تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* از گوشت گوسفند و مرغ در شهرستان شهرکرد در سال ۱۴۰۰

الهه برزم دهکردی[۱]، الهه تاج‌بخش*[۲]، حسن ممتاز[۳]

۱.دانش آموخته ی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*(نویسنده مسئول)، پست الکترونیکی: ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده:

به طور معمول غذاهای آلوده از عوامل اصلی عفونت‌های انسانی بوده و در این بین گوشت طیور و گوشت گوسفند از منابع مهم به حساب می‌آیند. سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* با داشتن عوامل حدت مختلف و مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه، عمدتاً به‌عنوان یک بیماری‌زای فرصت‌طلب محسوب می‌شوند. در این تحقیق جداسازی *انتروباکتر کلوآکه* ۳۸۴ گوشت مرغ و گوسفند به صورت تصادفی در سال ۱۳۹۹ درشهرستان شهرکرد به روش‌های میکروبی و مولکولی انجام شد. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک صورت گرفت و به منظور بررسی تولید بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف از طریق فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی شد. از ۳۸۴ نمونه‌ی مورد بررسی، *انتروباکتر کلوآکه* در ۲۵ نمونه (۶/۵۱ درصد) به عنوان *انتروباکتر کلوآکه* شناسایی شدند که در بررسی مولکولی در حضور ژن *hsp60*، نیز تأیید شدند. از این بین ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند بودند. در بین جدایه ها بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم در۲۰ ایزوله (درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین در ۱۵ جدایه (۲۳/۸ درصد) گزارش شد. در روش میکروتیتر. ۱۵ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۱۰ ایزوله (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط را نشان دادند. مطالعه حاضر حاکی از آن است که سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* مولد ESBL نسبتاً از شیوع بالایی برخوردارند. افزایش میزان این سویه‌ها غالباً ناشی از تجویز غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها است که رفع این مشکل مستلزم به‌کارگیری عوامل ضد میکروبی جدید و محدود نمودن استفاده غیرضروری از عوامل ضدمیکروبی و افزایش بهره‌گیری از ابزارهای کنترل عفونت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتروباکتر کلوآکه*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، گوشت گوسفند، گوشت مرغ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه:

خانواده *انتروباکتریاسه* گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی است که جایگاه اصلی آن‌ها دستگاه گوارش انسان و حیوانات خون گرم می‌باشد. آن‌ها در محیط طبیعی ساپروفیت هستند و در خاک و فاضلاب‌ها یافت می‌شوند و نیز قسمتی از فلور نرمال دستگاه گوارش انسان محسوب می‌شوند (Mezzatesta, et al., 2012). انتروباکترها باسیل‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که اندازه‌ای معادل ۰/۶ تا ۲ میکرومتر دارند و نیز به واسطه دارا بودن تاژک اطرافی متحرک می‌باشد (Antony and Prasad, 2011).

میکروارگانیسم‌های گونه *انتروباکتر* در آب، خاک، فاضلاب، محصولات لبنی و سبزیجات وجود دارند و قسمتی از فلور روده بوده و به طور معمول بیماری‌زا نیستند. اگرچه *انتروباکتر* به ندرت در افراد سالم ایجاد عفونت می‌کند اما می‌توانند عامل مهم مرگ و میر و بیماری در افراد مبتلا به نقص ایمنی باشند. *انتروباکتر* اندوتوکسینی تولید می‌کند که باعث بروز توکسمی می‌شود. علائم عفونت‌های *انتروباکتر* اختصاصی نبوده و در سایر باکتری‌های گرم منفی هم وجود دارد. (Conly, 2012). گونه‌های *انتروباکتر* به علت کلنی‌های بزرگ و موکوئیدی شبیه به گونه‌های *کلبسیلا* هستند، اما با تعداد کمی از آزمون‌ها مثل حرکت و اوره‌آز از هم افتراق داده می‌شوند (Murray, et al., 2020). طبقه بندی جنس *انتروباکتر* به طور مکرر دچار تغییر شده است. چندین گونه در این جنس دوباره تعریف شده‌اند از جمله: *انتروباکتر آئروژنز*، *انتروباکتر آمنیجنوس*، *انتروباکترکانسروجنوس*، *انتروباکتر کووانی*، *انتروباکتر جرجوویا*، *انتروباکتر اینترمدیوس*، *انتروباکتر پیرینوس* (Morand, et al., 2009). مکانیسم بیماری‌زایی انتروباکتر پیچیده و چند عاملی است که با دخالت تعدادی از عوامل حدت احتمالی، که نقش آن‌ها در توسعه بیماری هنوز مشخص نیست، ایجاد می‌شود. پس از چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال، سویه‌های *انتروباکتر* در شرایط آزمایشگاهی بسیاری از فاکتورهای حدت بالقوه، از جمله انتروتوکسین‌ها، آلفا-همولیزین و سیتوتوکسین‌های منفذساز فعال‌شده با تیول شبیه به سم II مانند شیگا را تولید می‌کنند (Davin-Regli A. and Jean-Marie, 2015). امروزه مصرف فرآورده‌های غذایی با منشأ دامی که ممکن است حاوی باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی باشند، نگرانی‌های زیادی را برای مصرف کنندگان ایجاد کرده است. از مهم‌ترین خطر باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی در مواد غذایی، بروز مقاومت دارویی در برابرباکتری‌های پاتوژن در بدن مصرف کنندگان می‌باشد.

از آن‌جا که تاکنون تحقیقی در مورد الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند در شهرستان شهرکرد صورت نگرفته است، مطالعه حاضر طراحی تا به بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند پرداخته شود

مواد و روش کار:

جداسازی باکتری

این مطالعه از نوع توصیفی – مقطعی می‌باشد که در یک دوره یک‌ساله (از خرداد ماه ۱۳۹۸ تا خرداد ۱۳۹۹) در شهرستان شهرکرد ۳۸۴ نمونه‌ی گوشت گوسفند و مرغ (قسمت ران) انجام شد. بر اساس فرمول آماری زیر تعداد نمونه‌ها ۳۸۴ عدد

$$n=\frac{Z^2 pq}{d^2}$$

انتخاب شد . نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن با رعایت شرایط اسپتیک به آزمایشگاه کنترل کیفی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. تمامی نمونه‌ها از نظر حضور *انتروباکتر کلوآکه* مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار ۱۰گرم از هر نمونه در شرایط استریل همگن و به محیط استریل پپتون واتر اضافه شد و ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس توسط لوپ استریل به محیط مک کانگی آگار انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از گذراندن زمان فوق کلنی-های مشکوک به *انتروباکتر کلوآکه* انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام شد. جهت تشخیص بیوشیمیایی جدایه های *انتروباکترکلوآکه* آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل تولید اندول، واکنش متیل رد، ووژس پروسکائر، سیترات، تولید سولفید هیدروژن، اوره، لایزین دکربوکسیلاز، آرژینین دهیدرولاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، حرکت و تولید اسید در اثر تخمیر قندها انجام شد (Shimaa, et al., 2023).

تشخیص مولکولی جدایه ها

به‌منظور تشخیص مولکولی و تأیید جدایه‌های *انتروباکتر کلوآکه*، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن)[1] طبق دستور شرکت سازنده صورت گرفت. برای تعیین غلظت DNA، استوک تهیه شده ۱:۱۰۰ رقیق شد. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در صورتی‌که جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد DNA دارای کیفیت خوبی

[1] DNPTM (CinnaGen)

جهت انجام PCR است. پس از خواندن جذب نوری نمونه‌ها، با استفاده از فرمول زیر غلظت DNA تعیین شد (۸).

فاکتوررقت × (ng/µl)۵۰ × OD ۲۶۰ = DNA (غلظت ng/µl)

جهت تأیید قطعی وجود *انتروباکتر کلوآکه* در کلونی‌های رشد یافته، از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن *hsp60* استفاده شد (Masoomiv Jahandizi, et al., 2020).

در این تحقیق از سویه استاندارد *انتروباکتر کلوآکه* ATCC 23355 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. توالی پرایمر مورد استفاده در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *hsp60* *انتروباکتر کلوآکه*

ژن	توالی	اندازه محصول	دمای اتصال
hsp60	F: GGT AGA AGA AGG CGT GGT TGC R: ATG CAT TCG GTG GTG ATC ATC AG	۳۴۱	۵۸

جهت ردیابی ژن *hsp60* واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرومول دئوکسی نوکلیوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از هر یک از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام می‌پذیرد. فرایند دمایی برای ردیابی ژن *hsp60* شامل یک سیکل ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و ۲۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۴ دقیقه بود.

محصول PCR در این مرحله بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدوداً ۶۰ دقیقه انجام گرفت و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری شد و ثبت گردید. وجود قطعه ۳۴۱ جفت بازی تکثیر یافته از ژن *hsp60* در این مرحله نشان‌گر وجود قطعی *انتروباکتر کلوآکه* در جدایه های مورد آزمایش بود.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی-بائر[2] مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institue) ۲۰۱۹ استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (STX 25µg)، آمیکاسین (AN 30 µg)، نیتروفورانتئین (FM 300µg)، سفوتاکسیم (CTX 30µg)،

[2]Kirby Bauer

سفتازیدیم (CAZ 30µg)، سفتریاکسون (CRO 30 µg) و سفالوتین (CF 30µg)، سیپروفلوکساسین (CP 5µg)، نالیدیکسیک اسید (NA30µg)، نورفلوکساسین (NOR 10µg)، تتراسایکلین (TE 30µg)، ایمی‌پنم (IMP 10µg)، جنتامایسین (GM 10µg)، آمپی‌سیلین (AM 10µg)، کانامایسین (K 30 µg)، اریترومایسین (E 15µg) که از شرکت پادتن طب-ایران خریداری شدند.

شناسایی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولید کننده‌ی بتا لاکتامازهای وسیع الطیف

به‌منظور بررسی سویه‌های *انتروباکتر کلوآکه* تولیدکننده آنزیم-های *ESBL* آزمون دیسک ترکیبی[3] انجام شد. در این آزمون مهار فعالیت *ESBLs* توسط اسید کلاوولانیک ارزیابی می‌شود و دیسک‌های حاوی سفالوسپورین به تنهایی (سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفپیم) و در ترکیب با اسید کلاوولانیک استفاده می‌شود. هاله اطراف دیسک سفالوسپورین همراه با اسید کلاوولانیک با هاله اطراف دیسک سفالوسپورین به تنهایی مقایسه می‌شود. برای انجام این آزمون مانند دیسک انتشاری عمل شد. ۲ الی ۳ کلنی از کشت کلنی(۲۴ ساعته) در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و بعد از مقایسه با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت انجام شد. از یک دیسک سفتازیدیم (CAZ) (۳۰ میکروگرم) به تنهایی و یک دیسک سفتازیدیم در ترکیب با اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰ میکروگرم) و دیسک سفوتاکسیم (CTX) (۳۰ میکروگرم) در کنار دیسک اسید کلاوولانیک (CAC) (۳۰/۱۰ میکروگرم) استفاده شد.

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. کشت‌های باکتریایی بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت بررسی شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های سفالوسپورین همراه و بدون اسیدکلاوولانیک اندازه‌گیری و با هم مقایسه شد. در صورتی-که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف هر دیسک به تنهایی در مقایسه با دیسک ترکیبی خود ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر بود به‌عنوان سویه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نظر گرفته شد. از سویه *اشریشیاکلی* ATCC 25922 و *کلبسیلا پنومونیه* ATCC700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد (Torshizi, et al., 2011).

آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. برای این منظور ابتدا یک لوپ کامل از کلنی باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح

[3]-Combination Disk Test (CDT)

شد و به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل TSB (حاوی ۰/۲۵ گلوکز) تلقیح گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از این محیط در داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل TSB ریخته شد و از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 1705 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از شست‌وشوی میکروپلیت‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۹ درصد افزوده شد و گرمخانه گذاری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محتوی داخل چاهک‌ها خالی و شست‌وشوی چاهک‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید تا سلول‌ها تثبیت گردند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شدند و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت‌ها خشک شد. سپس جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الایزا (BioTeK، ساخت کشور آمریکا) خوانده شد. که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. به‌طوری‌که جدایه هایی که $4ODc < OD$ به‌عنوان بیوفیلم قوی، در صورتی‌که $2ODc < OD \leq 4ODc$ داشتند به‌عنوان بیوفیلم متوسط و $OD \leq 2ODc$ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و $OD \leq ODc$ به‌عنوان بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. (Torshizi, et al., 2011).

واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{TEM}

واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های *bla* با استفاده از پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۴) انجام شد. (Rizi, et al., 2016).

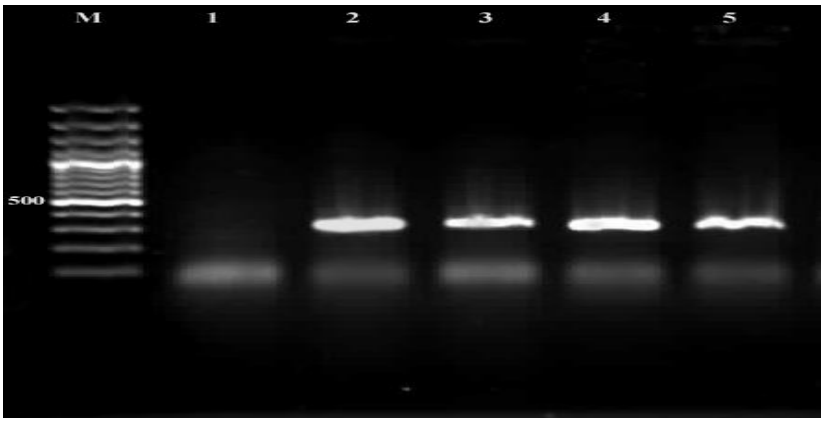
جدول ۴: پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV}

ژن	توالی پرایمر ('3-'5)	اندازه‌ی محصول (bp)	دمای اتصال
bla_{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R: TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	۷۴۷	۶۵
bla_{CTX-M}	F: ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGC R: TGGGTAAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG	۵۹۳	۶۵
bla_{TEM}	F:TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	۴۴۵	۶۵

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرومول دئوکسی نوکلیوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از هر یک از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام می پذیرد. فرایند دمایی شامل یک سیکل ۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۱۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه و ۲۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام شد. جهت انجام الکتروفورز ۱۵ میکرولیتراز محصول PCR با ۳ میکرولیتراز بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک ژل منتقل گردید. به همراه نمونه‌ها از مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی یا ۱ کیلو بازی (فرمنتاس لیتوانی) جهت تعیین وزن باند موردنظر در الکتروفورز استفاده شد. مولکول‌های DNA به علت داشتن فسفات که دارای بار منفی است، به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. رنگ نشانگر نیز خود باردار شده همراه DNA به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند.

نتایج:

پس از کشت نمونه‌های گوشت و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی ۲۵ جدایه (۶/۵۱ درصد) به عنوان *انتروباکتر کلوآکه* شناسایی شدند که در بررسی مولکولی و حضور ژن *hsp60*، نیز تأیید شدند (شکل ۱). که ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند می-باشد.



شکل ۱: الکتروفورز ژن *hsp60* جدایه های *انتروباکتر کلوآکه*: ستون M مارکر، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون-های ۳ تا ۵ : نمونه‌های مثبت

نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه*

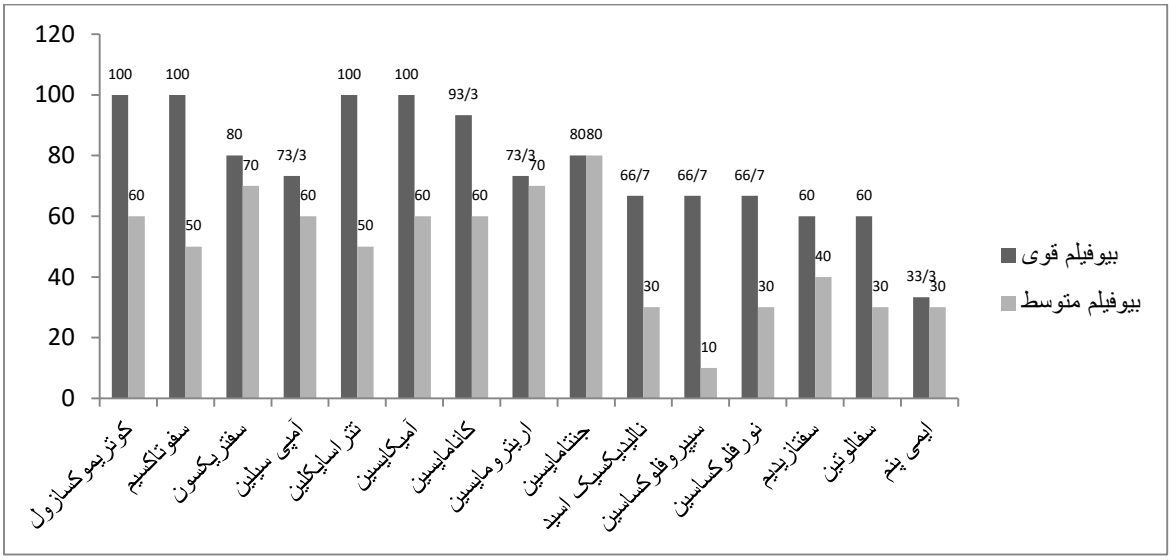
حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، آمیکایسین، نیتروفورانتئین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفالوتین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، تتراسایکلین، ایمی‌پنم، جنتامایسین، آمپی-سیلین، کانامایسین و اریترومایسین مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم در ۲۰ جدایه (۸۰ درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتئین در ۱۵ جدایه (۲۳/۸ درصد) مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت مرغ و گوسفند

آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کوتریموکسازول	۲۰	۸۰	۴	۱۶	۱	۴
سفوتاکسیم	۲۰	۸۰	۳	۱۲	۲	۸
سفتریکسون	۱۸	۷۲	۲	۸	۵	۲۰
آمپی سیلین	۱۷	۶۸	۳	۱۲	۵	۲۰
تتراسایکلین	۱۷	۶۸	۴	۱۶	۴	۱۶
آمیکایسین	۱۵	۶۰	۷	۲۸	۳	۱۲
کانامایسین	۱۶	۶۴	۴	۱۶	۵	۲۰
اریترومایسین	۱۴	۵۶	۵	۲۰	۶	۲۴
جنتامایسین	۱۴	۵۶	۴	۱۶	۷	۲۸
نالیدیکسیک اسید	۱۲	۴۸	۳	۱۲	۱۰	۴۰
سیپروفلوکساسین	۱۲	۴۸	۴	۱۶	۹	۳۶
نورفلوکساسین	۱۰	۴۰	۵	۲۰	۱۰	۴۰
سفتازیدیم	۱۰	۴۰	۴	۱۶	۱۱	۴۴
سفالوتین	۹	۳۶	۴	۱۶	۱۲	۴۸
ایمی پنم	۵	۲۰	۵	۲۰	۱۵	۶۰

نتایج مربوط به آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

در روش میکروتیتر پلیت ۲۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* براساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۱۵ جدایه (۶۰ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۰ جدایه (۴۰ درصد) تولید بیوفیلم متوسط را نشان دادند. عدم تولید بیوفیلم در هیچ‌کدام از جدایه ها مشاهده نگردید. در نمودار (۳) نتایج تولید بیوفیلم جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت کوسفند و مرغ آورده شده است.



نمودار ۲: مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه های *انتروباکتر کلوآکه* بر اساس بیوفیلم

براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، تتراسایکلین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین با تولید بیوفیلم رابطه آماری معناداری مشاهده شد ($p < 0.05$) اما بین مقاومت با سایرآنتی‌بیوتیک‌ها و تولید بیوفیلم رابطه آماری معناداری مشاهده نشد.

از ۲۵ جدایه *انتروباکتر کلوآکه* مورد بررسی ۱۰ جدایه (۴۰ درصد) در بررسی فنوتیپی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شدند. در بررسی مولکولی ۵ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن $bla_{\text{CTX-M}}$، ۴ جدایه (۴۰ درصد) دارای ژن bla_{TEM} و ۳ جدایه (۳۰ درصد) دارای ژن bla_{SHV} بودند.

بحث

امروزه مصرف فرآورده‌های غذایی با منشأ دامی که ممکن است حاوی باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی باشند، نگرانی‌های زیادی را برای مصرف کنندگان ایجاد کرده است. مصرف بی-رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم رعایت نکات ضروری در استفاده از آن‌ها در دامداری‌ها و مرغداری‌ها و باقی‌مانده آن‌ها در گوشت، شیرو سایر مواد غذایی با منشأ دامی سبب ایجاد خطرهای قابل توجه برای مصرف کنندگان خواهد شد (Gracey, and Gollins 1992). نتایج حاصله از مطالعات صورت گرفته طی سی سال اخیر در کشور ضرورت‌هایی را در جهت کنترل کیفیت مواد غذایی با منشأ دامی آشکار می‌سازد. مشاهده آلودگی به بقایای آنتی‌بیوتیکی در اغلب بررسی‌های صورت گرفته روی شیر و لبنیات، اندام‌های مصرفی طیور هم‌چون کبد و کلیه و گوشت در برخی از استان‌ها از

جمله نکات قابل توجه در تهدید سلامت غذایی کشور می‌باشد. (Msgari Abasi, et al., 2009). وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های بیمارستانی یکی از نگرانی‌های بزرگ و اساسی علم پزشکی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و گسترش باکتری‌های مقاوم نه تنها بین بیماران بستری در بیمارستان بلکه در بین افراد جامعه از پیامدهای این معضل است (.Yelin , et al., 2019). بسیاری از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه از عوامل شایع عفونت‌های ادراری بوده و مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها شده است که مقاومت آن‌ها به بتالاکتام‌ها (مثل آمپی‌سیلین و سفوتاکسیم) و نیز سایر آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مثل کوتریموکسازول و سولفونامیدها در بسیاری از مناطق دنیا گزارش شده است (Yang, et al.,). برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی عبارتند از: تتراسایکلین‌ها (مثل اکسی تتراسایکلین، کلرتتراسایکلین، داکسی سایکلین)، پنی‌سیلین‌ها، ماکرولیدها (تایلوزین، تیل مایکوزین و ...)، آمینوگلیکوزیدها مثل نئومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و ...). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشند. در سال‌های اخیر استفاده از طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها از تدابیر درمانی مناسب به‌منظور کنترل بیماری‌های عفونی در افراد مختلف می‌باشد و به‌دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی‌میکروبی، شیوع و انتشار کلون‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در بیمارستان‌ها افزایش یافته است. بنابراین، بررسی الگوی مقاومت ضدمیکروبی باکتری‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (Jay James, et al., 2000).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۳۸۴ نمونه‌ی گوشت مورد بررسی، تعداد ۲۵ نمونه آلوده به *انتروباکتر کلوآکه* می‌باشند. که ۱۸ نمونه مربوط به گوشت مرغ (۷۲ درصد) و ۷ نمونه (۲۸ درصد) مربوط به گوشت گوسفند می‌باشد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمی پنم (۲۰ درصد) گزارش گردید.

علت آلودگی کمتر در گوشت قرمز می‌تواندبه علت بافت مخصوص آن باشد که بعد از مرگ حیوان حالت اسیدی پیدا می‌گند و باعث کاهش pH می‌شود. زیرا طبق بررسی‌های انجام شده، باکتری‌ها بر روی گوشت‌هایی که دارای pH پایین هستند به کندی رشد می‌کنند (Jay James, et al., 2000).

غذاهای حیوانی منبع مهمی برای تغذیه برای بسیاری از مردم در سراسر جهان هستند، اما مصرف آن‌ها ممکن است چندین خطر برای سلامتی داشته باشد. این موضوع، ایمنی غذاهای حیوانی را در خط مقدم نگرانی‌های اجتماعی قرار می‌دهد و یکی از چالش‌های فعلی و مداوم برای تولیدکنندگان مواد غذایی است. یکی از این خطرات برای سلامتی باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه می‌باشند که به طور طبیعی در دستگاه گوارش پستانداران زندگی می‌کنند. این باکتری‌ها نه تنها باعث فساد مواد غذایی می‌شوند، بلکه خطر میکروبیولوژیکی برای مصرف کنندگان نیز دارند. مصرف گوشت خام یا نیم پز و محصولات غذایی با آلودگی متقاطع باعث افزایش عفونت انسانی در اعضای این خانواده می‌شود. باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه همیشه به‌عنوان باکتری‌های شاخص برای کیفیت میکروبیولوژیکی غذا و سطح بهداشت فرآیندهای تولیدی، به دلیل این خطرات مورد نیاز بوده‌اند (Jay James, et al., 2000).

در تحقیق انجام شده توسط Edris و همکاران که بر روی ۲۷۴ نمونه غذای حیوانی شامل: گوشت گاو، مرغ، خرگوش، شیر، کره و تخم مرغ جمع آوری شده از سوپرمارکت‌ها به منظور جداسازی انتروباکتریاسه ها انجام شد. در این تحقیق *پسودوموناس آئروژینوزا* از بیشترین فراوانی (۱۱/۴ درصد) برخوردار بود که بیشترین آلودگی درگوشت خرگوش، کره و شیر گزارش گردیده است. در این تحقیق شیوع *انتروباکتر کلوآکه* (۷/۲۷ درصد) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما از فراوانی کمتری برخوردار می‌باشد. کمترین فراوانی متعلق به *پروتئوس میرابیلیس* می‌باشد. در این تحقیق بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید و سفوروکسیم (۱۰۰ درصد) گزارش شد. در حالی‌که در تحقیق ما بیشترین مقاومت به کوتریموکسازول و سفوتاکسیم (۸۰ درصد) گزارش شده است (Edris, et al., 2023).

در تحقیقی که توسط Haryani و همکاران بر روی ۷ نوع غذای خیابانی در مالزی صورت گرفت، در ۶ نمونه آلودگی به انتروباکتر کلوآکه گزارش شد. در این تحقیق بیشترین مقاومت نسبت به استرپتومایسین (۸۵/۷۱ درصد)گزارش شد. مقاومت نسبت به تتراسایکلین (۸۶,۴۲ درصد) و و مقاومت نسبت به سفوروکسیم (۲۸,۵۷ درصد) گزارش شد (Hayrani, et al., 2008).

توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در حدت باکتری‌ها دارد. بیوفیلم از یک طرف باعث محافظت میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده می‌شود و از طرف دیگر باعث مبادله مواد ژنتیکی

می‌باشد. باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم دارند نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها مقاومت زیادی دارند و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می‌کنند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف می‌نمایند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد می‌باشند ولی پایداری ژنتیکی در آن‌ها بیشتر می‌باشد. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌نماید. بیوفیلم باکتریایی، جامعه‌ای از باکتری‌های چسبنده و رشد کننده بر سطوح جان‌دار یا بی‌جان محصور در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی است. در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه ور و یا ذرات خاک باشد. ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد (Kadouri, et al., 2005).

تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای باکتری‌ها دارد از جمله حفاظت آن‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی کننده‌ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم، بنابراین آن‌ها می‌توانند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کنند و زنده بمانند. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم باکتری‌ها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد (Davey, et al., 2000).

در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم ۲۵ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* جدا شده از گوشت، که براساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. ۱۵ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلم قوی، ۱۰ ایزوله (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط را نشان دادند. واکنش بیوفیلم منفی در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نگردید. در تجزیه و تحلیل آماری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، تتراسایکلین، آمیکایسین و سیپروفلوکساسین با واکنش بیوفیلم رابطه آماری معناداری مشاهده گردید. در تحقیق انجام شده توسط Edris و همکاران (Edris et al., 2023) توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در ایزوله‌های *انتروباکتر کلوآکه* (۵۷/۱۴ درصد) و توانایی تشکیل بیوفیلم متوسط (۴۲/۸۶ درصد) گزارش کردید که تقریباً با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می‌باشد. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سرار جهان است. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف و

با زمان تغییر می‌کند (Mehrang, et al., 2008; Al-Zahrani, et al., 2005; Knothe, et al., 1983).

نتیجه‌گیری

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در دو دهه اخیر افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته‌اند. این باکتری‌ها به علت غیر فعال سازی طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام به‌ویژۀ نسل سوم سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها، مشکلات فراوانی را برای درمان ایجاد کرده‌اند. پیدایش و انتشار این باکتری‌ها به‌نظر می‌رسد که غالباً ناشی از استفادۀ گسترده داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف باشد به‌طوری‌که امروزه شاهد افزایش روزافزون باکتری‌های تولیدکنندۀ *ESBL* هستیم. ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از لحاظ بالینی بسیار با اهمیت هستند، زیرا الگوی مقاومت دارویی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از زحمات معاونت محترم پژوهشی و جناب آقای دکتر منوچهر مؤمنی تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند.

تعارض در منافع: وجود ندارد

حمایت مالی: ندارد

منابع:

1- Antony B. and Prasad BR. 2011. An outbreak of neonatal septicaemia by *Enterobacter cloacae*. Asian. Pacific. J. Trop. Dis. 1(3): 227-9.
2- Conly J. 2012. Antimicrobial resistance in Canada. Canadian. Med. Association. J. 167: 885-891.
3- Davin-Regli A. and Jean-Marie P. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers. Microbiol. 6: 392.
4- Davey M.E. and O'toole G.A. 2000. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics.Microbiol Mol. Biol. Rev64(4): 847-867.
5- Al-Zahrani A.J. and Akhtar N. 2005. Susceptibility patterns of extended spectrum β-lactamases *(ESBL)* producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in a teaching hospital. Pakistan.J. Med. Res. 44(2): 64-67.
6- Gracey JF. and Gollins D.S. 1992. Meat Hygiene. 9th ed. London: Baillière Tindall; 1992.
7- Hadziyannis E., Tuohy M., Thomas L., Procop W.G. and Hall S.G. 2000.

Screening and confirmatory testing for extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli, Klebsilla pneumoniae,* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 36: 113-117.

8- Haryani Y., Tunung R. and Chai L.C. Characterization of *Enterobacter cloacae* Isolated from Street Foods 57 Characterization of *Enterobacter cloacae* isolated from Street Foods. ASEAN Food Journal 15 (1): 57-64.

9- Jay James M. 2000. Modern Food Microbiology, 6th ed. Aspen publisher.

10- Kadouri D. and O'toole GA. 2005. Susceptibility of Biofilms to *BdellovibrioBacteriovorus* Attack.Appl Environ. Microbiol. 71(7): 4044-4051.

11- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M. and Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection. 11: 315-317.

12- Masoomi Jahandizi R., Aletaha M. and Musavi M.K. 2020. Evaluation of the Frequency of TEM beta-lactamase gene in patients with urinary tract infections in Bonab County. Iran. J. Bio. 32(3): 438-48

13- Mesgari Abasi M., Rashidi M.R. and Javadi A. 2009. Levels of tetracycline residues in cattle meat, liver, and kidney from a slaughterhouse in Tabriz, Iran. Turk. J. Vet. Animal. Sci. 33(4): 345-349.

14- Mezzatesta M.Lina., Gona F. and Stefani S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future. Microbiology. 7(7): 887-902.

15-Mehrang H. and Rahbar M. 2008. Prevalence Of extended spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 31: 147-151.

16- Morand P.C, Billoet A., Rottman M., Sivadon-Tardy V., Eyrolle L., Jeanne L, et al. 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J. Clin. Microbiol. 47: 2489-2495.

17- Murray PR., Holmes B., Aucken H.M. 2010. *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Plesiomonas, Serratia,* and other members of the *enterobacteriaceae*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.

18- Rains R. 1993. Principles of Antibiotics. Shafiee A, Ganbarpour A (Translated by). Tehran: Tehran University Press.

19- Rizi K.S., Peerayeh S.N., Bakhshi B. and Rahbar M.2016. Prevalence of integrons and

Antimicrobial Resistance Genes Among Clinical Isolates of Enterobacter spp. From Hospitals of Tehran. International Journal of Enteric Pathogens. 3(1); e-22531.

20- Edris S.N., Hamad A., Dina A.BA. and Islam S. 2023 Antibiotic resistance patterns and biofilm formation ability of Enterobacterales recovered from food of animal origin in Egypt. Vet. World. 2023: 16: 403-413

21- Torshizi R., Zamanzad B., Mokhtareyan K. and Karimi A. 2011. Determination of CTX-M genes in *enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. J. Shahrekord. Univ. Med. Sci. 13(3): 9-17.

22- Yang Q., Zhang H,, Yu Y,, Kong H,, Duan Q,, Wang Y, and Xu Y. 2015. In vitro activity of imipenem/relebactam against Enterobacteriaceae isolates obtained from intra-abdominal, respiratory tract and urinary tract infections in China: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2015–2018. Clin. Infect Dis. 71(4): 427-435.

23- Yelin I., Snitser O., Novich G., Katz R., Tal O., Parizade M. and Kishony R. 2019. Personal clinical history predicts antibiotic resistance of urinary tract infections. Nature Medicine. 25(7), 1143-1152.

Determining antibiotic resistance pattern in *Enterobacter cloacae* strains isolated from checken and sheep meat in Shahrekord city

Abstract

Usually, contaminated food is one of the main causes of human infections, and in this case, poultry meat and sheep are considered as the main causes. *Enterobacter cloacae* strains, having different virulence factors and multiple antibiotic resistance are mainly considered as an opportunistic pathogen. In this research, the isolation of *Enterobacter cloacae* from chicken and sheep meat samples in Shahrekord in 2019 was done by microbial and molecular methods. Antibiotic resistance pattern was determined by disc diffusion method and microtitre plate method was used to check biofilm production. The ability to produce broad-spectrum β-lactamase enzymes was investigated through phenotypic and genotypic methods. Out of 384 examined samples, *Enterobacter cloacae* were identified in 25 samples (6.51%) which also confirmed in the presence of the *hsp60* in molecular analysis. Among these, 18 samples were related to chicken meat (72%) and 7 samples (28%) were related to sheep meat. The highest antibiotic resistance to cotrimoxazole and cefotaxime was reported in 20 isolates (80%) and the lowest resistance to nitrofuranthein was reported in 15 isolates (23.8%). In microtiter method. 15 isolates (60%) showed strong biofilm reaction, 10 isolates (40%) showed moderate biofilm reaction. The present study indicates that *ESBL*-producing *Enterobacter cloacae* strains have a relatively high prevalence. The increase in the number of these strains is often caused by the irrational prescription of antibiotics, which requires the use of new antimicrobial agents, limiting the unnecessary use of antimicrobial agents, and increasing the use of infection control tools.

Key words: Antibiotic resistance, Checken, *Enterobacter cloacae*, ESBL, Sheep.