مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۱۰، زمستان۱۳۹۱، صفحات ۷۱ - ۵۹

بررسی جدایه های سالمونلا تولید کننده β- لاکتاماز وسیع الطیف نوع SHV از منابع مختلف با استفاده از روش های فنوتیپی و ژنوتیپی

مهدی قره خانی[۱] ، دکتر پژواک خاکی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
[۲] بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، ایران
نویسنده رابط: دکتر پژواک خاکی، بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
همراه: ۰۹۱۲۳۸۹۴۹۸۶ E.mail: khakipejvak@yahoo.com & p.khaki@rvsri.ir

چکیده

زمینه و اهداف: سالمونلا در تمام نقاط دنیا در میزبان های بسیاری همچون حیوانات اهلی، وحشی و انسان باعث بیماری سالمونلوزیس می شود. از سوی دیگر مصرف بی رویه دارو باعث افزایش مقاومت دارویی و پیدایش گونه های چند مقاومتی در سروتیپ های مختلف سالمونلا شده است. لذا به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و میزان فراوانی ژن مقاومتی *SHV* در میان سروتیپ های مختلف سالمونلا، تعداد ۷۰ سروتیپ سالمونلا، موجود در کلکسیون میکروبی بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج(RTCC)، با استفاده از روش های فنوتیپی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی: در آزمون فنوتیپی از روش" دیسک ترکیبی" جهت شناسایی سروتیپ های مولد ESBL مورد استفاده قرار گرفت. در روش ژنوتیپی ؛ حضور ژن bla_{SHV} با استفاده از PCR، بررسی گردید.

یافته ها: تمام سروتیپ های مورد مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های سفتیزوکسیم، اُفلاکساسین، ایمی پنم، سفوتاکسیم، انروفلوکساسین و آمیکاسین حساس بودند. بیشترین مقاومت ها نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین(۴۰٪)، نیتروفورانتوئین(۴۰٪) و تتراسایکلین(۳۸/۶٪) مشاهده شد و سی و دو مورد از جدایه ها(۴۵/۷٪) دارای مقاومت چند دارویی بودند. بر اساس نتایج آزمون دیسک ترکیبی ۱۰ جدایه مولد ESBL تشخیص داده شد، که در این میان تنها شش جدایه(۸/۶٪) دارای ژن bla_{SHV} بودند.

نتیجه گیری: در این مطالعه برای اولین بار در ایران حضور ژن مقاومتیbla_{SHV} در دام و طیور نشان داده شد که این امر نشان از ظهور سروتیپ های حامل این ژن را دارد و احتمال خطر انتقال این سروتیپ های مقاوم به آنتی بیو تیک از طریق این منابع به انسان وجود دارد. بنابر این لزوم انجام آزمایش های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و شناسایی مستمر این نوع سروتیپ ها مولد ESBL در جامعه لازم و ضروری است.

کلیدواژه: مقاومت آنتی بیوتیکی , $ESBLs$, bla_{SHV} , PCR

۱-مقدمه

سالمونلاها عامل بیماری های؛ تیفوئید، باکتریمی، آنتروکولیت و سالمونلوز هستند. سالمونلوز که از عفونت های مشترک انسان و حیوانات می باشد، به معضل بزرگ بهداشتی در جهان بخصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران تبدیل شده است(۲،۱). از آنجائیکه بهترین گزینه در درمان عفونت های سالمونلایی آنتی بیوتیک ها می باشند، ظهور مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، نظیر سفالوسپورین های نسل سوم بعنوان اولین انتخاب، بر علیه سالمونلاهای مهاجم، باعث افزایش نگرانی ها در این زمینه شده است. دلیل گسترش روزافزون این گونه مقاومت ها غالباً ژن های پلاسمیدی سازنده آنزیم های بتالاکتاماز می باشند که باعث غیر فعال شدن هسته مرکزی سفالوسپورین ها(حلقه بتا لاکتام) و در نتیجه بی اثر شدن دارو می شوند(٤،۳). در اواسط دهه ۱۹۸۰ گروه جدیدی از آنزیم ها به نام بتالاکتامازهای با طیف وسیع ESBLsشناسایی شدند که قادر به تخریب سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم بودند(۵). متاسفانه مصرف بی رویه این نوع از آنتی بیوتیک ها از یک سو و ازسویی دیگر قابلیت باکتری ها در انتقال ژنهای مقاومت دارویی، از نسلی به نسل دیگر و حتی به صورت شایع از یک گونه میکروبی به گونه دیگر؛ باعث شیوع روزافزون سویه های مقاوم و بروز مشکلاتی در روند درمان شده است(٦). انواعی از این گونه آنزیم ها شناخته شده اند که در این میان انواع *SHV,TEM* و در سالیان اخیر *CTX-M* با شیوع بیشتری در قاره ها و کشورهای مختلف از جمله ایران گزارش شده اند(۷،۵). این آنزیم ها غالباً توسط پلاسمیدهای بزرگ (بالای$۱۰۰kb$ و یا بیشتر) بیان می شوند و انواع مختلف آنها به واسطه ایجاد جهش و بدنبال آن جایگزینی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنها بوجود آمده اند که این تغییرات ساختمانی عمده، فعالیت بتالاکتامازی این موتانت ها را به سمت نسل سوم سفالوسپورین ها افزایش می دهد(۵). بتالاکتامازهای وسیع الطیف از کلاس ملکولیA و D هستندکه عمدتاً توسط مهار کننده های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می شوند که این امر اساس تست های تشخیص فنوتیپی این آنزیم ها را تشکیل می دهد(۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف عمدتًا درانتروباکتریاسه ها و بخصوص کلبسیلا و اشرشیا تولید می شوند و سایر جنس های باکتریهای روده ای به لحاظ تولید این آنزیم ها، در رتبه های بعدی قرار دارند(۲۳). جدایه های مقاوم به عوامل آنتی میکروبی مربوط به سالمونلا در ابتدا در سروتیپ تیفی در سال ۱۹۷۰ در آمریکای لاتین و آسیا پدیدار شد(۸). ظهور این سویه های مقاوم در میان گونه های سالمونلا در میان جمعیت انسانی و نیز در حیوانات پرورشی به عنوان منبع غذایی انسان در سالیان اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. در این تحقیق، الگوی مقاومت دارویی، تولید *ESBL* و بررسی حضور ژن bla_{SHV} در میان جدایه های سالمونلایی جداسازی شده از منابع مختلف (انسان ، دام و طیور) مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ سروتیپ های مورد مطالعه

۷۰ جدایه موجود در کلکسیون میکروبی بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- کرج، مورد بررسی قرار گرفتند. در این میان ۱۸ جدایه با منشاء انسانی، ۳۸ جدایه از طیور و ١٤ جدایه نیز با منشاء دام بودند(جدول۱).

جدول ۱. سروتیپ و منشاء جدایه ها به همراه نتایج یک به یک آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

ردیف	شماره RTCC	سروتایپ	منشاء
1	1585	*Salmonella aberdeen*	انسان
2	1598,1622	*Salmonella arizona*	انسان
3	1621	*Salmonella enteritidis*	انسان
4	1625	*Salmonella cholerasuis*	انسان
5	1650	*Salmonella infantis*	انسان
6	1666,1667	*Salmonella nigeria*	انسان
7	1670	*Salmonella papuana*	انسان
8	1671, 1674, 1676, 1677	*Salmonella paratyphi A*	انسان
9	1678	*Salmonella paratyphi B*	انسان
10	1687,1688	*Salmonella paratyphi C*	انسان
11	1689,1690	*Salmonella paratyphi*	انسان
12	1605	*Salmonella blegdam*	طیور
13	1606	*Salmonella bracderup*	طیور
14	1614	*Salmonella derby*	طیور
15	1619	*Salmonella duesseldrof*	طیور
16	1626,1628,1630,1632,1644	*Salmonella gallinarum*	طیور
17	1635	*Salmonella group B*	طیور
18	1634,1637, 1638, 1639	*Salmonella group C1*	طیور
19	1643	*Salmonella group E4*	طیور
20	1645,1647	*Salmonella havana*	طیور
21	1651	*Salmonella Kentucky*	طیور
22	1652	*Salmonella Kottbus*	طیور
23	1654	*Salmonella Kuilsrivier*	طیور
24	1659,1660	*Salmonella meleagridis*	طیور
25	1662	*Salmonella meunchen*	طیور
26	1663	*Salmonella montevideo*	طیور
27	1664	*Salmonella moscow*	طیور
28	1665	*Salmonella mura*	طیور
29	1679	*Salmonella typhimurium*	طیور
30	1698	*Salmonella recding*	طیور
31	1699	*Salmonella rostock*	طیور
32	1693-62, 1693-73, 1693-82, 1693-69, 1693-64	*Salmonella infantis*	طیور
33	1624,1693-59	*Salmonella enteritidis*	طیور
34	1693-80	*Salmonella bakongo*	طیور
35	1640	*Salmonella group C2*	دام
36	1704	*Salmonella seftenberg*	دام
37	1627,1691	*Salmonella poona*	دام
38	1658	*Salmonella mbandaka*	دام
39	1608	*Salmonella capeci*	دام

40	1620	*Salmonella eastbourne*	دام
41	1623	*Salmonella enteritidis*	دام
42	1599	*Salmonella arizona*	دام
43	1604	*Salmonella birkenhead*	دام
44	1592	*Salmonella abortus ovis*	دام
45	1597	*Salmonella arechavaleta*	دام
46	1591,1596	*Salmonella abortus*	دام
47	1669	*Salmonella oranienburg*	دام

۲-۲ آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

در این مطالعه، حساسیت سروتیپ های مورد مطالعه، توسط سی دیسک آنتی بیوتیک مختلف به روش دیسک دیفیوژن و بر اساس استاندارد CLSI بر روی محیط مولر هینتون آگار(pH بین ۷/٤ تا ۷/۲) انجام گرفت و در نهایت پس از انکوباسیون به مدت ۲٤-۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C؛ نتایج مورد بررسی قرار گرفت(۵).

۲-۳ بررسی سروتیپ های مولد ESBL به روش فنوتیپی

جهت بررسی حضور آنزیم های بتالاکتاماز طیف وسیع از آزمون دیسک ترکیبی (Combinated Disk) استفاده گردید به منظور تشخیص سروتیپ های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف از دیسک های تشخیصی که در جدول شماره ۳ آورده شده، استفاده گردید.

جدول۲.آنتی بیوتیک های مورد استفاده در آزمون دیسک ترکیبی(تهیه شده از شرکت MAST)

آنتی بیوتیک به همراه مهارکننده	آنتی بیوتیک
Ceftazidim 30 µg + 10 µg of Clavulanic acid	*Ceftazidim 30 µg*
Cefotaxime 30 µg + 10 µg of Clavulanic acid	*Cefotaxime 30 µg*
Cefapodoxime 30 µg + 10 µg of Clavulanic acid	*Cefapodoxime 30 µg*

افزایش بیش از ۵ میلی متر (≥۵) در قطر هاله هر کدام از آنتی بیوتیک های فوق در ترکیب با کلاولانیک اسید نسبت به آنتی بیوتیک تنها، نشانه تولید ESBL توسط باکتری خواهد بود(۵).

۲-۴ بررسی سروتیپ های مولد ESBL به روش ژنوتیپی

با آزمایش PCR حضور ژن bla_{SHV} را در سروتیپ های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت(جدول۳). پس از تخلیص DNA جدایه ها به روش استاندارد فنل-کلروفرم، کیفیت و کمیت DNA تخلیص شده؛ با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بررسی شد. محلول PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از مستر میکس(شرکتampliqon) برای هر نمونه تهیه شد(جدول٤). با روش گرادیانت گذاری، دمای آنالینگ مناسب برای پرایمر تعیین گردید.

Target gene	Primer sequence	Product size	References
blaSHV			*Pitout et al. 1998* *Hasman et al. 2005*
SHV-F *SHV-R*	*5´-CACTCAAGGATGTATTGTG -3´* *5´-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG -3´*	*≈ 950*	*Saenz et al. 2004* *Riano et al. 2006*

جدول ۳. مشخصات پرایمر اختصاصی ژن blaSHV مورد استفاده در این مطالعه

Tempture	Time	Cycle
Hot Start 94 c^o	5 min	1
Denaturation 94 c^o	1 min	30
Annaling temp. 60°c	1 min	
Extension 72c^o	1 min	
Final Extesion 72 c^o	10min	1

جدول ٤. پروفایل حرارتی مورد استفاده برای آزمایش PCR

۳- نتایج

۳-۱ تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

بیشترین مقاومت در میان جدایه های مورد بررسی؛ نسبت به دیسک های سفالکسین(۲۸مورد،۴۰٪)، نیتروفوراتوئین(۲۸ مورد،۴۰٪) و در مرتبه بعدی تتراسایکلین(۲۷مورد،۳۸/۶٪) دیده شد. نسبت به آنتی بیوتیک های اُفلاکساسین، سفتیزوکسیم، سفوتاکسیم، آمیکاسین، انروفلوکساسین و ایمی پنم هیچ گونه مقاومتی مشاهده نشد. آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و سفیپیم (هر کدام با یک مورد مقاومت،۱/۴٪) و پس از این دو، آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و سفتریاکسون(هر کدام با ۲مورد مقاومت، ۲/۸۵٪) کمترین مقاومت ها را در بین جدایه های مورد بررسی داشتند (جدول۵).

جدول ۵- نتایج جدایه ها مورد آزمون آنتی بیوگرام

ردیف	آنتی بیوتیک	تعداد جدایه های حساس (٪)	تعداد جدایه های نیمه حساس (٪)	تعداد جدایه های مقاوم (٪)
۱	آمیکاسین(AN)	٦٩ (٪۹۸/٦)	۱ (٪۱/٤)	-
۲	آمپی سیلین(AM)	٤٣ (٪٦۱/٤)	۱۳ (٪۱۸/٦)	۱٤ (٪۲۰)
۳	آمپی سیلین / سولباکتام(SAM)	٥٤ (٪۷۷/٤)	٥ (٪۷/۲)	۱۱ (٪۱٥/۷)

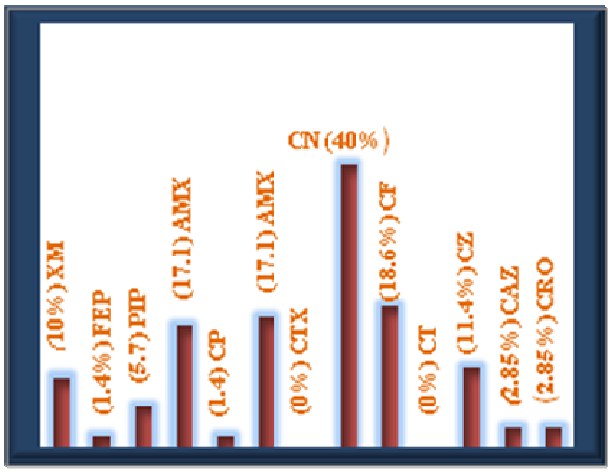
٤	آموکسی سیلین(AMX)	٤٣ (٪٦١/٤)	١٥ (٪٢١/٤)	١٢ (٪١٧/٢)
٥	تتراسایکلین(TE)	٢٦ (٪٣٧/٢)	١٧ (٪٢٤/٣)	٢٧ (٪٣٨/٦)
٦	سفازولین(CZ)	٤٨ (٪٦٨/٦)	١٤ (٪٢٠)	٨ (٪١١/٤)
٧	سفتریاکسون(CRO)	٦٨ (٪٩٧/٢)	–	٢ (٪٢/٩)
٨	سیپروفلوکساسین(CP)	٦٩ (٪٩٨/٦)	–	١ (٪١/٤)
٩	کو-تریموکسازول(SXT)	٦٤ (٪٩١/٤)	٢ (٪٢/٩)	٤ (٪٥/٧)
١٠	جنتامایسین(GM)	٦٥ (٪٩٢/٩)	–	٥ (٪٧/٢)
١١	ایمی پنم(IPM)	٦٩ (٪٩٨/٦)	١ (٪١/٤)	–
١٢	نیتروفورانتوئین(FM)	٣٦ (٪٥١/٤)	٦ (٪٨/٦)	٢٨ (٪٤٠)
١٣	اُفلاکساسین(OFX)	٧٠ (٪١٠٠)	–	–
١٤	پیپراسیلین(PIP)	٦٢ (٪٥٤/٣)	٤ (٪٥/٧)	٤ (٪٥/٧)
١٥	سفالکسین(CN)	٢٢ (٪٣١/٤)	٢٠ (٪٢٨/٦)	٢٨ (٪٤٠)
١٦	سفالوتین(CF)	٣٨ (٪٥٤/٣)	١٩ (٪٢٧/٢)	١٣ (٪١٨/٦)
١٧	سفکسیم(CFM)	٦٢ (٪٨٨/٦)	٥ (٪٧/٢)	٣ (٪٤/٣)
١٨	سفتازیدیم(CAZ)	٥٩ (٪٨٤/٣)	٩ (٪١٢/٩)	٢ (٪٢/٩)
١٩	سفوتاکسیم(CTX)	٦٨ (٪٩٧/٢)	٢ (٪٢/٩)	–
٢٠	سفی پیم(FEP)	٦٧ (٪٩٥/٧)	٢ (٪٢/٩)	١ (٪١/٤)
٢١	سفتیزوکسیم(CT)	٦٩ (٪٩٨/٦)	١ (٪١/٤)	–
٢٢	سفوروکسیم(XM)	٣٦ (٪٥١/٤)	٢٧ (٪٣٨/٦)	٧ (٪١٠)
٢٣	فورازولیدون(FR)	٥٠ (٪٧١/٤)	٣ (٪٤/٣)	١٧ (٪٢٤/٣)
٢٤	کاناماسین(K)	٤٩ (٪٧٠)	١١ (٪١٥/٧)	١٠ (٪١٤/٣)
٢٥	کلرامفنیکل(C)	٦٣ (٪٩٠)	–	٧ (٪١٠)
٢٦	نالیدیکسیک اسید(NA)	٥٦ (٪٨٠)	٦ (٪٨/٦)	٨ (٪١١/٤)
٢٧	نئومایسین(N)	٢٥ (٪٣٥/٧)	٣٦ (٪٥١/٤)	٩ (٪١٢/٩)
٢٨	انروفلوکساسین(NFX)	٧٠ (٪١٠٠)	–	–
٢٩	فلوروفنیکول(FF)	٦٦ (٪٩٤/٣)	١ (٪١/٤)	٣ (٪٤/٣)
٣٠	کلیستین(CL)	٥٢ (٪٧٤/٣)	–	١٨ (٪٢٥/٧)

در مجموع؛ ۴۵ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مختلف در میان جدایه های مورد بررسی مشاهده شد(جدول۶). تعداد ۱۱ جدایه(۱۵/۷٪) به هیچ یک از آنتی بیوتیک ها مقاومتی نشان ندادند. سی و دو جدایه (۴۵/۷٪) دارای مقاومت چند دارویی (*MDR*) بودند. دو جدایه با داشتن ۱۳ مورد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب، مقاومترین جدایه ها بودند(جدول۶). در میان آنتی بیوتیک های بتا لاکتام، سفالکسین بیشترین و سفتیزوکسیم کمترین مقاومت را داشتند(نمودار۱).

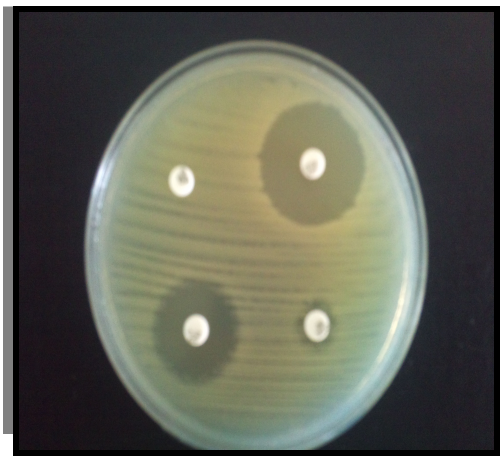
جدول٦. الگوی های مقاومت آنتی بیوتیکی

ردیف	نوع مقاومت	الگوی مقاومتی	تعداد جدایه ها
١	١ دارویی	N	١
٢	١ دارویی	CN	٢
٣	١ دارویی	CL	٣
٤	١ دارویی	FM	٤
٥	١ دارویی	TE	٢
٦	١ دارویی	AMX	١
٧	١ دارویی	CF	١
٨	١ دارویی	GM	١
٩	٢ دارویی	AMX,FM	١
١٠	٢ دارویی	FM,FR	٣
١١	٢ دارویی	CL,CN	٥
١٢	٢ دارویی	AM,CN	١
١٣	٢ دارویی	CZ,FM	١
١٤	٢ دارویی	CN,TE	١
١٥	٣ دارویی	K,N,TE	١
١٦	٣ دارویی	CL,CN,CP	١
١٧	٣ دارویی	CAZ,CL,CN	١
١٨	٣ دارویی	TE,AMX,CZ	١
١٩	٣ دارویی	CN,CF,TE	١
٢٠	٣ دارویی	AM,FR,FM	١
٢١	٣ دارویی	CN,FR,FM	١
٢٢	٣ دارویی	CN,CL,FM	١
٢٣	٤ دارویی	FR,FM,N,TE	١
٢٤	٤ دارویی	TE ،CN ،CRO,CF	١
٢٥	٤ دارویی	C,FF,NA,PIP	١
٢٦	٥ دارویی	CN ،NA ،CL ،XM,FM	١
٢٧	٦ دارویی	AM,PIP,FM,CF,CN,TE	١
٢٨	٦ دارویی	FR,FM,N,K,SXT,TE	١

۲۹	٦ دارویی	NA,FF,C,CN,CF,TE	۲
۳۰	٦ دارویی	CL,FR,FM,GM,CF,TE	۱
۳۱	۷ دارویی	CL,NA,AM,FR,FM,TE	۱
۳۲	۷ دارویی	FR,FM,N,TE,K,AM,,C	۱
۳۳	۸ دارویی	AMX,NA,CFM,AM,FR,FM,CN,TE	۱
۳٤	۸ دارویی	XM,TE,AM,SAM,K,GM,CF,AMX	۱
۳۵	۸ دارویی	FR,TE,AM,SAM,K,C,CN,AMX	۱
۳٦	۸ دارویی	SAM,CL,NA,FR,FM,CN,TE,CZ	۱
۳۷	۸ دارویی	SAM,CL,NA,FR,FM,CN,TE,AM	۱
۳۸	۹ دارویی	CF,IPM,CTX,OFX,FM,C,CN,CT,TE	۱
۳۹	۹ دارویی	CF,IPM,CAZ,CN,CZ,AM,XM,SAM,CFM	۱
٤۰	۹ دارویی	CF,SXT,K,CRO,FEP,XM,CN,FM,TE	۱
٤۱	۹ دارویی	AM,AMX,SAM,CL,NA,CN,FR,FM,TE	۱
٤۲	۱۰ دارویی	SAM,XM,AM,FM,AMX,CN,TE,K,CF,GM	۱
٤۳	۱۱ دارویی	SAM,AM,XM,FF,CZ,AMX,CFM,CF,CN,FM,TE	۱
٤٤	۱۳ دارویی	CZ,AMX,CN,TE,K,SAM,XM,AM,PIP,CL,FM,CF,FR	۱
٤۵	۱۳ دارویی	CZ,AMX,CN,TE,K,SAM,XM,AM,PIP,N,C,SXT,GM	۱



نمودار۱: درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام



شکل ۱: تفاوت درهاله عدم رشد دیسک های سفتازیدیم و سفوپودکسیم در مقایسه با دیسک های حاوی کلاولانیک اسید آنها

۳-۲ تشخیص فنوتیپی ESBL

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون دیسک ترکیبی، ده جدایه مولد ESBL تشخیص داده شدند که عمدتاً بر اساس تفاوت در قطر هاله (≤۵) دیسک سفتازیدیم در مقایسه با سفتازیدیم/ کلاوولانیک اسید مشخص شدند(جدول شماره ۷ و شکل۱).

یک مورد نیز از تفاوت دیسک سفوپودوکسیم با سفوپودو کسیم / کلاوولانیک اسید ناشی می شد . البته یکی از این جدایه ها، از طریق تفاوت در هر دو دیسک سفتازیدیم و سفوپودوکسیم نسبت به دیسک های حاوی کلاوولانیک اسید، حامل ESBL تشخیص داده شد.

جدول۷ . مشخصات ۱۰ جدایه دارای ESBL

RTCC No.	سروار	منبع	مقاومت به آنتی بیوتیک های غیر بتا لاکتام	مقاومت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام	آزمون تائید فنوتیپی ESBL	آزمون تائید ژنوتیپی ESBL
۱۶۲۲	*S.arizona*	انسان	*TE,FM,FF,SAM*	*CF,CN,CFM,CZ,XM, AMX*	+	+
۱۶۹۰	*S.paratyphi*	انسان	*CL*	*CN,CAZ*	+	+
۱۶۴۷	*S.havana*	طیور	*TE,K,GM,*	*XM,AM,CF, AMX*	+	+
۱۶۴۰	*S.group C2*	طیور	*TE,K,GM,FM,SAM*	*XM,AM,CN,CF, AMX*	+	+
۱۵۹۹	*S.arizona*	دام	*SAM*	*XM,AM,CN,CF, AMX,XM,CFM,CAZ*	+	+
۱۶۷۹	*S.paratyphi*	دام	*TE*	*CRO,CN,CF*	+	+
۱۶۰۴	*S.birkenhead*	دام	*FM,TE,K,CL,PIP,SAM,*	*CF,CZ,CN,AM,XM*	+	-
۱۶۲۵	*S.cholerasuis*	انسان	*FM*	-	+	-
۱۶۳۸	*S.groupC1*	طیور	*FR,FM*	*CN*	+	-
۱۶۵۴	*S.kuilsrivier*	طیور	*FM*	-	+	-

۳-۳ آزمون PCR

نتایج آزمایش PCR تمامی جدایه ها، جهت تعیین حضور ژن bla_{SHV} با پرایمر اختصاصینشان داد که؛ ۶ جدایه با ایجاد قطعه ای در حدود ۹۵۰ bp معادل قطعه تکثیر یافته در سویه کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه؛ ATCC 700603) ، دارای ژن bla_{SHV} می باشد که سهم جدایه های طیور، انسان و دام هر کدام دو مورد بود(جدول شماره ۷ و شکل۲).

شکل ۲. قطعات حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر bla_{SHV}(قطعاتی با طول تقریبی 950 bp)
ستون1 : سایز مارکر(100bp)
ستون 2,3,4,7,8 : جدایه های bla_{SHV} مثبت
ستون 5,6 : جدایه های فاقد ژن bla_{SHV}
ستون 9 : نمونه کنترل مثبت کلبسیلا پنومونیه ATCC700603
ستون 10: نمونه کنترل منفی

۴- بحث و نتیجه گیری

متعاقب انتشار ژن های مقاومتی در میان گونه های اشرشیا کلی و کلبسیلا، ظهور سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک ها، به مشکلی بزرگ در بین انسان و حیوانات تبدیل شده است(۱). باکتری های مقاوم، مدتهای طولانی توسط محققینی در سرتاسر جهان مورد بررسی قرار گرفته اند. نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز الگویی باورپذیر و مطابق با بسیاری از تحقیقات متعددی است که سالیان اخیر صورت پذیرفته است. بطوریکه در این مطالعه؛ مشاهدهٔ مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی نسل اول، نظیر سفالوتین، سفازولین و سفالکسین و یا پنی سیلین های قدیمی تر نظیر آمپی سیلین، بدلیل استفاده طولانی مدت و مداوم از آنها؛ زیاد از ذهن دور نیست. مشاهده ۲۷ مورد مقاومت حدواسط نسبت به آنتی بیوتیک سفوروکسیم؛ از نسل دوم سفالوسپورین ها؛ در این مطالعه، تاکیدی بر این مطلب می باشد که بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نسل دوم نیز در حال افزایش است. همچنین، تاثیر مناسب آنتی بیوتیک های جدیدتر مانند سفالوسپورین های نسل سوم مانند سفوتاکسیم، سفتیزوکسیم و سفتازیدیم، با توجه به نبود مقاومت و یا تعداد اندک مقاومت نسبت به آنها، کاملاً ملموس می باشد. بنابراین نیاز به آزمایشگاه های مجهز و لزوم انجام آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی(آنتی بیوگرام، E-test و ..) قبل از تجویز هر نوع آنتی بیوتیک جهت درمان، کاملاً احساس می شود. اگرچه در نگاه اول هزینه های مربوط به این آزمایشات، ممکن است منجر به سهل انگاری در این زمینه شود اما با نگاهی دقیق تر به مساله، مشخص می شود که هزینه های گزاف درمان با آنتی بیوتیک های غیر موثر بسته به نوع عفونت یعنی به نوعی درمان کورکورانه، در مقابل اندک هزینه این آزمایشات، قابل چشم پوشی است و کاملاً مقرون به صرفه بنظر می رسد. البته بکارگیری دیسک های تشخیصی متناسب با نوع بیماری بر اساس استانداردهای موجود، انجام صحیح تست و نهایتاً استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی معتبر و استاندارد که بصورت تجاری در بازار موجود می باشد نیز بخش دیگر مساله را که به آزمایشگاههای تشخیصی مربوط است را تشکیل می دهد.

مطالعات متعددی در طی ۲دهه اخیر به منظور بررسی مقاومت دارویی و شناسایی مولدین ESBL ها در میان اعضاء خانواده انتروباکتریاسه در ایران صورت گرفته است اما بسیاری از این مطالعات، بر روی دیگر اعضاء این خانواده نظیر کلبسیلا و اشرشیاکلی بوده و نیز تمرکز محققین در این مطالعات بیشتر بر روی ایزوله های کلینیکی بوده است و بسیار محدود سالمونلا ها با منشاء دام و طیور مورد بررسی قرار گرفته اند. ازجمله این موارد می توان به تحقیقات شاهچراغی در سال ۱۳۸٦ بر روی گونه های کلبسیلا پنومونیه و یا هاشم زاده و همکاران در شیراز بر روی گونه های انتروباکتر و افتخار و همکارانش بر روی گونه های اشرشاکلی اشاره نمود(۹،۱۰،۱۱).

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق مشابه نتایج بسیاری دیگر از تحقیقات(Weill et al; 2004.,Thamson et al; 2008., Zhao et al; 2008)، آنتی بیوتیک های کم اثر شامل تتراسیکلین ، سفالوسپورین های نسل اول، کانامایسین نئومایسین، آمپی سیلین، نیتروفورانتوئین و فورازولیدون و همچنین بدلیل، کاهش تاثیر سفالوسپورین های نسل دوّم در مقایسه با نسل سوم بر سالمونلاها، در درمان این عفونت ها نباید مورد استفاده قرار گیرند. رفع این مشکل مستلزم به کارگیری عوامل ضد میکروبی جدید و محدود نمودن استفاده غیر ضروری از عوامل ضد میکروبی و بهره گیری از ابزارهای کنترل عفونت می باشد(۹)

مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و آمپی سیلین؛ در میان گونه های سالمونلا توسط رنجبر و همکارانش در تهران(۱)، تامپسون و همکارانش در انگلیس(۱۲) و دیوادی در سال ۲۰۱۰(۱۳) و بسیاری دیگر از تحقیقات در چند ساله اخیر نشان داده شده است. از سوی دیگر حساسیت به سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، فلوروفنیکول و آمیکاسین در مطالعات استراپ در سال ۲۰۱۰، مرشد در تهران، روتیمی در مطالعه ای مشترک در کویت و امارات متحده و ژاوو در سالهای ۲۰۰۳ و ۲۰۰۸ در میان سویه های مختلف سالمونلا با منشاء انسان، دام و طیور قبلاً نیز گزارش شده است(۱٦،۱٤،۲،۱۵و۲٤). همچنین در مطالعه قبلی توسط دکتر خاکی و همکاران؛ در میان جدایه های طیور؛ به مانند این تحقیق؛ بیشترین مقاومت ها نسبت به نیتروفورانتوئین، فورازولیدن و سفالکسین مشاهده شد و حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های فلورفنیکول، افلوکساسین، جنتامیسین و انروفلوکساسین نشان داده شد(۱۷).

در مطالعه ای که توسط حمیدیان در سال ۲۰۰۹ بر روی جدایه های کلینیکی سالمونلا در تهران انجام شد(۱۸)، نتایج مقاومت به تتراسایکلین(٤۳/۷٪)، آمپی سیلین(۱۵/۵٪) و کلرامفنیکل(۱٤/۷٪) و همچنین حساسیت به سیپروفلوکساسین تقریباً مطابق با نتایج مطالعه حاضر بود. اما برعکس تحقیق فوق مقاومت به نالیدیکسیک اسید(٤۵/۷٪)،در این تحقیق مقدار کمتری(۱۱/٤٪) را نشان می داد.

علیرغم هزینه های بالای روشهای ژنوتیپی مانند PCR در مقایسه با روشهای فنوتیپی تشخیص مقاومت، گسترش روشهای مولکولی منجر به درمان مؤثر و سریعتر آنان و جلوگیری از گسترش ایزوله های مقاوم باکتریها می گردد.

حضور ژن مقاومتی *SHV* بوسیله PCR در این مطالعه ، در ٦ جدایه(۱٤/۳٪) گزارش شد که سهم جدایه های انسان، طیور و دام هر کدام ۲ جدایه بود. اگرچه این میزان در مقایسه با مطالعه ای در سال ۲۰۰٤ در ترکیه که ۷٤/۳٪ جدایه های مورد بررسی حامل این ژن بودند(۱۲) و De ghelder و همکارنش که ۳۲٪ جدایه سالمونلایی دارای ژن *SHV* را شناسایی کردند(۱۹) و یا مطالعه ای که در ایتالیا(۲۰۰۸) بر روی جدایه های طیور و محصولات آنها و نیز در آفریقای جنوبی در میان جدایه های کلینیکی سالمونلا انجام گرفت، بترتیب ۱۲ و ۱٤ جدایه حامل انواع مختلفی از ژن های bla_{SHV} تشخیص داده شدند مقدار کمی می باشد(۲۰). اما مشابه این تحقیق؛ هاسمن و همکارانش در کشور هلند(۲۰۰۵)؛ در میان جدایه های سالمونلایی با منشاء مختلف، تنها ۲ جدایه حامل ژن bla_{SHV} را شناسایی کردند. همچنین در سال ۲۰۰۹ در کشور مصر، احمد و همکارانش؛ در میان ایزوله های دامی

مـورد بررسـی، ۲ جدایـه حامـل ژن bla_{SHV} را مشـاهده کردند(۲۲،۲۱).

در این مطالعه، حضور سـویه هـای مقـاوم و *SHV* مثبـت سـالمونلا، عـلاوه بـر جمعیـت انسـانی، در طیـور پرورشی برای اولین بـار در ایـران گـزارش شـد. ایـن امـر نشاندهنده گسترش ژن های مقاومـت پلاسـمیدی در میـان سروتیپ های مختلف سالمونلا در انسان، دام و البته طیـور می باشد. انتقال این نوع آلودگی به انسـان از طریـق طیـور پرورشی بعنوان منابع غذایی انسان، باعث شیوع روز افزون سویه های مقاوم و شکست درمان بـا آنتـی بیوتیـک هـای انتخابی متعاقب ایجاد عفونت در انسان خواهد شد. لذا این مطالعـه ، طیـور و محصـولات آن را بـه عنـوان منـابع سالمونلای حامل ESBL در ایران مطرح کرده و نیاز مبـرم به بازبینی محصولات حیوانی را برای جلـوگیری از شـیوع سویه های مقاوم، وجود دارد.

تشکر و قدردانی

محققین این مقاله از تمام مسئولین موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج که امکانات و هزینه های این پژوهش را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی بعمل می آورند.

فهرست منابع:

1- Ranjbar R., Giammanco G.M., Aleo A., Anna Plano M.R., Naghoni A., and Mammina C., 2010. Characterization of the First Extended-Spectrum β-Lactamase–Producing Nontyphoidal SalmonellaStrains Isolated in Tehran, Iran. Food borne Pathogens and Disease; 7: p. 1-10

2- Rotimi V O., Jamal W., 2008. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. *Diagnostic microbiology and infections disease*; 60:71-77

3- Joklik J., Zinsser B., Wolfgang K. Zinsser Microbiology- 20th Edition –V. 2, systematic bacteriology, chapter 15: P.269

4- Jemima S.A., Verghese S., 2008. Multiplex PCR for *bla*CTX-M & *bla*SHV in the extended spectrum betalactamase (ESBL) producing Gram-negative isolates, Indian J Med Res; 128: p. 313-317

5- Perez F., Endimiani A., Hujer K. M. and Bonomo R.A., 2007.The Continuing Challenge of ESBLS. *American Curr Opin Pharmacol*; 7(5): 459–469.

6- Steward C.D., Rasheed J. K., Hubert S. K., Biddle J. W., Raney P. M., Anderson G. J., Williams P. P., Brittain K. L., 2001. Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumonia* From 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β-Lactamase Detection Methods. Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology;**8**(39) p. 2864–2872

7- Xavier Weill F., Demartin M., TandeD., Espie E., Rakotoarivony I., 2004. SHV-12-Like Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Strains of *Salmonella enterica* Serotypes Babelsberg and Enteritidis Isolated In France among Infants Adopted from Mali. American Society for Microbiology.,Journal Of Clinical Microbiology. **6**(42): p. 2432–2437

8- Tasli H., Hakki BI. Molecular characterization of TEM and SHV derived ESBL in hospital based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis*.2005; **58**: 162-167

۹- شاهچراغی ف.، اکبری شهمیرزادی ن.، امیر مظفری ن. تشخیص مولکولی ژن های بتا لاکتاماز bla_{CTX} و bla_{TEM} در ایزوله های اسینتوباکتر، جداشده از نمونه های بالینی در بیمارستان های منتخب تهران. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. بهار ۱۳۸۸؛ سال۳،شماره۱، صص ۹-۱

۱۰- هاشمی زاده ز، بازرگانی ع، امامی الف. مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتر و فراوانی سویه های تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف در بیماران بخش مراقبت های ویژه بیمارستان نمازی شیراز(۸۷-۱۳۸۶). مجله علمی

دانشگاه علوم پزشکی قزوین؛ تابستان ۱۳۸۹؛سال۱٤، شماره۲، صص٥٤-٤٧

11- Eftekhar F., Hosseini-Mazinani S.M.2005. PCR detection of plasmid mediated TEM, SHV and AmpC β-lactamases in community and nosocomial urinary isolates of *Escherichia coli*. Iranian Journal of Biotechnology.Vol. **3**, No. 1, p.48-54

12- Thomson.K.S, Black.J,Smith Moland.E, 2008. Identification of plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase CTX-M-57 in salmonella enteric serovar Typhimorium.International Journal of Antimicrobial agents.**31**:76-90.

13- Douadi B., Lin Thong K., Watanabe H. Characterization of Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* by Antibiograms, Plasmids, Integrons, Resistance Genes, and PFGE. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2010; **20**(6): 1042–1052

14- Morshed R., Peighambari S. M., 2010. Drug resistance plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of salmonella Enteritidis.New Microbiologica.33:47-56.

15- Zhao S., Qaiyumi S., Friedman S., Singh R., Foley S.L., McDermott P.F., Donkar T., Bolin,3 S. Munro C., 2003. Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. American Society for Microbiology, Antimicrobial Agents And Chemotherapy; 12(42) p. 5366–5371

16- Aarestrup F. M., Hasman H., Veldman K., Mevius D. 2010. Evaluation of Eight Different Cephalosporins for Detection of Cephalosporin Resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. Microbial Drug Resistance; 4(16): p.253-261

۱۷- انسیه ع.، مرادی بیدهندی س، خاکی پ. بررسی شیوع آلودگی سالمونلایی در نمونه های طیور و محصولات آن و شناسایی سویه های MDR و ESBL. پایان نامه دانشجویی؛ ۱۳۸۹:دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

18- Hamidian M., Tajbakhsh M., Rusmussen J.W., 2009. Emergence of Extended-Spectrum β-Lactamases in clinical Isolates of Salmonella enteric in Thehran, Iran. Journal of Infection Diseases; 62: p. 368-371

19- De Gheldre Y., Avesani V., Berhim C., Delmee M., Glupczynski Y. 2003. Evaluation of oxoid combination discs for detection of extended-spectrum β-lactamases.JAC; 52(4):591-597.

20- Chiaretto G., Zavagnin P., Bettini F., Mancin M., Minorello C. 2008. Extended spectrum β-lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry.Veterinary Microbiology; 128: p. 406–413

21- Ahmed A. M., Younis E. A., Shimamoto T. 2009.Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt, Acta Tropica; 111: p. 144–149

22- Hasman H., Mevius D., Veldman K. 2005; β-Lactamases among extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-resistant Salmonella from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands, Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 56: p.115–121

23- Weldhagen G. F., Poirel L. and Nordmann P., 2003. Ambler Class A Extended-Spectrum β-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. MiniReview. American Society for Microbiology. Antimicrobial AgentS and Chemotherapy. 47(8): p. 2385–2392

24- Zhao S.,White D.G.,Friedman S.L.,Glenn A., Blickenstaff K., Ayers S.L. ,Abbott J.W., Hall rabinson E., McDermott P.F., 2008. Antimicrobial resistace in *salmonella enteric* serovar Heidelberg isolates from retail meays including poultry from 2002 to 2006. AEM.74(21): p.6656-6662.