تحقیقی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلا انتریکا*، مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تیپ *CMY-2* در طیور

مریم نادری مزجین[۱]، دکتر پژواک خاکی*[۲]، دکتر فاطمه نوربخش[۳]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی - میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران.

۲- دانشیار، بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *سالمونلا به عنوان یک پاتوژن منتقله از غذا در سراسر جهان شناخته شده است. محصولات مرغ به‌طور گسترده به عنوان مخزن قابل توجهی برای سالمونلا محسوب می‌شوند. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلا انتریکا، مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended Spectrum Beta Lactamases: ESBL) در طیور انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۷۰ سروتیپ سالمونلا انتریکا از جوجه‌های گوشتی جمع‌آوری شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی تمامی جدایه‌های سالمونلا با روش استاندارد انتشار دیسک کربی- بائر ارزیابی و ۲۹ آنتی‌بیوتیک در این مطالعه استفاده شد. کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) به عنوان گونه‌های کنترل کیفیت استفاده گردید. تعیین سالمونلاهای مولد ESBLs توسط دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد.*

یافته ها : *سروتیپ‌های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس، شایع‌ترین سروتیپ‌ها تعیین شدند. همه سروتیپ‌ها به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، ایمی‌پنم و انروفلوکساسین حساس بودند. بیشترین مقامت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوکسین (۹٦درصد)، سفازولین (۹٦درصد)، سفالوتین (٦٥درصد) مشاهده شد. مقاومت چنددارویی در ۵۹ جدایه (۸٤ درصد) یافت شد. ٤۷ جدایه (٦۷ درصد) مولد ESBL بودند. با انجام PCR ، ۱۷ جدایه (۳۳/۳۳ درصد) حاوی ژن balaCMY2 بودند.*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در مقابل سالمونلا انتریکا به خاطر تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در طیور بسیار زیاد است.*

کلید واژه‌ها : *سالمونلا ، ESBL ، مقاومت چنددارویی، ژن balaCMY2*

* نویسنده مسؤول : دکتر پژواک خاکی ، پست الکترونیکی p.khaki@rvsri.ac.ir

نشانی: کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش میکروب شناسی

کدپستی ۳۱۹۷٦۱۹۷۵۱ ، تلفن ۳٤٥۷۰۰۳۸-۰۲٦ ، نمابر ۳٤٥٥۲۱۹٤

وصول مقاله : ۱۳۹٥/۱۰/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٦/۸/۲۹ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٦/۹/۲٦

مریم نادری مزجین https://orcid.org/0000-0001-6305-7539 ، دکتر پژواک خاکی https://orcid.org/0000-0001-8839-1023

مقدمه

باکتری سالمونلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای انتقال‌یابنده از طریق مواد غذایی به‌خصوص گوشت طیور است که باعث بروز بیماری‌های مختلف از جمله سالمونلوزیس می‌شود (۱). برطبق آخرین طبقه‌بندی جنس سالمونلا دارای دو گونه مهم سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری است که گونه انتریکا خود دارای شش تحت گروه شامل سالمونلا آریزونا، انتریکا، دی‌آریزونا، سالامی، هوتنا و ایندیکا است (۲). سالمونلوز یکی از بیماری های مهم و خطرناک باکتریایی است که انسان و بسیاری از گونه‌های جانوری را تهدید می‌کند. سالمونلوز طیور از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و دام محسوب می‌گردد (۳). سالمونلا انتریکا باکتری مشترک بین انسان و دام است که از طریق زنجیره غذایی منتقل می‌شود (۴). این باکتری یکی از شایع‌ترین علل اسهال و استفراغ است و استفاده نادرست و هضم غذایی که به‌طور کامل پخته نشده در درجه اول باعث عفونت می‌شود. بنابراین پیشگیری و کنترل سالمونلوز در انسان تا حد زیادی براساس کنترل و پیشگیری عفونت در حیوانات است (۵). در مطالعه سلطان دلال و همکاران در شهرستان رباط کریم، سالمونلا به‌عنوان عامل اسهال ۷/۲ درصد از کودکان گزارش گردید (۶). برای درمان بیماری‌های ناشی از سالمونلا از آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌شود؛ اما شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در میان سالمونلاها مشکل اصلی در درمان عفونت‌های سالمونلایی است (۷). از علل افزایش مقاومت

آنتی‌بیوتیکی، مصرف بی‌رویه و کنترل نشده آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و حیوان و کامل نکردن دوره درمان توسط بیماراست که باعث از بین رفتن باکتری‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در برخی از حیوانات مانند جوجه‌های گوشتی و بوقلمون برای افزایش رشد، سبب پیدایش سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک شده است (۸). پلاسمیدهایی که ژن‌های مقاومت نسبت به داروها را حمل می‌کنند؛ براحتی می‌توانند از طریق فرایندهای تبادل ژنی بین گونه‌ها و حتی جنس‌های مختلف باکتریایی انتقال یابند (۹). تولید آنزیم‌های تغییردهنده آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نظیر استرپتومایسین، نئومایسین و کاناماسین و نیز آنزیم‌های بتالاکتامازی مختلف، نمونه هایی از مکانیسم‌های ژنتیکی مقاومت آنتی بیوتیکی با واسطه پلاسمیدها است (۱۰). آنزیم‌های بتالاکتاماز دارای توانایی تجزیه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف نسل سوم مانند سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و داروهای منوباکتام (آزترونام) هستند و بر روی سفامایسین‌ها (سفوکسیتین و سفوتتان) و کرباپنم‌ها (ایموپنم و مروپنم) بی‌اثرند. فعالیت آنها توسط کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌گردد (۸). این آنزیم‌های جدید و وسیع‌الطیف را تحت عنوان ESBLs (Extended Spectrum Beta Lactamases) می‌شناسند. ESBLs به چهار گروه اصلی طبقه‌بندی شده است (۱۱). طبقه‌بندی مولکولار ابتدا توسط Ambler در سال ۱۹۸۰ هنگامی که فقط سکانس چهار اسیدآمینه از بتالاکتامازها شناخته شده بود؛ پیشنهاد گردید. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می شوند. کلاس A شامل پنی‌سیلینازهای کروموزومی در باکتری‌های گرم منفی است که ESBL را نیز در برمی‌گیرد. کلاس C تیپ AmpC را در برمی‌گیرد که سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز نموده و به مهارکننده‌های بتالاکتام مقاوم هستند. کلاس D اگزاسیلینازها (*OXA*) بوده و منشا پلاسمیدی دارند و با کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند و کلاس B متالوبتالاکتامازها هستند که بتالاکتامازهای حاوی روی بوده و در سودوموناس آئروژینوزا و باکتروییدس فراژیلیس یافت می شوند (۸). مصرف غیررویه و بی‌منطق آنتی‌بیوتیک‌ها بدون توجه به الگوهای مقاومتی میکروارگانیسم می‌تواند باعث ظهور سویه‌هایی شود که حتی به درمان‌های جدید مقاومت داشته باشند (۱۲). این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلا انتریکا، مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در طیور انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۷۰ جدایه سالمونلا موجود در کلکسیون میکروبی بخش میکروب شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج در سال ۹۴-۱۳۹۳ مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند.

نمونه های مورد آزمایش در محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار، نوترینت آگار و بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. روز بعد هر تک کلنی خالص سالمونلا در شرایط استریل بر روی محیط‌های TSI، اوره، لایزین، سیترات، MRVP و اندول کشت داده شد و به‌مدت ۷۲ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

برای تعیین و تایید سروار سالمونلا آزمون سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های مونووالان و پلی‌والان براساس جدول کافمن - وایت انجام شد. برای این کار از آنتی‌سرم‌های اختصاصی سالمونلا (شرکت Mast) استفاده گردید (۷).

مطابق استاندارد، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute انجام شد. سوسپانسیونی از تمام ایزوله‌ها در سرم فیزیولوژی معادل نیم مک فارلند تهیه و در محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck Germany) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت Mast برای آنتی‌بیوگرام روی محیط مزبور قرار داده و بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد و با استفاده از استاندارد جهانی (CLSI) به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم تفسیر و گزارش گردید.

تمام جدایه‌ها به منظور تایید تولید ESBL با آزمون CDT (Combined Disk Test) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمون سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند از جدایه‌ها با سرم فیزیولوژی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید (۳۰µg و ۱۰ µg) سفوتاکسیم و سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید (۳۰µg و ۱۰ µg)، سفوپودوکسیم و سفوپودوکسیم/کلاوولانیک اسید (۳۰µg و ۱۰ µg)، سفپیم و سفپیم/کلاوولانیک اسید (۳۰µg و ۱۰ µg) به‌فاصله حداقل (۲/۵ سانتی‌متر) از یکدیگر بر روی محیط اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتیجه با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با

جدول ۱ : مشخصات پرایمر اختصاصی ژن balaCMY2

Target gene	*Primer sequnce*	*Product size*	*References*
-F ʔblaCMY	*5-´CTGCGGAACCGTAATCCAGG-3´*	*≈1004bp*	*Sio et al. 2000*
-R ʔblaCMY	*5-´CGTTATGCTGCGCTCTGCTG-3´*		

قطر هاله دیسک فاقد مهار کننده با در نظر گرفتن استاندارد CLSI، ESBL بودن هر جدایه بررسی گردید (۱۱).

به منظور شناسایی ژنوتیپی جدایه های سالمونلا انتریکا تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ *CMY* با آزمایش PCR، حضور ژن *blaCMY2* در جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت (جدول یک).

در ابتدا DNA تمام سروارهای مورد مطالعه به روش استاندارد فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل استخراج گردید. آزمایش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر از محلول مسترمیکس (شرکت Ampliqon) برای هر نمونه تهیه شد. با روش گرادیانت دمای اتصال مناسب برای پرایمر برای ۳۲ سیکل انجام شد.

یافته‌ها

با توجه به نتایج سروتایپینگ ۷۰ جدایه، بیشترین موارد به *Salmonella typhimurium*، *Salmonella enteritidis*، *Salmonella newport* و *Salmonella infantis* تعلق داشت (جدول ۲).

جدول ۲ : فراوانی سروارهای جدا شده

سروتیپ	تعداد (درصد)
Salmonella typhimurium	۲۹ (۴۱/۴)
Salmonella enteritidis	۱۵ (۲۲)
Salmonella newport	۶ (۸)
Salmonella infantis	۵ (۷)
Salmonella arizona	۲ (۳)
Salmonella gallinarum	۲ (۳)
Salmonella congo	۲ (۳)
Salmonella typhi	۱ (۱/۴)
Salmonella dublin	۱ (۱/۴)
Salmonella II	۱ (۱/۴)
Salmonella muenchen	۱ (۱/۴)
Salmonella dytona	۱ (۱/۴)
Salmonella nigeria	۱ (۱/۴)
Salmonella panama	۱ (۱/۴)
Salmonella urbana	۱ (۱/۴)
Salmonella victeraborg	۱ (۱/۴)

همه ۷۰ جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، افلاکساسین، ایمیپنم، انروفلوکساسین حساس بودند. کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های فلورفنیکل و سفتریاکسون (هر کدام یک درصد) و پیپراسیلین (۳ درصد) مشاهده شد. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین (۹۶درصد)، سفازولین(۹۶درصد)، سفالوتین (۶۵درصد) مشاهده شد و در مراتب بعدی آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین (۶۰درصد)، نیتروفوراتوئین (۳۳درصد)، آموکسی سیلین و تتراسایکلین (۱۷درصد) قرار داشتند (جدول ۳).

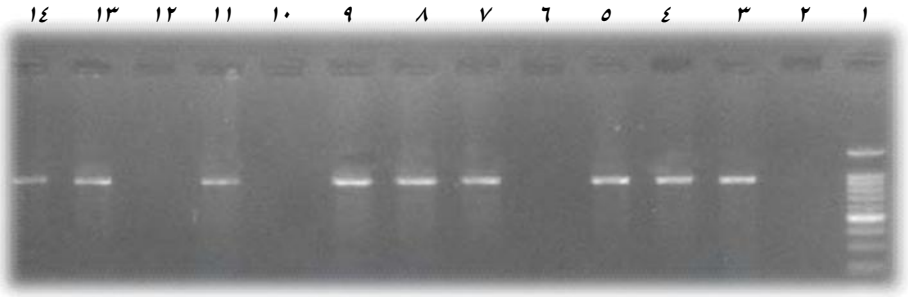
جدول ۳ : فراوانی جدایه‌های مورد آزمون آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک‌ها	تعداد (درصد)		
	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
سفازولین	۶۷ (۹۶)	۱ (۱)	۲ (۳)
سفالکسین	۶۷ (۹۶)	۰ (۰)	۳ (۴)
سفالوتین	۴۶ (۶۵)	۱۸ (۲۷)	۶ (۸)
کلیستین	۴۲ (۶۰)	۵ (۸)	۵۳ (۳۲)
نیتروفورانتوئین	۲۳ (۳۳)	۳ (۵)	۴۴ (۶۲)
آموکسی سیلین	۱۲ (۱۷)	۲۰ (۲۹)	۳۸ (۵۴)
تتراسایکلین	۱۲ (۱۷)	۱۲ (۱۸)	۴۶ (۶۵)
آمیکاسین	۹ (۱۳)	۱۲ (۳۸)	۴۹ (۷۰)
فورازولیدون	۹ (۱۳)	۵ (۸)	۶۵ (۷۹)
کوتریموکسازول	۷ (۱۰)	۰ (۰)	۳۶ (۸۹)
کانامایسین	۵ (۷)	۵ (۸)	۶۰ (۸۵)
کلرامفنیکل	۴ (۶)	۰ (۰)	۶۶ (۹۴)
نئومایسین	۴ (۶)	۳۳ (۴۷)	۳۳ (۴۷)
استرپتومایسین	۴ (۶)	۷ (۱۱)	۹۵ (۸۳)
سفتازیدیم	۳ (۴)	۲ (۴)	۵۶ (۹۲)
سفکسیم	۳ (۴)	۰ (۰)	۷۶ (۹۵)
سفتیزوکسیم	۳ (۴)	۴ (۷)	۳۶ (۸۹)
نالیدیکسیک اسید	۳ (۴)	۶ (۱۰)	۱۶ (۸۶)
پیپراسیلین	۲ (۳)	۲ (۴)	۶۶ (۹۳)
سفتریاکسون	۱ (۱)	۳ (۵)	۶۶ (۹۴)
فلوروفنیکول	۱ (۱)	۴ (۷)	۵۶ (۹۲)
آمپی سیلین	۰ (۰)	۳ (۵)	۷۶ (۹۵)
افلاکساسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۰ (۱۰۰)
ایمی پنم	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۰ (۱۰۰)
جنتامایسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۰ (۱۰۰)
سفوتاکسیم	۰ (۰)	۴ (۷)	۶۶ (۹۳)
سفی پیم	۰ (۰)	۲ (۴)	۸۶ (۹۶)
سیپروفلوکساسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۰ (۱۰۰)
انروفلوکساسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۰ (۱۰۰)

تعیین حساسیت جدایه های مختلف سالمونلاهای جدا شده نشان داد که از میان ۷۰ جدایه سالمونلا، ۵۹ جدایه (۸۴درصد) با داشتن سه مقاومت و یا بیشتر به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، بنا به قاعده به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت‌های چند دارویی مشخص شدند.

۱۰ جدایه به ترتیب با ۱۴ مورد مقاومت (یک جدایه)، ۱۰ مورد مقاومت (۲ جدایه)، ۹ مورد مقاومت (یک جدایه) و ۸ مورد مقاومت (۶ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاوم‌ترین جدایه‌ها تعیین شدند.

با دیسک‌های سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم(CAZ)، سفوپودوکسیم (CPD) و سفپیم (CPM) همراه با دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید، در مجموع ۴۷ جدایه (۶۷درصد) تولید کننده ESBLs تعیین شدند. در این میان ۱۴ جدایه به‌طور همزمان با دو آنتی‌بیوتیک سفپیم CPM و CV/CPM و سفتازیدیم CAZ و CV/CAZ مولد ESBL بودند. همچنین یک نمونه به‌صورت همزمان با سه آنتی بیوتیک سفتازیدیم CAZ و CV/CAZ، سفوپودوکسیم CPD و CV/CPD و سفپیم CPM و CV/CPM مولد ESBL شناخته شدند.



شکل ۱ : قطعات حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر balaCMY2 (قطعاتی با طول تقریبی ۱۰۰٤)
ستون ۱: سایز مارکر (۱۰۰ bp)؛ ستون ۲ : نمونه کنترل منفی؛ ستون ۳ : نمونه کنترل مثبت کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603؛
ستون‌های ۳ و ٤ و ٥ و ۷ و ۸ و ۹ و ۱۱ و ۱۳ و ۱٤ : جدایه‌های balaCMY2 مثبت
ستون‌های ۲ و ٦ و ۱۰ و ۱۲ : جدایه‌های فاقد ژن balaCMY2

نتایج واکنش PCR بر روی جدایه های تولید کننده ESBL با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تعیین حضور ژن *blaCMY2* نشان داد که ۱۷ جدایه حاوی ژن مربوطه (۱۰۰۴ bp) معادل قطعه تکثیر یافته در سویه کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603) هستند (شکل یک). تمام ۱۷ نمونه حاوی ژن *CMY2* با روش‌های فنوتیپی مولد ESBL گزارش گردید.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه سروتیپ های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس، شایع ترین سروتیپ ها تعیین شدند. بیشترین مقاومت به سفالکسین، سفازولین و سفالوتین مشاهده گردید. مقاومت چنددارویی در ۸۴ درصد از جدایه ها تعیین شد. ۶۷ درصد از جدایه ها مولد ESBL بودند. ۳۳/۳۳ درصد از جدایه ها حاوی ژن *balaCMY2* بودند.

سویه‌های ESBL نوع خاصی از مقاومت‌های دارویی هستند که اولین بار در سال ۱۹۸۳ گزارش شدند (۱۳). کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم و سولفامتاکسازول از اولین داروهای ضدمیکروبی بودند که در درمان عفونت‌های سالمونلایی مورد استفاده قرار گرفتند و در اکثر موارد میزان حساسیت in vitro به این داروها با اثرات بالینی آنها مطابقت داشت. به مرور زمان و با ایجاد مقاومت‌های دارویی به‌ویژه مقاومت‌های چندگانه در سالمونلا تیفی و غیرتیفی درمان با مشکل مواجه گردید (۱۴). بتالاکتامازها سیستم‌های دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بخش بالینی مصرف شدند؛ بتالاکتامازها همراه آنها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست آنتی‌بیوتیک‌تراپی ایفا کردند. در ابتدا شیوع آنها در ارگانیسم‌هایی مثل استافیلوکوکوس اورئوس بود که به‌طور معمول مولد آنزیم نبودند و به‌پاتوژن‌هایی نظیر هموفیلوس آنفولانزا و نایسریا گونوره که قبلاً آنزیم را نداشتند؛ گسترش پیدا کرد (۱۵). در مطالعه‌ای حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۶۳ نمونه سالمونلای جدا شده از طیور در منطقه آذربایجان شرقی، بیشترین حساسیت را در مقابل جنتامیسین، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم- سولفامید و بیشترین مقاومت در برابر نیتروفورانتوئین، اریترومایسین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و سفالوتین نشان داده شد (۱۶). در این مطالعه تنها با درنظر گرفتن نتایج حاصل از بررسی جدایه‌های طیور مشخص می‌شود که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم- سولفامی کلرامفنیکل و جنتامایسین در مطالعه حاضر و مطالعه بایرامی و همکاران (۱۶) در حداقل میزان است که در مقایسه با نتایج ما، تنها در آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مشابهت داشت.

در مطالعه حاضر به ترتیب سروارهای تیفی موریوم، انتریتیدیس، نیوپورت و اینفنتیس، بالاترین میزان جدایه ها را به خود اختصاص دادند. در تحقیقی مشابه که در اسپانیا توسط Carraminana انجام شد؛ بیشترین سروارهای جدا شده از طیور را *Newport*، *Hadar*، *Enteritidis*، *Heidelberg*، *Typhimurium* و *Virchow* گزارش گردید (۱۷). در مطالعه دیگری در نپال سروارهای جداشده *Cholorasuis*، *Pullorum*، *Typhi* و *Gallinarum* گزارش شد (۱۸). Ammar و همکاران سروتیپ‌های *Typhimurium* و *Livingstone* را از کلواک ماکیان جدا کردند (۱۹). با توجه به گزارشات فوق می‌توان نتیجه گرفت اختلاف در مناطق جغرافیایی مورد آزمایش می‌تواند نتیجه اختلاف در سروتیپ‌های جدا شده در کشورهای مختلف و از جمله ایران باشد.

در مطالعه Elumalai و همکاران در بررسی سالمونلا، جدایه ها به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، سفالوسپورین (سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفیکسیم و سفپیم) حساس بودند (۲۰). در مطالعه حاضر همه ۷۰ جدایه، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، افلاکساسین، ایمیپنم و انروفلوکساسین حساس بودند.

در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، سفازولین و سفالوتین مشاهده شد و آنتی بیوتیک های فلورفنیکل و سفتریاکسون و پیپراسیلین کمترین تعداد مقاومت را داشتند. همچنین سروار تیفی موریوم شایع‌ترین سالمونلای مقاوم شناخته شد. در مطالعه انجام شده در فرانسه طی سال‌های ۹۵-۱۹۹۴

مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و تتراسیکلین در حد بالایی ارزیابی شد و سروتایپ تیفی موریوم شایع‌ترین سالمونلای مقاوم شناخته شد (۲۱).

در مطالعه حاضر درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین مشاهده نگردید. در حالی که در مقایسه با مطالعه انجام شده در ایتالیا توسط Graziani و همکاران مقاومت سالمونلاهای جداسازی شده از ماکیان به آنتی‌بیوتیک‌ها آمپی‌سیلین (۵۴/۳درصد)، کلرامفنیکل (۲۴/۵درصد)، کانامایسین(۸/۵درصد)، جنتامایسین (۳/۲درصد) و سیپروفلوکساسین (یک درصد) گزارش شد (۲۲). مقایسه این نتایج با یافته‌های مطالعه ما نشان می‌دهد که جدایه‌های این مطالعه از حساسیت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده برخوردار بودند.

در مطالعه حاضر از ۷۰ جدایه مورد مطالعه، ۶۷ درصد جدایه‌ها مولد ESBLs بودند. از این میان یک جدایه به‌صورت همزمان به سه‌آنتی بیوتیک مقاوم بود که این جدایه با آزمون PCR حامل ژن بتالاکتاماز *CMY* بود. ۱۳ جدایه به‌صورت همزمان به دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند که از این میان ۶ جدایه به‌طور همزمان حامل ژن *CMY* بودند. پس از آزمون PCR مشخص شد که ۱۷ جدایه حامل ژن *CMY* بودند. در مقایسه با مطالعه De Gheldre و همکاران بر روی ۱۰۵ سویه سالمونلا مشخص شد که از این میان ۹۶ جدایه (۹۱درصد) از لحاظ حضور ESBL مثبت هستند. از میان تیپ *TEM* در ۷۱ جدایه (۷۲درصد) به‌دست آمد و *SHV* در ۳۱ جدایه (۳۲درصد) جدایه وجود داشت (۲۳). در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، سفازولین و سفالوتین مشاهده شد و نتایج حاصل از آزمون دیسک ترکیبی و PCR نشان از حضور ژن *CMY2* در نمونه‌های مورد بررسی بود. در مطالعه انجام شده Lee و همکاران در کره جنوبی بر روی خوک‌های مبتلا به اسهال مشخص شد سالمونلای جدا شده به آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید، سفالوتین، کلرامفنیکل، فلوروفنیکل، سفوکسیتین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند و همچنین نتایج حاصل از آزمون دیسک ترکیبی و PCR نشان داد حضور ژن *CMY2* عامل مقاومت سالمونلا در برابر عوامل ضدمیکروبی است (۲۴). در مطالعه انجام شده دیگری در سیچوان چین، سالمونلا انتریکا سروتیپ دربی (۴۶ درصد) و تیفی موریوم (۱۰ درصد) به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ‌های جدا شده از طیور بودند که در این میان بالاترین مقاومت نسبت به تتراسایکلین (۷۷ درصد)، سولفامتوکسازول / تری‌متوپریم (۴۳ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۴۱ درصد) و اسپکتینومایسین (۴۱ درصد) بود. آزمون PCR حضور دو ژن *blaOXA* و *blaCMY* را در نمونه‌های سالمونلا جدا شده از طیور نشان داد (۲۵).

نتایج مطالعه ما نشان داد که اکثر سالمونلاهای جدا شده از طیور از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی متنوع بوده و کاهش حساسیت به سفالوسپورین‌های طیف گسترده نگران‌کننده است و برای مبارزه با سالمونلا ناشی از مواد غذایی، یک تهدید جدی برای سلامت عمومی به‌شمار می‌رود.

طی بررسی به‌عمل آمده مطالعه‌ای درخصوص وجود جدایه‌های سالمونلا تیپ *CMY2* در ایران مشاهده نشد و بیشترین مطالعات انجام شده روی این ژن بر روی باکتری *اشریشیا کلی* صورت گرفته است. در مطالعه ممتاز و همکاران توزیع ژن‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از جوجه‌های وارداتی کشته شده در ایران بررسی شد. از مجموع ۳۶۰ نمونه جمع‌آوری شده (۱۵/۸ درصد) *اشریشیا کلی* جداسازی شد. مقاومت به تتراسایکلین در ۵۲/۶ درصد و مقاومت به سولفونامیدها ۴۴/۷ درصد گزارش شد. هیچ ژن شناخته شده مرتبط با مقاومت به استرپتومایسین و سفالوتین یافت نشد. هیچکدام از ژن‌های بتالاکتامازی *balaCMY* شناسایی نشدند (۲۶). در مطالعه ما همه ۱۷ جدایه حاوی ژن *CMY* مرتبط به مقاومت به سفازولین، سفالکسین و سفالوتین بودند.

حضور ژن *CMY* در نمونه‌های طیور نشان‌دهنده ظهور سروارهای حامل این ژن است. سالمونلا یکی از باکتری‌های مولد ESBL از جمله تیپ *CMY* است. با در نظر گرفتن مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ضرورت شناسایی کامل ESBLs توسط آزمایشگاه و نیز شناخت مکانیسم‌های مقاومت آن توسط پزشکان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دارای قدرت ممانعت‌کننده بتالاکتام در کاهش ظهور مقاومت توصیه می‌شود. با توجه به افزایش مقاومت چنددارویی در این باکتری و همچنین افزایش سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و کاهش اثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بایستی در مصرف این آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص سفالوسپورین نسل سوم دقت گردد. همچنین روش‌های فنوتیپی به‌تنهایی در شناسایی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها کافی نبوده و استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی مفید ارزیابی شده است (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت به طیور در ژن *balaCMY2* یافت شد و مصرف غذا با منشا طیور می‌تواند باعث انتقال مقاومت به انسان شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه خانم مریم نادری مزجین برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی مولکولی – میکروبیولوژی از گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی واحد ورامین – پیشوا دانشگاه آزاد اسلامی بود. بدین‌وسیله از همه

مسؤولین و همکاران بخش میکروب‌شناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج که امکانات و هزینه‌های این مطالعه را فراهم نمودند؛ صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Nair S, Lin TK, Pang T, Altwegg M. Characterization of Salmonella serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2346-51.

2. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. J Clin Microbiol. 2000 Jul; 38(7): 2465-67.

3. Moat AG, Foster JW, Spector MP. Microbial Physiology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons. 2002; p: 66.

4. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan; 48(1): 1-14.

5. Rabsch W, Simon S, Humphrey T. Public health aspects of Salmonella infections. In: Barrow P. Salmonella in Domestic Animals. Chap 18. 2nd ed. Wallingford: CAB International. 2013; pp: 351-76.

6. Soltan Dallal MM, Rastegar Lari A, Sharifi Yazdi MK. [Pattern of serotyping and antibiotic resistance of Salmonella in children with diarrhea]. J Gorgan Univ Med Sci. 2014; 16(1): 100-105. [Article in Persian]

7. Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of fecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry Slaughterers. J Antimicrob Chemother. 2001 Jun; 47(6): 763-71. https://doi.org/10.1093/jac/47.6.763

8. Mansouri S, Shareifi S. Antimicrobial resistance pattern of Escherichiacoli causing UTLs: and that of human fecal flora in the southeast of Iran. Microbial Drug Resistance. 2004 Jul; 8(2): 123-28. https://doi.org/10.1089/ 107662902760190662

9. Lay K, Chansong N, Chuanchuen R. Plasmid profiles of multidrug-resistant Escherichia coli from clinically healthy swine. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2012; 42(2): 229-33.

10. Kinzelman J, McLellan SL, Amick A, Preedit J, Scople CO, Olapade O, et al. Identification of human enteric pathogens in gull feces at SouthwestLake Michigan bathing beaches. Can J Microbiol. 2008; 54(12): 1006-15. https://doi.org/10.1139/W08-096

11. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother. 2006 Jul; 58(1): 211-5. doi:10.1093/jac/dkl211

12. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jan; 46(1): 1-11.

13. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.

14. Florijn A, Nijssen S, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Comparison of E test and double disk diffusion test for detection of extended spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Mar; 21(3): 241-43.

15. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1991 Sep; 35(9): 1697-704.

16. Bairami Azar H, Zare P, Ghorbani Choboghlo H, Panahi T, Saeedian A, Afrazeh Y. Isolation of Salmonella Spp from apparently Healthy Ostriches in East Azerbaijan Province. The 13th Iranian and 2nd International Congress of Microbiology. Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. 2012 July 14-16. p: 488. [Abstract]

17. Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in Salmonella serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. Vet Microbiol. 2004 Nov; 104(1-2): 133-39. doi:10.1016/j.vetmic. 2004.08.010

18. Maskey AP, Day JN, Phung QT, Thwaites GE, Campbell JI, Zimmerman M, et al. Salmonella enterica serovar Paratyphi A and S. enterica serovar Typhi cause indistinguishable clinical syndromes in Kathmandu, Nepal. Clin Infect Dis. 2006 May; 42(9): 1247-53. doi:10.1086/503033

19. Ammar A, Alloui N, Bennoune O, Kassah-Laouar A. Survey of Salmonella serovars in broilers and laying breeding reproducers in East of Algeria. J Infect Dev Ctries. 2010 Mar; 4(2): 103-6.

20. Elumalai S, Muthu G, Selvam RE, Ramesh S. Detection of TEM-, SHV- and CTX-M-type β-lactamase production among clinical isolates of Salmonella species. J Med Microbiol. 2014 Jul; 63(Pt 7): 962-67. doi:10.1099/jmm.0.068486-0

21. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 2004 Mar; 42(3): 1089-94.

22. Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Lucarelli C, Owczarek S, Ricci A, et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. Vet Microbiol. 2008 Apr; 128(3-4): 414-18. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.017

23. De Gheldre Y, Avesani V, Berhin C, Delmée M, Glupczynski Y. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2003 Oct; 52(4): 591-97. doi:10.1093/jac/dkg415

24. Lee KE, Lim SI, Choi HW, Lim SK, Song JY, An DJ. Plasmid-mediated AmpC β-lactamase (CMY-2) gene in Salmonellatyphimurium isolated from diarrheic pigs in South Korea. BMC Res Notes. 2014; 7: 329. doi:10.1186/1756-0500-7-329

25. Li R, Lai J, Wang Y, Liu S, Li Y, Liu K, Shen J, Wu C. Prevalence and characterization of Salmonella species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. Int J Food Microbiol. 2013 Apr; 163(1): 14-18. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020

26. Momtaz H, Rahimi E, Moshkelani S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in E. coli isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. Vet Med. 2012; 57(4): 193-97.

27. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008 Mar; 8(3): 159-66. doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0

Original Paper

Antibiotic resistance of *Salmonella enterica* producing Extended-spectrum B-lactamases (ESBLs) type *CMY-2*, in poultry

Maryam Naderi Mozajin (M.Sc)[1], Pejvak Khaki (Ph.D)*[2], Fatemeh Noorbakhsh (Ph.D)[3]

[1]M.Sc in Cellular and Molecular Biology - Microbiology, Department of Microbiology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad Univercity, Varamin-Pishva, Iran. [2]Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad Univercity, Varamin-Pishva, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Salmonella* is one of the most important zoonotic pathogens responsible for food-borne infections all over the world. Poultry products are widely acknowledged to be a significant reservoir for *Salmonella*. This study was done to evaluate the antibiotic resistant of *Salmonella enterica* producer of beta lactamase spectrum in poultry.

Methods: In this descriptive – laboratort study 70 *Salmonella enterica* serotypes were collected from poultry. All *Salmonella* isolates were tested to antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disk diffusion according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Twenty-nine antibiotics were used in this study. *Klebsiella pneumoniae*; ATCC 700603 was used as quality control strains. The isolates were determined to be ESBL-producing *Salmonella* by the conventional double-disk synergy and genotypic method.

Results: Among 70 *salmonella* isolates, the most prevalent serotypes were *S.typhimurium* and *S.enteritidis*. All serotypes were susceptible to gentamicin, ciprofloxacin, oflaxacin, imipenem, enrofloxacin. The common resistance was observed to cephalexin (96%), cefazolin (96%) and cephalotin (65%). Among the 70 *Salmonella* isolates studied, multi-drug resistance was observed in 59 (84%) isolates. Forty-seven (67%) isolates were found to be ESBL-producing isolates. PCR assay of all isolates showed that 17 isolates (33.3%) carried bala *CMY2* gene.

Conclusion: This study showed that antibiotic resistance to *Salmonella enterica* serotypes is due to beta lactamase enzyme in this strain is considerably increased in poultry.

Keywords: *Salmonella enterica*, ESBL, Multi-drug resistant, *Bala CMY2* gene

*** Corresponding Author: Khaki P (Ph.D), E-mail: p.khaki@rvsri.ac.ir**

Received 8 Jan 2017 **Revised** 20 Nov 2017 **Accepted** 17 Dec 2017

Maryam Naderi Mozajin (https://orcid.org/0000-0001-6305-7539), Pejvak Khaki (https://orcid.org/0000-0001-8839-1023)

Cite this article as: Naderi Mozajin M, Khaki P, Noorbakhsh F. [Antibiotic resistance of *Salmonella enterica* producing Extended-spectrum B-lactamases (ESBLs) type *CMY-2*, in poultry]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Summer; 20(2): 109-115. [Article in Persian]