مطالعه ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از کره و سرشیر سنتی در اصفهان

نهال سلیمی[1]، محمداحمدی[2*]، ابراهیم رحیمی[3]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت موادغذایی، گروه بهداشت موادغذایی ، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذائی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
۳. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *m.ahmadi@iauamol.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۰

چکیده

از بین ۲۲ گونه ثبت شده در این گروه از باکتری ها، *اسینتوباکتر بومانی* فراوان ترین گونه ثبت شده در موارد عفونت های بالینی در انسان معرفی شده است. توانایی انتقال این باکتری از طریق برخی از انواع مواد غذایی خصوصاً شیر وفراورده های آن به انسان اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، به بررسی آلودگی ۱۰۰ نمونه کره و سرشیر جمع آوری شده از نظر حضور *اسینتوباکتر بومانی* پرداخته شد و مقاومت باکتریایی و ژن های حدت در جدایه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد در بین نمونه‌های سرشیرسنتی ۲ درصد و در بین نمونه-های کره سنتی ۴ درصد آلوده به *اسینتوباکتر بومانی* مشاهده شد. در بررسی انجام پذیرفته در زمینه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *سینتوباکتر بومانی*، میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی بر علیه آنتی بیوتیک های مروپنم، ایمی پنم، کلرامفنیکل، متی سیلین، کارباپنم و فوزیدیک اسید، صفر درصد گزارش گردید. بر اساس نتایج حاصل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی-بیوتیک‌های دئوکسی سایکلین، سفوتاکسیم، کلرامفنیکل، ایمی پنم، کارباپنم، موپیروسین، متی‌سیلین، اسیدفوزیدیک و آمپی‌سیلین مقاوم بودند. فراوان ترین ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده *tetA*، *tetB*، dfrA1، aac(3)-IV، sul1، *csgA*،*cnf2*، *jurA*، *citm*، *blasHV*، *aadA1* و *Aac3IV* بودند. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که فراوان ترین ژن‌های حدت ردیابی شده در سویه *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از انواع کره و سرشیر به ترتیب *fimH*، *papC*، *Pai* و *kpsmTII* بودند. این مطالعه بیان می‌کند که فرآورده‌های شیر خام موجود در بازار می‌تواند منبع اسینتوباکتر بومانی مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها باشند و به انتشار ژن‌های مقاومت از طریق زنجیرهٔ غذایی کمک کند. بنابراین باید سطح بهداشت در جامعه افزایش پیدا کند و مصرف بی رویهٔ آنتی-بیوتیک‌ها در دام و طیور به‌صورت برنامهٔ مدون به اجرا درآید.

کلید واژه ها: اسینتوباکتر بومانی، سرشیرسنتی ، کره سنتی ، مقاومت آنتی بیوتیکی. اصفهان.

مقدمه

شیر و فراورده های لبنی آن از اهمیت بسیار زیادی در رژیم غذایی انسان برخوردارند. شیر سرشار از ویتامین های محلول در چربی و آب، پروتئین و مواد معدنی است. روزانه میلیون ها نفر از شیر و فراورده‌های لبنی آن در وعده های غذایی خود استفاده می کنند. بنابراین بهداشت این ماده غذایی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. گزارشات بسیار فراوانی از وقوع بیماری های منتقله از طریق شیر به انسان در دسترس است (Engür et al., 2014; Gurung et al., 2013).

گونه های اسینتوباکتر، باکتری های گرم منفی، هوازی و غیر تخمیری هستند که معمولا در طبیعت یافت می-شوند. باکتری های این گروه سازگاری بسیار خوبی با محیط پیرامون خود دارند. تحمل فعالیت آبی کم، مقاومت به مواد ضدعفونی کننده مانند کلرهگزیدین و فنل ها، سازگاری در دماهای حدود ۶۰ درجه سلسیوس و در

نهایت مقاوم شدن در برابر چندین گروه از آنتی بیوتیک ها، از جمله ویژگی های بارز این گروه از باکتری ها است. از بین ۲۲ گونه ثبت شده در این گروه از باکتری ها، *اسینتوباکتر بومانی* فراوانترین گونه ثبت شده در موارد عفونت های بالینی در انسان معرفی شده است. گرد و غبار بیمارستانی، غذاهای یخ زده، شیر خام، سبزیجات، آب انبار، محلول دیالیز صفاقی، ونتیلاتور، دستکش آلوده و محیط آلوده بیمارستان از منابع این باکتری هستند (Müller et al., 2018; Tavakol et al., 2018).

توانایی انتقال این باکتری از طریق برخی از انواع مواد غذایی خصوصا شیر، سبزیجات و ماهی به انسان بر اهمیت آن افزوده است. میزان شیوع آلودگی شیر خام دام‌ها به این باکتری حدود ۷ تا ۲۱ است (Müller et al., 2018; Tavakol et al., 2018). با توجه به شیوع این باکتری در شیر، مراقبت و پایش شیر خام از نظر حضور این باکتری و مشخص کردن میزان شیوع آن در ایران بسیار مهم است.

درمان موراد ابتلا بهبیماری ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* خصوصا در موارد انتقال از طریق مواد غذایی، مصرف آنتی بیوتیک هاست. با این وجود سالانه گزارشات فراوانی از وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های *اسینتوباکتر بومانی* بر علیه آنتی‌بیوتیک های رایج ارائه می شود (Berlau et al., 1999; Eijkelkamp et al., 2014). بنابراین بررسی الگوی مقاومت سوش های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از شیر خام دام و فراورده های لبنی آن که روزانه مورد مصرف میلیون ها نفر قرار می‌گیرد، کاملا ضروری به نظر می‌رسد. *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از مواد غذایی و همچنین نمونه های عفونت‌های بالینی معمولا دارای یکسری ژن‌ها و فاکتور های حدت هستند. وظیفه این فاکتور ها اتصال و چسبندگی، حمله و تهاجم و در نهایت ایجاد آسیب به سلول های میزبان است. از جمله مهمترین فاکتورهای حدت ردیابی شده در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* می‌توان به انواع فیمبریه (*sfa*، *afa* و *pap*)، خانواده آنتی‌ژن (*dra*)، تیپ ۱ فیمبریه (*fimH*)، گیرنده فیبرونکتین (*fbn*)، فاکتور مقاومت به سرم (*traT*)، یرسینیاباکتین (*fyuA*)، پوشاننده‌های پلی‌ساکارید (*kpsMT*)، فاکتور نکروز کننده سایتوتوکسیک (*cnf*)، فاکتورهای تهاجمی (*ibeA*) و کولیسین V (*cvaC*) اشاره نمود (Momtaz et al., 2018; Tavakol et al., 2018). با توجه به اهمیت بالای حضور این فاکتورها در موارد بالینی، ارزیابی حضور این ژن ها در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از مواد غذایی نیز بسیار مهم و ضروری است.

متاسفانه مطالعات بسیار محدودی در زمینه ارزیابی شیوع و خصوصیات حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از فراورده های شیردر دسترس است. لذا مطالعه حاضر به بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی فاکتورهای حدت در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از سرشیر و کره می‌پردازد.

روش کار

الف) مواد

مجموعا ۱۰۰ نمونه، از انواع کره سنتی و سرشیر سنتی جمع آوری شد.

ب) روش‌ها

جداسازی *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌ها

نمونه ها پس از غنی‌سازی اولیه در محیط TSB، روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی اسینتوباکتر به طریقه میکروسکوپی تایید شد. سپس جهت تشخیص گونه‌های مختلف اسینتوباکتر تست‌های بیوشیمیایی IMVIC، اوره‌آز، TSI، MRVP، SIM، کاتالاز و اکسیداز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد. ایزوله‌هایی که دارای واکنش لاکتوز منفی، غیرمتحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، اندول منفی، پیگمان منفی، اوره‌آز

مثبت، سیترات مثبت ، H_2S منفی، MR منفی و vp منفی بودند، به عنوان *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شدند (۷) و در ۷۰- درجه سلسیوس در محیط TSB حاوی ۳۰درصد گلیسرول، نگه‌داری شدند.

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوش‌های *اسینتوباکتر بومانی*

به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* از روش انتشار دیسک در محیط مولر هینتون آگار با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت پادتن طب- ایران و با توجه به دستورالعمل انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI)، استفاده شد (CLSI, 2017). آنتی بیوتیک‌های تست شده شامل: تتراسیکلین (۳۰ µg/disk)، دئوکسی سیکلین، اریترومایسین (۵ µg/disk)، کانامایسین، سفوتاکسیم (۳۰ µg/disk)، سفالکسین، سفکسیم، کلرامفنیکل، کوآموکسی کلاو، سفازولین، ایمی پنم، کارباپنم، کوتریموکسازول، ریفامپین (۳۰ µg/disk)، سفتی راکسون، موپیروسین، ونکومایسین، تری متوپریم- سولفامتوکسازول، متی سیلین (۱۰ µg/disk)، فوزیدیک اسید، آمیکاسین و آمپی سیلین (۱۰ µg/disk) بودند. پس از گرمخانه‌گذاری هوازی پرگنه های جداسازی شده در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از باکتری *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 10392 (تهیه شده از بخش خصوصی)به منظور کنترل در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی

به منظور استخراج DNA از کشت یک شبه باکتری در محیط Brain Heart Infusion (BHI) استفاده می شود. برای این منظور سوش های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت BHI گرمخانه گذاری شدند. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت مورد نظر، استخراج شد. سپس نمونه های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، قرار داده شدند.

ردیابی مولکولی فاکتورهای حدت و ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به منظور ردیابی ژن های حدت و فاکتور های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی، از تکنیک PCR استفاده شد. لیست پرایمر های مورد استفاده و شرایط انجام واکنش‌ها در جدول ۱ آمده است (Momtaz et al., 2018). در تمامی واکنش های PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت استفاده شد. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از باکتری اسینتوباکتر بومانی ATCC 10357 به عنوان کنترل مثبت، استفاده شد.

جهت ردیابی محصول مورد نظر از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲درصد استفاده شد. برای این منظور یک گرم پودر آگاروز را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE ذوب و پس از اضافه کردن ۵ میکرولیتر Gel Red به آن، در سینی مخصوص الکتروفورز ریخته شد. جهت انجام الکتروفورز، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر نشانگر مخلوط و به چاهک درون ژل انتقال یافت. سپس ژل ها توسط سایبر گرین رنگ آمیزی شد و نوار های DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی گردیدند. به همراه نمونه، از مارکر 1kb جهت تعیین اندازه باند مورد نظر در الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۳۰ ولت و به مدت حدود ۳۰ دقیقه انجام گرفت. مولکول DNA به دلیل داشتن فسفات دارای بار منفی است و به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند.

جدول ۱: لیست پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن های حدت و ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سوش های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از شیر و فراورده های آن

ژن هدف	توالی پرایمر ها (5′-3′)	اندازه محصول (bp)	شرایط دمایی	حجم واکنشها (۵۰ میکرولیتر)
draBC	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	1 cycle: 95 0C ---------- 4 min. 30 cycle: 95 0C ---------- 50 s 58 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 45 s 1 cycle: 72 0C ---------- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 1.5 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1.25 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 µL DNA template
cnf1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498		
csgA	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200		
cvaC	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680		
iutA	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300		
fyuA	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880		
cnf2	AATCTAATTAAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	543	1 cycle: 94 0C ---------- 6 min. 34 cycle: 95 0C ---------- 50 s 58 0C ---------- 70 s 72 0C ---------- 55 s 1 cycle: 72 0C ---------- 10 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 150 µM dNTP (Fermentas) 0.75 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
kpsMT II	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272		
PAI	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	930		
papC	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328		
fimH	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	1 cycle: 95 0C ----------	5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2

200 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 5 µL DNA template	------ 4 min. 34 cycle: 94 0C ------ ------ 60 s 56 0C ------ ------ 45 s 72 0C ------ ------ 60 s 1 cycle: 72 0C ------ ------ 10 min	170	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	*ibeA*
		1070	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	*PapG* II-III
		410	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	s*fa/focDE*
		290	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	*traT*
5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 150 µM dNTP (Fermentas) 0. 5 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ------ ------ 6 min. 33 cycle: 95 0C ------ ------ 70 s 55 0C ------ ------ 65 s 72 0C ------ ------ 90 s 1 cycle: 72 0C ------ ------ 8 min	447	TATCCAGCTAAGCGCGAACT ATTTGCCGACTACCTTGGTC	*aadA1*
		286	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	*aac(3)-IV*
		822	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCTCGGTCTC	*sul1*
		768	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	*blaSHV*
		462	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	*CITM*
		547	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	*cat1*
		698	CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	*cmlA*
		577	GGTTCACTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	*tet(A)*
		634	CCTCAGCTTCTCAACGCGTG GCACCTTGCTGATGACTCTT	*tet(B)*
		367	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	*dfrA1*

			GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	
		670	GGGTATGGATATTATTGATAAAG CTAATCCGGCAGCACTATTTA	*qnr*
5 µL PCR buffer 10X 1.5 mM Mgcl2 100 µM dNTP (Fermentas) 1 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 µL DNA template	1 cycle: 95 0C ---------- 4 min. 30cycle: 95 0C ---------- 45 s 58 0C ---------- 60s 72 0C ---------- 40 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5min	188	GAATAGAATGGTTAACTCTC CCAAACCACTAGGTTATC	*imp*
		382	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	*vim*
		569	GTACAAGGGATTCGGCATCG GTACAAGGGATTCGGCATCG	*sim*
5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 5 min. 32 cycle: 95 0C ---------- 50 s 60 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 70 s 1 cycle: 72 0C ---------- 10 min	501	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	*Oxa-23-like*
		246	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	*Oxa-24-like*
		353	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	*Oxa-51-like*
		599	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	*Oxa-58-like*

تجزیه و تحلیل داده‌ها

درصد آلودگی در منابع و محصولات مختلف محاسبه شده است. اختلاف بین گروه های مختلف با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با استفاده از روش K^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری در سطح $p < ۰/۰۵$ تعیین شد.

نتایج

جداسازی *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌ها در این مطالعه، در بین نمونه‌های سرشیر سنتی ۱ نمونه (۲ درصد) و در بین نمونه‌های کره سنتی ۲ نمونه (۴ درصد) آلوده به *اسینتوباکتر بومانی* مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲: شیوع *اسینتوباکتر بومانی* در فرآورده های شیر سنتی بر اساس روش کشت و مولکولی

نوع نمونه	تعداد نمونه	روش کشت		روش مولکولی	
		تعداد مثبت	نمونه درصد	تعداد مثبت	نمونه درصد
کره سنتی	۵۰	۲	۴	۲	۴
سرشیر سنتی	۵۰	۱	۲	۱	۲
مجموع	۱۰۰	۳	۳	۳	۳

از نظر آلودگی *اسینتوباکتر بومانی* بین نمونه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$).

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوش‌های *اسینتوباکتر بومانی*

امروزه گسترش ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی با ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی چندگانه به مشکل مهمی در درمان عفونت های حاصل از اسینتو باکترها تبدیل شده است.

جدول۳ وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به طور خلاصه نشان می‌دهد. در بررسی انجام پذیرفته در زمینه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی*، میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی بر علیه آنتی بیوتیک های مروپنم، ایمی پنم، کلرامفنیکل، متی سیلین، کارباپنم و فوزیدیک اسید، صفر درصد گزارش گردید. بر اساس نتایج حاصل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دئوکسی سایکلین، سفوتاکسیم، کلرامفنیکل، ایمی پنم، کارباپنم، موپیروسین، متی‌سیلین، اسیدفوزیدیک و آمپی‌سیلین مقاوم بودند.

جدول ۳: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از فرآورده های شیرسنتی

	کره سنتی	سرشیر سنتی
تتراسیکلین	۲	۱
دئوکسی سیکلین	۰	۰
اریترومایسین	۱	۱
کانامایسین	۰	۰
سفوتاکسیم	۰	۰
سفالکسین	۱	۰
سفکسیم	۱	۰
کلرامفنیکل	۰	۰
کوآموکسی کلاو	۰	۰

سفازولین	۰	۰
ایمی پنم	۰	۰
کارباپنم	۰	۰
کوتریموکسازول	۲	۱
ریفامپین	۰	۱
سفتی راکسون	۰	۰
موپیروسین	۰	۰
ونکومایسین	۰	۰
تری متوپریم	۰	۰
سولفامتوکسازول	۱	۰
متی سیلین	۰	۰
فوزیدیک اسید	۰	۰
آمیکاسین	۱	۰
آمپی سیلین	۰	۰

ردیابی مولکولی فاکتورهای حدت و ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی

جدول ۴ ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای حدت را به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است، فراوان ترین ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده از کره سنتی *tetA*، *tetB*، dfrA1، aac(3)-IV، sul1، csgA،cnf2، jurA، citm، blasHV، aadA1 و Aac3IV مربوط به کره و سرشیر سنتی بودند. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که فراوان ترین ژن‌های حدت ردیابی شده در سویه *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده به ترتیب fimH، papC، Pai و kpsmTII بودند.

جدول ۴ : فاکتورهای مقاومت جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از فرآورده های شیر سنتی

نمونه / ژن مقاومت	کره سنتی	سرشیر سنتی
tet A	۲	۱
tet B	۱	۱
dfrA1	۲	۱
Sul 1	۱	۱
cnf2	۱	۱
csgA	۰	۱
jurA	۱	۰
citm	۰	۰
cat1	۰	۰
cmIA	۰	۰

blasHv	۰	۰
AadA1	۰	۱
Aac3IV	۱	۱
Oxa 24 like	۰	۰
Oxa 23 like	۰	۰
Oxa 51 like	۰	۰
Oxa 58 like	۰	۰
fimH	۲	۱
papC	۱	۱
pAI	۱	۰
kpsmTII	۰	۰

بحث

امروزه گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی و همچنین ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه به مشکل مهمی در درمان عفونت-های حاصل از اسینتوباکترها تبدیل شده‌اند. انواع مختلفی از باکتری های بیماری زا از فرآورده‌های شیری سنتی جداسازی شده اند. *اسینتوباکتر بومانی* به عنوان ارگانیسم‌هایی شناخته می‌شوند که تقریباً در همه جا یافت می‌شوند و اغلب در محیط پخش می شوند. با توجه به اینکه یکی از راه‌های انتقال مقاومت دارویی، از طریق مصرف موادغذایی آلوده به باکتری‌ها است (Askari et al., 2019)، از اینرو، هدف از این مطالعه بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی فاکتورهای حدت در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از کره و سرشیر سنتی بود. بررسی ها نشان می دهد که حضور باکتری در بستر آلوده حیوانات، نوک پستان، دستگاه شیردوش، ظروف نگهداری و انتقال شیر و عدم اعمال سرد کردن شیر و انتقال متقاطع از افراد آلوده در سالن شیردوشی از فاکتورهای اصلی در آلودگی شیر به گونه های *اسینتوباکتر* هستند (Saad et al., 2018). بنابراین عملیات تولید خوب (GMP) در زنجیره تولید فرآورده-های شیر مختلف می‌تواند این آلودگی را کاهش دهد.

اسینتوباکتر بومانی قبلاً به عنوان یک پاتوژن حیوانات با شیوع متنوع در کشورهای مختلف از جمله در اسکاتلند ۱/۲۰ درصد (Hamouda et al., 2011) و سنگال ۵/۱۰ درصد (۱۲) شناخته شده بود. Rafei و همکاران (۲۰۱۵) شیوع بالای گونه های *اسینتوباکتر بومانی* در نمونه های غذایی با منشأ حیوانی از جمله گوشت خام ، شیر خام و فراورده های آن را در لبنان گزارش دادند. در مطالعه مرادی و همکاران (۱۳۹۷) بر روی ۷۰ نمونه فراورده های شیر شامل ۵۰ نمونه شیر محلی و ۲۰ نمونه پنیر از سطح شهر همدان در فواصل زمانی مختلف، مشخص شد ۴/۵ درصد از فراورده های شیر آلوده به اسینتوباکتر بودند. در باکتری‌های جدا شده از شیر شیوع ژن‌های SHV (۶۶/۵ درصد)، VEB (۶۶/۵ درصد) و PER (۳۳/۵ درصد) گزارش شد (Moradi et al., 2018). Gennari و همکاران (۱۹۹۲) توانستند ازفراورده های شیر سویه‌های *اسینتوباکتر* را جداسازی کنند و گزارش کردند ۳/۷ درصد اسینتو*باکتر* می‌توانند به دلیل فعالیت لیپولیتیک شیرطنابی (Ropy Milk) تولید کنند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مهمترین ویژگی‌های *اسینتوباکتر بومانی* است. در بررسی انجام پذیرفته در زمینه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی*،

میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه آنتی بیوتیک-های مروپنم، ایمی‌پنم، کلرامفنیکل، متی‌سیلین، کارباپنم و فوزیدیک اسید، صفر درصد گزارش گردید. شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های حیوانی، در ابتدا به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک ها برای درمان، پیشگیری و کنترل بیماری ها و در نهایت به عنوان محرک رشد در حیوانات تولیدکننده مواد غذایی نسبت داده می‌شود. زیرا استفاده از آنتی بیوتیک ها برای تحریک رشد حیوانات در ایران مجاز است (Askari et al., 2019). میزان شیوع پایین مقاومت در برابر کارباپنم‌ها، کلرامفنیکل و ایمی‌پنم (صفر درصد) به این دلیل است که این آنتی‌بیوتیک‌ها مجاز به درمان حیوانات تولید کننده مواد غذایی نیستند (Askari et al., 2019, Tavakol et al., 2018).

Michalopoulos و Falagas در سال ۲۰۱۰ نشان می دهند که سویه های مختلف *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های مصرفی و خصوصا تتراسایکلین، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم، توبرامایسین، آمیکاسین، ایمی پنم، سولفامتوکسازول، کلرامفنیکل، آموکسی سیلین، سفتریاکسون و اریترومایسین مقاوم شده اند. احمد و همکاران (۲۰۱۸) شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه های *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شده از نمونه‌های گوشت را بر ضد آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم، سفتریاکسون، جنتامایسین، کانامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سولفامتاکسوزول و نورفلوکسازین گزارش کردند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتکی مشابه از سویه‌های اسینتوباکتر بومانی در رومانی (Constantiniu et al., 2004)، ترکیه (Kulah et al., 2009)، فرانسه (Kempf et al., 2012) و ایتالیا (Zarrilli et al.,2013) گزارش شده است.

در مطالعه انجام شده توسط Karlowsky و همکاران (۱۹۹۸-۲۰۰۱) این امر به اثبات رسیده و آن‌ها نیز حساسیت ایزوله‌های اسینتوباکتر به مروپنم را ۹۰ درصد گزارش کرده‌اند. در مطالعه ای که توسط Basustaoglu و همکاران در سال ۲۰۰۱ به منظور بررسی ویژگیهای اپیدمیولوژیک سویه‌های اسینتوباکتر بومانی انجام گرفت نشان داد که از ۳۲ ایزوله اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی، همه ایزوله‌ها به ایمی پنم حساس بودند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. Cho و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۴۷ سویه‌های اسینتوباکتر از نمونه‌های شیر خشک در آلمان دریافتند که تمام سویه‌های اسینتوباکتر مورد آزمایش به کلرامفنیکل و اکساسیلین مقاوم بودند، اما به تتراسایکیلن، تومبروزین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین حساسیت نشان دادند.

در این مطالعه، ویژگی‌های فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، آنالیزهای ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تایید کرد. ژن-های مقاومت به آمینوگلوکوزیدها (aadA1 و aac(3)-IV و Aac3IV)، بتالاکتام ها (blasHV)، تتراسایکلین (*tetA* و *tetB*)، سولفونامیدها (sul1 و dfrA1) تشخیص داده شد.

حدت اسینتوباکتر بومانی به فاکتورهای زیادی از جمله تولید اسلایم، لیپوپلی ساکارید (LPS) و غیره بستگی دارد (Farahami and Khodarahmi, 2014; Mohajeri et al., 2016). نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که فراوان ترین ژن‌های حدت در سویه اسینتوباکتر بومانی جدا شده از انواع کره و سرشیر به ترتیب fimH، papC، PAI و kpsmTII بودند. Askari و همکاران (۲۰۱۹) ژن‌های حدت *aac(3)-IV*، *sul1*، *sim* و *dfrA1* و اینتگرون کلاس I را در گوشت گوسفند، بز و شتر شناسایی نمودند. بیشترین الگوی مقاومت سویه‌های اسینتوباکتر بومانی در نمونه‌های گوشت بز و شتر مشاهده شد. Ghafoori Kanaan و همکاران (۲۰۱۹) ژن‌های حدت *fimH*، *afa/draBC*، *sfa/foc DE*، *cnfI* و *cnf2* را در گوشت مرغ و ژن‌های حدت *fimH*، *afa/draBC*، *cnf2*، *sfa/foc DE*، *cnfI*، *iutA* و *fyuA* را در گوشت بوقلمون شناسایی کردند.

نتیجه‌گیری کلی

یافته های این تحقیق، نشانگر آلودگی پایین به *اسینتوباکتربومانی* در نمونه‌های کره و سرشیر سنتی می باشد. سویه‌های *A. baumannii* در محیط‌های طبیعی شایع بوده و باعث درگیری انسان می‌شوند. از این رو تشخیص زودهنگام همراه با تعیین مشخصات مقاومت و استراتژی های کنترل سخت برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به دارو ضروری است. این مطالعه بیان می‌کند که فرآورده‌های شیر خام موجود در بازار می‌تواند منبع اسینتوباکتر بومانی مقاوم به انواع کلاس‌های آنتی-بیوتیکی باشد و به انتشار ژن‌های مقاومت از طریق زنجیرهٔ غذایی نیز کمک کند و از این طریق می‌تواند باعث انتقال به محیط شود. برای کنترل انتقال باکتری‌های فرصت-طلب و جلوگیری از توسعهٔ ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید سطح بهداشت در جامعه افزایش پیدا کند و مصرف بیرویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها در دام و طیور به‌صورت برنامهٔ مدون به اجرا درآید.

منابع

1. Askari, N., Momtaz, H., Tajbakhsh, E. 2019. Prevalence and phenotypic pattern of antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from different types of raw meat samples in Isfahan, Iran. Vet Med Sci. 6(1): 147-152.

2. Basustaoglu, A.C., Kisa, O., Sacilik, S.C., Ozyurt, M., Yildiran, S.T. 2001.Epidemiological characterization of hospital-acquired Acinetobacter baumannii isolates from a 1500-bed teaching hospital by phenotypic and genotypic methods. J Hosp Infect. 47 (3): 246- 247.

3. Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E.P., Pitt, T.L. 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J Hosp Infec. 42(3): 201-204.

4. CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute,

5. Cho, G.S., Li, B., Rostalsky, A., Fiedler, G., Rösch, N., Igbinosa, E. 2018. Diversity and antibiotic susceptibility of Acinetobacter strains from milk powder produced in Germany. Frontiers Mic. 9: 536-540.

6. Constantiniu, S., Romaniuc, A., Iancu, L.S., Filimon, R., Taraşi, I. 2004. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. strains isolated from hospital units. J Prevent Med. 12(3–4): 35–42.

7. Eijkelkamp, B.A., Stroeher U.H., Hassan, K.A., Paulsen, I.T., Brown, M.H. 2014. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. BMC Gen. 15(1):1020- 1027.

8. Engür, D., Çetinkaya Çakmak, B., Kaynak Türkmen, M., Telli, M., Eyigör, M., Güzünler, M. A. 2014. milk pump as a source for spreading *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. Breastfeeding Med. 9(10): 551-554.

9. Farahami, A., Khodarahmi, R. 2014. Frequency of adhesive virulence factors in Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii isolated from clinical samples. Asian J Biol Sci. 7(4):158–164.

10. Gennari, M., Parini, M., Volpon, D., Serio, M. 1992. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of Psychrobacter and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. Int J Food Mic. 15(1): 61-75.

11. Ghafoori Kanaan, M.H., Shahrazad, M.J., Al-Shadeedi, A., Al-Massody, A.J., Ghasemia, A. 2020. Drug resistance and virulence traits of *Acinetobacter baumannii* from Turkey and Chicken Raw Meat. Comp Immunol Mic Infect Dis. 70: 101451.

12. Gurung, M., Nam, H.M., Tamang, M.D., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., et al. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter from raw bulk tank milk in Korea. J Dairy Sci. 96(4):1997-2002.

D.F. 2003. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agent Chemother. 47 (5): 1681- 1688.

15. Farahami, A., Khodarahmi, R. 2014. Frequency of adhesive virulence factors in Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii isolated from clinical samples. Asian J Biol Sci. 7(4):158–164.

16. Kulah, C., Aktas, E., Comert, F., Ozlu, N., Akyar, I., Ankarali, H. 2009. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. BMC Infect Dis. 9(1): 30-38.

17. Müller, S., Janssen, T., Wieler, L.H. 2014. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine: emergence of an underestimated pathogen? Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 127: 435-446.

18. Kempf, M., Rolain, J.M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., et al. 2012. Carbapenem resistance and Acinetobacter baumannii in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PLoS One. 7(6): e39495.

19. Momtaz, M., Mohajeri, H., Shokoohizadeh, P., Tajbakhsh, E. 2018. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. Antimicrob Res Infec Control. 7(1): 120-129.

20. Moradi, M., Arabestani, M.R., Roshanaii, G., Alikhani, M.Y. 2018. The Study of Antibiotic Resistance and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) Encoding Genes in Acinetobacter baumanni

13. Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., Amyes, S.G. 2011. Epidemiology of Acinetobacter baumannii of animal origin. Int J Antimicrob Agent.; 38(4): 314-318.

14. Karlowsky, J.A., Draghi, D.C., Jones, M.E., Thornsberry, C., Friedland, I.R., Sahm, Isolates from Raw Foodstuffs. Iran J Med Mic. 12 (5): 329-337.

21. Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M. L., Dabboussi, F., Kempf, M. 2015. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl Environ Mic. 81(7): 2359-2367.

22. Saad, N.M., Amin. W.F., Mostafa, S.M. 2018. Detection of acinetobacter species in milk and some dairy products. Assiut Vet Med J. 64(156): 34-40

23. Michalopoulos, A., Falagas, M.E. 2010. Treatment of Acinetobacter infections. Expert Opin Pharmacother. 11(5): 779-788.

24. Mohajeri, P., Sharbati, S., Farahani, A., Rezaei, Z. 2016. Evaluate the frequency distribution of nonadhesive virulence factors in carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii isolated from clinical samples in Kermanshah. J Nat Sci Biol Med. 7(1):58.

25. Tavakol, M., Momtaz, H., Mohajeri, P., Shokoohizadeh, L., Tajbakhsh, E. 2018. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. Antimicrob Res Infec Control. 4(7):120-123.

26. Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., Tsakris, A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agent. 41(1): 11–19

Genotypic and Phenotypic Pattern of Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Traditional Butter and Cream in Isfahan

Salimi N[1], Ahmadi M[2], Rahimi E[3]

1. Ph.D. Student of Food Hygiene, Food Hygiene Department, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2. Food Hygiene Department, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *m.ahmadi@iauamol.ac.ir*

Received: 31 October 2020 Accepted: 29 January 2021

Abstract

Acinetobacter species are saprophytic and have emerged as an important nosocomial pathogen. In this study, 100 samples of traditional butter and cream, were evaluated for the presence of the *A. baumannii*. The *A. baumannii* isolates were genotyped based on virulence genes and phenotype according to antibiotic resistance patterns. The results showed that from 50 samples of butter and cream, 2 samples (4%) and 1 sample (2%) were contaminated with *A. baumannii*. Antibiotic resistance examination showed that all isolates were resistant to the antibiotics of meropenem, imipenem, chloramphenicol, methicillin, carbapenem and fusidic acid. The most abundant genes encoding antibiotic resistance in *A. baumannii* strains were *tetA*, tetB, *dfrA1*, *aac* (3) -IV, *sul1*, *cnf2*, *csgA*, *jurA*, *citm*, *blasHV*, aadA1 and Aac3IV. The results also showed that the most abundant virulent genes in *A. baumannii* strains that detected from traditional milk and dairy products were *fimH*, *papC*, *Pai* and *kpsmTII*, respectively. It is recommended to use a preventive method to reduce or eradicate *A. baumannii* from the human food chain and to prevent the spread of infection.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Traditional Cream, Traditional Butter, Antibiotic resistance, Isfahan.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.