Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The Study of Antibiotic Resistance and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) Encoding Genes in *Acinetobacter baumanni* Isolates from Raw Foodstuffs

Mohammad Moradi[1], Mohammad Reza Arabestani[1], Ghodratollah Roshanaii[2], Mohammad Yousef Alikhani[*3,1]

1. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2. Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3. Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

Article Information

Article history:
Received: 2017/09/17
Accepted: 2018/11/19
Available online: 2018/12/22

Article Subject:
Antibiotic Resistance

IJMM 2018; 12(5): 329-337

Corresponding author:

Mohammad Yousef Alikhani
Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email:
alikhani43@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Pharmaceutical residuals like antibiotics in livestock products and their consumption by humans from food chain can lead to the spread of bacteria resistant to antibiotics. The aim of the current study was to investigate antibiotic resistance and determine the prevalence rate of genes encoding extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) in *Acinetobacter* strains isolated from raw foodstuffs.

Materials and Methods: In this study, 300 samples from protein foodstuffs (mutton, beef, chicken, hamburger, hot dog, sausages) and dairy foodstuffs (raw milk and cheese) were prepared and investigated in terms of contamination with *Acinetobacter baumannii* from July 2015 to November 2016. The isolated bacteria were identified by biochemical tests to species level and confirmed by the PCR technique via *blaOXA-51* gene. Antibiotic resistance of the isolates was studied using the diffusion disc method. Also, the presence of ESBLs enzymes in the isolates wa s done phenotypically and genetically through PCR and combined disk tests.

Results: The results showed that 43 strains of *A. baumannii* were isolated from the protein and dairy foodstuffs, 93% from protein foodstuffs and 7% from dairy foodstuffs. Also, 30% of the isolates had multidrug- resistance (MDR). Further, the findings of PCR illustrated that the prevalence of genes encoding ESBLs in the isolates were: *TEM* 21%, *PER* 23.5%, *VEB* 18.5% *and SHV*35%.

Conclusions: Foodstuffs can act as a food source for *A. baumannii* that can lead to transferring and spreading genes encoding antibiotic resistance to humans.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic resistance ،Extended-Spectrum Beta-Lactamase

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Moradi M, Arabestani M R, Roshanaii G, Alikhani M Y. The Study of Antibiotic Resistance and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) Encoding Genes in Acinetobacter baumanni Isolates from Raw Foodstuffs . Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :329-337

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۲ ـ شماره ۵ ـ آذر ـ دی ۱۳۹۷
Journal homepage: www.ijmm.ir
مقاله پژوهشی

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان شیوع ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از موادغذایی خام

محمد مرادی[۱]، محمدرضا عربستانی[۱]، قدرت‌الله روشنایی[۲]، محمدیوسف علیخانی[۱،۳*]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱
موضوع:
مقاومت پادزیستی (آنتی بیوتیکی)
IJMM1397;12(5): 329-337

نویسندهٔ مسئول:
محمدیوسف علیخانی
مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

پست الکترونیک:
alikhani43@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: وجود باقیمانده‌های مواد دارویی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های دامی و مصرف آن به‌دست انسان از طریق زنجیرهٔ غذایی، باعث گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین میزان شیوع ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله‌شده از موادغذایی خام است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه از موادغذایی پروتئینی (گوشت گوسفند، گاو، مرغ، همبرگر، سوسیس، کالباس) و مواد لبنی (شیر و پنیر) از آبان۱۳۹۴ تا تیر۱۳۹۵ تهیه و از نظر آلودگی به *اسینتوباکتر بومانی* بررسی شد. باکتری‌های جداشده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تا سطح گونه تعیین هویت و با تکنیک PCR با ردیابی ژن *blaOXA-51* تأیید نهایی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک‌دیفیوژن بررسی شده و حضور آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در این ایزوله‌ها به‌صورت فنوتیپی و ژنوتیپی با روش‌های Combined Disk Test و PCR مطالعه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که تعداد ۴۳ سویهٔ *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌های موادغذایی پروتئینی و لبنی خام ایزوله شد که ۹۳درصد سویه‌ها از موادغذایی پروتئینی و ۷درصد سویه از موادغذایی لبنی جدا شده است. میزان ۳۰درصد از ایزوله‌ها مقاومت چندگانه داشتند. همچنین نتایج PCR مشخص کرد که شیوع ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* شامل ۳۵درصد *SHV*، ۲۱درصد *TEM*، ۲۳/۵درصد *PER* و ۱۸/۵ درصد *VEB* است.

نتیجه‌گیری: موادغذایی خام می‌تواند به‌عنوان منبع *اسینتوباکتر بومانی* عمل کند و درنتیجه باعث انتقال و انتشار ژن‌های کدکنندهٔ مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان باشد.

کلمات کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مصرف غذا امکان انتقال بسیاری از پاتوژن‌ها (باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها) را به بدن انسان فراهم می‌سازد (۱). همچنین وجود باقی‌مانده‌های مواد دارویی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در فراورده‌های دامی و مصرف آن توسط انسان از طریق زنجیرهٔ غذایی، باعث بروز واکنش‌هایی نظیر آلرژی، تب، اسهال، گرفتگی ماهیچه‌های شکمی، اثرات مخرب بر متابولیسم مواد در دستگاه گوارش می‌شود که طی آن ژن‌های کدکنندهٔ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از فلور میکروبی دام به پاتوژن‌های انسانی انتقال می‌یابند. انتشار این پاتوژن‌ها از این طریق به دغدغهٔ اصلی بهداشت عمومی تبدیل شده است (۲). انواع زیادی از میکروارگانیسم‌ها یا توکسین‌های آنان با مکانیسم‌های مختلف در ایجاد بیماری‌های منتقله از غذا نقش دارند. باکتری‌ها بیشترین موارد بیماری را سبب شده و به‌دنبال آن ویروس‌ها و انگل‌ها قرار دارند. از میان بیماری‌های باکتریایی منتقله از طریق موادغذایی می‌توان به بوتولیسم، کامپیلوباکتریوزیس، عفونت اشریشیاکلی، سالمونلوزیس و شیگلوزیس اشاره کرد (۳). *اسینتوباکتر بومانی*،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

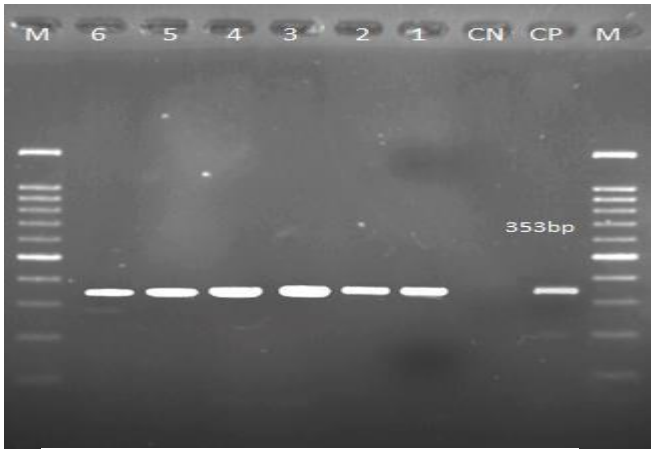
کوکوباسیل گرم منفی، اکسیداز منفی غیرمتحرک و هوازی اجباری است که می‌توان آن را از موادغذایی جدا کرد. گونه‌های متعلق به این جنس، پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که مسبب بروز عفونت‌های ناشی از قرارگیری در محیط‌های جمعی و عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه در بیماران بستری‌شده در بخش مراقبت‌های ویژه هستند (۴-۷). *اسینتوباکتر بومانی* علاوه بر اینکه دارای طیف وسیعی از مقاومت ذاتی است، توان دستیابی به مکانیسم‌های جدیدتر و مقاومت به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان را دارد (۸-۱۰). جداسازی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به اکثر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها نشان‌دهندهٔ تشابه ژنتیکی این ایزوله‌ها است (۱۱،۱۲). پس می‌توان انتظار داشت که زنجیرهٔ غذایی می‌تواند نقش مهمی در انتشار پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته باشد (۱۳). حضور طیف گسترده‌ای از ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) در باکتری‌ها، یکی از عوامل عمدهٔ نگرانی در سلامت جهانی است. یکی از دلایل اصلی اینکه چرا *اسینتوباکتر بومانی* توجه فراوانی را در عرصهٔ بالین و موادغذایی به خود جلب کرده، همین توانایی شگفت‌انگیز آن برای به‌دست‌آوردن و انتشار ژن‌های مقاومتی است که نتیجهٔ آن مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد شد. اگر حداقل به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشد (MDR) و اگر علاوه بر سه کلاس آنتی‌بیوتیکی به کاربانم ها نیز مقاوم باشد، به‌عنوان (XDR) خواهد بود (۱۴). لذا هدف از این مطالعه، بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین شیوع ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی ایزوله‌شده از موادغذایی خام است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از آبان ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵ تعداد ۲۳۰ نمونه از موادغذایی پروتئینی شامل ۲۵ نمونه گوشت گوسفند، ۲۵ نمونه گوشت گاو، ۱۰۸ نمونه گوشت مرغ، ۲۴ نمونه همبرگر، ۲۴ نمونه سوسیس، ۲۴ نمونه کالباس و ۷۰ نمونه از مواد لبنی شامل ۵۰ نمونه شیر محلی و ۲۰ نمونه پنیر از سطح شهر همدان در فواصل زمانی مختلف تهیه و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی انتقال داده شد. حدود ۲۵ گرم از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از گوشت و سایر موادغذایی را در ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB براث به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور شیکردار قرار داده و سپس ۱۰ میکرولیتر از این محیط را روی محیط مکانکی آگار و بلادآگار کشت و پلیت‌ها در حرارت ۳۷ درجهٔ سلسیوس، به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کلنی‌ها شناسایی و تعیین هویت شد.

شناسایی باکتری

سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* ایزوله‌شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، مانند حرکت، سیمون سیترات، TSI، SIM، کاتالاز و اوره‌آز و کشت روی محیط OF حاوی قند گلوکز و رشد در دمای ۴۴-۴۲ درجهٔ سلسیوس بررسی و تعیین‌هویت‌شده و با ردیابی ژن *blaOXA-51* (شکل ۱) که در سویه‌های *اسینتوباکتربومانی* وجود دارد، تأیید شدند (۱۵،۱۶). به‌منظور انجام آزمون‌های تکمیلی نمونه‌های باکتریایی به محیط کشت BHI Broth حاوی ۱۸درصد گلیسرول تلقیح و در دمای ۷۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد.



شکل ۱. الکتروفورز ژن **blaOXA-51** با باندهای **bp** ۳۵۳ در اسینتوباکتربومانی، مارکر **bp DNA ۱۰۰**

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمون آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد انتشار دیسک (Kirby Bauer) بر محیط مولرهینتون آگار (Merck, Germany) انجام و براساس استانداردهای CLSI سال ۲۰۱۴ تفسیر شد (۱۷). در این بررسی از ۲۰ دیسک مختلف آنتی‌بیوتیکی (شرکت هایمدیا، هند) استفاده شد. از *E.coli*ATCC 25922 نیز براساس پروتکل CLSI به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد و برای تأیید مقاومت به کلیستین بعد از روش دیسک دیفیوژن سویه‌های مقاوم با روش حداقل غلظت مهاری طبق پروتکل CLSI تأیید شدند.

Combined Disk Test (CDT)

برای انجام این آزمون، باکتری‌ها بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و دیسک‌های سفوتاکسیم (30µg)/ سفوتاکسیم +

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

اسید کلاولانیک (30µg+10µg) و سفتازیدیم (30µg)/ سفتازیدیم+ اسید کلاولانیک (30µg+10µg) (شرکت mast انگلستان) با فاصلهٔ ۱۵ میلی‌متر از لبهٔ پلیت روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد و پس از ۱۸ ساعت، قطر هالهٔ رشدنیافتگی اندازه‌گیری شد. چنانچه هالهٔ رشدنیافتگی در دیسک‌های ترکیبی حاوی اسید کلاولانیک نسبت به حالت بدون اسید کلاولانیک، ۵ میلی‌متر یا بیشتر بود، به‌معنای مثبت‌شدن این تست و تأیید تولید ESBL در نظر گرفته می‌شد (۱۸).

استخراج DNA

استخراج DNA به روش جوشاندن (boiling) انجام گرفت. ابتدا ایزوله‌های تعیین‌هویت‌شده زیر هود میکروبیولوژی با استفاده از لوپ استریل مقداری از باکتری برداشته و در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل داخل یک ویال اپندرف ۱/۵ سی‌سی مخلوط و یک سوسپانسیون تهیه و سپس آن را ورتکس کرده تا سوسپانسیون یکنواختی تهیه شود. سپس ویال به‌مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ (rpm)۸۰۰ قرار می‌دهیم و بعد از اتمام این عمل، مایع رویی را دور ریخته و این عمل شست‌وشو سه بار تکرار می‌شود. بعد از آخرین مرحلهٔ شست‌وشو و دورریختن محلول رویی، ۱۰۰mL از محلول NaOH ۵۰ میلی‌مولار روی رسوب ریخته و ورتکس می‌کنیم و در بن ماری ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار می‌دهیم؛ سپس ویال را از بن ماری خارج و بعد از مقداری خنک‌شدن، ۵۰mL از Tris20mM به ویال اضافه و بعد ورتکس می‌کنیم تا یکنواخت شود و سپس ویال را در سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور (rpm)۱۲۰۰۰ قرار می‌دهیم. بعد از اتمام این مرحله، به‌دقت و به‌آرامی مقدار ۱۰۰mL مایع رویی که حاوی DNA استخراج شده است، برداشته و در داخل میکروتیوپ استریل می‌ریزیم. تا زمان انجام PCR، DNA استخراج‌شده در دمای منفی ۲۰ نگهداری شد (۱۹).

تکثیر ژن‌های مدنظر به روش PCR

از ژن *blaOXA-51* (شکل ۱) به‌عنوان تأیید ژن داخلی استفاده شد. برای تکثیر ژن‌های بتالاکتاماز *SHV*، *TEM*، *PER*، *VEB* از پرایمرهای جدول (۱) استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µL شامل ۱۰µL مس ترمیکس (شرکت Ampliqon)، DNA۲µL، ۱µL از هر پرایمر ۱۰pmol، ۱۱µL آب مقطر در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به‌کاررفته در PCR

منبع	دمای اتصال (°C)	اندازهٔ باند(bp)	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	پرایمر
۲۰	۵۰	۳۷۰	5-GAAACAACTTTGACGATTGA-3 5-CCCTGTTTTATGAGCAACAA-3	*F-VEB* *R-VEB*
۲۱	۵۰	۹۲۰	5-ATGAATGTCATTATAAAAGC-3 5-AATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3	*F-PER* *R-PER*
۲۲	۵۴/۲	۲۹۳	5-CGCCTGTGTATTATCTCCCT-3 5-CGAGTAGTCCACCAGATCCT-3	*SHV- F* *SHV- R*
۲۲	۵۷/۷	۴۰۳	5-TTTCGTGTCGCCCTTATTCC-3 5-ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG-3	*TEM-F* *TEM-R*
۲۳	۵۲	۳۵۳	5-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3 5-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3	*OXA-51 F* *OXA-51 R*

یافته‌ها

نتایج نشان می‌دهد که تعداد ۴۳ (۱۴/۵درصد) جدایهٔ *اسینتوباکتر بومانی* در ۳۰۰ نمونه موادغذایی یافت شد. از ۱۰۸ نمونه گوشت مرغ ۳۱ (۲۸/۵درصد) جدایه، از ۲۵ نمونه گوشت گوسفند ۴ (۱۶درصد) جدایه، از ۲۵ نمونه گوشت گاو ۲ (۸درصد) جدایه، از ۲۴ نمونه همبرگر ۲ (۸/۵درصد) جدایه، از ۲۴ نمونه سوسیس ۱ (۴درصد) جدایه و از ۵۰ نمونه شیر ۳ (۶درصد) جدایهٔ *اسینتوباکتر بومانی* جدا شد. درضمن از نمونه‌های کالباس و پنیر محلی هیچ سویه‌ای جدا نشد.

نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی

بین ۴۳ سویهٔ *اسینتوباکتر بومانی*، مقاومت به سفتیزوکسیم، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و سفکسیم (۱۰۰درصد)، سفالوتین

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

(۸۶درصد)، سفتازیدیم (۴۲درصد)، تیکارسیلین (۳۲/۵۰درصد)، کلیستین (۲۳/۵۰درصد) مشاهده شد (جدول ۱). مقاومت به نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین فقط در ایزوله‌های همبرگر و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به تتراسایکلین فقط در ایزوله‌های گوشت مرغ مشاهده شد. مقاومت به کلیستین در سویه‌های ایزوله‌شده از نمونه‌های همبرگر، گوشت گاو، گوشت گوسفند و بیشترین مقاومت مربوط به ۷ (۱۶/۵۰درصد) ایزوله گوشت مرغ بود. مقاومت به تیکارسیلین حداقل در یک نمونه از همه نوع موادغذایی دیده شد، ولی در نمونه گوشت مرغ ۹ (۲۱درصد) دیده شد. مقاومت سفتازیدیم در نمونهٔ گوشت مرغ ۱۴ (۳۲/۵۰درصد)، در نمونهٔ گوشت گوسفند ۲ (۴/۵۰درصد) و در نمونه‌های گوشت گاو و همبرگر هرکدام ۱ (۲/۵۰درصد) دیده شد. مقاومت به توبرامایسین و ایمی‌پنم مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲. توزیع فراوانی الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی ۴۳ سویه *اسینتوباکتر بومانی* جداشده از موادغذایی خام

آنتی‌بیوتیک	حساس (%) NO	حد واسط (%) NO	مقاوم (%) NO
ایمی‌پنم (10µg)	۴۳ (۱۰۰)	۰	۰
تیکارسیلین (30µg)	۰	۲۹ (۶۷/۵۰)	۱۴ (۳۲/۵۰)
سیپروفلوکساسین (30µg)	۴۰ (۹۳)	۲ (۴/۵۰)	۱ (۲/۵۰)
تری متوپریم-سولفامتوکسازول (23.75.1.25µg)	۳۵ (۸۱/۵۰)	۶ (۱۴)	۲ (۴/۵۰)
توبرامایسین (10µg)	۴۱ (۹۵/۵۰)	۲ (۴/۵۰)	۰
جنتامایسین (30µg)	۳۸ (۸۸/۵۰)	۳ (۷)	۲ (۴/۵۰)
سفتریاکسون (30µg)	۱ (۲/۵۰)	۳۶ (۸۳/۵۰)	۶ (۱۴)
سفوتاکسیم (30µg)	۰	۳۸ (۸۸/۵۰)	۵ (۱۱/۵۰)
سفتازیدیم (30µg)	۶ (۱۴)	۱۹ (۴۴)	۱۸ (۴۲)
سفی پیم (30µg)	۳۳ (۷۶/۵۰)	۶ (۱۴)	۴ (۹/۵۰)
کلرامفنیکل (30µg)	۰	۰	۴۳ (۱۰۰)
آمپی‌سیلین (10µg)	۰	۰	۴۳ (۱۰۰)
تتراسایکلین (30µg)	۴۱ (۹۵)	۱ (۲/۵۰)	۱ (۲/۵۰)
پلی‌میکسین B(30µg)	۳۷ (۸۶)	۰	۶ (۱۴)
نورفلوکساسین (10µg)	۴۲ (۹۷/۵۰)	۰	۱ (۲/۵۰)
افلوکساسین (5µg)	۴۲ (۹۷/۵۰)	۰	۱ (۲/۵۰)
کلیستین (10µg)	۳۳ (۷۶/۵۰)	۰	۱۰ (۲۳/۵۰)
سفکسیم (5µg)	۰	۰	۴۳ (۱۰۰)
سفالوتین (30µg)	۰	۶ (۱۴)	۳۷ (۸۶)
سفتیزوکسیم (30µg)	۰	۰	۴۳ (۱۰۰)

نتایج Combined Disk Test (CDT)

از ۴۳ سویهٔ *اسینتوباکتر بومانی* هیچ سویهٔ با روش CDT به‌عنوان ESBL مثبت مشاهده نشد.

نتایج تکثیر ژن‌های بتالاکتاماز (ESBLs):

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که شیوع ژن‌های بتالاکتاماز (ESBLs) در سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله‌شده

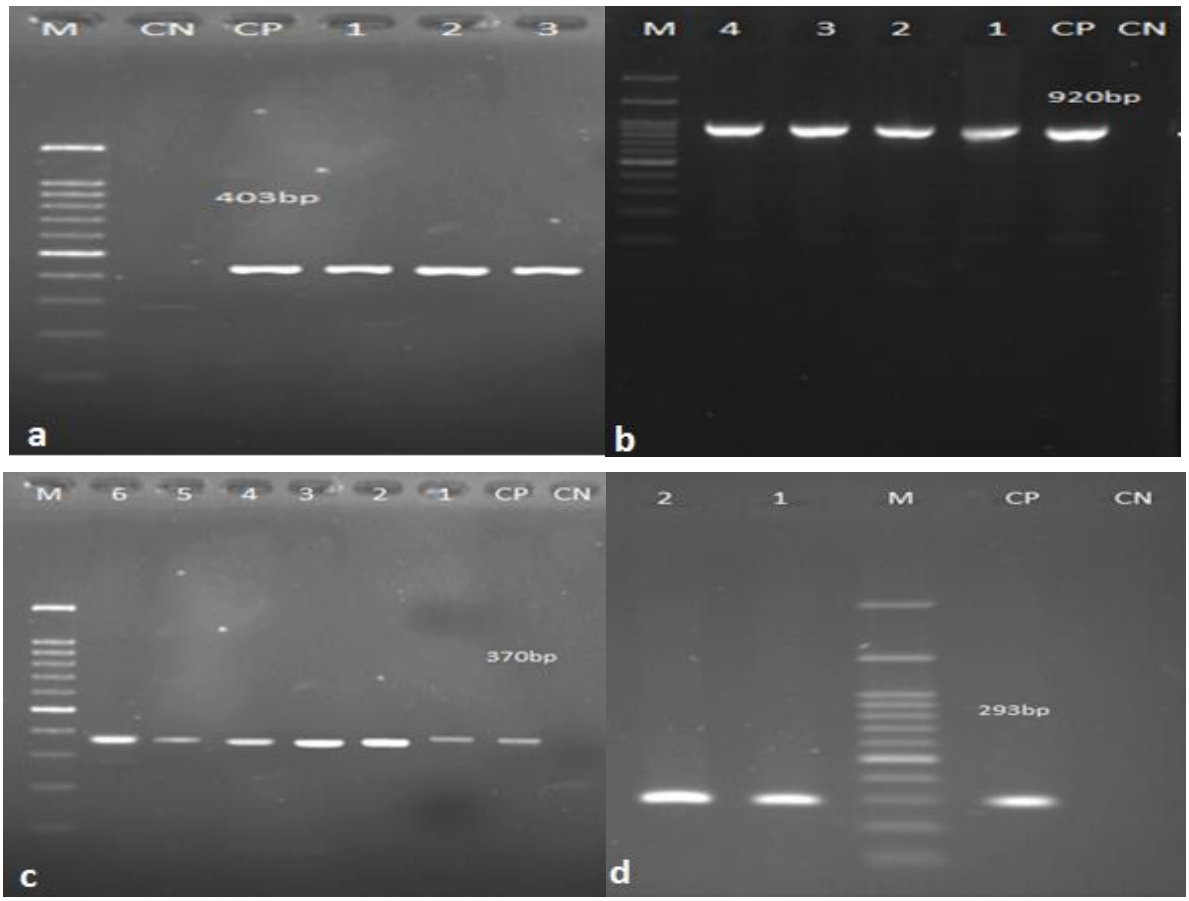
www.SID.ir

Archive of SID

از موادغذایی شامل SHV ۱۵ (۳۵درصد)، *TEM* ۹ (۲۱درصد)، *PER* ۱۰ (۲۳/۵ درصد)، *VEB* ۸ (۱۸/۵درصد) (شکل ۲) هستند. درصد شیوع ژن‌های مدنظر در سویه‌های ایزوله‌شده از نمونه‌های گوشت مرغ، گاو، گوسفند، همبرگر، سوسیس و شیر در جدول (۳) آورده شده است.

جدول ۳. نتایج PCR ژن‌های بتالاکتاماز در سویه‌های ایزوله‌شده از نمونه‌های موادغذایی

نمونه	VEB No (%)	PER No (%)	TEM No (%)	SHV No (%)
گوشت مرغ	۶ (۱۹/۵)	۷(۲۲/۵)	۸(۲۶)	۱۱(۳۵/۵)
گوشت گاو	۰	۰	۰	۰
گوشت گوسفند	۰	۲(۵۰)	۱(۲۵)	۰
همبرگر	۰	۰	۰	۲(۱۰۰)
سوسیس	۰	۰	۰	۰
شیر	۲(۶۶/۵)	۱ (۳۳/۵)	۰	۲(۶۶/۵)



شکل ۲. a الکتروفورز ژن TEM با باندهای ۴۰۳bp، b الکتروفورز ژن PER با باندهای 920 bp، c الکتروفورز ژن VEB با باندهای ۳۷۰ bp، d الکتروفورز ژن SHV با باندهای 293 bp در اسینتوباکتربومانی، مارکر DNA ۱۰۰ bp

www.SID.ir

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه یکی از راه‌های انتقال مقاومت دارویی، از طریق مصرف موادغذایی آلوده به باکتری‌ها است. مطالعهٔ حاضر نشان داد که (۱۷/۵درصد) از نمونه‌های موادغذایی پروتئینی و (۴/۵درصد) از موادغذایی لبنی آلوده به *اسینتوباکتر بومانی* بود. اگرچه گوشت مرغ (۲۸/۵) درصد و گوشت گوسفند (۱۶) درصد بیشترین آلودگی را داشتند، ولی آلودگی نمونه‌های گوشت گاو (۸) درصد، همبرگر (۸/۵) درصد، سوسیس (۴) درصد و شیر (۶) درصد را نمی‌توان نادیده گرفت؛ چراکه خطراتی برای بهداشت عمومی دارد. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به کلیستین (۲۳/۵درصد)، سفوتاکسیم (۱۱/۵درصد)، سفی‌پیم (۹/۵درصد)، جنتامایسین (۴/۵درصد) و سیپروفلوکساسین (۲/۵درصد) مشاهده شد. درحالی‌که در مطالعهٔ انجام‌شده از سوی M. Gurung و همکاران روی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از ۲۲۸۷ مخزن شیر، ۵۷ (۳۲/۴درصد) سویهٔ *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله کرد و هیچ‌کدام از این ایزوله‌ها نسبت به سفی‌پیم، ایمی‌پنم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین یا کلیستین مقاوم نبود؛ ولی به جنتامایسین (۷/۴درصد) و به سفوتاکسیم (۴درصد) مقاوم بود که مقاومت در این مطالعه نسبت به مطالعهٔ ما پایین‌تر بود (۲۴). در مطالعه‌ای که Lupo A و همکاران روی ۲۴۸ نمونه گوشت در سوئیس انجام دادند، مشخص شد که یک‌چهارم این نمونه‌ها آلوده به *اسینتوباکتربومانی* بوده و از بین نمونه‌های موردمطالعه بیشترین آلودگی مربوط به گوشت مرغ بود و اغلب ایزوله‌های *اسینتوباکتر* از نمونه‌های ذکرشده به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج بالینی حساس بودند. با این حال تعداد کمی از ایزوله‌ها نسبت به کلیستین (۵درصد)، سیپروفلوکساسین (۲/۵درصد)، تتراسایکلین (۵درصد) و سفتازیدیم (۲/۵درصد) مقاوم بودند. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه با پژوهش کنونی مغایرت داشت که نشان می‌دهد میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف الگوهای خاصی دارد (۲۵). مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که مقاومت به تتراسایکلین (۲/۵درصد)، سفتازیدیم (۴۲درصد)، پلی‌میکسین B (۱۴درصد)، تری‌متوپریم ـ سولفامتوکسازول (۴/۵درصد) است. ولی در مطالعهٔ Carvalheira و همکاران از پنجاه نمونه گوشت (مرغ، بوقلمون، گوشت گاو و گوشت خوک) ۱۶۶ سویه *اسینتوباکتر* ایزوله شد که از این تعداد ۳۱ (۱۸/۷درصد) سویه *اسینتوباکتر بومانی* بود که درصد مقاومت انواع سویه‌های مختلف *اسینتوباکتر* به انواع آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان مثل سفتازیدیم (۴۳/۵۰درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۲/۹درصد) و همچنین کلیستین (۴۱/۷درصد) و پلی‌میکسین B (۳۵/۱درصد)، مقاومت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، تتراسایکلین، آمینوگلیکوزیدها (آمیکاسین و توبرامایسین) و آمپی‌سیلین سولباکتام به‌ترتیب بیشتر از ۱۰درصد (۲۳/۲درصد، ۲۳/۲درصد، ۱۴/۳درصد، ۱۲/۵درصد، ۱۲/۵درصد) بود. ۵۱/۲درصد سویه‌ها MDR و ۹/۶درصد XDR بودند (۲۶). مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به سفالوتین، سفتریاکسون، افلوکساسین و نورفلوکساسین، نشان می‌دهند که الگوی مقاومت چند داروی (MDR) در میان سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* ۳۰درصد است. بیشترین میزان مقاومت، در یک سویه با ۱۳ آنتی‌بیوتیک و در دو سویه با ۱۰ آنتی‌بیوتیک و کمترین مقاومت به ۶ آنتی‌بیوتیک گزارش شد. این نتایج می‌تواند نگرانی به‌دنبال داشته باشد؛ چراکه برخی از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان نمونه‌های کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یافته‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه با مطالعات مشابهی که در بالا ذکر شده‌اند نتایج متفاوتی داشت که دلیل این تفاوت‌ها می‌تواند شرایط جغرافیایی و سطح بهداشت و مصرف بی‌رویه برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دام‌پروری و استفادهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف در کلینیک است. همچنین یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میزان شیوع ژن‌های بتالاکتاماز (ESBL) در موادغذایی *SHV* (۳۵درصد)، *PER* (۲۳/۵درصد)، *TEM* (۲۱درصد)، *VEB* (۱۸/۵درصد) چشمگیر بوده که در گوشت مرغ شیوع ژن‌های *SHV* (۳۵/۵۰درصد)، *TEM* (۲۶درصد)، *PER* (۲۲/۵۰درصد)، *VEB* (۱۹/۵۰درصد) و در گوشت گوسفند شیوع ژن‌های *PER* (۵۰درصد)، *TEM* (۲۵درصد) و در همبرگر شیوع ژن‌های *SHV* (۱۰۰درصد) مشاهده شد. در باکتری‌های جداشده از شیر، شیوع ژن‌های *SHV* (۶۶/۵۰درصد)، *VEB* (۶۶/۵۰درصد)، *PER* (۳۳/۵۰درصد) گزارش شد. درمجموع این مقاله بیان می‌کند که موادغذایی پروتئینی و لبنی خام موجود در بازار می‌تواند منبع *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به انواع کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی باشد و به انتشار ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از طریق زنجیرهٔ غذایی نیز کمک کند و از این طریق می‌تواند باعث انتقال به بیمارستان و محیط شود. برای کنترل انتقال باکتری‌های فرصت‌طلب و جلوگیری از توسعهٔ ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید سطح بهداشت در جامعه افزایش پیدا کند و مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها در دام و طیور به‌صورت برنامهٔ مدون به اجرا درآید؛ چراکه موادغذایی پروتئینی و لبنی و مشتقات آنها برای تغذیهٔ انسان بسیار مهم است؛ لذا کنترل و نظارت بر آماده‌سازی، حمل‌ونقل و اصول نگهداری سالم موادغذایی ضروری است.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

از کارمندان و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان که ما را در اجرای این تحقیق صمیمانه یاری داده‌اند، نهایت سپاسگزاری را داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

References

1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases—the challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. International journal of food microbiology. 2010; 139: 3-15. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021
2. Myllyniemi A-L. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food and Environmental Hygiene. 2004; ISBN 952-10-2048-2.
3. Fadaei A, Jamshidi E, Kheiri S. Comparison of bacterial contamination of raw and pasteurized milk used in Shahrekord in 2006. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2008; 10(2): 37-44.
4. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou M-L. Reservoirs of Acinetobacter baumannii outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. International Journal of Infectious Diseases. 2013; 17(10): e802-e805. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.021
5. Oh YJ, Song SH, Baik SH, Lee HH, Han IM, Oh DH. A case of fulminant community-acquired Acinetobacter baumannii pneumonia in Korea. Kjim. 2013; 28(4): 486–90. https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.486
6. Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park K-H, Jang H-C. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant Acinetobacter infections. Cmj. 2014; 50(2): 37-44. https://doi.org/10.4068/cmj.2014.50.2.37
7. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. Adv drug deliver rev. 2014; 78: 3-13. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.003
8. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nature Reviews Microbiology. 2007; 5(12): 939-51.https://doi.org/10.1038/nrmicro1789
9. Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection. New England Journal of Medicine. 2008; 358(12): 1271-81. https://doi.org/10.1056/NEJMra070741
10. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 59(6): 1210-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkl509
11. Decker BK, Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Hall GS, Jacobs MR, et al. Longitudinal analysis of the temporal evolution of Acinetobacterbaumannii strains in Ohio, USA, by using rapid automated typing methods. PloS one. 2012; 7(4): e33443. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033443
12. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. Int j antimicrob agents. 2013; 41(1): 11-19. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008
13. Seiffert SN, Tinguely R, Lupo A, Neuwirth C, Perreten V, Endimiani A. High prevalence of extended-spectrum-cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in poultry meat in Switzerland: emergence of CMY-2-and VEB-6-possessing Proteus mirabilis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013; 57(12): 6406-8.
14. Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from Serbia: Revision of CarO classification. PloS one. 2015; 10(3): e0122793. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122793
15. Visca P, Seifert H, Towner KJ. Acinetobacter infection–an emerging threat to human health. IUBMB life. 2011; 63(12): 1048-54. https://doi.org/10.1002/iub.534
16. Hausler WJ, Sussman M, Topley WWC, Wilson SGS. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacterial Infections. Arnold. 1998.
17. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth informational supplement, M100-S24. CLSI. 2014; 34(1).

www.SID.ir

Archive of SID

18. CLSI N. Clinical and Laboratory Standard Institute: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved standard. M2-A9 9th edition Wayne: CLSI, NCCLS. 2006.

19. Taris N, Baron S, Sharbel T, Sauvage C, BoudryP. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Aquaculture research. 2005; 36(5): 516-18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01208.x

20. Farajnia S, Azhari F, Alikhani MY, Hosseini MK, Peymani A, Sohrabi N. Prevalence of PER and VEB type extended spectrum betalactamases among multidrug resistant Acinetobacter baumannii isolates in North-West of Iran. Iranian journal of basic medical sciences. 2013; 16(6): 751.

21. El-Shazly S, Dashti A, Vali L ,Bolaris M, Ibrahim AS. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of Acinetobacter baumannii. International Journal of Infectious Diseases. 2015; 41: 42-9. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.016

22. Bali EB, Accedil L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(8): 650-4.

23. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. International journal of antimicrobial agents. 2006; 27(4): 351-3 https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004.

24. Gurung M, Nam H, Tamang M, Chae M, Jang G , Jung S, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter from raw bulk tank milk in Korea. Journal of dairy science. 2013; 96(4): 1997-2002.

25. Lupo A, Vogt D, Seiffert SN, Endimiani A, Perreten V. Antibiotic resistance and phylogeneticcharacterization of Acinetobacter baumannii strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. Journal of food protection. 2014; 77(11): 1976-81. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-073

26. Carvalheira A, Casquete R, Silva J, Teixeira P. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter spp. isolated from meat. International journal of food microbiology. 2017; 243: 58-63. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.001

Downloaded from ijmm.ir at 13:49 +0330 on Sunday March 10th 2019

www.SID.ir