

جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا تیفی موریوم

رضا رنجبر^{PhD*}، علی ناغونی^{MSc¹}، مرتضی ایزدی^{MD²}

نعمت... جنیدی جعفری^{MD³}، یونس پناهی^{PhD³}

* آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران
ranjbar@bmsu.ac.ir

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۸/۷/۲۹

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۸/۷/۱۵

چکیده

اهداف. سالمونلوز در زمره مهم‌ترین بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق غذا محسوب می‌شود. بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم‌اکنون به مشکلی رو به گسترش در میان گونه‌های سالمونلا تبدیل شده و معضلات بهداشتی و پزشکی رو به افزایشی را در کنترل و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری به وجود آورده است. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های بالینی سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار تیفی موریوم بود.

روش‌ها. سویه‌های سالمونلا از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران از اردیبهشت ۱۳۸۶ تا خرداد ۱۳۸۷ جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده به ۸ آنتی‌بیوتیک مطابق با روش استاندارد توصیه شده از طرف جدول استاندارد CLSI تعیین شد.

یافته‌ها. از مجموع کل سرووارهای جداسازی شده، ۲۱ ایزوله (۱۵/۲٪) مربوط به سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار تیفی موریوم بودند. از این تعداد، ۱۴ ایزوله (۶۶/۶٪) مقاوم به کلرامفنیکل، ۱۲ ایزوله (۵۷/۱٪) مقاوم به آمپی‌سیلین، ۵ ایزوله (۲۳/۸٪) مقاوم به کوتریموکسازول، ۳ ایزوله (۱۴/۳٪) مقاوم به نئومایسین و ۲ ایزوله (۹/۵٪) مقاوم به نالیدیکسیک‌اسید بودند. هیچ کدام از ایزوله‌ها نسبت به سیروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین مقاومتی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری. سالمونلا تیفی موریوم به‌عنوان یکی از سرووارهای غیرتیفوئیدی نسبتاً شایع در بیماران قابل جداسازی است. آنتی‌بیوتیک‌های سیروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین در صورت داشتن اندیکاسیون مصرف، کارایی مناسبی در مهار رشد این سرووار دارند.

کلیدواژه‌ها: سالمونلا تیفی موریوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت‌های منتقل‌شونده از راه غذا

مقدمه

جنس سالمونلا یکی از جنس‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه است که برای اولین بار توسط *دانیل سالمون* شناسایی شد [۱]. بسیاری از باکتری‌های تشکیل‌دهنده این جنس می‌توانند برای انسان و حیوانات بیماری‌زا باشند [۲]. این باکتری یکی از شایع‌ترین باکتری‌های منتقل‌شده از حیوانات به انسان‌ها است که به دلیل دارا بودن مخازن حیوانی متعدد، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های منتقل‌شونده از غذا و یکی از مشکلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌شود [۳، ۴].

طبقه‌بندی این میکروارگانیسم‌ها پیچیده است و تاکنون بر اساس آنتی‌ژن‌های O و H بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ سالمونلا شناسایی شده است [۵]. سالمونلا در انسان می‌تواند عامل بیماری‌هایی مانند گاستروانتریت، تب روده‌ای (تیفوئید یا پاراتیفوئید) و سپتی‌سمی باشد [۳]. شایع‌ترین تظاهر عفونت سالمونلایی، عفونت‌های گوارشی است [۴]. میکروارگانیسم‌های غالب در ایجاد این عفونت، *سالمونلا تیپ‌موریوم* و *سالمونلا انتری‌تیدیس* هستند [۲]. دوره کمون گاستروانتریت سالمونلایی، ۸ تا ۲۴ ساعت است. از علائم بیماری می‌توان به تهوع، سردرد، استفراغ و اسهال شدید با اندکی لوکوسیت در مدفوع اشاره کرد [۲]. حدود دو هفته پس از عفونت، اکثر بیماران کشت مدفوع مثبت خواهند داشت [۶]. مهم‌ترین اقدام درمانی در گاستروانتریت سالمونلایی، اصلاح دهیدراتاسیون و اختلالات الکترولیتی است. معمولاً بدون نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها بهبودی حاصل می‌شود [۶]. از آنتی‌بیوتیک‌ها فقط در بیماران پرخطر استفاده می‌شود، از جمله در بیماران کمتر از ۳ ماه و بیماران که ضعف سیستم ایمنی، سوء تغذیه و بدخیمی دارند [۲]. آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول، آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در درمان سالمونلوز تا قبل از دهه ۸۰ میلادی بودند [۷]. طی دو دهه اخیر، سویه‌های سالمونلای دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است [۸، ۹، ۱۰]. این امر باعث شد تا از سفالوسپورین‌های با طیف اثر گسترده و فلوروکینولون‌ها در درمان سالمونلاهای مقاوم به چند دارو استفاده شود [۱۱، ۱۲].

از سال ۱۹۹۱ میلادی، سویه‌های سالمونلا با مقاومت سطح بالا به سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها نیز گزارش شده است که در این موارد استفاده از آزیترونام و آزیترومایسین مؤثر بوده است [۱۳]. داروهای جدید علاوه بر هزینه گزاف، عوارض ناخواسته هم دارند [۱۴]. مصرف بی‌رویه و غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها بدون توجه به الگوهای مقاومتی میکروارگانیسم می‌تواند باعث ظهور سویه‌هایی شود که حتی به درمان‌های جدید مقاومت داشته باشند و ظهور سویه‌های اخیر با مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها مبین این حقیقت است [۱۳]. از طرفی الگوی مقاومت در مناطق مختلف متفاوت بوده و آگاهی از آن برای پزشکان هر منطقه به منظور به‌کارگیری صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماران ضروری است.

این پژوهش به‌منظور بررسی میزان جداسازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا* سرووار تیپ‌موریوم جداشده از موارد بالینی انجام گرفت.

روش‌ها

این تحقیق، مطالعه‌ای توصیفی است که روی نمونه‌های بالینی به‌دست‌آمده از بیماران مراجعه‌کننده به چند بیمارستان در شهر تهران انجام شد. نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال بلافاصله پس از نمونه‌گیری به محیط کشت سلنیت F منتقل شد. نمونه‌ها به مدت حداکثر ۶ ساعت در این محیط نگهداری شدند. سپس به محیط‌های کشت انتخابی به مانند سالمونلا-شیکلا آگار (SS) و بیسموت‌سولفیت آگار انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در روز بعد، کلونی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی شده و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد نظیر انتقال روی محیط TSI، سیترات، لیزین‌آیرون آگار، اوره و MRVP مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های اختصاصی سرووار انجام پذیرفت.

به‌منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک‌دیفیوژن آگار استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق شامل آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، کوتریموکسازول (۲۵ μg)، نالیدیکسیک-اسید (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، نئومایسین (۳۰ μg) و سفتریاکسون (۳۰ μg) (پادتن طب؛ ایران) بودند. آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با استاندارد نیم‌مک‌فارلند انجام شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به‌وسیله سواب استریل پنبه‌ای روی محیط مولر هیتتون آگار (Merck؛ آلمان) به‌صورت متراکم کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند. محیط‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. سپس قطر منطقه ممانعت از رشد به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و مقاومت یا حساسیت باکتری با استفاده از جدول استاندارد CLSI مشخص شد.

نتایج

از مجموع سویه‌های جداسازی‌شده سالمونلا، تعداد ۲۱ ایزوله (۱۵/۲٪) مربوط به *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا* سرووار تیپ‌موریوم بودند. از این تعداد، ۱۴ ایزوله (۶۶/۶٪) مقاومت نسبت به کلرامفنیکل، ۱۲ ایزوله (۵۷/۱٪) مقاومت به آمپی‌سیلین، ۵ ایزوله (۲۳/۸٪) مقاومت به کوتریموکسازول، ۳ ایزوله (۱۴/۳٪) مقاومت به نئومایسین و ۲ ایزوله (۹/۵٪) مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید داشتند.

افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به‌علت استفاده بدون کنترل از مواد ضد میکروبی در محصولات غذایی حیوانات یا استفاده غیراصولی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها باشد [۱۶، ۱۷]. اخیراً ظهور سویه‌های واجد مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی (MDR) سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت‌های حاصل از این میکروارگانیسم‌ها در انسان‌ها و حیوانات شده است [۱۸، ۱۹].

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی در آزمایشگاه نشان داد که سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین، آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان سالمونلا تیفی موریوم هستند. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول به ترتیب ۶۶/۶٪، ۵۷/۱٪ و ۲۳/۸٪ بود. البته گفتنی است که امروزه این آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر در درمان عفونت‌های حاصل از سالمونلا مورد استفاده قرار می‌گیرند. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئوماپسین نیز که از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی است، بیش از ۱۴٪ بود. از طرف دیگر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی دیگر یعنی جنتامایسین در این تحقیق مشاهده نشد.

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مورد نالیدیکسیک اسید حاکی از آن بود که فقط در ۲ مورد (۹/۵٪) در روش دیسک دیفیوژن، قطر هاله ممانعت از رشد کوچک‌تر یا مساوی ۱۳ میلی‌متر بود که نشان‌دهنده میزان پایین مقاومت سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم مورد مطالعه نسبت به نالیدیکسیک اسید است. در ضمن بیش‌ترین میزان مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل (۹ مورد) گزارش شد.

در کشور عربستان سعودی، طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ روی ۲۲ سویه سالمونلا (۱۷ مورد سالمونلا تیفی موریوم و ۵ مورد سالمونلا انترتیدیسی) نشان داده شد که تمامی سویه‌های جداسازی شده به سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بودند، که با نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد [۲۰].

هم‌چنین در مطالعه دیگر که در ایالات متحده آمریکا روی حدود ۲۴۹ ایزوله سالمونلا تیفی موریوم انجام شد، ۱۶۴ ایزوله (۶۵/۹٪) به آمپی‌سیلین و ۱۱۶ ایزوله (۴۶/۶٪) به کلرامفنیکل مقاوم بودند. از لحاظ مولکولی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل در سالمونلا بیش‌تر به‌وسیله پلازمیدها انتقال می‌یابد [۲۱].

بررسی مقاومت دارویی سالمونلاهای غیر تیفوئیدی در دانمارک طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۲ منجر به جداسازی ۸۱۴۴ سویه غیر تیفوئیدی سالمونلا از منابع مختلف شد که از این تعداد، ۱۸۸۶ مورد مربوط به سالمونلا تیفی موریوم‌های جداسازی شده از موارد بالینی بودند. در این بررسی، بیش‌ترین میزان مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در سالمونلا تیفی موریوم (۱۹٪) نشان داده شد [۲۲].

هیچ‌کدام از ایزوله‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین مقاومتی نشان ندادند. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. جدول ۲ نیز نشان‌دهنده فراوانی الگوهای مقاومت واحد و چندگانه آنتی‌بیوتیکی است.

جدول ۱) الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

در سالمونلا تیفی موریوم جداسازی شده از موارد بالینی

| آنتی‌بیوتیک‌ها | غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها (µg) | تعداد سویه‌های مقاوم (%) |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| کلرامفنیکل | ۳۰ | ۱۴ (۶۶/۶) |
| آمپی‌سیلین | ۱۰ | ۱۲ (۵۷/۱) |
| کوتریموکسازول | ۲۵ | ۵ (۲۳/۸) |
| سفتریاکسون | ۳۰ | ۰ (۰) |
| کینولون‌ها | | |
| نالیدیکسیک اسید | ۳۰ | ۲ (۹/۵) |
| سیپروفلوکساسین | ۵ | ۰ (۰) |
| آمینوگلیکوزیدها | | |
| نئوماپسین | ۳۰ | ۳ (۱۴/۳) |
| جنتامایسین | ۱۰ | ۰ (۰) |

جدول ۲) فراوانی الگوهای مقاومت یگانه و چندگانه آنتی‌بیوتیکی

در سالمونلا تیفی موریوم

| الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی | تعداد ایزوله‌ها |
|---------------------------|-----------------|
| C | ۲ |
| Sx | ۱ |
| AC | ۹ |
| ASx | ۱ |
| ACNeSx | ۱ |
| CNaNeSx | ۱ |
| ACNaNeSx | ۱ |

A (آمپی‌سیلین)، C (کلرامفنیکل)، Na (نالیدیکسیک اسید)، Ne (نئوماپسین) و Sx (کوتریموکسازول)

بحث

برای درمان انتریت‌های سالمونلائی در مواردی که خطر عفونت تهاجمی وجود دارد (مانند بیماران با سیستم ایمنی تضعیف‌شده، بیماران که عفونت خارج روده‌ای دارند و شیرخواران و کودکان) استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها الزامی است [۲]. امروزه به‌دلیل افزایش مقاومت در سویه‌های سالمونلا، بیشتر از فلوروکینولون‌ها نظیر سیپروفلوکساسین و سفالوسپورین‌های نسل سوم نظیر سفتریاکسون در درمان عفونت‌های حاصل استفاده می‌کنند و کمتر از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کوتریموکسازول، که زمانی بیش‌ترین استفاده را در درمان این عفونت‌ها داشتند، استفاده می‌شود [۷، ۸]. برای اولین بار مقاومت آنتی‌بیوتیکی به کلرامفنیکل در سالمونلا‌ها در دهه ۵۰ میلادی در انگلستان و سپس در یونان مشاهده شد [۱۵].

نتیجه گیری

سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار تیفی موریم به عنوان یکی از سرووارهای غیرتیفوئیدی نسبتاً شایع در بیماران قابل جداسازی است. آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین در صورت داشتن اندیکاسیون مصرف، کارآیی مناسبی در مهار رشد این سرووار دارند.

منابع

- humans in England and Wales: A comparison of data for 1994 and 1996. *Microb Drug Resist.* 1997;3:263-6.
- ۱۰- ایرانشاهی نگین، رنجبر رضا، سیادت داود، هرزندی ناصر، نجاتی مهدی، نوروزیان داریوش و همکاران. ارزیابی آزمون حساسیت به نالیدیکسیک اسید جهت غربالگری سویه های بالینی سالمونلای کاهش حساسیت یافته به سیپروفلوکساسین. *مجله میکروشناسی پزشکی ایران.* ۱۳۸۷؛ ۳(۴):۶۱-۵۰.
- 11- Barnass S, Franklin J, Tabaqchali S. The successful treatment of multiresistant nonenteric salmonellosis with seven day oral ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1990;25:299-300.
- 12- Bryan JP, Rocha H, Scheld WM. Problems in salmonellosis: Rationale for clinical trials with newer β -lactam agents and quinolones. *Rev Infect Dis.* 1986;8:189-207.
- 13- Parry CM, Tinhchien T, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *Engl J Med.* 2002;347(20):1770-80.
- 14- Kaplana D, Colberg MB, Rubin RH. *Salmonella infectious in Gorbach infectious disease.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
- 15- Mirza SH, Beeching NJ, Hart CA. Multi-drug resistant typhoid: Global problem. *J Med Microbiol.* 1996;44:317-9.
- 16- Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Intl J Antimicrob Agents.* 2000;14:327-35.
- 17- Aarestrup FM. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Intl J Antimicrob Agents.* 1999;12:279-85.
- 18- Murray BE. Resistance of Shigella, Salmonella and other selected enteric pathogens to antimicrobial agents. *Rev Infect Dis.* 1986;8(2):172-81.
- 19- Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: Resistance gene clusters in Salmonella chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 2006;8:1923-30.
- 20- Halawani E, Shohayeb M. Molecular characterization of multiple antibiotic resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium and Eenteritidis isolated in Saudi Arabia. *World J Med Sci.* 2008;3(1):43-9.
- 21- Margaret A, Dale D, Hancock T, Besser E, Daniel H, Rice J, et al. Changes in antimicrobial resistance among Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates from humans and cattle in the Northwestern United States, 1982-1997. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(6):802-6.
- 22- Marianne NS, Strodl A, Soren A, Steen E, Frank MA. Antimicrobial drug resistance of Salmonella isolates from meat and humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):638-41.
- 1- Winn W, Allen S, Janda W. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 6th ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
- 2- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology.* 23rd ed. New York: McGraw-Hill; 2004.
- 3- Lesser C, Miller SI. *Salmonellosis.* In: Fauci F, Braunwald E, Isselbacher KJ, editors. *Harrisons principles of internal medicine.* 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- 4- Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Zaeimi Yazdi J, Morovvati S, Jonajdi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. *Pak J Biol Sci.* 2007;10(7):1138-40.
- ۵- رنجبر رضا، ناغونی علی، تبرائی بهمن. ناهمگونی الگوی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در میان ایزوله های بالینی سالمونلا در تهران. *مجله میکروشناسی پزشکی ایران.* ۱۳۸۷؛ ۲(۲):۳۳-۲۷.
- ۶- نورمظفری امیر، تهرانی هما، نیاکانی مریم. بررسی میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید در سالمونلاهای تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی جدا شده از بیماران بستری در یک دوره یکساله ۸۵-۱۳۸۴. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران.* ۱۳۸۶؛ ۱۴(۵۶):۴۳-۵۱.
- 7- Chia JH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in Salmonella isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):1-7.
- 8- Davis MA, Hancock DD, Besser TE. Changes in antimicrobial resistance among Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates from humans and cattle in the Northwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:802-6.
- 9- Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA. Increase in multiple antibiotic resistances in nontyphoidal salmonellas from