

تحقیقی

مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا انتریکا، مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ CMY-2 در طیور

مریم نادری مزجین^۱، دکتر پژواک خاکی^{۲*}، دکتر فاطمه نوربخش^۳^۱ - کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی - میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران.^۲ - دانشیار، بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.^۳ - استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلا به عنوان یک پاتوژن منتقله از غذا در سراسر جهان شناخته شده است. محصولات مرغ به طور گسترده به عنوان مخزن قابل توجهی برای سالمونلا محسوب می شوند. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا انتریکا، مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended Spectrum Beta Lactamases: ESBL) در طیور انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۷۰ سروتیپ سالمونلا انتریکا از جوجه های گوشتی جمع آوری شد. حساسیت آنتی بیوتیکی تمامی جدایه های سالمونلا با روش استاندارد انتشار دیسک کربی - بانر ارزیابی و ۲۹ آنتی بیوتیک در این مطالعه استفاده شد. کلبسیلا پنومونه (ATCC 700603) به عنوان گونه های کنترل کیفیت استفاده گردید. تعیین سالمونلاهای مولد ESBLs توسط دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد.

یافته ها: سروتیپ های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس، شایع ترین سروتیپ ها تعیین شدند. همه سروتیپ ها به جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، ایمی پنم و انروفلوکساسین حساس بودند. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفالوکسین (۹۶ درصد)، سفازولین (۹۶ درصد)، سفالوتین (۶۵ درصد) مشاهده شد. مقاومت چنددارویی در ۵۹ جدایه (۸۴ درصد) یافت شد. ۴۷ جدایه (۶۷ درصد) مولد ESBL بودند. با انجام PCR، ۱۷ جدایه (۳۳/۳۳ درصد) حاوی ژن *balaCMY2* بودند.

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

کلید واژه ها: سالمونلا، ESBL، مقاومت چنددارویی، ژن *balaCMY2*

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

نشانی: کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش میکروب شناسی
کدپستی ۳۱۹۷۱۹۷۵۱، تلفن ۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸، نمابر ۳۴۵۵۲۱۹۴

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۱۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۶

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

مقدمه

سالمونلا انتریکا باکتری مشترک بین انسان و دام است که از طریق زنجیره غذایی منتقل می شود (۴). این باکتری یکی از شایع ترین علل اسهال و استفراغ است و استفاده نادرست و هضم غذایی که به طور کامل پخته نشده در درجه اول باعث عفونت می شود. بنابراین پیشگیری و کنترل سالمونلوز در انسان تا حد زیادی براساس کنترل و پیشگیری عفونت در حیوانات است (۵). در مطالعه سلطان دلال و همکاران در شهرستان رباط کریم، سالمونلا به عنوان عامل اسهال ۷/۲ درصد از کودکان گزارش گردید (۶). برای درمان بیماری های ناشی از سالمونلا از آنتی بیوتیک ها استفاده می شود؛ اما شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک ها در میان سالمونلاها مشکل اصلی در درمان عفونت های سالمونلائی است (۷). از علل افزایش مقاومت

باکتری سالمونلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و از مهم ترین عوامل بیماری زای انتقال یابنده از طریق مواد غذایی به خصوص گوشت طیور است که باعث بروز بیماری های مختلف از جمله سالمونلوزیس می شود (۱). بر طبق آخرین طبقه بندی جنس سالمونلا دارای دو گونه مهم سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری است که گونه انتریکا خود دارای شش تحت گروه شامل سالمونلا آریزونا، انتریکا، دی آریزونا، سالامی، هوتا و ایندیکا است (۲). سالمونلوز یکی از بیماری های مهم و خطرناک باکتریایی است که انسان و بسیاری از گونه های جانوری را تهدید می کند. سالمونلوز طیور از بیماری های مهم مشترک بین انسان و دام محسوب می گردد (۳).

روش بررسی

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

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

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

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

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

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

جدول ۱: مشخصات پرایمر اختصاصی ژن *balaCMY2*

| Target gene | Primer sequence | Product size | References |
|------------------|-----------------------------|--------------|-----------------|
| -F <i>blaCMY</i> | 5- 'CTGCGGAACCGTAATCCAGG-3' | 1004bp | Sio et al. 2000 |
| -R <i>blaCMY</i> | 5- 'CGTTATGCTGCGCTCTGCTG-3' | | |

جدول ۳: فراوانی جدایه‌های مورد آزمون آنتی‌بیوگرام

| آنتی‌بیوتیک‌ها | تعداد (درصد) | |
|-----------------|--------------|------------|
| | مقاوم | نیهمه حساس |
| سفازولین | ۶۷ (۹۶) | ۱ (۱) |
| سفالکسین | ۶۷ (۹۶) | ۰ (۰) |
| سفالوتین | ۴۶ (۶۵) | ۱۸ (۲۷) |
| کلیستین | ۴۲ (۶۰) | ۵ (۸) |
| نیتروفوراتونین | ۲۳ (۳۳) | ۳ (۵) |
| آموکسی سیلین | ۱۲ (۱۷) | ۲۰ (۲۹) |
| تتراسایکلین | ۱۲ (۱۷) | ۱۲ (۱۸) |
| آمیگاسین | ۹ (۱۳) | ۱۲ (۳۸) |
| فورازولیدون | ۹ (۱۳) | ۵ (۸) |
| کوتریموکسازول | ۷ (۱۰) | ۰ (۰) |
| کانامایسین | ۵ (۷) | ۵ (۸) |
| کلرامفتیکل | ۴ (۶) | ۰ (۰) |
| نتومایسین | ۴ (۶) | ۳۳ (۴۷) |
| استریتومایسین | ۴ (۶) | ۷ (۱۱) |
| سفتازیدیم | ۳ (۴) | ۲ (۴) |
| سفکسیم | ۳ (۴) | ۰ (۰) |
| سفتیزوکسیم | ۳ (۴) | ۴ (۷) |
| تالییدیسیک اسید | ۳ (۴) | ۶ (۱۰) |
| پیراسیلین | ۲ (۳) | ۲ (۴) |
| سفتراکسون | ۱ (۱) | ۳ (۵) |
| فلوروفنیکول | ۱ (۱) | ۴ (۷) |
| آمی سیلین | ۰ (۰) | ۳ (۵) |
| افلاکساسین | ۰ (۰) | ۰ (۰) |
| ایمی پنم | ۰ (۰) | ۰ (۰) |
| جتنامایسین | ۰ (۰) | ۰ (۰) |
| سفتوتاکسیم | ۰ (۰) | ۴ (۷) |
| سفی پیم | ۰ (۰) | ۲ (۴) |
| سیپروفلوکسازین | ۰ (۰) | ۰ (۰) |
| انروفلوکسازین | ۰ (۰) | ۰ (۰) |

تعیین حساسیت جدایه‌های مختلف سالمونلاهای جدا شده نشان داد که از میان ۷۰ جدایه سالمونلا، ۵۹ جدایه (۸۴ درصد) با داشتن سه مقاومت و یا بیشتر به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، بنا به قاعده به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت‌های چند دارویی مشخص شدند. ۱۰ جدایه به ترتیب با ۱۴ مورد مقاومت (یک جدایه)، ۱۰ مورد مقاومت (۲ جدایه)، ۹ مورد مقاومت (یک جدایه) و ۸ مورد مقاومت (۶ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاوم‌ترین جدایه‌ها تعیین شدند.

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

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

به منظور شناسایی ژنوتیپی جدایه‌های سالمونلا اتریکا تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ CMY با آزمایش PCR، حضور ژن blaCMY2 در جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت (جدول یک). در ابتدا DNA تمام سروارهای مورد مطالعه به روش استاندارد فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل استخراج گردید. آزمایش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر از محلول مسترمیکس (شرکت Ampliqon) برای هر نمونه تهیه شد. با روش گرادیانت دمای اتصال مناسب برای پرایمر برای ۳۲ سیکل انجام شد.

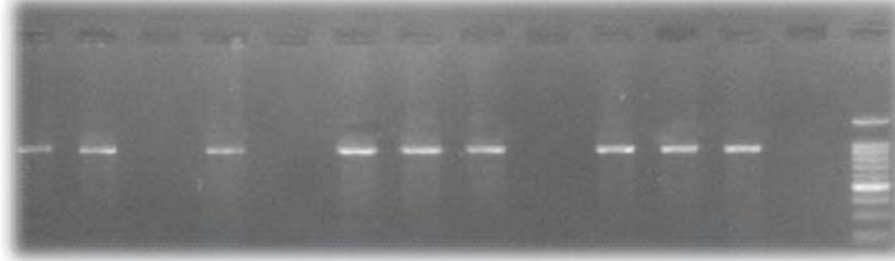
یافته‌ها

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

| جدول ۲: فراوانی سروارهای جدا شده | |
|----------------------------------|--------------|
| سرو تیپ | تعداد (درصد) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | ۲۹ (۴۱/۴) |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | ۱۵ (۲۲) |
| <i>Salmonella newport</i> | ۶ (۸) |
| <i>Salmonella infantis</i> | ۵ (۷) |
| <i>Salmonella arizona</i> | ۲ (۳) |
| <i>Salmonella gallinarum</i> | ۲ (۳) |
| <i>Salmonella congo</i> | ۲ (۳) |
| <i>Salmonella typhi</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella dublin</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella II</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella muenchen</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella dytona</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella nigeria</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella panama</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella urbana</i> | ۱ (۱/۴) |
| <i>Salmonella victoraborg</i> | ۱ (۱/۴) |

همه ۷۰ جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، افلاکسازین، ایمینم، انروفلوکسازین حساس بودند. کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروفنیکول و سفتریاکسون (هر کدام یک درصد) و پیراسیلین (۳ درصد) مشاهده شد. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین (۹۶ درصد)، سفازولین (۹۶ درصد)، سفالوتین (۶۵ درصد) مشاهده شد و در مراتب بعدی آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین (۶۰ درصد)، نیتروفوراتونین (۳۳ درصد)، آموکسی سیلین و تتراسایکلین (۱۷ درصد) قرار داشتند (جدول ۳).

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴



شکل ۱: قطعات حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر *blaCMY2* (قطعاتی با طول تقریبی ۱۰۰۴) ستون ۱: سایز مارکر (۱۰۰ bp)؛ ستون ۲: نمونه کنترل منفی؛ ستون ۳: نمونه کنترل مثبت کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603؛ ستون‌های ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ و ۹ و ۱۱ و ۱۳ و ۱۴: جدایه‌های *blaCMY2* مثبت ستون‌های ۲ و ۶ و ۱۰ و ۱۲: جدایه‌های فاقد ژن *blaCMY2*

کلرامفنیکل، تری‌متوپریم-سولفامید و بیشترین مقاومت در برابر نیتروفوران‌توئین، اریترومایسین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و سفالوتین نشان داده شد (۱۶). در این مطالعه تنها با در نظر گرفتن نتایج حاصل از بررسی جدایه‌های طیور مشخص می‌شود که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم-سولفامی کلرامفنیکل و جنتامایسین در مطالعه حاضر و مطالعه بایرامی و همکاران (۱۶) در حداقل میزان است که در مقایسه با نتایج ما، تنها در آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مشابهت داشت.

در مطالعه حاضر به ترتیب سرووارهای تیفی موریوم، انتریتیدیس، نیوپورت و اینفتیس، بالاترین میزان جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند. در تحقیقی مشابه که در اسپانیا توسط Carraminana انجام شد؛ بیشترین سرووارهای جدا شده از طیور را *Virchow*، *Heidelberg*، *Enteritidis*، *Hadar*، *Newport* و *Typhimurium* گزارش گردید (۱۷). در مطالعه دیگری در نپال سرووارهای جدا شده *Cholorasuis*، *Pullorum*، *Typhi* و *Gallinarum* گزارش شد (۱۸). Ammar و همکاران سروتپ‌های *Livingstone* و *Typhimurium* را از کلواک ماکیان جدا کردند (۱۹). با توجه به گزارشات فوق می‌توان نتیجه گرفت اختلاف در مناطق جغرافیایی مورد آزمایش می‌تواند نتیجه اختلاف در سروتپ‌های جدا شده در کشورهای مختلف و از جمله ایران باشد. در مطالعه Elumalai و همکاران در بررسی سالمونلا، جدایه‌ها به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، سفالوسپورین (سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون، سفیکسیم و سفیم) حساس بودند (۲۰). در مطالعه حاضر همه ۷۰ جدایه، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیروفلوکساسین، افلاکساسین، ایمینم و انروفلوکساسین حساس بودند.

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

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

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه سروتپ‌های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس، شایع‌ترین سروتپ‌ها تعیین شدند. بیشترین مقاومت به سفالکسین، سفازولین و سفالوتین مشاهده گردید. مقاومت چنددارویی در ۸۴ درصد از جدایه‌ها تعیین شد. ۶۷ درصد از جدایه‌ها مولد ESBL بودند. ۳۳/۳۳ درصد از جدایه‌ها حاوی ژن *blaCMY2* بودند.

سویه‌های ESBL نوع خاصی از مقاومت‌های دارویی هستند که اولین بار در سال ۱۹۸۳ گزارش شدند (۱۳). کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم و سولفامتازول از اولین داروهای ضد میکروبی بودند که در درمان عفونت‌های سالمونلایی مورد استفاده قرار گرفتند و در اکثر موارد میزان حساسیت *in vitro* به این داروها با اثرات بالینی آنها مطابقت داشت. به مرور زمان و با ایجاد مقاومت‌های دارویی به‌ویژه مقاومت‌های چندگانه در سالمونلا تیفی و غیرتیفی درمان با مشکل مواجه گردید (۱۴). بتالاکتامازها سیستم‌های دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در بخش بالینی مصرف شدند؛ بتالاکتام‌ها همراه آنها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست آنتی‌بیوتیک‌تراپی ایفا کردند. در ابتدا شیوع آنها در ارگانیزم‌هایی مثل استفیلوکوکوس اورئوس بود که به‌طور معمول مولد آنزیم نبودند و به‌پاتوژن‌هایی نظیر هموفیلوس آنفولانزا و نایسریا گونوره که قبلاً آنزیم را نداشتند؛ گسترش پیدا کرد (۱۵). در مطالعه‌ای حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۶۳ نمونه سالمونلای جدا شده از طیور در منطقه آذربایجان شرقی، بیشترین حساسیت را در مقابل جنتامایسین،

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

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

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

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

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

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

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

را فراهم نمودند؛ صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

مسئولین و همکاران بخش میکروبی شناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج که امکانات و هزینه های این مطالعه

References

- Nair S, Lin TK, Pang T, Altwegg M. Characterization of Salmonella serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2002 Jul;40(7):2346-51.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2000 Jul; 38(7): 2465-67.
- Moat AG, Foster JW, Spector MP. *Microbial Physiology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons. 2002; p: 66.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan; 48(1): 1-14.
- Rabsch W, Simon S, Humphrey T. Public health aspects of Salmonella infections. In: Barrow P. *Salmonella in Domestic Animals*. Chap 18. 2nd ed. Wallingford: CAB International. 2013; pp: 351-76.
- Soltan Dallal MM, Rastegar Lari A, Sharifi Yazdi MK. [Pattern of serotyping and antibiotic resistance of Salmonella in children with diarrhea]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2014; 16(1): 100-105. [Article in Persian]
- Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of fecal Escherichia coli in poultry farmers and poultry Slaughterers. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jun; 47(6): 763-71. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/47.6.763>
- Mansouri S, Shareifi S. Antimicrobial resistance pattern of Escherichiacoli causing UTIs: and that of human fecal flora in the southeast of Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2004 Jul; 8(2): 123-28. doi: <https://doi.org/10.1089/107662902760190662>
- Lay K, Chansong N, Chuanchuen R. Plasmid profiles of multidrug-resistant Escherichia coli from clinically healthy swine. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2012; 42(2): 229-33.
- Kinzelman J, McLellan SL, Amick A, Preedit J, Scople CO, Olapade O, et al. Identification of human enteric pathogens in gull feces at SouthwestLake Michigan bathing beaches. *Can J Microbiol*. 2008; 54(12): 1006-15. doi: <https://doi.org/10.1139/W08-096>
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jul; 58(1): 211-5. doi: [10.1093/jac/dkl211](https://doi.org/10.1093/jac/dkl211)
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jan; 46(1): 1-11.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection*. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.
- Florijn A, Nijssen S, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Comparison of E test and double disk diffusion test for detection of extended spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar; 21(3): 241-43.
- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Sep; 35(9): 1697-704.
- Bairami Azar H, Zare P, Ghorbani Choboghlo H, Panahi T, Saeedian A, Afrazeh Y. Isolation of Salmonella Spp from apparently Healthy Ostriches in East Azerbaijan Province. The 13th Iranian and 2nd International Congress of Microbiology. Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. 2012 July 14-16. p: 488. [Abstract]
- Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in Salmonella serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol*. 2004 Nov; 104(1-2): 133-39. doi: [10.1016/j.vetmic.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.010)
- Maskey AP, Day JN, Phung QT, Thwaites GE, Campbell JI, Zimmerman M, et al. Salmonella enterica serovar Paratyphi A and S. enterica serovar Typhi cause indistinguishable clinical syndromes in Kathmandu, Nepal. *Clin Infect Dis*. 2006 May; 42(9): 1247-53. doi: [10.1086/503033](https://doi.org/10.1086/503033)
- Ammar A, Alloui N, Bennoune O, Kassah-Laouar A. Survey of Salmonella serovars in broilers and laying breeding reproducers in East of Algeria. *J Infect Dev Ctries*. 2010 Mar; 4(2): 103-6.
- Elumalai S, Muthu G, Selvam RE, Ramesh S. Detection of TEM-, SHV- and CTX-M-type β -lactamase production among clinical isolates of Salmonella species. *J Med Microbiol*. 2014 Jul; 63(Pt 7): 962-67. doi: [10.1099/jmm.0.068486-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.068486-0)
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar; 42(3): 1089-94.
- Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Lucarelli C, Owczarek S, Ricci A, et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet Microbiol*. 2008 Apr; 128(3-4): 414-18. doi: [10.1016/j.vetmic.2007.10.017](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.017)
- De Gheldre Y, Avesani V, Berhin C, Delmée M, Glupczynski Y. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct; 52(4): 591-97. doi: [10.1093/jac/dkg415](https://doi.org/10.1093/jac/dkg415)
- Lee KE, Lim SI, Choi HW, Lim SK, Song JY, An DJ. Plasmid-mediated AmpC β -lactamase (CMY-2) gene in Salmonellatyphimurium isolated from diarrheic pigs in South Korea. *BMC Res Notes*. 2014; 7: 329. doi: [10.1186/1756-0500-7-329](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-329)
- Li R, Lai J, Wang Y, Liu S, Li Y, Liu K, Shen J, Wu C. Prevalence and characterization of Salmonella species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int J Food Microbiol*. 2013 Apr; 163(1): 14-18. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020)
- Momtaf H, Rahimi E, Moshkelani S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in E. coli isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. *Vet Med*. 2012; 57(4): 193-97.
- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar; 8(3): 159-66. doi: [10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)

Original Paper

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

Maryam Naderi Mozajin (M.Sc)¹, Pejvak Khaki (Ph.D)^{*2}, Fatemeh Noorbakhsh (Ph.D)³

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

³Assistant Professor, Department of Microbiology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran.

Abstract

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

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

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

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

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

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

Received 8 Jan 2017

Revised 20 Nov 2017

Accepted 17 Dec 2017

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