مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۵)

بررسی حضور گونه کلستریدیوم پرفریجنز در کبد اجساد بانوان و آقایان به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری زمان سپری شده از مرگ

محمدکیانی، نیما بهادر*

گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی‌شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۱۰/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: بیشترین پژوهش‌های پزشکی قانونی برای برآورد فاصله زمانی پس از مرگ به ویژگی‌های فیزیکی ـ شیمیایی تجزیه و اثراتی که عوامل محیطی بر روی فرآیند تجزیه دارند، بستگی دارد، اما میکروارگانیسم‌ها در میزبان‌های بزرگتر استقرار می‌یابند و زمانی که میزبان می‌میرد به سرعت تغییر یافته و به عنوان جمعیت‌های میکروبیوم اجساد انسانی در حال فساد شناخته می‌شوند. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی حضور گونه کلستریدیوم پرفریجنز در کبد اجساد بانوان و آقایان به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری زمان سپری شده از مرگ بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۳۴ جسد انسانی که به روش‌های مختلفی نظیر؛ قتل، خودکشی و فوت مشکوک ازبین رفته بودند نمونه تهیه گردید و پس از همگن‌سازی، نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت بلاد آگار و SPS در شرایط بی هوازی با استفاده از گاز پک در کندل جار کشت داده شد. پس از آن تست‌های اولیه جهت شناسایی جدایه ها شامل؛ رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز و اکسیداز سایر تست‌های تشخیصی مانند؛ همولیز، تخمیر طوفانی وآزمون نگلر انجام گردید. سپس جهت اطمینان خاطر از وجود سویه کلستریدیوم، با استفاده از سویه استاندارد انستیتوی رازی ATCC 13124 در مراحل بعد آزمون PCR انجام گردید، در آخر ارتباط بین مرگ و باکتری جداسازی شده مورد مطالعه قرار گرفت

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از آزمون‌ها بیانگر جداسازی ۸ سویه باکتریایی بوده که از بین جدایه‌ها ۲ جدایه باکتری‌های گرم منفی، ۲ جدایه باکتری گرم مثبت، ولی متفاوت با خصوصیات کلستریدیوم و ٤ سویه بر اساس تکثیر PCR ژن 16S rRNA با سایز محصول برابر با ۷۲۲ جفت باز متعلق به جنس کلستریدیوم شناسایی گردید. در نمونه‌های اخذ شده، زمان پس از مرگ با توجه به اطلاعات درج شده در پرونده‌های متوفیان از سوی پزشکی قانونی بین ۱۹ تا ۱۹۲ ساعت گزارش شده بود که در هر چهار نمونه جدا شده زمان پس از مرگ بیش از ۵۰ ساعت تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: گرچه در حالت عادی و شرایط یکسان از طریق معاینه ظاهری بدن جسد، بررسی جمود نعشی، کبودی نعشی و میزان سردی بدن می‌توان مدت زمان گذشته شده از مرگ را محاسبه نمود، اما از نتایج به دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً بین زمان حضور سویه کلستریدیوم در کبد و مدت زمان سپری شده از مرگ ارتباطی وجوددارد.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنز، فاصله زمانی پس از مرگ، واکنش زنجیره ایی پلی مراز

* **نویسنده مسئول: نیما بهادر،** شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، گروه میکروبیولوژی

Email: bahador@iaushiraz.ac.ir

مقدمه

بیشترین پژوهش‌های پزشکی که برای درک بهتر چگونگی برآورد فاصله زمانی بعد از مرگ مورد استفاده قرار می‌گیرد، مستلزم بررسی ویژگی‌های فیزیکی ـ شیمیایی تجزیه و اثراتی که عوامل محیطی بر روی فرآیند تجزیه دارند، می‌باشد. در علوم حشره‌شناسی از چرخه زندگی بندپایانی مانند دیپترا[1] و کلئوپاترا[2] که در لاشه در حال فساد تجمع یافته‌اند برای تعیین زمان سپری شده از مرگ[3] استفاده می‌کنند. علم تافونومی[4] که از کلمه یونانی تافو به معنای دفن گرفته شده است، به مطالعه فسیل‌های مرده تجزیه شده می‌پردازد تا از اطلاعاتی مانند ماهیت و زمان مرگ اطمینان یابد، اما در مقایسه با سایر حوضه‌های تافونومی، پژوهش‌های پزشکی نسبتاً کمی وجود دارند که به تجزیه انسان براثر تغییرات میکروبی پرداخته است، بنابراین چنین پژوهش‌هایی ممکن است تشخیص حیاتی PMI را تسهیل نمایند(۱). مطالعه میکروبیوم‌ها، پتانسیل‌های بی‌شماری برای علوم پزشکی قانونی دارد، زیرا میکروبیوم‌ها منحصر به فرد بوده و جمعیت‌های خاصی از میکروب‌ها معمولاً با فرآیندها و محیط‌های خاصی در ارتباط هستند. در حقیقت، میکروب‌ها به عنوان مدارک فیزیکی از ابتدای قرن بیستم شناخته شده‌اند، ولی کاربرد آنها در علوم پزشکی قانونی محدود شده بود، چرا که تکنولوژی توالی یابی درآن زمان بسیار گران و کندتر از آن بود که اجازه جمع شدن مقدار کافی توالی‌های DNA را برای شناسایی جمعیت‌های مختلف میکروبی بدهد. اما امروزه پیشرفت در سیستم‌های توالی و خطوط محاسباتی باعث شده که جوامع بسیار متمایز میکروبی مورد شناسایی قرار گیرد و زمینه‌های پزشکی قانونی میکروبیوم را راه‌اندازی نمایند. پزشکی قانونی بر شناسایی سویه‌های خاص میکروب‌های مرتبط با تروریسم، بیماری و آلودگی با استفاده از تفاوت‌های کامل در ژنوم فردی تمرکز می‌کند که بسیاری از آنها برای دهه ها شناسایی و مطالعه شده‌اند(۲). تخمین زمان پس از مرگ مسلماً یکی از سخت‌ترین وظایف در پژوهش‌های جنایی است. پاتولوژیست‌ها در حال حاضر می‌توانند به اظهارات شاهد، سوابق ارتباطی، تغییرات پس از مرگ و یا انتومولوژی(حشره شناسی) تکیه کنند که این روش‌ها محدودیت‌هایی دارند. میکروبیوم‌ها به دلایل مختلفی به عنوان یک ابزار برای ارزیابی تخمین زمان پس از مرگ دارای پتانسیل عالی هستند.

این گروه از ارگانیسم‌ها بدون توجه به فصل، همواره مشاهده می‌شوند، بنابراین میکروب‌ها شکلی از شواهد فیزیکی فراگیر هستند. سئوالی که مطرح می‌گردد این است که چگونه می‌توان کورنومتر میکروبی پس از مرگ را کالیبره نمود تا زمان دقیق مرگ یک بدن در یک صحنه جرم مشخص شود؟(۵ـ۳). در واقع متابولومیکس، برای ارزیابی تخمین زمان پس از مرگ با توجه به نشانگرهای جدید

1-Diptera
2-Coleoptera
3-Postmortem Interval (PMI)
4-Forensic taphonomy

زیستی مرتبط با تغییرات زمانی پس از مرگ؛ پتانسیل بالقوه‌ای در پژوهش‌های جنایی دارد(۸-٦)، هم‌چنان که یک فرد در طول روز حرکت می‌کند، دنباله‌ای از میکروب‌ها و مولکول‌ها پشت سرش باقی می‌مانند. در این میان میکروبیوم پوست بسیار فردی است، به طوری که دست دو نفر می‌تواند بیش از ۸۰ درصد از نظر نوع میکروب موجود در آن متفاوت باشد. البته پتانسیل میکروارگانیسم‌ها برای نشان دادن این که آیا یک فرد خاص یک جسم را لمس کرده یا این که اخیراً در آن محیط بوده است یا خیر، قابل توجه است. با توجه به توانایی ادغام تکنیک‌های میکروبیوم و متابولومیسم، ترکیب تکنیک‌های اسپکترومتری جرمی[1] و توالی‌های میکروبی قادر به شناسایی ترکیبات شیمیایی تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. به طوری که تجزیه و تحلیل بیوشیمایی قادر به شناسایی بیش از ۳۰۰ اسید چرب متیل استری(FAMEs)[2] و اسید های چرب فسفولیپید(PLFAs)[3] برای شناسایی جمعیت‌های میکروبی روی انگشتان و شی خاصی که در صحنه جرم لمس شده است می‌باشد(۱۰ و ۹). یکی از باکتری‌های شایع در ایجاد فساد نعشی در اندام‌های داخلی نظیر کبد؛ گونه *Clostridium perfrigenes* است. این باکتری دارای کلاژنازهایی است که پس از مرگ دیواره روده را سوراخ نموده و از طریق شبکه مویرگی بدن خود را به اندام‌های داخلی نظر کبد رسانده و باعث عفونت و فساد نعشی می‌گردد و حضور آلفا توکسین که می‌تواند لسیتین را تجزیه نموده و فسفوریل کولین ایجاد نماید یکی دیگر از شاخص‌های مهم به شمار می‌آید(۱۱). بنابراین با توجه به این که دنیای بزرگ و پهناور میکروارگانیسم‌ها در حوزه میکروبیولوژی جنایی می‌تواند به عنوان یک ابزار مهم برای کشف علمی جرایم محسوب گردد. علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه کشورهای توسعه یافته در این خصوص، متأسفانه در کشور ما حتی یک آزمایشگاه میکروب‌شناسی جنایی وجود ندارد. بر همین اساس در حقیقت هدف اصلی و ضرورت اجرای این تحقیق، توجه اذهان اساتید و دانشجویان این حرفه به سمت پیشرفت هرچه بیشتر در حوزه میکروب‌شناسی جنایی می‌باشد و در تحقیق حاضر سعی شده است فاصله زمانی حرکت باکتری پس از مرگ از روده به کبد به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری زمان پس از مرگ در نظر گرفته شود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۳٤ نمونه از کبد اجساد انسانی که به طرق مختلف نظیر؛ قتل با سلاح گرم، قتل با سلاح سرد، فوت مشکوک، خودکشی با دارو، خودکشی به وسیله حلق‌آویزی یا اعتیاد و سنکوب در نتیجه استفاده از مشروبات الکلی فوت نموده‌اند، مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. زمان اخذ نمونه‌ها در هفته آخر فروردین و هفته اول اردیبهشت ماه ۹۸ با توجه به محدوده

1-Mass Espetrometry(MS)
2-Fatty Acid Methyl Esters(FAMEs)
3-Phospholipid Fatty Acids(PLFAs)

زمانی و حضور اجساد در مرکز پزشکی قانونی تهیه گردید. کمینه دما هنگام نمونه‌گیری ۲۳/۲ درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما در زمان اخذ آخرین نمونه ۲۳/۷ درجه سانتی‌گراد بوده و روند افزایش دما از نمونه اول تا نمونه ۳٤ در حدود ۰/۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. در ابتدای کار برش عمقی در بافت کبد ایجاد نموده(شکل ۱) و به مقدار ۵۰ گرم از بافت عمقی کبد اقدام به داخل ظروف استریل یک بار مصرف، به وسیله کلد باکس به آزمایشگاه مرکز پزشکی قانونی شیراز منتقل گردید.

نمونه‌های اخذ شده از گروه‌های سنی مختلف شامل؛ جنین داخل رحم مادر، جسد مرد، زن، پیرمرد که به روش‌های متفاوتی(قتل، خودکشی، فوت مشکوک) فوت نموده بودند اخذ گردیده و مورد بررسی قرار گرفت که به لحاظ رعایت شئونات اخلاقی از ذکر نام کامل اجساد خودداری شده است(جدول۱) . نمونه‌ها در سالن تشریح پزشکی قانونی شیراز تهیه و آزمایش‌ها در آزمایشگاه جنایی تشخیص هویت مورد آنالیز قرار گرفت. برای این منظور از نمونه‌های کبد اخذ شده مقدار ۰/۲ گرم جدا کرده و به یک عدد هاون چینی استریل شده انتقال داده سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به داخل هاون ریخته و آن را کوبیده تا فرآیند همگن سازی یا هموژنایز[1] حاصل شود. در مرحله بعد از محلول به دست آمده به وسیله لوپ بر روی محیطهای کشت سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین[2] و بلاد آگار استفاده گردید و به روش سه خطی کشت داده شد. سپس کلنی‌های خالص سازی شده به کمک آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، همولیز، آزمون نگلر و تخمیر طوفانی شناسایی شدند(۱۲).

فرآیند استخراج DNA بر روی نمونه‌های تأیید شده با آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گردید. با توجه به این که در این پروژه پژوهش‌های کلنی‌های میکروبی بر روی دو نوع محیط کشت جامد و مایع رشد یافته بودند، برای این منظور از هر دو محیط کشت کلنی میکروبی را برداشته و طی فرآیند چند مرحله‌ای شامل استفاده از بافر لیز کننده، لیزوزیم، RNase و سایر مراحل خالص‌سازی DNA انجام شد. سپس تشخیص اختصاصی گونه کلستریدیوم پرفریجنز بر اساس تکثیر PCR ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتید:Clos58-fAAAGGAAGATTAATACCGCATAA و Clos780-r ATCTTGCGACCGTACTCCCC با سایز محصول PCR برابر با ۷۲۲ جفت باز انجام گردید. پرایمر ها با توالی های موجود در بانک ژن[3] مقایسه شدند و هیچ کدام از آن‌ها توالی‌های کاملاً مشابه با گونه‌های غیر هدف نداشتند(۱۳). در این روش، کنترل منفی و مثبت برای گونه کلستریدیوم استفاده شد. ddH2O به عنوان کنترل منفی برای تأیید عدم وجود آلودگی و تسهیل رفع خطاهای تجربی و اثبات حذف محتوی DNA غیر هدف مورد استفاده قرار گرفت و سویه کلستریدیوم به عنوان کنترل مثبت ATCC13124

1-Homogenization
2-Sulfite Pollymyxin Sulfadiazine(SPS)
3-Gene Bank

Closteridium perfringens از آرشیو جدایه‌های باکتریایی موسسه رازی تهیه شد. برای انجام PCR از ترکیبات مستر میکس، پرایمرهای اختصاصی، DNA نمونه و آب دیونیزه بدون نوکلئاز استفاده گردید. مسترمیکس شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA پلی‌مراز ۰/۲ میکرولاندا، ۰/۲ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر و ۰/۵ میکرولیتر dNTP می‌باشد. چرخه دمایی مورد استفاده در آزمون PCR شامل ۳۷ چرخه دمایی می‌باشد. چرخه اول در دمای ۹٤ درجه به مدت ۳ دقیقه انجام شده و سپس ۳۵ چرخه در دماهای ۹٤، ۵۰ ، ۵۲ ، ۵٦ ، ۵۸ و ۷۰ درجه صورت گرفته و در نهایت یک چرخه در دمای ۷۲ درجه و در دماهای تعیین شده انجام شد. سپس محلول DNA تکثیر یافته را داخل چاهک‌های ژل الکتروفورز به کمک رنگ لودینگ رنگ نموده و به میزان ۷ لاندا از DNA را درون چاهک ها ریخته و جریان الکتریکی را برقرار نموده تا DNA حرکت نماید. چاهک‌ها را در کنار قطب منفی قرار داده و زمانی که DNA ۳/٤ مسیر را طی نمود به وسیله دستگاه خوانش ژل نتیجه خوانش گردید، در این تحقیق از مارکر متعلق به شرکت پارس توس به مقدار ۵۰ میکروگرم و با میزان ۱۰۰ bp استفاده شد.

شکل ۱: نمونه‌گیری از کبد جسد انسان ـ جنسیت: مرد ۳۰ ساله در حالت کلوزآپ بر روی قفسه سینه

جدول شماره (۱).فهرست نمونه های اخذ شده از کبد اجساد مختلف به انضمام نوع جنسیت، علت مرگ، زمان تقریبی مرگ،تاریخ تشریح جسد، نوع واکنش همولیز و تخمین زمان پس از مرگ(PMI).

ردیف	جنسیت	علت مرگ	سن	تاریخ تقریبی فوت	تاریخ تشریح جسد	نوع همولیز	تخمین زمان مرگ
۱	زن	نامشخص	٤٨	۹۸/۲/۲	۹۸/۲/۰۳	BETA	٢٦ ساعت
۲	مرد	اعتیاد	٤٢	۹۸/۱/۲٦	۹۸/۱/۲۸	GAMA	**٥٨ ساعت**
۳	مرد	اعتیاد	۳۰	۹۸/۱/۳۰	۹۸/۱/۳۱	BETA	**٤٨ ساعت**
٤	زن	تصادف	٥۰	۹۸/۱/۲۹	۹۸/۱/۳۱	GAMA	**٤٨ ساعت**
٥	مرد	عفونت ریوی	۷۰	۹۸/۱/۳۰	۹۸/۱/۳۱	BETA	**٤٨ ساعت**
٦	مرد	اعتیاد	۳٥	۹۸/۱/۲۲	۹۸/۱/۳۱	BETA	**٢٤٠ ساعت**
۷	زن	اعتیاد	۳۲	۹۸/۱/۳۱	۹۸/۰۲/۰۲	BETA	**٤٨ ساعت**
۸	مرد	قتل	۲٥	۹۸/۱/۳۰	۹۸/۰۲/۰۲	BETA	**١٩ ساعت**
۹	مرد	خودکشی(حلق آویزی)	٤٨	۹۸/۱/۳۰	۹۸/۱/۳۱	BETA	٢٦ ساعت
۱۰	مرد	نامشخص	۲٥	۹۸/۱/۲۹	۹۸/۰۲/۰۲	BETA	٤٨ ساعت
۱۱	زن	تحت بررسی	۲٥ هفته	۹۸/۱/۲٥	۹۸/۲/۰۳	BETA	١٩٢ ساعت
۱۲	مرد	(حلق آویزی)	٤٥	۹۸/۰۲/۰۳	۹۸/۰۲/۰۳	BETA	٢١ ساعت
۱۳	مرد	تحت بررسی	٨٦	۹۸/۰۲/۰۱	۹۸/۰۲/۰۳	ALFA	٤٨ ساعت
١٤	زن	تحت بررسی	۲۳	۹۸/۰۱/۰۳	۹۸/۰۲/۰۳	BETA	٢١ ساعت
۱٥	زن	سوختگی	۲٥	۹۸/۰۲/۰۲	۹۸/۰۲/۰۳	BETA	٤٨ ساعت
١٦	مرد	اعتیاد	٤٢	۹۸/۰۲/۰٤	۹۸/۰۲/۰٥	BETA	٢٤ ساعت
۱۷	مرد	تحت بررسی	٤٩	۹۸/۰۲/۰٤	۹۸/۰۲/۰٥	GAMA	٢٤ ساعت
۱۸	مرد	قتل	٥۰	۹۸/۰۲/۰۳	۹۸/۰۲/۰٥	BETA	٥٨ ساعت
۱۹	مرد	سوختگی	٥۲	۹۸/۲/٦	۹۸/۲/۷	GAMA	٢٤ ساعت
۲۰	زن	تحت بررسی	۲۸	۹۸/۰۲/۰٦	۹۸/۲/۷	BETA	٢٤ ساعت
۲۱	زن	تحت بررسی	۲٥	۹۸/۲/٦	۹۸/۲/۷	BETA	٢٤ ساعت
۲۲	مرد	اعتیاد	۳٤	۹۸/۲/٦	۹۸/۲/۷	BETA	٢٤ ساعت
۲۳	مرد	ایست قلبی	٦٤	۹۸/۲/۷	۹۸/۲/۷	ALFA	١٩ ساعت
۲٤	مرد	خفگی	٦٥	۹۸/۱/۰۷	۹۸/۰۲/۰۹	ALFA	٦٨ ساعت
۲٥	مرد	تحت بررسی	۳٥	۹۸/۰۲/۰٦	۹۸/۰۲/۰۸	ALFA	٤٨ ساعت
۲٦	مرد	تحت بررسی	۲۹	۹۸/۰۲/۰٦	۹۸/۰۲/۸	ALFA	٤٨ ساعت
۲۷	مرد	خودکشی(حلق آویزی)	۱۸	۹۸/۰۲/۰۸	۹۸/۰۲/۸	ALFA	٢١ ساعت
۲۸	زن	تحت بررسی	۳۱	۹۸/۰۲/۰۷	۹۸/۰۲/۸	ALFA	٢٤ ساعت
۲۹	مرد	ایست قلبی	۳٤	۹۸/۰۲/۰۸	۹۸/۰۲/۸	GAMA	٢١ ساعت
۳۰	مرد	اعتیاد	٤٩	۹۸/۰۲/۰۷	۹۸/۰۲/۸	GAMA	**٢٤ ساعت**
۳۱	زن	نامشخص	۲٥	۹۸/۰۲/۰٥	۹۸/۰۲/۰۸	BETA	**٧٢ ساعت**
۳۲	مرد	قتل	۲۸	۹۸/۰۲/۰٥	۹۸/۰۲/۰۸	BETA	**٩٦ ساعت**
۳۳	مرد	اعتیاد	٤٦	۹۸/۰۲/۰۷	۹۸/۰۲/۰۸	ALFA	**٤٨ ساعت**
۳٤	مرد	خفگی	٤١	۹۸/۰۲/۰٦	۹۸/۲/۰۹	BETA	**١١٦ ساعت**

یافته‌ها

در بررسی محیط‌های کشت موجود، از ۳٤ نمونه تهیه شده تحت شرایط بی‌هوازی از ٢٦ نمونه اخذ شده از بافت کبدی اجساد انسانی رشدی مشاهده نگردید که در تمامی‌موارد مذکور زمان تقریبی مرگ کمتر از ٤٨ ساعت گزارش شده بود. نمونه‌های اخذ شده از اجساد با شماره ۲ ،٦ ، ۱۸ ، ۲٤ ، ۲٥ ، ۳۱ ، ۳۲ و ۳٤ بر روی هردو محیط کشت بلاد و SPS رشد یافته و تولید کلنی نموده‌اند(شکل ۲). در هشت مورد از نمونه‌های رشد یافته، تنوع میکروبی بر اساس

مورفولوژی کلنی‌های موجود بر سطح محیط کشت تأیید شده است.

از آنجایی که در تحقیق حاضر کلستریدیوم پرفرینجنز به عنوان شاخص تعیین زمان مرگ در نظر گرفته شده بود با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی اولیه جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و از بین 8 نمونه کشت یافته(۲ ،٦ ، ۱۸ ، ٢٤ ، ۲۵ ، ۳۱ ، ۳۲ و ۳٤)، باکتری‌های گرم منفی(جدایه‌های ۲ و ٦) حذف شده و ٦ جدایه گرم مثبت(۱۸، ٢٤، ۲۵، ۳۱، ۳۲ و ۳٤) مورد ارزیابی به وسیله سایر آزمون‌ها قرار گرفت. بر همین اساس تست کاتالاز بر روی شش نمونه میکروبی باقیمانده انجام شد که نمونه‌های ٢٤ و ۲۵ آزمایش کاتالاز مثبت ثبت گردید. بنابراین با توجه به این که باکتری کلستریدیوم پرفریجنز یک گرم مثبت بی‌هوازی با تست کاتالاز منفی می‌باشد دو نمونه ٢٤ و ۲۵ نیز از روند آزمایش خارج گردید و انجام آزمایش با نمونه‌های ۱۸ ، ۳۱ ، ۳۲ و ۳٤ ادامه یافت که تست اکسیداز آن‌ها منفی مشاهده گردید. هم‌چنین تمامی چهار جدایه(۱۸ ، ۳۱ ، ۳۲ و ۳٤) همولیز از نوع بتا را و نیز تخمیر طوفانی در محیط کشت لیتموس همراه با گاز را نشان دادند. در واقع یکی از خواص مهم کلستریدیوم‌ها وجود آلفا توکسین است که می‌تواند لسیتین را تجزیه نموده و فسفوریل کولین ایجاد نماید. آزمایش مربوطه بر روی نمونه‌های باقیمانده به شرح(۱۸، ۳۱، ۳۲ و ۳٤) انجام و نتیجه مثبت حاصل از آزمایش به وضوح در نمونه‌های ماخوذه قابل مشاهده بود(شکل ۳).

نتایج حاصل از آزمون مولکولی بیانگر آن است که هر چهار سویه جدا شده متعلق به جنس کلستریدیوم پرفرینجنس می‌باشند(شکل٤).

با توجه به جدول ۲ و با بررسی سن در چهار جسد مذکور مشاهده گردید که نمونه‌ها در فاصله سنی ۲۵ تا ۵۰ سال قرارداشته‌اند و این می‌تواند نشان دهد که این سویه باکتریایی در اجساد با عمر متفاوت قادر به رشد و ایجاد فساد نعشی در اندام‌های مختلف بدن خصوصاً کبد می‌باشد. هم‌چنین در بررسی علت مرگ چهار جسد مذکور تعداد دو نفر از اجساد به شیوه قتل با سلاح گرم(کلاشینکف) و با سلاح سرد(قمه) کشته شده‌اند. یکی از اجساد اقدام به حلق‌آویزی و خودکشی نموده و جسد دیگر متعلق به یک زن با علت مرگ نامشخص می‌باشد. با بررسی علت تامه مرگ در هر ٤ جسد مذکور این گونه استنباط می‌گردد که نوع مرگ تأثیری در روند رشد باکتری پس از مرگ و فساد نعشی ندارد. علاوه بر این با مطالعه در خصوص تخمین زمان مرگ ٤ جسد مذکور که از طریق علوم جنایی و بررسی پزشکی قانونی زمان مرگ در اجساد مذکور به ترتیب ۵۸، ۹٦، ۷۲ و ۱۱٦ ساعت تخمین زده شده بود. با توجه به این که سویه کلستریدیوم پس از مرگ از فضای معده‌ای روده‌ای به سمت اندام‌های داخلی بدن خصوصاً کبد حرکت نموده و علت اصلی فساد نعشی در این اندام‌ها می‌باشد، بدیهی است نتایج حاصل شده در نمونه شماره ۱۸ کمترین زمان تقریبی پس از مرگ ۵۸ ساعت بوده که این گونه استنباط می‌گردد، سویه

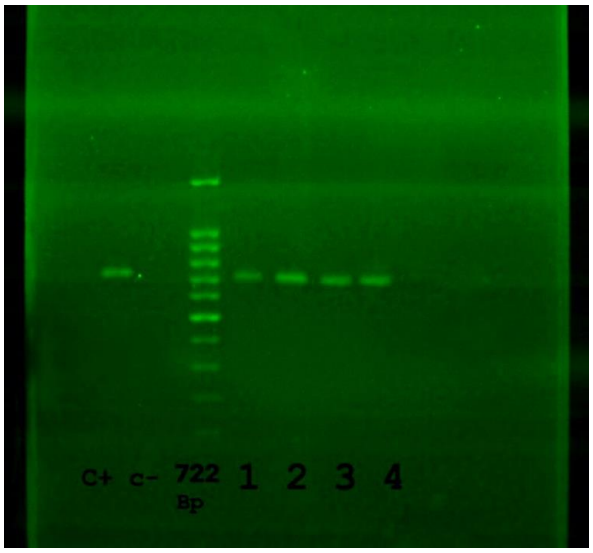
باکتریایی در فاصله زمانی ۵۲ تا ۵۸ ساعت پس از مرگ در کبد مشاهده گردیده است و قبل از این بازده زمانی در سایر اجسادی که زمان پس از مرگ آنها زیر ۵۸ ساعت بوده است هیچگونه رشدی بر روی محیط کشت مشاهده نگردیده است.

شکل ۲: تنوع میکروبی جدا شده از کبد اجساد انسان با جنسیت مختلف و بزرگنمایی در حالت کلوزآپ ـ نمای بسته

الف) ب)

ج)

شکل ۳. الف) همولیز جدایه کلستریدیومی‌بر روی محیط بلاد آگار، ب) تخمیر طوفانی جدایه کلستریدیومی و ج) آزمون نگلر از کبد اجساد انسان با جنسیت مختلف و بزرگنمایی در حالت کلوزآپ ـ نمای بسته



شکل٤: الکتروفورز ژل محصول PCR. چاهک اول: سویه استاندارد کنترل مثبت، چاهک دوم: کنترل منفی، چاهک سوم: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های چهارم، پنجم، ششم و هفتم: سویه‌های جدا شده کلستریدیوم پرفریجنز

جدول۲ : ارتباط بین زمان مرگ و حضور کلستریدیوم درنمونه های کبدی

ایزوله ها شماره	جنسیت	علت فوت	سن	تاریخ تقریبی فوت	تاریخ تشریح جسد	نوع همولیز	زمان پس از مرگ
۱۸	مرد	قتل	۵۰	۹۸/۰۲/۰۳	۹۸/۰۲/۰۵	ß	۵۸ ساعت
۳۱	زن	نامشخص	۲۵	۹۸/۰۲/۰۵	۹۸/۰۲/۰۸	ß	۹٦ ساعت
۳۲	مرد	قتل	۲۸	۹۸/۰۲/۰۵	۹۸/۰۲/۰۸	ß	۷۲ ساعت
۳٤	مرد	خفگی	٤۱	۹۸/۰۲/۰٦	۹۸/۲/۰۹	ß	۱۱٦ ساعت

بحث

مطالعه میکروبیوم‌ها پتانسیل بی‌نظیری برای علوم پزشکی قانونی است، زیرا میکروبیوم‌ها منحصر به فرد هستند و جمعیت‌های خاصی از میکروب‌ها معمولاً با فرآیندها یا محیط‌های خاصی در ارتباط هستند. در حقیقت، میکروب‌ها به عنوان مدارک فیزیکی از ابتدای قرن بیستم شناخته شده‌اند، ولی کاربرد آنها در علوم پزشکی قانونی محدود شده بود، چرا که تکنولوژی توالی‌یابی در آن زمان عموماً بسیار گران‌تر و کندتر از آن بود که اجازه جمع شدن مقدار کافی توالی‌های DNA را برای شناسایی جمعیت‌های مختلف میکروبی بدهد. پیشرفت در سیستم‌های توالی و خطوط محاسباتی باعث شده است که جوامع بسیار متمایز میکروبی را در عمق بی سابقه مطالعه کنند و زمینه‌های پزشکی قانونی میکروبیوم را راه‌اندازی نمایند. چنان که چندین گروه تحقیقاتی، توان بالقوه‌ای را برای استفاده از داده‌های میکروبیوم برای ارزیابی فاصله پس از مرگ نشان داده‌اند(٤ـ۲)، این پژوهشها الگوهای موجود در جوامع میکروبی را با استفاده از توالی نسل بعدی مارکرهای ژنی فیزیکی و

ژنتیکی و یا نشانگر ژن‌های اطلاعاتی(یعنی ITS,16S rRNA, 18S rRNA) و روش‌های محاسباتی و آماری مانند یادگیری ماشین مورد بررسی قرار دادند. بنابراین با توجه به میکروبیوم افراد مختلف در بخش‌های مختلف ارگان‌های بدن به ویژه در روده و پوست تحقیق حاضر در نظر دارد که با دسترسی به اجساد انسانی که مرگ به صور مختلف صورت گرفته است میکروبیوم پوست این افراد را از نظر تنوع مورد ارزیابی قرار دهد شاید بیانگر اطلاعاتی مهم در زمینه پزشکی قانونی و به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری زمان سپری شده از مرگ باشد.

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت علت یابی مرگ انسان به اواخر قرن نوزدهم بر می‌گردد. علاقه به میکروب‌شناسی پس از مرگ در اوایل قرن بیستم، عمدتاً در تلاش برای کسب دلایل قابل اعتماد مرگ، به وجود آمد. گرچه استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان مدارک ردیابی ایده‌ای بود که به وسیله دانشمند پیشگام پزشکی قانونی ادموند لوکارد، که با تأسیس اولین ازمایشگاه جرم مدرن در لیون فرانسه در سال ۱۹۱۰ شروع شد، وی هم‌چنین مفهوم بادل را بنیاد نهاد. ایده‌ای که تمام دانشجویان سال اول پزشکی قانونی به عنوان "هر تماسی اثری به جای می گذارد" می شناسند. بر همین اساس و الگو لوکارد از میکروارگانیسم‌ها به عنوان شواهد ردیابی در چژوهش‌های مختلف استفاده نمود.سپس در اوایل قرن بیست و یکم فاز صعود دیگری برای پیشرفت‌های عمده در پرونده پزشکی میکروبی به شمار آمد، چنان که توسعه بیوتکنولوژی برای توالی‌یابی DNA و شناسایی مولکول‌ها به صورت دقیق و ارزان با سرعت بی‌سابقه‌ای ادامه یافت(۱٤). بنابراین پیشرفت در اکولوژی میکروبی که به وسیله توالی یابی نسل بعد DNA، اسپکتروفتومتری جرمی(MS) و روش‌های محاسباتی انجام می‌شوند؛ توانایی محققین را در شناسایی تنوع میکروبی روی زمین متحول کرده‌اند(۱۵).

تجزیه بدن انسان تقریباً ٤ دقیقه بعد از مرگ آغاز می‌شود. در ابتدای تعفن و پوسیدگی، باکتری‌های هوازی تکثیر می‌شوند. باکتری‌های روده‌ای اندوژنوس در این بین تولید گازهایی می‌کند که جسد را باد کرده می‌کنند، در طول مرحله نفخ، باکتری‌های روده‌ای اندوژنوس، فیرمیکوتس‌ها در خانواده لاکتوباسیلاسه و باکتریوئیدها در خانواده باکتریوئیداسه در حفره شکمی جسد افزایش می‌یابند. معمولاً باسیل‌های گرم مثبت *کلستریدیوم پرفرنیجنس* در جمعیت میکروبی شروع به رشد می‌کنند و تحت شرایط و موقعیت ایده‌آل دو برابر می‌شوند. در طی یک تنفس هوازی و تخمیر، باکتری‌ها هیدروکربن‌ها را تولید نموده و ترکیبات آمونیوم و آمین‌های بیوژنیک باعث نفخ جسد فراتر از ظرفیت پوست جسد در حال تجزیه شده که منجر به از هم گسیختگی آن می‌شود. تعفن با باکتری‌های اندوژنوس در معده و روده و دیگر میکروارگانیسم‌هایی که از طریق خون و لنف به سایر نقاط بدن منتشر می‌شوند، افزایش می‌یابد. بعد از آن میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌های هوازی غالب

می‌شوند. در معرض اکسیژن قرار گرفتن حفره شکمی به چندین گونه باکتری‌های هوازی اجازه می‌دهد که میکروارگانیسم‌هایی متعلق به آلفاپروتئو باکترها، راسته ریزوبیالس از خانواده‌های فیلوباکتریاسه، هایفومیکروبیاسه و بروسلاسه و گاما پروتئو باکترهای بی‌هوازی اختیاری مخصوصاً از خانواده انتروباکتریاسه رشد کنند(۱۵). تاناتو میکروبیوم یک اصطلاح نسبتاً جدید است که به علم مطالعه میکروب‌های کلونیزه شونده در ارگان‌های داخلی بعد از مرگ می‌پردازد. موفقیت‌های اخیر علمی در یک مطالعه ابتدایی درباره تاناتومیکروبیوم آشکار ساخته است که بیشتر میکروب‌ها در بدن انسان در جمعیت‌های میکروبی پس از مرگ، بی هوازی‌های اجباری خصوصا گونه‌های کلستریدیدم می‌باشند. بنابراین این فرضیه مطرح گردید که با تغییرات وابسته به زمان در تاناتومیکروبیوم در ارگان‌های داخلی می‌توان زمان مرگ را همراه با فساد بدن انسان تخمین زد. در انسان‌های سالم بیشتر ارگان‌های داخلی به علت وجود دایمی سیستم ایمنی، استریل یا عمدتاً عاری از میکروب هستند، اما بعد از مرگ، سیستم ایمنی دیگر فعال نیست و تکثیر میکروبی تسهیل می‌گردد، تجزیه بدن انسان در وهله اول مربوط به باکتری‌ها است و جسد اطلاعات مربوط به هویت، محل و زمان‌بندی کلونیزاسیون میکروبی را فراهم می‌کند که در پژوهش‌های جنایی از اهمیت بالایی برخوردار است و بر اساس آن می‌توان تاحدود زیادی به زمان مرگ دسترسی یافت(۱٦). پژوهش‌های میکروبیوم اجساد مشخص کرده است که در نواحی داخلی بدن اجساد در حال پوسیدگی گونه‌های کلستریدیوم، با سرعت بیش از حدی رشد می‌کنند(خون، مغز استخوان، کبد، پروستات). تجزیه بدن انسان یک پروسه چند عاملی است که واسطه آن میکروب‌هایی هستند که در درون و یا در خارج از بیومس مرده زندگی می‌کنند، تکثیر می‌شوند و یا می‌میرند، گونه‌های کلستریدیوم بی‌هوازی اجباری هستند و باکتری‌های سیمبیوز متداول در روده سالم به شمار می‌آیند. طی پژوهش‌های گذشته، در نمونه‌های پس از مرگ انسان فراوانی بالایی از گونه‌های کلستریدیوم در توالی یابی نسل بعدی امپلیکون‌های ژن 16S rRNA، کشف شد. باکتری‌های روده‌ای از جمله گونه‌های کلستریدیوم، قادر به جابه جایی به بافت‌های اطراف، ٤٨ تا ٥٢ ساعت پس از مرگ در ۲۵ درجه سانتی‌گراد هستند. پس از مرگ گونه‌های بی‌هوازی کلستریدیوم در طول تجزیه انسان در همه جا حضور دارند. سه پویایی وجود دارد که به حضور همه جانبه کلستریدیوم‌ها در انسان‌های در حال تجزیه کمک می‌کند؛ ۱) زمان مضاعف شدن بسیار کوتاه آن، به طوری که گونه یافت شده در اجساد انسانی؛ *Clostridium perfrigens*، سریع ترین زمان تولید را برابر با ۷/٤ دقیقه در دمای بهینه(۳۷ تا ٤٥ درجه سانتی‌گراد) نشان داده است، ۲)توالی پروتئولیتیک باکتری، گونه‌های کلستریدیوم کلاژزنازهایی دارند که فیبرهای کلاژن مهره‌داران بومی را هضم می‌کند که توانایی نفوذ به سطوح

اپیتلیال کلون و لایه‌های موکوزی و مهاجرت به بافت‌های مجاور را به آن‌ها می‌دهد و۳) آخرین فاکتورفاسد کننده سودمند گونه‌های کلستریدیوم از طریق ایجاد ایست قلبی انسان است که منجر به هیپوکسی می‌شود. یک جسد که خون اکسیژنه ندارد می‌تواند ورود باکتری‌های بی‌هوازی روده‌ای را که به صورت طبیعی در کولون یافت می‌شوند، از جمله گونه‌های کلستریدیوم را تسهیل نماید تا به سرعت و به راحتی در میزبان غنی از مواد مغذی رشد نماید(۱۷).

از طرف دیگر کبد در ربع بالایی سمت راست حفره شکمی قرار گرفته است و سنگین‌ترین ارگان داخلی و بزرگترین غده در بدن انسان است، که حدود ۱/٤ تا ۱/۸ کیلوگرم وزن دارد. کبد بالاترین فراوانی تاکسونی میکروبی پس از مرگ را در بین تمام ارگان داخلی انسان دارد که به فاکتورهای متعددی وابسته است. برای مثال، کبد نقش اصلی را در تمام پروسه‌های متابولیک بازی می‌کند و در کنار دیگر ارگان‌های شکمی قرار گرفته است که تعداد بی‌شماری میکروب دارد. هم‌چنین، آنزیم‌های پانکراسی، اسیدهای معدی(مانند هیدروکلریک اسید) و مایعات کیسه صفرا، اتولیزهای بسیار سریعی ایجاد می‌کنند و فساد را تسریع می‌کنند که سریعاً به کبد و سایر ارگان‌های مجاور نیز کشیده می‌شود. بررسی‌ها نشان داد که ارگان‌هایی که اولین نشانه تجزیه جسد(ساعت تا روزها) را نشان دادند شامل؛ تراک حنجره، مجرای معده‌ای روده‌ای، پانکراس، طحال، کبد، مدول آدرنال و رحم بارور شده بودند و ارگان‌هایی که نیاز به زمان بیشتری برای تجزیه داشتند شامل؛ قلب، شش ها، کلیه‌ها، ازوفاگوس، دیافراگم، رگ‌های خونی، مثانه، پروستات، رحم بارور نشده، پوست، ساختارهای تاندون عضلانی و استخوان‌ها بودند و سلول‌های عضلات اسکلتی انسان‌ها می‌توانند به مدت ۱۷ روز بعد از مرگ زنده و فعال باقی بمانند(۱۸).

در تحقیق حاضر از تعداد ۳٤ نمونه اخذ شده پس از انجام همگن‌سازی نمونه‌ها بر روی محیط کشت داده شده فقط ۸ جدایه مشاهده گردید. در واقع پس از فوت یک انسان، در بدن باکتری‌های بی‌هوازی نظیر کلستریدیوم‌ها در داخل روده خود را به بافت مویرگی دیواره روده رسانده و از طریق مسیر مویرگی شروع به حرکت به سمت اندام‌های بدن خصوصاً کبد و طحال می‌نمایند. با در نظر گرفتن شرایط محیطی ثابت نظیر دما و رطوبت این مهاجرت میکروبی در یک بازه زمانی ٥۲ ساعت به بالا انجام می‌شود و میکروارگانیسم پس از این بازه زمانی در کبد حضور یافته و شروع به فساد میکروبی در بافت کبدی می‌کند که با نتایج به دست آمده هم‌خوانی دارد و این نکته در تعیین زمان مرگ بسیار حایز اهمیت است. البته تا زمانی که فساد نعشی در بدن شکل نگرفته است، تعیین زمان تقریبی مرگ از طریق معاینه ظاهری جسد نظیر جمود نعشی، کبودی نعشی، تشکیل لارو حشرات امکان‌پذیر است، اما در اجسادی که در اثر حوادث مرگبار مانند؛ تصادف، قتل با سلاح گرم و سرد و آتش‌سوزی فوت می‌نمایند عملاً تشخیص

زمان تقریبی مرگ از طریق معاینه ظاهری و بررسی جمود و کبودی‌های نعشی میسر نمی‌باشد، اما تحقیق حاضر با نتایج ه به دست آمده از نمونه‌های تهیه شده از کبد نشان داد که بین حضور سویه کلستریدیوم و زمان مرگ می‌توان ارتباطی برقرار نمود و از ان به عنوان شاخصی برای اندازه گیری زمان مرگ استفاده کرد.

درراستای تحقق حاضر سایر محققان بر این باور هستند که طی بازه‌های زمانی مختلف و محیط‌های متفاوت مرطوب و خشک این میکروارگانیسم‌ها هستند که می‌توانند به عنوان شاخصی برای زمان مرگ به عنوان یک ابزار استفاده شوند(۱۹و۲۰) و نقش میکروب‌ها به عنوان شاهدی در پزشکی قانونی در دهه‌های اخیر از اهمیت بالایی برخوردار است(۲۱). به طوری که بلک و همکاران نیز طی تحقیقی به شناسایی میکروارگانیسم‌ها از اجساد با استفاده از روش 16S rRNA و استفاده از نواحی ITS پرداخته است و عنوان نمود که این تکنیک‌ها می‌توانند به شناسایی میکروارگانیسم‌ها و ارتباط آنها با زمان مرگ کمک نماید. وی در تحقیق خود به جای استفاده از ارگانی مانند کبد به نمونه پوست و محیط اطراف آن پرداخته است، زیرا بر این باور است که این دو نوع نمونه نسبت به سایر نمونه‌ها به راحتی قابل دسترس است(۲۲). از طرف دیگر سایر پژوهشگران نیز نمونه پوست را به دلیل این که قادر به انتقال به محیط خاکی و نیز قادر به ماندن در میکروبیوم خاک است و جهت شناسایی می‌تواند مؤثر باشد معرفی نمودند(۲۳)، اما در تحقیقی که به وسیله جوان و همکاران انجام شد کبد به عنوان نمونه‌ای مناسب برای شناسایی زمان پس از مرگ معرفی گردید و طی مقاله خود به حضور ژن‌های آپوپتوتیک با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پرداخته است که راهی نوین در این زمینه می‌باشد(۲٤).

با توجه به این که فضای کار بر روی کالبدگشایی اجساد در سالن تشریح امری کاملاً محرمانه و متأثر از دستور مقام قضایی می‌باشد، برای انجام کار در آن فضا ضمن اخذ کد اخلاق از دانشگاه آزاد اسلامی، مراحل دیگری نظیر دستور و اجازه مقام قضایی و کسب مجوز از حفاظت اطلاعات پزشکی قانونی در دستور کار قرار گرفت و از محدودیت‌های طرح می باشد.

باید به این مسئله مهم اذعان و اعتراف نمود که دنیای متنوع، پیچیده و زیبای میکروب‌شناسی در پیکره اجساد دارای رازها و ایده‌های بکری برای رسیدن به دنیای ناشناخته پس از مرگ در کالبد اجساد می‌باشد که این تنوع میکروبی در اجساد می‌تواند ایده‌های زیادی را در جهت کشف جرم در ذهن متبلور سازد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده و پژوهش‌های انجام شده می‌توان چنین نتیجه گرفت و پیشنهاد نمود که استفاده از میکروبیوم پوست می‌تواند تا حدودی در تشخیص جنسیت فردی که به صحنه جرم وارد شده است پی برد و یا می‌توان با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به ارتباط بین میکروبیوم پوست مقتول و اشیا شخصی وی دست

یافت و یا با استفاده از میکروبیوم اجساد و استفاده از سایر بافت‌های مقتول در سیستم عدالت کیفری و تشخیص زمان مرگ جسد استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

میکروارگانیسم‌ها در طبیعت منحصر به فرد هستند و تقریباً هر زیستگاهی، حتی زیستگاه‌های حیوانی از جمله انسان را اشغال می نمایند. این ارگانیسم‌ها که در میزبان‌های بزرگتر استقرار می‌یابند، جمعیت‌های پیچیده مشتمل بر بسیاری گونه‌ها را می سازند که زمانی که میزبان می‌میرد به سرعت تغییر می‌یابند و به عنوان جمعیت‌های اپی‌نکروتیک لاشه‌های حیوانی در حال فساد شناخته می‌شوند. بنابراین این دنباله از جمعیت های میکروبی به سرعت در حال تغییر، به عنوان " ساعت‌های میکروبی" استفاده شده‌اند تا بنیان تحقیق برای استفاده احتمالی ازکمک آن ها دربرآورد زمان پس از مرگ فراهم شود(۳). باسیل‌های گرم مثبت کلستریدیوم پرفرینجنس از جمله؛ باکتری‌های بی‌هوازی اجباری هستند که به دلیل ویژگی‌های خاص ارگانیسم عموماً در روده مشاهده می‌گردند. این ارگانیسم‌ها قادر به جابه‌جایی به بافت‌های اطراف، ٤٨ تا ٥٢ ساعت پس از مرگ در ٢٥ درجه سانتی‌گراد هستند. به طوری که در لایه موکوسی و اپیتلیوم تک لایه روده‌ای سکونت داشته و هگزوزهای از پیش هضم شده را که از معده وارد می‌شوند به اسید استیک، استون، بوتانوئیک اسید و بوتانول و اتانول متابولایز می‌کنند و طی پروسه تخمیر آن را به پیروات تبدیل می‌کند. به علاوه کلستریدیوم، آمینواسیدترئونین اسید را با استفاده از α کتوبوتیرات سنتاز، ترئونین دهیدراتاز و پروپانول دهیدروژناز متصل به NAD به پروپانول تجزیه می‌کند(۲۵). بنابراین پس از مرگ، گونه‌های بی‌هوازی کلستریدیوم در طول تجزیه بدن انسان در همه جا حضور دارند که می‌تواند؛ ۱)زمان مضاعف شدن بسیار کوتاه آن، ۲) توالی پروتئولیتیک باکتری و ۳) هیپوکسی به دلیل ایست قلبی باشد. از آنجایی که کبد ارگانی مهم در بدن به شمار می‌آید و نقش اصلی را در تمام پروسه‌های متابولیک بازی می‌کند جایگاه مناسبی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. در تحقیق حاضر بررسی‌ها و آزمایش‌های انجام شده بر روی کبد اجسادی که در فواصل زمانی متفاوتی فوت نموده بودند سه نتیجه اساسی را در ذهن متبلور می‌سازد، بدین شرح که؛ با بررسی سن در اجساد مورد مطالعه مشخص گردید که ارگانیسم قادر است در اجساد با سنین عمر متفاوت رشد نموده و باعث ایجاد فساد نعشی در اندام‌های مختلف بدن خصوصاً کبد باشد، با بررسی علت تامه مرگ در هر جسد اینگونه استنباط می گردد که نوع مرگ تاثیری در روند رشد باکتری پس از مرگ و فساد نعشی ندارد و با مطالعه در خصوص تخمین زمان مرگ اجساد که از طریق علوم جنایی و بررسی‌های پزشکی قانونی انجام شد مشخص گردید که این سویه باکتریایی دقیقاً در فاصله زمانی ٥٢ تا ٥٨ ساعت پس از مرگ در کبد

مشاهده گردیده است و قبل از این بازه زمانی در سایر اجسادی که زمان پس از مرگ آنها زیر ۵۸ ساعت بوده است هیچگونه رشدی بر روی محیط کشت مشاهده نگردیده است.

بنابراین با توجه به شرح مطالب فوق‌الذکر و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی ومولکولی بر روی ۳٤ نمونه اخذ شده از کبد اجساد انسانی می توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که حضور سویه کلستریدیوم پس از ۲/۵ روز از زمان مرگ در کبد اجساد قابل ایزوله و جداسازی می باشد و در صورتی که در کبد اجساد سویه کلستریدیومی استخراج گردد به قطعیت می‌توان اذعان نمود که بیش از ۲/۵ روز یا ۵۸ ساعت از مرگ جسد گذشته است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و ملکولی ـ میکروبیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.SHIRAZ.REC.1398.020 دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می‌باشد، که با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه انجام شد. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شیراز و نیز از مجموعه اداره کل پزشکی قانونی استان فارس که فضا و شرایط را برای انجام نمونه‌گیری از اجساد فراهم نمودند نهایت تشکر را دارد.

REFERENCES

1.Sheree J, Finley M, Benbow E, Javan GT. Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks. International Journal of Legal Medicine 2015; 129(3): 623-32.
2.Metcalf JL. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. Science 2016; 351: 158–62.
3.Pechal JL. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. Int J Legal Med 2014; 128: 193–205.
4.Hauther KA. Estimating time since death from postmortem human gut microbial communities. J Forensic Sci 2015; 60: 1234–40.
5.Carter DO. Seasonal variation of postmortem microbial communities. Forensic Sci Med Pathol 2015; 11: 202–7.
6.Bouslimani A. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. Nat Prod Rep 2014; 31: 718–29.
7.Bouslimani A. Lifestyle chemistries from phones forindividual profiling. Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113: E7645–54.
8.Bouslimani A. Molecular cartography of the human skinsurface in 3D. Pro. Natl Acad Sci USA 2015; 112: E2120–9.
9.Ritchie N, Schutter M, Dick R, Myrold D. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterizemicrobial communities in soil. Appl Environ Mircrobiol 2000; 66: 1668–75
10.Buyer J, Sasser M. High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils. Appl Soil Ecol 2012; 61:127–30.
11.Burcham ZM, Hood JA, Pechal JL, Krausz KL, Bose JL, Schmidt CJ, et al. Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic Sci Int* 2016*;* 264: 63–9.
12.Adcock PW, Saint CP. Rapid confirmation of Clostridium perfringens by using chromogeneic and flurogeneic substrate. Appl Environ Microbiol 2001; 67(9): 4382–4.
13. Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using
16S Ribosomal DNA Primers. *Poult. Sci*. 2004;83, 1093- 1098.
14.Metcalf JL, Xu ZZ, Bouslimani A, Dorrestein P, Carter DO, Knight R. 2017. Microbiome tools for forensic science. Cell press. 2017; 35(9): 814-823.
15. Alivisatos AP. Microbiome A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science* 2015; 350: 507.58
16.Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss J A, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res* 2009; 19: 2317–23.
17.Clement C, Hill JM, Dua P, Culicchia F, Lukiw WJ. Analysis of RNA from alzheimer's disease post-mortem brain tissues. *Mol Neurobiol* 2016; 53,1322–8.
18.Olakanye AO, Nelson A, Ralebitso-Senior TK. A comparative in situ decomposition study using still born piglets and leaf litter from a deciduous forest. Forensic Sci Int 2017; 276: 85–92.
19.Burcham ZM, Hood JA, Pechal JL, Krausz KL, Bose JL, Schmidt CJ, Benbow ME, Jordan HR. Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. Forensic Sci Int 2016; 264: 63–9.
20.Megyesi MS, Nawrocki SP, Haskell NH. Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. J Forensic Sci 2005; 50: 618-28.
21.Pinheiro J. Decay process of a cadaver. Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J(editirs). Forensic anthropology and medicine: Complementary Sciences from recovery to cause of death. Humana Press: Totowa, NJ; 2006; 85-116.
22.Mecalf JL. Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. Forensic Science International: Genetics 2019; 38: 211-8.
23.Belk A, Zhenjiang ZX, Carter DO, Lynne A, Bucheli S, Knight R and Metcalf JL. Microbial data accurately predicts the postmortem interval using random forest regression models. Genes(Basel) 2018; 9(2); 104.
24.Cobaugh KL, Schaeffer SM, Debruyn JM. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. PLoS One 2015; 10(6); e0130201.
25.Javan GT, Can F, Finely Sh, Soni Sh. The apoptotic thanatotranscriptome associated with the liver of cadavers. Forensic Science Medicine and Pathology 2015; 11(4); 509-16.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Determination of *Clostridium perfringenes* in the Liver of Women and Men after Death as an Indicator for Postmortem Interval

Keyani M, Bahador N*

Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: 10 Apr 2020 Accepted: 02 Jan 2021

Abstract:

Background & aim: Most medical research to estimate the time interval after death depends on the physicochemical properties of the decomposition and the effects that environmental factors have on the decomposition process, but microorganisms settle in larger hosts and change over time. Found and known as microbial populations of decaying human bodies. Therefore, the aim of this study was to determine the presence of *Clostridium perfringens* in the liver of male and female corpses as an indicator for measuring the elapsed time of death.

Methods: In this experimental study that was conducted in 2019, 34 human bodies were found in different ways such as; Murder, suicide and suspected death. Samples were prepared and after homogenization cultured on blood agar and SPS media under anaerobic conditions using pack gas in Kendel Jar. Afterward they were characterized using gram staining, catalase and oxidase, and other diagnostic tests such as hemolysis, stormy fermentation, and nagler tests. Then for the confirmation of presence of *Clostridum* PCR was done using standard isolates from Razi Institute with code No: ATCC 13124 and finally relationship between the isolated bacterium and death process were evaluated.

Results: The results obtained from the tests indicated that 8 bacterial strains were isolated from which 2 isolates were Gram negative, 2 isolates were Gram positive with different characterization of *Clostridium* and 4 strains belonged to *Clostridium* based on 16SrRNA gene and product size of 722bp. In the samples taken, the time after death was reported to be between 19 and 192 hours according to the information contained in the files of the deceased by forensic medicine. In all four isolated samples, the time after death was determined to be more than 50 hours.

Conclusion: Although in normal condition it could be estimated the time of death according to examination of the body, freezing a corpse, cyanosis of the corpse and coldness of the body, but according to the results obtained from this study it could be concluded that There is a relationship between the presence of *Clostridium* strain in the liver and the time elapsed since death.

Keywords: *Clostridium perfringenes*, PMI, Polymerase Chain Reaction

***Corresponding author: Bahador N**, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Email: bahador@iaushiraz.ac.ir

Please cite this article as follows:

Keyani M, Bahador N. Determination of *Clostridium perfringenes* in the Liver of Women and Men after Death as an Indicator for Postmortem Interval. Armaghane-danesh 2021; 26(2): 200-216.