decompensated cirrhotic patients. PloS one. 2017; 12 (2): e0169310.

12. Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. FEMS Microbiology Reviews. 2015; 39 (4): 567-91.

13. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. Cell. 2014; 157 (27); 121-141.

14. Raeisi J, Oloomi M, Zolfaghari MR, Siadat SD, Zargar M, Pourramezan Z. Bacterial DNA Detection in the Blood of Healthy Subjects. The Iranian Biomedical Journal. 2022; 26 (3): 230-239.

15. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology Journal. 2008; 74 (8): 2461-70.

16. Whittle E, Leonard MO, Harrison R, Gant TW, Tonge DP. Multi-method characterization of the human circulating microbiome. Frontiers in Microbiology. 2019; 9: 3266.

17. Gunvanti R, Lakshmi JT, Ariyanachi K, Saranya M, Kamlakar S, Sakthivadivel V, et al. Blood culture contamination rate as a quality indicator - a prospective observational study. Maedica (Bucur). 2022; 17 (2): 311-6.

18. Xu X, Wang Z & Zhang X. The human microbiota associated with overall health. Critical Reviews in Biotechnology. 2015; 35(1): 129-140.

19. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, et al. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. The FASEB Journal. 2013; 27 (3): 1012-22.

20. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. Genome Biology. 2015; 16 (1): 191.

21. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. Genome Medicine. 2016; 8 (1): 51.

22. Loohuis LMO, Mangu S, Ori1 APS, Jospin G, Koslicki D, Taegyun Yang H, et al. Transcriptome

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

analysis in whole blood reveals increased microbial diversity in schizophrenia. Translational Psychiatry. 2018; 8 (1): 96.

23. Panaiotov S, Filevski G, Equestre M, Nikolova E, Kalfin R. Cultural isolation and characteristics of the blood microbiome of healthy individuals. Advances in Microbiology. 2018; 8: 406-21.

24. Moriyama K, Ando C, Tashiro K, Kuhara S, Okamura S, Nakano S, et al. Polymerase chain reaction detection of bacterial 16S rRNA gene in human blood. Microbiology and Immunology. 2008; 52 (7): 375-82.

25. McLaughlin RW, Vali H, Lau PC, Palfree RG, De Ciccio A, Sirois M, et al. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40 (12): 4771-5.

26. Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard M, Leuillet S, Winkler A, Xiao Y, et al. The Use of next generation sequencing for improving food safety: translation into practice. Food Microbiology. 2019; 79: 96-1.

27. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. Science. 2009; 324 (5931): 1190-2.

28. Prideaux L, Kang S, Wagner J, Buckley M, Mahar JE, De Cruz P, et al. Impact of ethnicity, geography, and disease on the microbiota in health and inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases. 2013; 19 (13): 2906-18.

29. Ghaemi F, Fateh A, Sepahy AA, Zangeneh M, Ghanei M, Siadat SD. Blood microbiota composition in Iranian pre-diabetic and type 2 diabetic patients. Human Antibodies. 2020; 19: 163-177.

30. Tarashi S, Siadat SD, Ahmadi Bad Si, Zali M, Biassoni R, Ponzoni M, Moshiri A. Gut bacteria and their metabolites: which one is the defendant for colorectal cancer? Microorganisms. 2019: 7(561); 1-34.

31. Havaei SA, Sinisa V, Narimani T, Kazemi M, Karbalaei M, Stefania S, Dillon JR. Epidemic methicillin-susceptible Staphylococcus aureus lineages are the main cause of infections at an iranian university hospital. Journal of Clinical Microbiology. 2011; 49(11): 3990-3993.

32. Pourakbari B, Sadr A, Haghi Ashtiani MT, Mamishi S, Dehghani M, Mahmoudi S, et al. Five-year evaluation of the antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing bloodstream infections in Iran. The Journal of Infection in Developing Countries. 2012; 6(2):120-125.

33. Cheng HS, Tan SP, Wong DMK, Koo WLY, Wong SH, Tan NS. The blood microbiome and health: current evidence, controversies, and challenges. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24 (6): 5633.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]