Archive of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۴، شماره ۱۶۴، بهمن ۱۳۹۶ http://rjms.iums.ac.ir مقاله پژوهشی

بررسی ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به جنتامایسین جداشده از گوشت‌های قرمز مصرفی

***رضوان شیروانی:** گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران (*نویسنده مسئول). r.shirvani1368@gmail.com
الهه مدنی پور: گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. elamadani20@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *انتروکوک‌ها*، بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان را تشکیل می‌دهد که توانمندی بالایی در کسب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک دارند. استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های کشاورزی و صنایع غذایی منجر به انتشار ژن‌های مقاومت در باکتری‌های پاتوژن و فلور طبیعی، انتقال به انسان و نیز ایجاد بیماری می‌شود که یک تهدید جدی برای بهداشت و سلامت انسان است. هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن *bla CTX-M* در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به جنتامایسین جدا شده از گوشت‌های قرمز مصرفی می‌باشد.

روش‌کار: در این مطالعه‌ی مقطعی، ۱۹۰ نمونه *انتروکوکوس* از گوشت‌های قرمز کشتارگاه شهرستان بروجرد جمع‌آوری و ۹۰ سویه *انتروکوکوس فکالیس* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی شد، سپس آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل CLSI انجام شد. در نهایت فراوانی ژن *bla CTX-M* در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین با استفاده از پرایمر اختصاصی، توسط PCR موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و پنی‌سیلین به ترتیب با ۹۴/۴۴٪ و ۵۶/۶۶٪ گزارش شد و سویه‌ها حساسیت بالایی نسبت به نیتروفورانتئین، مروپنم و سیپروفلوکساسین داشتند. از ۹۰ نمونه مورد آزمایش، ۹ نمونه (۱۰٪) مقاوم به جنتامایسین بودند که ژن مذکور در هیچ‌یک از ۹ سویه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به انتقال آسان ژن‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز از طریق پلاسمید، عدم ردیابی ژن مذکور در میان باکتری‌های موردبررسی نشان می‌دهد که این ژن همراه ژن‌های عامل مقاومت به جنتامایسین منتقل نمی‌شود، بنابراین رابطه‌ی معنی‌داری بین این ژن و آنتی‌بیوتیک موردبررسی مشاهده نشد.

کلیدواژه‌ها: *انتروکوکوس فکالیس*، جنتامایسین، بتالاکتاماز، واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

مقدمه

انتروکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که بی‌هوازی اختیاری و کاتالاز منفی هستند و با داشتن توانایی رشد در غلظت ۶/۵٪ از سدیم کلرید، pH بالا (pH=9.6) و همچنین با داشتن قدرت هیدرولیز بایل اسکولین، L- پیرولیدونیل- β - نفتیلامید (PYR) شناسایی می‌شوند(۱). این باکتری‌ها به‌صورت مخمرهای سخت در نظر گرفته می‌شوند، زیرا فاقد چرخه‌ی کربس و زنجیره‌های تنفسی هستند. حضور دائمی *انتروکوک‌ها* در دستگاه گوارش انسان و حیوانات به‌عنوان فلور نرمال، اهمیت بالینی آن‌ها در ایجاد عفونت، توانایی ایجاد مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک و ظرفیت بالای آن‌ها برای انتقال افقی ژن‌ها، این گروه از باکتری‌ها را به یک گروه مناسب برای تحقیقات اکولوژیک جهت ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تبدیل نموده است(۲، ۳).

عمل بیماری‌زایی *انتروکوک‌ها* در ابتدا وابسته به بافت‌های میزبان است. در طول فرآیند تهاجم بافتی سبب کلونیزاسیون در محیط‌های متفاوت، افزایش پتانسیل ردوکس، از بین بردن مواد مغذی ضروری، فاگوسیت لوکوسیت‌ها و دیگر نقص‌ها می‌شود(۴).

مصرف غذا امکان انتقال بسیاری از پاتوژن‌ها ازجمله باکتری‌ها را به بدن فراهم می‌سازد. زنجیره غذایی به‌عنوان یک منبع *انتروکوکی* مقاوم به عوامل ضدمیکروبی شناخته‌شده است و *انتروکوک* ها معمولاً در غذاهای با منشأ حیوانی مانند گوشت وجود دارند و به دلیل این‌که زیستگاه اصلی آن‌ها دستگاه گوارش است پتانسیل قابل‌توجهی برای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

آلودگی گوشت‌ها در زمان کشتار دارند(۵). در میان محصولات غذایی، گوشت یکی از حساس‌ترین مواد غذایی فسادپذیر به شمار می‌آید، زیرا محیطی بسیار مساعد جهت فعالیت میکروب‌ها، مخمرها و کپک‌ها است. هم‌چنین وجود باقی‌مانده‌های مواد دارویی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های دامی و مصرف آن توسط انسان از طریق زنجیره غذایی، باعث بروز واکنش‌هایی نظیر واکنش‌های آلرژیک، تب، اسهال و ... می‌شود. انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان از طریق زنجیره غذایی صورت می‌گیرد که طی آن ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از فلور میکروبی دام به پاتوژن‌های انسانی منتقل می‌شود(۶).

شایع‌ترین *انتروکوکوس*‌های دخیل در عفونت های انسانی، *انتروکوکوس فکالیس* (۹۰- ۸۵ درصد) و *انتروکوکوس فاسیوم* (۱۰- ۵ درصد) هستند. *انتروکوکوس فکالیس* یکی از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک است که می‌تواند در تعداد نسبتاً بالایی در طول تخمیر گوشت یافت شود و ممکن است به همراه *لاکتوباسیلوس* در فرآیند تخمیر شرکت داشته باشند(۷). این باکتری‌ها اکثراً مقاوم به گرما بوده که اسپور تولید نمی‌کنند و این موضوع نشان‌دهنده‌ی بقای آن‌ها در گوشت‌های خام و پخته‌شده است(۶).

انتروکوک‌ها، می‌توانند سبب اکتساب و انتقال عامل ژن‌های عامل مقاومت شوند. مصرف بی‌رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای دام و طیور به‌عنوان فاکتور افزاینده رشد می‌تواند سبب سهولت در تبادل ژن‌های مقاوم ویرولانت بین سویه‌های *انتروکوک* و توانایی بالای ارگانیسم در انتقال بین افراد و بیماران و محیط، فراوانی قابلیت انتشار این سویه را در بین محیط‌های مختلف تائید می‌کند(۸). کاملاً واضح است که استفاده‌ی بی‌رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان یا کنترل عفونت در انسان و یا به‌عنوان فاکتورهای رشد در غذای حیوانات یکی از دلایل شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است.

ازجمله مقاومت‌های ایجادشده در *انتروکوکوس*‌ها می‌توان به مقاومت نسبت به دوزهای بالای آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد(۹). اخیراً مقاومت باکتریایی که از طریق تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در حال افزایش است به‌عنوان یک مشکل درمانی تلقی می‌گردد. بتالاکتامازها از مهم‌ترین آنزیم‌های مهارکننده‌ی داروهای بتالاکتام در باکتری‌ها است که با هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام از اتصال آنتی‌بیوتیک به جایگاه هدف جلوگیری می‌کند و باعث ظهور مقاومت می‌گردد(۱۰). که به چهار گروه A تا D تقسیم‌بندی می‌شوند(۱۱). بر اساس این طبقه بندی، آنزیم‌های وسیع‌الطیف در گروه A قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم‌های موتاسیون‌یافته TEM و SHV می‌باشند(۱۲). بتالاکتامازهای تیپ CTX-M به‌طور گسترده از طریق پلاسمیدهای حامل ESBL که فاقد TEM و SHV منتشر گردید،که توسط پلاسمید کد می‌شوند و قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بوده و به‌وسیله کلاوولانیک اسید و تازوباکتام مهار می شوند و به‌طور افزاینده‌ای در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* شایع هستند(۱۳). در طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایران انجام‌شده، آنزیم‌های ESBL افزایش پیدا کرده است. لذا این مطالعه با هدف تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جداشده از گوشت‌های قرمز مصرفی کشتارگاه شهرستان بروجرد و بررسی فراوانی بتالاکتامار وسیع‌الطیف CTX-M در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین انجام شد.

روش‌کار

جمع آوری نمونه: در این مطالعه‌ی مقطعی، ۲۲۰ نمونه از گوشت‌های قرمز شهرستان بروجرد در طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ جمع‌آوری شد؛ که از این ۲۲۰ نمونه، ۱۹۰ نمونه *انتروکوکوس* جداسازی شد. نمونه برداری به روش سوآب برداری انجام شد، بدین صورت که از سطح ۱۰۰ سانتی‌مترمربع با دو سوآب از سطح گوشت نمونه‌برداری انجام شد. این سطح با فریم‌هایی که مساحت داخلی آن ۱۰۰ سانتی‌متر مربع بود تعیین می‌شد. نمونه برداری از چهار ناحیه گردن، قسمت خلفی عضلات دست، تهیگاه و کفل انجام شد. عمل سوآب کشی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- توالی پرایمر استفاده شده در این پژوهش

ژن هدف	توالی پرایمر (′۳→′۵)	طول قطعه (bp)	منبع
CTX-M	F: TCAGCGAAAAACACCTTG R:GATATCGTTGGTGGTGCCAT	۵۴۳	(۱)

به‌صورت افقی و عمودی ابتدا با سوآب مرطوب و سپس با سوآب خشک انجام گرفت. در نهایت هردو سوآب در لوله‌های حاوی BHI براث قرار داده شدند و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند.

شناسایی باکتری: پس از تهیه کشت خالص از نمونه‌ها، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، بایل اسکولین، PYR، رشد در محیط BHI براث حاوی ۶/۵٪ کلرید سدیم، نمونه‌ها در حد جنس شناسایی شدند(۱۴). سپس نمونه‌های *انتروکوکوس* با استفاده از آزمایشات تولید اسید از مانیتول، سوربیتول، سوربوز، آرابینوز و ساکاروز در حد گونه شناسایی شدند که بعد از انجام آزمایشات فوق مشخص گردید که ۹۰ جدایه *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۰۰ جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* بودند.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری *E. faecalis* با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بایر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical Standards Institute and Laboratory) انجام گردید. تعدادی از کلونی باکتری را به وسیله‌ی آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت نیم‌مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فاصله‌ی استاندارد و بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیده و بعد از ظهر ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید. جهت انجام این مطالعه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۱۵µg/disc)، آمپی‌سیلین (۱۰µg/disc)، جنتامایسین (۱۰µg/disc) تتراسیکلین (۳۰µg/disc)، پنی‌سیلین (۱۰µg/disc)، سیپروفلوکساسین (۵µg/disc)، کلرامفنیکل (۳۰µg/disc)، لینزولید (۳۰µg/disc)، مروپنم (۱۰µg/disc)، استرپتومایسین (۳۰µg/disc) و نیتروفورانتئین (۳۰µg /disc) خریداری شده از شرکت ROSCO دانمارک تهیه گردید. از سویه های استاندارد *E. faecalis ATCC29212* و *E. faecalis ATCC51299* به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده شد.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA، از کشت ۲۴ ساعته نمونه‌ها در محیط BHI براث (Merck آلمان) استفاده شد که با استفاده از سانتریفیوژ، رسوب سلولی جمع‌آوری گردید و استخراج طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA (سینا ژن) انجام گردید و DNAهای استخراج گردیده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- نگه داری شد.

آزمون PCR: با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *CTX-M* (جدول ۱) گرفته شده از مقالات و خریداری شده از شرکت پیشگام صورت گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵µl (مقدار ۷/۵ میکرولیتر dsH2O، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۱ میکرولیتر Primer F، ۱ میکرولیتر Primer R و ۳ میکرولیتر DNA Template) طبق برنامه دمایی و زمانی زیر انجام شد.

برای دناتوراسیون اولیه DNA به مدت ۲ دقیقه در دمای ^{o}c ۹۴ قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ^{o}c ۹۴ به مدت ۲۰ ثانیه، الحاق پرایمرها به DNA هدف در ^{o}c ۵۱ به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر پرایمرها در ^{o}c ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه در ۳۵ چرخه تکرار شد و سرانجام ۳ دقیقه جهت تکثیر نهایی در ^{o}c ۷۲ قرار گرفت.

جهت الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۵٪ و بافر TBE 0.5 X (سینا ژن) استفاده شد. برای تعیین سایز محصولات PCR از یک مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Merck آلمان) استفاده شد. باندهای DNA بعد از رنگ آمیزی توسط Safe stain (Merck آلمان) با استفاده از دستگاه Gel-documentation (Vilber-Lourmat فرانسه)

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

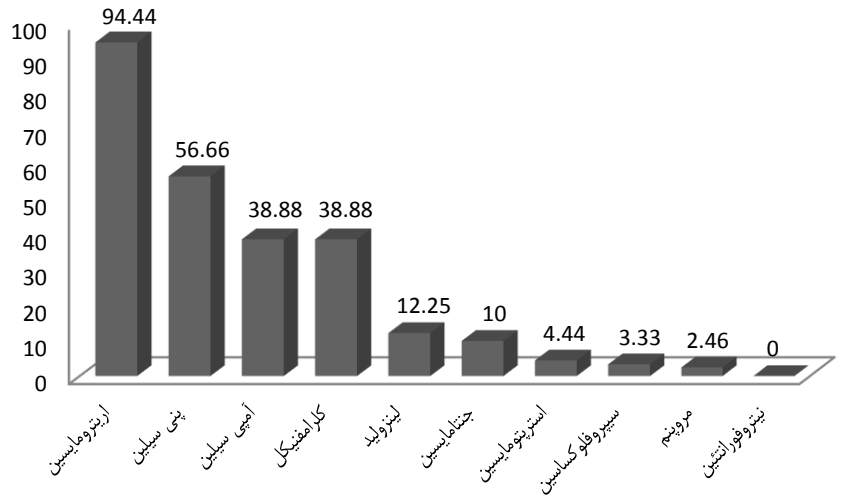
مشاهده گردید. در نهایت نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Excel آنالیز شدند.

از *E. faecalis ATCC29212* به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن *CTX-M* (تهیه شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور) استفاده شد. سویه استاندارد به شکل لیوفیلیزه خریداری و عملیات احیای آن با کشت در محیط نوترینت براث و گرماگذاری آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید(۱۵).

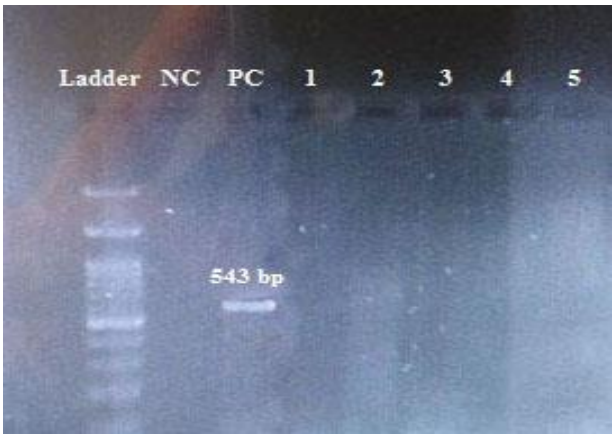
یافته‌ها

از ۱۹۰ نمونه‌ی گوشت‌های قرمز جمع‌آوری شده‌ی کشتارگاه شهرستان بروجرد بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی و تأییدی، مشخص شد که ۹۰ نمونه (۴۷/۳۶٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۰۰ نمونه (۵۲/۶۳٪) *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شد.

نتایج تست آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک مشخص کرد که ۹ مورد (۱۰٪) از ۹۰ نمونه، مقاوم به جنتامایسین می‌باشند. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام (نمودار ۱) نشان‌دهنده‌ی مقاومت‌های چندگانه‌ی سویه‌های مختلف بود.



نمودار ۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت بر حسب درصد



تصویر۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های *انتروکوکوس فکالیس*های مقاوم به جنتامایسین برای ژن *bla CTX-M* . از چپ به راست به ترتیب، ستون اول (Ladder) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون دوم کنترل منفی (NC)، ستون سوم *ATCC 29212* (PC) به‌عنوان کنترل مثبت و شماره‌های ۵- ۱ نمونه‌های مورد آزمایش.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

بیشترین میزان مقاومت برحسب استاندارد CLSI 2013 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (۹۴/۴۴٪) و پنی‌سیلین (۵۶/۶۶٪) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک های نیتروفورانتئین و مروپنم و سیپروفلوکساسین به ترتیب با ۰٪، ۲/۲۲ و سیپروفلوکساسین مشاهده شد. پس از بررسی ژنوم استخراج شده‌ی *انتروکوکوس فکالیس*های مقاوم به جنتامایسین با آزمون PCR، مشخص شد در هیچ‌یک از ۹ سویه‌ی مقاوم به جنتامایسین، ژن *CTX-M* وجود ندارد (تصویر ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان می‌توانند از طریق خوردن گوشت‌های آلوده به انسان منتقل شوند. از این‌رو سالم بودن گوشت از اهمیت بالایی در حفظ سلامت جامعه برخوردار است. به دلیل ماهیت خود گوشت و تهیه آن از منابع حیوانی، عدم وجود فرآیند حرارتی در حین کشتار و تأثیر اندک انجماد در کاهش بار میکروبی، گوشت خام در گروه غذاهای با ریسک بالای میکروبی قرار دارد(۱۶). بنابراین نیاز به روش‌های کنترلی و پیشگیرانه در تولید آن احساس می‌گردد. اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظت‌های معمولی قادر به از بین بردن *انتروکوکوس*ها نیستند. درمان متداول شامل استفاده از یک آمینوگلیکوزید همراه با یک عامل ضد دیواره (بتالاکتام) است. البته، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در *انتروکوکوس*ها در حال افزایش است. اگر این باکتری‌ها دارای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز باشند نه‌تنها با مصرف آنتی‌بیوتیک‌های معمولی از بین نمی‌روند، بلکه سبب ایجاد سویه‌های مقاوم‌تر نیز می‌شوند. معمولاً *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های بالینی و *انتروکوکوس فاسیوم* در گوشت‌ها و سبزیجات گونه‌های غالب هستند. در این پژوهش ۱۹۰ نمونه *انتروکوکوس* از گوشت جداسازی شد که ۹۰ نمونه *انتروکوکوس فکالیس* (۴۷/۳۶٪) و ۱۰۰ نمونه *انتروکوکوس فاسیوم* (۵۲/۶۳٪) بود. پژوهش‌هایی که توسط Hayes و همکاران در سال۲۰۰۳، لیلا اربابی و همکاران در سال ۱۳۸۹ و Merk vrabec در سال ۲۰۱۵، دکتر سیما سود و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت این موضوع را به‌خوبی نشان داد(۱۷-۲۰).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مقاومت به اریترومایسین و پنی‌سیلین بالای ۵۰٪ است. سویه‌های *انتروکوکوسی* موجود در گوشت‌ها برخلاف سویه‌های بالینی، اکثراً نسبت به سویه‌های بالینی حساس است(۲۱). درصورتی‌که در این مطالعه مقاومت زیادی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک فوق دیده شد. در پژوهش‌های Chedly و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاومت بالا نسبت به اریترومایسین و نیز در پژوهش‌های Hayes و همکاران در سال۲۰۰۳، بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین مشاهده شد(۱۷, ۱۹). همچنین بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانتئین، مروپنم و سیپروفلوکساسین مشاهده شد. در نتایج حاصل‌شده از مطالعه‌ی تیمور نژاد تمام سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* به نیتروفورانتئین حساس بودند و مطالعه فرزاد محمدی و همکاران نشان داد سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* حساسیت بالایی نسبت به سه آنتی‌بیوتیک فوق داشتند(۲۲، ۲۳).

این مسئله می‌تواند بیانگر میزان مصرف آنتی بیوتیک در یک منطقه باشد. آنتی‌بیوتیک‌هایی همانند اریترومایسین و پنی‌سیلین به‌مراتب بیشتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، مورداستفاده قرار می‌گیرند. مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجادکننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌ها صورت می‌گیرد. البته بسته به نوع نمونه (بالینی و غذایی) مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم متفاوت است.

لازم به ذکر است شیوع ژن‌های ویرولانس در جدایه های بالینی بیشتر از مواد غذایی و گوشت است پس درنتیجه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نیز در نمونه‌های بالینی بیشتر خواهد شد؛ که پژوهش‌های Abriouel و همکاران در سال ۲۰۰۲ این موضوع را ثابت کردند(۲۴).

ژن‌های مقاومت اغلب از طریق پلاسمید،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

ترنسپوزون و یا اینتگرون‌ها بین باکتری‌ها انتشار می‌یابند. به‌خوبی مشخص‌شده که پلاسمیدها یکی از مهم‌ترین عوامل انتشار سریع مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری‌ها هستند.

در این پژوهش ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین مشاهده نشد. در مطالعه‌ی مشابهی که توسط Merk vrabec در سال ۲۰۱۵ در دانشگاه پزشکی و داروسازی اسلواکی به‌منظور بررسی ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در *انتروکوکوس*‌های جداشده از پنیرهای مصرفی صورت گرفت در هیچ سویه‌ای ژن‌های نامبرده مشاهده نشد(۱). همچنین تاکنون بررسی‌های مستقیمی بر روی ژن‌های بتالاکتاماز در *انتروکوکوس فکالیس*‌های مقاوم به جنتامایسین در گوشت‌های قرمز مصرفی چه در داخل و چه در خارج از کشور صورت نگرفته است. در این بررسی ژن *bla CTX-M* در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین مشاهده نشد. لذا این موضوع نشان می‌دهد ژن *bla CTX-M* همراه با ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین منتقل نمی شوند و همچنین این احتمال می‌رود که علاوه بر وجود ژن‌های مقاومت به جنتامایسین و انتقال توسط پلاسمیدها، مکانیسم‌های دیگری غیر از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند پمپ‌های ترشحی و تغییر در پورین‌ها سبب مقاومت می گردند.

براساس مطالعات انجام‌شده ثابت گردیده است که یکی از راه‌های اصلی انتقال مقاومت دارویی به انسان، به‌واسطه‌ی انتقال سویه‌های مقاوم باکتری‌ها از حیوانات و گیاهان از طریق فرآورده‌های غذایی صورت می‌گیرد بدیهی است با اثبات شباهت‌های الگوی مقاومتی سویه‌های بیمارستانی و محیطی باکتری‌ها، می‌توان با کنترل و پیشگیری از آلودگی های محیطی، احتمال بروز مقاومت‌های بالینی را کاهش داد(۲۵).

تقدیر و تشکر

مؤلفین این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و همکاران آزمایشگاه و تمامی عزیزان یاری دهنده در انجام این پروژه، نهایت سپاس و امتنان را دارند.

منابع

1.Vrabec M, Lovayová V, Dudriková K, Gallo J, Dudriková E. Antibiotic resistance and prevalence of Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from bryndza cheese. Ital Sci Anim J; 2015.14(4):3968.

2. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J; 2007.11(3):161-7.

3. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link 3.between wastewater and human vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates. Curr Microbiol; 2008. 56(5):468-73.

4. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology; 2009.155(6):1749-57.

5. Jahan M, Krause DO, Holley RA. Antimicrobial resistance of Enterococcus species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. Int. J. Food Microbiol; 2013.163(2):89-95.

6. Myllyniemi AL. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. 2004.

7. Jahan M, Holley RA. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25. C and 37 C. Int. J. Food Microbiol; 2014.170:65-9

8. Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, FitzGerald S, Fox U, Boyle B, et al. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital J. Antimicrob. Chemother; 2015.70(10):2718-24.

9. Klare I, Heier H, Claus H, Witte W. Environmental strains of Enterococcus faecium with inducible high-level resistance to glycopeptides FEMS Microbiol. Lett; 1993.106(1):23-9.

10. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing Entero-bacteriaceae in Europe. Clin. Microbiol. Infect; 2008.14(s1):144-53.

11. Poole K. Resistance to β-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci; 2004.61(17):2200-23.

12. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother; 1995.39(6):1211.

13. Tzouvelekis L, Tzelepi E, Tassios P, Legakis N. CTX-M-type β-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int. J. Antimicrob.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

Agents; 2000.14(2):137-42.

14. Facklam R, Collins M. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J. Clin. Microbiol;1989.27(4):731-4.

15.Arbour N, Weirich A, Cornejo-Palma D, Prevost S, Ramotar K, Harder C. Real-time PCR detection of VRE. Spartan Bio sci AN0019, version 1; 2008.

16. Roberts T. Economics of private strategies to control foodborne pathogens. Choices; 2005.20(2):117-22.

17. Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Ferchichi L, Walsh TR. First report of mefA and msrA/msrB multidrug efflux pumps associated with bla TEM-1 β-lactamase in Enterococcus faecalis. Int. J. Infect. Dis; 2012.16(2):e104-e9.

18. Sood S, Malhotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J. Med. Res; 2008.128(2).

19. Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol; 2003.69(12):7153-60.

20. Arbabi L, Vandyoudefi J, Bouzari M, Rahimi F, RAHIMI F. Antibiotic Susceptibility Pattern among Vancomycin Resistant Enterococci Isolated from Meat and Fecal Samples in Tehran Livestock Husbandries. 2010.(Persion).

21. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance.in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek; 1999.76(1-4):115-37.

22. Teymournejad O, Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R. Nitrofurantoin sensitivity in vancomycin resistant enterococcus. J Arak Unive Med Sci; 2010.13(2).(Persion).

23. Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N. Evaluation of drug resistance frequency ʊřŹŚƨuʒ ε $! among Entrococcus faecium and E. faecalis strains and detection of vanA/B genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. Sci J Ilam Unive Med Sci; 2010.19:1-8.(Persion).

24. Franz CM, Grube A, Herrmann A, Abriouel H, Stärke J, Lombardi A, et al. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by Enterococcus faecalis FAIR-E 309. Appl. Environ. Microbiol; 2002.68(5):2550-4.

25. Norouzi J, Vali GR, Yousefi H. Surveying the effects of different methods of mutations on the antibiotic resistance patterns and plasmids in E. Coli and Staph. Aureus Feyz J Kashan Univ Med Sci; 2004.8(1).(Persion).

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

Study of *bla CTX-M* gene in gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* isolated from consumption red meats

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:40 IRDT on Saturday May 12th 2018

***Rezvan Shirvani**, Department of Cell and Molecular Biology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran (*Corresponding author). r.shirvani1368@gmail.com.
Ellahe Madani pur, Department of Microbiology, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran. elamadani20@gmail.com

Abstract

Background: *Enterococci* are part of normal flora of the human gastrointestinal tract, which have a high potential for acquiring antibiotic resistance genes. The widespread use of antibiotics in the agricultural and food industriel leads to release of resistance genes in pathogens and normal flora bacteria, transfer to human and also the cause of the disease, which is a serious menace to human health. So, the purpose of this study was evaluation prevalence of *bla CTX-M* gene in gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* isolated from consumption red meats.

Methods: In this cross-sectional study 190 *Enterococcus* isolates were collected from consumption red meats Boroujerd Slaughterhouse. 90 *E.faecalis* strains were identified by routine microbiological tests. The antibiotic susceptibility testing on isolates by disk diffusion method according to the CLSI was performed. Finally, to assess the frequency of *bla CTX-M* gene in gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* isolated from consumption red meats were performed by using PCR and specific primer.

Results: In this study, the highest antibiotic resistance was observed against erythromycin and penicillin (94.44% and 56.66% respectively), strains had a high sensitivity to nitrofurantoin, meropenem and ciprofloxacin.Out of 90 samples 9(10%) were resistant to gentamicin, the gene was not found in any of the 9 strains.

Conclusion: Given that the genes producing Betalactamase enzymes are easily transferred via plasmids, lack of tracking the mentioned genes among the studied bacteria suggests, this gene is not transferred along with genes inducing resistance to gentamicin. Thus significant relationship between these gene and investigated antibiotic was not observed.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Gentamicins, beta-Lactamases, Polymerase chain reaction

www.SID.ir