فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۵، زمستان ۱۳۸۸

بررسی انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق کانجوگاسیون در سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی

رباب رفیعی طباطبائی[1*]، سمانه یزدانی مقدم[1] و سیدعلی پوربخش[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج

چکیده

بسیاری از باکتری ها موجب بروز آلودگی در مواد غذایی می شوند. سالمونلا به دلیل داشتن گستردگی میزبان، سروتیپ های مختلف و ناقلین متعدد از شایع ترین آلوده کننده های مواد غذایی محسوب می گردد. مجموع ۶۰ سویه سالمونلا از مواد غذایی مشکوک به آلودگی با باکتری سالمونلا جدا شده و به منظور تعیین الگوی مقاومت دارویی و انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق کانجوگاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از انتشار دیسک به روش Kirby-Bauer بر اساس رهنمودهای NCCLS انجام شد. MIC با استفاده از Macrodilution Method تعیین شد. برای بررسی انتقال فاکتور مقاومت، کانجوگاسیون با استفاده از روش کشت مخلوط انجام شد. بالاترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین، تری متوپریم- سولفامتوکسازول و نالیدیکسیک اسید بود. مقاومت چندگانه در ۹۱/۶۶٪ سویه ها دیده شد. مقادیر MIC بین ۰/۵ تا ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. پس از مجاور سازی باکتری پذیرنده و سالمونلاها به عنوان دهنده، انتقال فاکتور مقاومت از سالمونلا به اشرشیاکلی در مورد ۶ آنتی بیوتیک انجام پذیرفت. در بررسی با سویه ی پذیرنده *E. coli* $DH_5\alpha$ F^- Lac^+Nal^r بیشترین درصد انتقال مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک تتراسایکلین با ۴۴/۴۴٪ بود و به دنبال آن تری متوپریم- سولفامتوکسازول، کلرامفنیکل، آمپی سیلین و سفالکسین و سفوتاکسیم انتقال یافتند. در بررسی با پذیرنده ی *E. coli* C_{1180} نیز بیشترین درصد انتقال مربوط به آنتی بیوتیک تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول با ۵۰٪ بود و به دنبال آن تتراسایکلین، کلرآمفنیکل، سفوتاکسیم و سفالکسین انتقال یافتند. در این مطالعه سالمونلاهای جداشده درصد بالایی از مقاومت را نشان دادند. پیدایش مقاومت روزافزون نسبت به داروهای آنتی بیوتیکی در بین سالمونلاها که در بسیاری از موارد پلاسمیدی بوده و از طریق کانجوگاسیون منتقل می شود موجب بروز مشکلاتی شده است. محدود کردن استفاده از آنتی بیوتیک ها در حیوانات و انسان، انجام تست های حساسیت آنتی بیوتیکی برای انتخاب داروی مناسب و رعایت دوز دارو و طول درمان می توانند گسترش سویه های مقاوم را کاهش دهند.

واژگان کلیدی: سالمونلا، فاکتور مقاومت، کانجوگاسیون

مقدمه

سالمونلوزیس به عنوان یک عفونت منتقل شده از حیوان به انسان توصیف می شود. انتقال بیماری به وسیله‌ی مسیر مدفوعی - دهانی صورت می گیرد که از طریق این مسیر محتویات روده ای یک حیوان آلوده، همراه با مواد غذایی یا آب وارد بدن انسان می شوند. یک دوره ی زمانی از دمای نامناسب که به سالمونلا اجازه رشد در مواد غذایی را می دهد و فرآیند حرارتی ناکافی یا عدم وجود فرآیند

Archive of SID

www.SID.ir

حرارتی نهایی فاکتورهای متفاوتی هستند که در ایجاد شیوع بیماری این ارگانیسم شرکت می‌نمایند (۱ و ۲). برای درمان بیماری‌های ناشی از سالمونلا از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می شود اما شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک ها در میان سالمونلاها مشکل اصلی در درمان عفونت های سالمونلایی‌می باشد. از علل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، مصرف بی رویه و کنترل نشده‌ی آنتی بیوتیک ها در انسان و حیوان و کامل نکردن دوره ی درمان توسط بیمار است که باعث از بین رفتن باکتری های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود. هم چنین استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها در برخی از حیوانات مانند جوجه های گوشتی و بوقلمون برای افزایش رشد، سبب پیدایش سالمونلاهای مقاوم شده است. ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیکها در بسیاری از موارد پلاسمیدی بوده و یکی از مهم ترین علل بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی، توانایی باکتری ها در انتقال این پلاسمیدها (R-Factor) به باکتری های دیگر است. به طوری که باکتری های روده ای دارای پلاسمید مقاومت می توانند از طریق آب ها و مواد غذایی آلوده وارد دستگاه گوارشی انسان شده و فاکتور R خود را به فلور طبیعی دستگاه گوارشی انتقال دهند. در محیط های بیمارستانی، در آزمایشگاه و در هر محیط دیگری که شرایط برای عمل انتقال فاکتور مقاومت مناسب باشد، پلاسمیدهای R می توانند از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال یابند(۳). بررسی ها نشان می دهد که عفونت های ناشی از سالمونلا در حال افزایش است. هم چنین مواد غذایی بسیاری در معرض آلودگی با سالمونلا هستند. گسترش مقاومت بین سویه های سالمونلا به صورت یک مشکل در بهداشت جهانی مطرح است که این مقاومت قابل انتقال در بین سروتیپ های سالمونلا و بین گونه های دیگر باکتری ها می باشد. بنابراین در این مطالعه سویه های سالمونلا به منظور بررسی توانایی انتقال فاکتور مقاومت از طریق کانجوگاسیون از مواد غذایی جدا شدند.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی مورد مطالعه

مجموع ۶۰ سویه سالمونلا از نمونه های مواد غذایی مشکوک به آلودگی با باکتری سالمونلا ارسال شده به سازمان دامپزشکی استان تهران جدا شدند. مواد غذایی شامل انواع مختلفی مانند گوشت قرمز، گوشت چرخ کرده، مرغ، خمیر مرغ و تخم مرغ بودند.

آزمایش های باکتریولوژیکی، بیوشیمیایی و سرولوژیکی

کشت و جداسازی سالمونلا از مواد غذایی براساس روش استاندارد ملی ایران انجام شد(۴) تشخیص نهایی سالمونلاها از طریق آزمایشات سرولوژیکی و با استفاده از Mast Diagnostic Kit انجام شده و گروه و واریته سرولوژیکی باکتری ها مشخص شد (۵ و ۶).

تعیین مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیکها

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک Kirby & Bauer براساس دستورالعمل NCCLS انجام گرفت (۶ و ۷ و ۸). دیسک های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت پادتن طب خریداری شده و شامل: آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم(AM)،سفالوتین ۳۰ میکروگرم (CF)، سفالکسین ۳۰ میکروگرم (CN) سفازولین ۳۰ میکروگرم (CZ)، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم (CTX)، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم (CRO)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ۲۵ میکروگرم (SXT)، استرپتومایسین ۱۰میکروگرم(S)،کانامایسین ۳۰میکروگرم(K)، نئومایسین ۳۰ میکروگرم (N)، جنتامی سین ۱۰ میکروگرم (GM)، نالیدیکسیک‌اسید۳۰میکروگرم (NA)، سیپرو فلوکساسین ۵ میکروگرم (CP)، تتراسیلکین ۳۰ میکروگرم (TE) و کلرآمفنیکل ۳۰ میکروگرم (C) بودند.

تعیین (Minimum Inhibitory Concentration) MIC:

برای تعیین MIC از روش تهیه رقت در محیط کشت مایع (Broth Dilution Method)) و براساس دستورالعمل NCCLS استفاده شد (۶ و ۹). پودرهای آنتی بیوتیکی از شرکت های مختلف داروسازی تهیه شدند که شامل کوثر، تهران دارو، سینا دارو و جابربن حیان بودند. محلول های ذخیره آنتی بیوتیکی با توجه به جزء فعال دارو (potency)، حجم مورد نیاز، غلظت نهایی محلول و با استفاده از حلال و رقیق کننده های مناسب تهیه شدند. دامنه غلظت‌های تهیه شده برای آنتی بیوتیک بستگی به سمیت آنتی بیوتیک و میزان مجاز آن در بدن

Archive of SID

www.SID.ir

دارد. معمولاً بالاترین میزان انتخاب شده که آن را با C نمایش می دهند ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر است. برای تهیه محلول های آنتی بیوتیکی با غلظت معین از فرمول $W = \frac{V \times C}{P}$ استفاده می شود که W وزن ماده ضد میکربی (میلی گرم)، V حجم مورد نیاز از محلول (میلی لیتر)، C غلظت نهایی محلول (میکروگرم در میلی لیتر) و P جزء فعال دارو (میکرو گرم در میلی گرم) می باشد. محیط کشت مورد استفاده Mueller Hinton broth بود و سوسپانسیون باکتریایی که کدورت آن با کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید، تهیه شد. با استفاده از محیط کشت مایع و محلولهای ذخیره آنتی بیوتیکی، رقت های ۰/۵، ۱، ۲، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ تهیه شدند و پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی به آنها در حرارت C ۳۷° به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شده و سپس نتایج خوانده شدند. یک لوله که فقط دارای محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بود به عنوان کنترل مثبت و لوله دیگر که فقط دارای محیط کشت بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. MIC نالیدیکسیک اسید و آمپی سیلین برای سویه های سالمونلای حساس به آنها تعیین گردید. هم چنین MIC تمام آنتی بیوتیکهای مورد استفاده برای سویه های پذیرنده *E. coli* $DH_5\alpha F^-Lac^+Nal^r$ و *E. coli* C_{1180} تعیین شد.

کانجوگاسیون

برای بررسی انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق کانجوگاسیون از روش کشت مخلوط استفاده شد (۱۰و ۱۱ و ۱۲). سویه *E. coli* $DH_5\alpha F^-Lac^+Nal^r$ مقاوم به نالیدیکسیک اسید و حساس به همه آنتی بیوتیکها و سویه *E. coli* C_{1180} مقاوم به آمپی سیلین و کانامایسین و حساس به سایر آنتی بیوتیکها به عنوان سویه های پذیرنده مورد استفاده قرار گرفتند. سویه های دهنده، سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی بودند که هر یک، به یک یا چند آنتی بیوتیک مقاوم بودند. هنگام استفاده از سویه پذیرنده مقاوم به نالیدیکسیک اسید و حساس به بقیه آنتی بیوتیک ها، از سویه های دهنده حساس به نالیدیکسیک اسید استفاده شد و هنگام استفاده از سویه پذیرنده مقاوم به آمپی سیلین و کانامایسین از دهنده های حساس به آمپی سیلین استفاده شد. باکتری های دهنده و پذیرنده روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک کلنی از سویه پذیرنده در ۵ میلی لیتر BHI broth و یک کلنی از سویه دهنده نیز در ۲ میلی لیتر BHI broth وارد شده و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شدند تا به مرحله رشد لگاریتمی برسند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از سویه دهنده و ۰/۹ میلی لیتر از سویه پذیرنده در لوله های استریل حاوی ۲ میلی لیتر محیط کشت BHI broth مخلوط شدند و پس از ۲۴ ساعت در ۳۷°C، ۰/۱ میلی لیتر از مخلوط سویه های دهنده و پذیرنده روی سطح محیط انتخابی به آرامی پخش گردید. هم چنین باکتری های دهنده و پذیرنده به طور جداگانه روی پلیت های حاوی محیط کشت انتخابی کشت داده شده و ۲۴ ساعت در ۳۷°C قرار گرفتند.

محیط کشت انتخابی

این محیط باید دارای دو آنتی بیوتیک مورد بررسی در عمل کانجوگاسیون باشد و باید به گونه ای باشد که فقط باکتری ترسن کانجوگانت یعنی سویه پذیرنده ای که مقاومت آنتی بیوتیکی را از سویه دهنده دریافت کرده است، قادر به رشد روی آن بوده و هیچیک از سویه های دهنده و پذیرنده به تنهایی نتوانند روی آن رشد کنند. بنابراین هنگام استفاده از پذیرنده *E. coli* $DH_5\alpha F^-Lac^+Nal^r$ محیط کشت انتخابی دارای آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید و یکی از آنتی بیوتیک هایی بود که سویه دهنده نسبت به آن مقاوم بود. در مورد دهنده های مقاوم به نالیدیکسیک اسید ولی حساس به آمپی سیلین از *E. coli* C_{1180} به عنوان پذیرنده استفاده شد و محیط کشت انتخابی دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین و یکی از آنتی بیوتیکهایی بود که سویه دهنده نسبت به آن مقاوم بود (به علت در دسترس نبودن پودر کانامایسین فقط سویه های حساس به آمپی سیلین مورد بررسی قرار گرفتند). در این مطالعه تعیین MIC برای مشخص شدن مقادیر دقیق آنتی بیوتیک مورد نیاز برای تهیه محیط کشت انتخابی صورت گرفت.

پس از شمارش کلنی های رشد یافته روی سطح محیط انتخابی و تأیید اینکه کلنی ها *E. coli* می باشند

Archive of SID

www.SID.ir

بر طبق فرمول زیر میزان انتقال مقاومت برای هر یک از پلیت ها محاسبه شد (۱۳،۱۴).

$$\text{میزان انتقال} = \frac{\text{تعداد سلول های ترنس کانجوگانت رشد یافته در سطح محیط انتخابی در یک میلی لیتر}}{\text{تعداد سلول های دهنده در یک میلی لیتر}}$$

پس از تلقیح باکتری دهنده در ۲ میلی لیتر محیط BHI و گرمخانه گذاری آن به مدت ۲۴ ساعت جهت رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، OD آن خوانده شد که اگر در ۵۵۰ نانومتر برابر ۱-۰/۸ بود، تعداد سلول های دهنده ۹×۱۰^{۹} سلول در میلی لیتر در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

با استفاده از آزمایشات باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی، ۶۰ سویه سالمونلا شناسایی شد که توسط آزمایشات سرولوژیکی، گروه و سروتیپ سالمونلاهای جدا شده، تعیین شد.

تعیین مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک:

بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین با ۵۲ سویه مقاوم (۸۶/۶۶ ٪)، تری متو پریم – سولفامتوکسازول با ۴۴ سویه مقاوم (۷۳/۳۳٪)، نالیدیکسیک اسید با ۴۰ سویه مقاوم (۶۶/۶۶٪) و استرپتومایسین با ۳۷ سویه مقاوم (۶۱/۶۶٪) بود. تمامی سویه ها حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند و سویه کاملاً حساس مشاهده نشد. حالت تک مقاومتی فقط مربوط به آنتی بیوتیک NA در ۵ سویه (۸/۳۳٪) مشاهده گردید. مقاومت به دو یا تعداد بیشتری آنتی بیوتیک (Multiple Drug Resistance = MDR) در ۵۵ سویه (۹۱/۶۶٪) وجود داشت که بیشترین حالت مربوط به مقاومت هفت گانه(۲۳/۳۳٪) و پس از آن مقاومت شش گانه (۱۶/۶۶٪) بود. حداکثر تعداد مقاومت، مربوط به ۱۰ آنتی بیوتیک (مقاومت ده گانه) بود و بنابراین سویه‌ی کاملاً مقاوم وجود نداشت. در سویه های مورد مطالعه، ۲۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمد که شایع ترین آن الگوی NA/SXT/TE/N/K/S بود که ۱۳/۳۳ درصد از سویه ها را شامل می شد (جدول ۱).

تعیین MIC

مقادیر MIC آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید برای ۲۰ سویه سالمونلای حساس به آن در جدول ۲و مقادیر MIC آمپی سیلین برای ۱۲ سویه سالمونلای حساس به آن در جدول ۳ نشان داده شده است. مقادیر MIC آنتی بیوتیکهای مورد بررسی برای سویه پذیرنده *E. coli* $DH_5\alpha F^{-}Lac^{+}Nal^{r}$ بین ۲ تا ۲۵۶ و مقادیر MIC آنتی بیوتیکهای مورد بررسی برای سویه پذیرنده *E. coli* C_{1180} بین ۰/۵ تا ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود.

کانجوگاسیون

برای عمل کانجوگاسیون ابتدا از ۲۰ سویه دهنده حساس به نالیدیکسیک اسید و سویه پذیرنده *E. coli* $DH_5\alpha F^{-} Lac^{+}Nal^{r}$ مقاوم به نالیدیکسیک اسید استفاده شد. بیشترین درصد انتقال مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بود که از ۱۸ سویه ی مقاوم به تتراسایکلین و حساس به نالیدیکسیک اسید مجاور شده با سویه ی پذیرنده، ۸ سویه (۴۴/۴۴٪) قادر به رشد روی محیط انتخابی TE+NA بودند. پس از آن آنتی بیوتیک تری متوپریم – سولفامتوکسازول قرار گرفت که از ۱۷ سویه ی مقاوم به تری متوپریم – سولفامتوکسازول و حساس به نالیدیکسیک اسید، در ۷ سویه (۴۱/۱۷٪) انتقال مقاومت به SXT به سویه پذیرنده صورت گرفته بود (جدول ۴).

سپس برای عمل کانجوگاسیون از ۱۲ سویه دهنده حساس به آمپی سیلین و سویه پذیرنده *E. coli* C_{1180} مقاوم به آمپی سیلین استفاده شد. بیشترین انتقال مقاومت در آنتی بیوتیک تری متوپریم – سولفامتوکسازول دیده شد که از بین ۱۰ سویه مقاوم به آن ۵ سویه (۵۰٪) انتقال مقاومت را انجام داده بودند و پس از آن از میان ۱۱ سویه مقاوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین ۵ سویه (۴۵/۴۵٪) در انتقال مقاومت شرکت کرده بودند (جدول ۵). میزان انتقال دارای مقادیر متفاوتی بود و با توجه به تعداد کلنی ها که بین ۱۵ تا $۱۰^{۲}\times$ ۷ متغیر بود، میزان انتقال در دامنه $۱۰^{-۸}\times$ ۱/۶ تا $۱۰^{-۷}\times$ ۷/۷۷ قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. انواع الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سالمونلای مورد مطالعه

ردیف	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	تعداد سویه ها	درصد سویه ها
۱	NA	۵	٪۸/۳۳
۲	NA/TE	۱	٪۱/۶۶
۳	SXT/TE	۲	٪۳/۳۳
۴	S/TE	۲	٪۳/۳۳
۵	NA/AM/S	۱	٪۱/۶۶
۶	AM/N/K	۱	٪۱/۶۶
۷	NA/TE/N/S	۵	٪۸/۳۳
۸	SXT/GM/CTX/CZ	۱	٪۱/۶۶
۹	NA/SXT/TE/K/S	۳	٪۵
۱۰	NA/TE/AM/N/S	۱	٪۱/۶۶
۱۱	NA/SXT/TE/N/K/S	۸	٪۱۳/۳۳
۱۲	SXT/TE/CN/CF/CP/C	۲	٪۳/۳۳
۱۳	NA/SXT/TE/N/K/S/C	۵	٪۸/۳۳
۱۴	SXT/TE/CN/CF/CP/C/CTX	۵	٪۸/۳۳
۱۵	NA/SXT/TE/CN/CF/CP/C/AM	۲	٪۳/۳۳
۱۶	NA/SXT/TE/CZ/N/K/S	۲	٪۳/۳۳
۱۷	NA/SXT/TE/CZ/N/K/S/C	۱	٪۱/۶۶
۱۸	NA/SXT/TE/CZ/N/K/S/C/CTX	۴	٪۶/۶۶
۱۹	SXT/TE/CZ/K/CP/CN/CF/AM/GM	۲	٪۳/۳۳
۲۰	NA/SXT/TE/N/K/CP/CN/C/AM/CTX	۲	٪۳/۳۳
۲۱	SXT/TE/N/CZ/CP/CN/AM/CTX/CF/S	۴	٪۶/۶۶
۲۲	SXT/TE/CZ/C/CN/AM/CF/K/S/GM	۱	٪۱/۶۶

جدول ۲. MIC آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید برای ۲۰ سویه ی سالمونلای حساس به این آنتی بیوتیک

غلظت نالیدیکسیک اسید(میکروگرم برمیلی لیتر)	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶
تعداد سویه های سالمونلا	۲	۱	۱	۲	۸	۲	۴
درصد سویه های سالمونلا	٪۱۰	٪۵	٪۵	٪۱۰	٪۴۰	٪۱۰	٪۲۰

جدول ۳. MIC آنتی بیوتیک آمپی سیلین برای ۱۲ سویه ی سالمونلای حساس به این آنتی بیوتیک

غلظت آمپی سیلین (میکروگرم بر میلی لیتر)	۱۶	۳۲	۶۴	۲۵۶	۵۱۲
تعداد سویه های سالمونلا	۲	۱	۴	۳	۲
درصد سویه های سالمونلا	٪۱۶/۶	٪۸/۳	٪۳۳/۳	٪۲۵	٪۱۶/۶

جدول ۴. تعداد و درصد سویه های ترنس کانجوگانت سالمونلای حساس به نالیدیکسیک اسید

آنتی بیوتیک	تعداد سویه ی مجاور شده	تعداد سویه های ترنس کانجوگانت	درصد سویه های ترنس کانجوگانت
تتراسایکلین	۱۸	۸	٪۴۴/۴۴
تری متوپریم سولفامتوکسازول	۱۷	۷	٪۴۱/۱۷
کلرامفنیکل	۸	۳	٪۳۷/۵
آمپی سیلین	۸	۲	٪۲۵
سفالکسین	۱۴	۲	٪۱۴/۲۸
سفوتاکسیم	۱۰	۱	٪۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵. تعداد و درصد سویه های ترنس کانجوگانت در سالمونلاهای حساس به آمپی سیلین

آنتی بیوتیک	تعداد سویه ی مجاور شده	تعداد سویه های ترنس کانجوگانت	درصد سویه های ترنس کانجوگانت
تری متوپریم سولفامتوکسازول	۱۰	۵	٪۵۰
تتراسایکلین	۱۱	۵	٪۴۵/۴۵
کلرامفنیکل	۷	۳	٪۴۲/۸۵
سفوتاکسیم	۶	۲	٪۳۳/۳۳
سفالکسین	۷	۲	٪۲۸/۵۷

سالمونلا یکی از باکتری های گرم منفی روده ای می‌باشد که عامل مهمی در بروز التهاب‌های روده‌ای حاصل از مواد غذایی است. زیستگاه اصلی گونه های سالمونلا روده جانورانی مانند پرندگان، خزندگان، حیوانات مزرعه، انسان و احتمالاً حشرات می‌باشد. گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین سروتیپ های سالمونلا به صورت یک مشکل در بهداشت جهانی مطرح است که این مقاومت در بین سروتیپ های سالمونلا و گونه های دیگر باکتری ها قابل انتقال می باشد (۱، ۲و ۳). در این مطالعه سویه های سالمونلا درصد مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده را نشان دادند. در بررسی Hidetake و همکاران در ژاپن (۲۰۰۴)، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ های سالمونلا جدا شده از گاو، خوک و طیور تعیین شد. تمامی سروتیپ‌ها مقاومت به آمپی‌سیلین، دی هیدرو استرپتومایسین، کانامایسین و اکسی تتراسایکلین را نشان دادند (۱۵). در مطالعه‌ی Altier (۲۰۰۴) روی سالمونلاهای جدا شده از خوک، دو الگوی مقاومت AM/C/S/SX/TE و /SX/TE AM/K/S شناسایی شد (۱۶). در بررسی Poppe و همکاران در کانادا (۲۰۰۶)، سالمونلا انتریکا سروتیپ نیوپورت جدا شده از حیوانات و محصولات غذایی حداقل به یازده آنتی بیوتیک به ویژه گروه سفالوسپورین ها مقاوم بود (۱۷). در مطالعه یK.A.Ray و همکاران (۲۰۰۶) سویه های سالمونلای جدا شده از محل های تهیه شیر و حیوانات آن به بیشتر آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند (۱۸). E.Stevenson و همکاران در آمریکا (۲۰۰۷) افزایش مقاومت به نالیدیکسیک اسید را در سویه های سالمونلا انتریکا اعلام نمودند. الگوی مقاومتی شایع در میان جدایه‌های آنها NA/AM/C/S/SXT/TE بود(۱۹). در مطالعه‌ی Thi Thu Hao Van و همکاران در ویتنام (۲۰۰۷) مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سالمونلای جدا شده از جوجه، گوشت گاو، خوک و حلزون صدف دار تعیین شد که سویه ها مقاومت بالایی به انواع آنتی بیوتیک ها نشان دادند. بیشترین مقاومت به تتراسایکلین بود(۲۰). در بررسی وجدانی فر و همکاران در تهران در سال ۲۰۰۵، مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از لاشه‌ی مرغ های ذبح و بسته بندی شده تعیین گردید که تمامی سویه‌ها نسبت به استرپتومایسین، پنی‌سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۲۱). همان طور که ملاحظه می شود در این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده در ایران و خارج از ایران، سویه های سالمونلا مقاومت چند آنتی بیوتیکی بالایی را نشان می دهند. الگوهای مقاومت بدست آمده در این مطالعه تا حدود زیادی شبیه پژوهش های دیگر می باشد. از علل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، مصرف بی رویه و کنترل نشده آنتی بیوتیک ها در انسان و حیوان است که باعث از بین رفتن باکتری های حساس و انتخاب سویه های مقاوم می شود. آنتی بیوتیک ها مصارف متفاوتی دارند. در بسیاری از مواقع برای کنترل و درمان بیماری های باکتریایی در انسان و حیوان تجویز می شود. در برخی از حیوانات مانند جوجه های گوشتی و بوقلمون برای افزایش رشد به کار می روند. بنابراین فشار انتخاب ناشی از مصرف آنتی بیوتیک ها در طیور بسیار بالا می باشد و در نتیجه در فلورای مدفوعی آن ها میزان بالایی از باکتری های مقاوم وجود دارد. این سویه های مقاوم در هنگام ذبح از دستگاه گوارش به لاشه طیور عزیمت می کنند و باعث آلودگی گوشت مرغ ها به سویه های مقاوم به چند دارو می شوند. آن ها هم چنین به طور مستقیم یا از طریق غذا به انسان سرایت کرده و در دستگاه گوارش انسان کلونیزه می شوند و ممکن است ژن های مقاومت را به فلورای طبیعی انسان انتقال دهند. ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیکها در بسیاری از موارد پلاسمیدی بوده و یکی از مهم ترین علل بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی، توانایی

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری ها در انتقال این پلاسمیدها (R-Factor) به باکتری های دیگر است. به طوری که باکتری های روده ای دارای پلاسمید مقاومت می توانند از طریق آب ها و مواد غذایی آلوده وارد دستگاه گوارشی انسان شده و فاکتور R خود را به فلور طبیعی دستگاه گوارشی انتقال دهند. در محیط های بیمارستانی، در آزمایشگاه و در هر محیط دیگری که شرایط برای عمل انتقال فاکتور مقاومت مناسب باشد، پلاسمیدهای R می توانند از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال یابند(۳). در این مطالعه انتقال فاکتور مقاومت در سویه های سالمونلای جدا شده از مواد غذایی بررسی گردید. این بررسی با روش کانجوگاسیون (متد کشت مخلوط) انجام شد. فاکتورهای مقاومت قابل انتقال در سویه های مقاوم دیده شد و شایع ترین الگوی مقاومتی انتقال یافته TE/SXT/C/AM/CN/CTX بود. در سال ۱۹۹۰ فرهودی مقدم و همکاران پس از جداسازی سالمونلاها از نمونه های اسهال در بچه های کم تر از ۵ سال در تهران، انتقال فاکتور مقاومت از طریق کانجوگاسیون را بررسی کردند. ۷۱/۹ درصد از سویه های مقاوم دارای فاکتورهای مقاومت قابل انتقال بودند. بیشترین میزان انتقال برای کلرامنفیکل با ۷۷/۶ درصد بود و کم ترین میزان هم مربوط به استرپتومایسین با ۲۰ درصد انتقال گزارش شد (۱۰). Lazora و همکاران (۲۰۰۴) سالمونلا انتریکای جداشده از خوک را برای عمل کانجوگاسیون با *E. coli* K_{12} مجاور کردند که سویه های ترنس کانجوگانت انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک های سولفامتوکسازول و تتراسایکلین و سولفونامید را نشان دادند (۲۲). در مطالعه ی Nogrady و همکاران در مجارستان (۲۰۰۵) مقاومت به کلرامفنیکل در سویه های سالمونلا بررسی شد که انتقال این مقاومت توسط پلاسمیدهای قابل انتقال در پروسه ی کانجوگاسیون به اثبات رسید (۱۱). Poppe و همکاران در کانادا (۲۰۰۶) سویه های سالمونلا نیوپورت را به عنوان دهنده و سویه *E. coli* C_{600} Nal^r را به عنوان پذیرنده در پروسه ی کانجوگاسیون استفاده کردند که پلاسمیدهای قابل انتقال، مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک ها را انتقال داده بودند(۱۷). در مطالعه Romani و همکاران (۲۰۰۸) سویه های سالمونلا برای بررسی انتقال مقاومت با سویه پذیرنده *E. coli* K_{12} J_5 کانجوگه شدند. نتایج گویای میزان انتقال مقاومت بالایی بویژه در مورد آمپی سیلین و تتراسایکلین بودند (۲۳). در مطالعه Lindsey وهمکاران در سال ۲۰۰۹ پلاسمیدهای R عامل بروز مقاومت آنتی بیوتیکی شناخته شدند (۲۴). در مطالعه Khan و همکاران (۲۰۰۹) پلاسمید بزرگی که حاوی ژن‌های مقاومت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول و استرپتومایسین بود از سویه های سالمونلای جدا شده از غذاهای دریایی به دست آمد (۲۵). مطالعات متعددی هم در زمینه ی انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی در محیط های آبی از جمله آب های قابل شرب رودخانه ها، لجن زارها، فاضلاب ها و پساب های شیمیایی توسط محققان صورت گرفته و باکتری های جدا شده از این آب ها، مقاومت های چندگانه را به نمایش گذاشته اند(۱۳ ,۲۶ ,۲۷). نتایج انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی در مطالعه ما با محققین حاضر هم سویی دارد. وجود پلاسمیدهای R در سویه های جدا شده تأیید شد زیرا بسیاری از آن ها قادر به انتقال مقاومت بودند. لازم به ذکر است که عوامل مختلفی ممکن است مانع این انتقال شوند. یک انتقال مقاومت موفق بستگی به وجود پیلی جنسی، گانجوگاسیون مناسب و وجود پلاسمیدهای قابل انتقال دارد و علت ناتوانی در کسب مقاومت می تواند نشان دهنده ی آن باشد که ژن های مقاومت، کروموزومی بوده و یا پلاسمید مربوطه غیر قابل انتقال می باشد بنابراین نتایج آزمایش در شرایط مختلف می تواند متفاوت باشد. امروزه بروز مقاومت های چندگانه در اکثر میکروب های بیماری زا از مشکلات درمان بیماری ها در جهان است. محدود کردن استفاده از آنتی بیوتیک ها در حیوانات و انسان، انجام تست های حساسیت آنتی بیوتیکی برای انتخاب داروی مناسب و رعایت‌دوز دارو و طول درمان می توانند گسترش سویه های مقاوم را کاهش دهند.

منابع

۱- ادمز، ام.ار.، موس، ام.ا.، ترجمه: مرتضوی، ع.، صادقی ماهونک، ع.، ۱۳۸۲، میکروبیولوژی غذایی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، چاپ دوم، ص۳۱۱-۳۳۰.

۲- ادیب فر، پ.، ۱۳۸۰، میکروب شناسی پزشکی، نشر نور دانش، ص۴۶۱-۴۸۴.

3- Mansouri, S., Shareifi, S., (2002). Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia*

Archive of SID

www.SID.ir

coli causing UTLs: and that of human fecal flora in the southeast of Iran, Microbial drug rasistance, **8**:123-128.

۴- جزوه مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، آبان ماه ۱۳۸۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی، تجدید نظر سوم.

۵- ام.جی، ج.، ترجمه: مرتضوی، ع.، معتمدزادگان، ع.، اعلمی، م.، گوهری اردبیلی، ا.، ۱۳۸۲، میکروبیولوژی غذایی مدرن، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، جلد دوم، ص۴۲۳-۴۵۴.

6- Baron, E.J., Finegold. S.M., Baily and Scott's Diagnostic Microbiology, the C.V. Mosby Company, (2002).

7- Bauer, Kirby Sherris & Truck, (1996). Am. J. clin path, **45**:493.

8- Performance Standard for antimicrobial disc susceptibility tests, (2002). Nccls, **22**:(1).

9- Forbes, B.A.,Sahm, D.F.,Weissfeld, A.S., (1998). Diagnostic Microbiology, 237-277.

10- Farhoudi-Moghaddam, A.A., Katouli, M., Jafari, A., Bahavar, M.A., Parsi, M., Malekzadeh, F., (1990). Antimicrobial drug resistance and resistance factor transfer among clinical isolates of *Salmonella* in Iran, From the Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Scand J Infect Dis **22**: 197-203.

11- Nogrady, N., Gado, I., Zsolt Fekete, P., Paszeti, J., (2005). synChloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* isolated from human and animal sources in Hungary, Vet. Med. – Czech, **4**: 164–170.

12- Tutura, G.C., Massa, S., Ghazviniazdeh, H., (1990). Antibiotic resistance among *E. coli* from bacteria isolated from carcasses of commerically slaughtered chickens, Int. J Food Microbial. **11**: 354-357.

13- Alcaide, E., Garay, E., (1984). R-Plasmid Transfer in *Salmonella* spp. Isolated from Wastewater and Sewage-Contaminated Surface Waters, Applied and Environmental Microbiology, 435-438.

14- Bhatia, R., Vaze, S., Agarwal, D.S., (1981).Transferable multi drug resistance in *S. typhimurium*, Indian of Medical Research **14**:642-647.

15- Hidetake, E., Morioka, A., Ishihara, K., (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002), report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, Japan, 266-270.

16- Altier, C., (2004). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from swine, Center for Veterinary Medicine.

17- Poppe, C., Martin, L., *et al*, (2006). Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella Newport* isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada, PMC, **70**:105-114.

18- Ray, K.A., Warnick, L.D., Mitchell, R.M., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Wells, S.J., Fossler, C.P., Halbert, L.W., May, K., (2006). Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* from Organic and Conventional Dairy Farms, American Daily Science Association, 2038-2050.

19- Stevenson, J.E., Gay, K., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M., Angulo, F.J., (2007). Increase in Nalidixic Acid Resistance among *Non-Typhi Salmonella enterica* Isolates in the United States from 1996 to 2003, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **51**(1): 195-197.

20- Van, T.T.H., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L.T., Coloe, P.J., (2007). Detection of *Salmonella* spp. in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance, Applied and Environmental Microbiology, **73**(21):6885-6890.

۲۱- وجدانی فر، ن.، ۱۳۸۴، سروتایپینگ سالمونلا در گوشت و مرغ بسته بندی شده در تهران، پایان نامه دکتری، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

22- Lazaro, N. S., Tibana, A., Rodrigues, D.P., M.F.Reis, E, R.Quintaes, B., Hofer, E., (2004). Antimicrobial Resistance and R-plasmid in *Salmonella* spp from swine and abattoir environments, pesq. Vet. Bras. 57-60.

23- Romani, C., Aleo, A., Pellissier, N., Viganò, A., Pontello, M., (2008). Characterization of multi-drug resistance in *Salmonella* strains isolated from animals, Ann Ist Super Sanità, **44**(3):292-300.

24- Lindsey, R.L., Fedorka-Cray, P.J., Frye, J.G., Meinersmann, R.J., (2009). Inc A/C Plasmids Are Prevalent in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates, Applied and Environmental Microbiology, **5**(7):1908-1915.

25- Khan, A.A., Ponce, E., Nawaz, M. S. , Cheng, C.M., Khan, J.A., West, C.S., (2009).

Archive of SID

www.SID.ir

Identification and Characterization of Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes among *Salmonella* Strains Isolated from Imported Seafood, American Society for Microbiology, No.4.

26- Alc Mellovl, A., Hassani, L., (1999). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from children living in the waste water- spreading field of marrakesh city, J.Microbiol-Biotech. And Biotechnology, **15**:91-96.

27- Bell, J.B., Macrae, W.R., Elliott, G.E., (1991). Incidence of R-factor in fecal coli from and *Salmonella* populations of the red river in Canada, Appl. Environ. Microbiol, **42**:204-210.

28-

Archive of SID

www.SID.ir