**مجله دانشکده پزشکی اصفهان** **مقاله پژوهشی**
**سال بیست و هشتم/شماره ۱۱۶/هفته چهارم دی ماه ۱۳۸۹**
**تاریخ دریافت:** ۸۹/۶/۹ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۸/۶

# بررسی شیوع نوپدیدی ژن مقاومت بتالاکتاماز وسیع الطیف Bla-ctx-m-type در سروتایپ‌های سالمونلا انتریکا جدا شده از مدفوع بیماران*

عباس عبداللهی[۱]، علی محمدی بردبری[۲]، مهدی فصیحی رامندی[۳]، راحله شایان[۴]، راحله رادمنش احسنی[۵]

## چکیده

**مقدمه:** سالمونلوزیس یکی از معضلات بهداشتی جوامع بشری به حساب می‌آید. با وجود این اهمیت، درمان دارویی سالمونلوزیس محدود به بیماری حاد و تب تیفوئید است. امروزه، پس از شناسایی اولین سویه‌ی مقاوم *سالمونلا*، گزارش‌های مبنی بر وجود انواع مقاومت‌های دارویی و به خصوص بتالاکتامازهای وسیع الطیف از سراسر دنیا ارایه می‌شود.

**روش‌ها:** ابتدا با روش انتشار از دیسک، حساسیت دارویی سویه‌های آن‌ها بررسی شد، سپس توسط روش E-test، MIC موارد مقاوم تعیین گردید. با استفاده از دیسک‌های ESBL جهت بررسی آنزیم بتالاکتاماز به روش Double disk، وجود بتالاکتاماز در انواع مقاوم تعیین شد و این مقاومت‌ها با استفاده از روش PCR و پرایمر یونیورسال، مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در۶۰ سویه، مقاومت به حداقل یک آنتی‌بیوتیک وجود داشت. از این میان، ۴۵ سویه واجد مقاومت چندگانه‌ی دارویی بود. بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین دیده شد، این در حالی بود که هیچ مقاومتی نسبت به ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین وجود نداشت که این نتایج توسط نتایج E-test تأیید شد. نتایج بررسی ESBLها حاکی از وجود ۵ مورد مقاومت به سفوتاکسیم بود. در مورد ایزوله‌های مقاوم، ۲ مورد واجد قطعه‌ی ژنی پلاسمیدی *Bla-ctx-m-type* بود.

**نتیجه‌گیری:** جدا سازی مقاومت چند دارویی در سالمونلاهای ایزوله شده و اثبات وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در انواع مقاوم، توجه ویژه به مصرف سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و بررسی‌های گسترده را در سطح ملی خاطر نشان می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** سالمونلا، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، مقاومت چند دارویی، آنزیم .CTX-M.

## مقدمه

بر اساس الگوی سروتایپینگ Kauffmann–White، بیش از ۲۴۰۰ سروتایپ مختلف بر اساس Agهای O، H و Vi برای *سالمونلا* شناسایی گردیده است که در ۲ گروه عمده‌ی S. enterica با ۶ زیرگونه و S. bongori قرار می‌گیرند (۳-۱)؛ سویه‌های بیماری‌زای انسانی اغلب در گروه S. enterica subspecies enteica (I) (که بیشترین سروتایپ‌های *سالمونلا* را شامل می‌شود) قرار می‌گیرد (۵-۴). مهم‌ترین تفاوت در نام‌گذاری این سروتایپ‌ها به علت اختلاف در نوع و شدت بیماری‌زایی سویه‌ها (به دو شکل عفونت تب تیفوئیدی و گاستروانتریت همراه با یا بدون سپتی‌سمی)، منشأ آلودگی (انسانی- حیوانی)، محل جغرافیایی شناسایی سویه (در مورد برخی از سروتایپ‌ها)، اپیدمیولوژی و الگوی حساسیت دارویی است (۹-۶).

* این تحقیق، بر اساس بودجه‌ی مصوب طرح شماره‌ی ۵۰-۱۳۸۷ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی فسا انجام شده است.
[۱] مربی، عضو هیأت علمی بخش میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا (عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی)، شیراز، ایران.
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] دانشجوی دکتری زیست فن‌آوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.
[۴] کارشناس ارشد باکتری شناسی، بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
[۵] کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: عباس عبداللهی
Email: a_abdollahi1360@yahoo.com



www.mui.ac.ir

تا اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی، آمپی سیلین، کلرامفنیکل و سولفونامیدها به عنوان داروی انتخابی در درمان سالمونلوزیس به کار می‌رفتند تا این که اولین سویه‌ی *سالمونلای* مقاوم به آمپی سیلین، کلرامفنیکل، سولفامتوکسازول، استرپتومایسین و تتراسایکلین با نام S. Typhimurium DT 104 شناسایی شد (۱۰).

آمار ارایه شده توسط CDC مبنی بر وجود مقاومت چندگانه دارویی در *سالمونلا*ها به میزان ۵۰ درصد است (۱۲-۱۱). به تازگی موارد مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و سفالوسپورین‌های وسیع الطیفی مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفتی‌زوکسیم، که اغلب توسط بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایجاد می‌گردد، درحال افزایش است ولی با وجود این مقاومت‌ها در اکثر نقاط دنیا، این دو دسته دارویی همچنان به عنوان مؤثرترین داروها در درمان سالمونلوزیس به شمار می‌رود (۱۵-۱۳).

اولین بتالاکتاماز موجود در باکتری‌های گرم منفی در اوایل سال‌های ۱۹۶۰ شناسایی شد، طی ۲۰ سال گذشته، آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام جدیدی تهیه شدند که در برابر فعالیت‌های هیدرولیزی بتالاکتامازها مقاوم بودند (۱۸-۱۶)، اما با به کارگیری هر گروه جدید جهت درمان بیماران، بتالاکتامازهای جدیدی به وجود می‌آمدند که نسبت به آن گروه جدید داروها مقاوم‌تر **بودند**. احتمالاً مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک‌های جدید جهت درمان بیماران و فشار انتخابی بر باکتری، بر تولید بتالاکتامازهای جدید توسط باکتری‌ها مؤثر بوده است (۲۰-۱۹). یکی از این گروه‌های جدید، اکسی مینوسفالوسپورین‌هایی بودند که برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی **از** اوایل سال‌های ۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند؛ به علت افزایش طیف فعالیت این آنزیم‌ها، به خصوص برای مقابله با اکسی مینوسفالوسپورین‌ها، آن‌ها را بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌نامند (ESBL یا Extended Spectrum beta-Lactamase). امروزه میزان بتالاکتامازهای وسیع الطیف مختلف رو به فزونی است؛ به گونه‌ای که در سرتاسر جهان در بسیاری از جنس‌های مختلف باکتری‌ها (مانند خانواده انتروباکتریاسه) یافت می‌شوند (۲۱-۲۰، ۱۸-۱۶).

در سال‌های اخیر، خانواده‌ی جدیدی از ESBLهای پلاسمیدی تحت عنوان CTX-M (سفوتاکسیماز) شناسایی شده است (۲۲)، که اغلب در خانواده‌ی انتروباکتریاسه تجلی می‌یابند. این آنزیم‌ها ارتباطی با بتالاکتامازهای TEM یا SHV (اولین بتالاکتامازهای وسیع الطیف شناسایی شده) ندارند و همچنین قابلیت زیادی در هیدرولیز انواع بتالاکتام‌ها دارند (۲۵-۲۳). از بررسی‌های سینتتیکی مشخص می‌شود که بتالاکتامازهای نوع CTX-M، نسبت به سایر آنزیم‌های بتالاکتاماز، توانایی بالاتری در انتقال مقاومت بین جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌ها دارند. آنزیم‌های CTX-M به ۵ گروه اصلی گروه ۱، شامل انواع CTX-M-1,3,10,12,15,22,23,28؛ گروه ۲، شامل انواع CTX-M-2,4,5,6,7,20؛ گروه ۸، شامل CTX-M-8؛ گروه ۹، شامل انواع CTX-M-9,13,14,16,17,19,21,24,27 و گروه ۲۵، شامل CTX-M-25 تقسیم می‌شوند. گونه‌های واجد بتالاکتامازهای نوع CTX-M از بسیاری از بخش‌های جهان ایزوله شده‌اند، اما در برخی مناطق مانند اروپای شرقی شیوع بیشتری دارند. گزارشات اندکی نیز مبنی بر وجود این آنزیم‌ها در ایزوله‌های بیماران ساکن



www.mui.ac.ir

اروپای غربی وجود دارد که اغلب به ایزوله‌های کسب شده از مهاجرانی مربوط می‌شوند که از مناطقی با شیوع بالا نقل مکان کرده‌اند (۲۶، ۲۰).

با توجه به اهمیت موضوع، هدف از این تحقیق، سروتایپینگ ایزوله‌های مدفوعی *سالمونلا انتریکا* و بررسی الگوی مقاومت دارویی، به خصوص تولید آنزیم CTX-M در سویه‌های مقاوم بود.

## روش‌ها

در این مطالعه که از انواع مطالعات مقطعی– تحلیلی بود، در یک دوره‌ی زمانی ۱۸ ماهه، به جمع آوری سویه‌های سالمونلا از مدفوع بیماران مشکوک، بنا به درخواست پزشک، پرداخته شد. نمونه‌های اخذ شده از بیماران را به سرعت (حداکثر تا ۱ ساعت) در محیط‌های افتراقی (XLD، SS agar، Mc Conkey) و محیط غنی کننده (SF) کشت و نتیجه‌ی کشت SF را پس از ۸ تا ۱۲ ساعت به محیط XLD و SS انتقال داده شد. کلنی‌های مشکوک به سالمونلا (تخمیر لاکتوز منفی، تولید سولفید هیدروژن مثبت)، را به محیط‌های TSI، Urea Agar، LIA، Citrate و MR-VP، انتقال داده، در نهایت با استفاده از جداول استاندارد، سالمونلا را شناسایی و جداسازی نمودیم (۲۷). پس از شناسایی سویه‌های سالمونلا، از کیت سروتایپینگ (BioMerieux ،France)، جهت تعیین سروتایپ‌های سالمونلا، استفاده گردید (۲۷).

تست تعیین حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام): سالمونلا به دست آمده، با انجام تست حساسیت دارویی با روش استاندارد شده انتشار از دیسک (Kirby-Bauer) مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام تست از دیسک‌های آنتی بیوتیک (شرکت پادتن طب، ایران) شامل (CFZ) سفتازیدیم ۳۰ µg، (CTX) سفوتاکسیم ۳۰ µg، (AMP) آمپی‌سیلین ۱۰ µg، (SXT) کوتری‌موکسازول ۲۵ µg، (NA) نالیدیکسیک اسید ۳۰ µg، (IPM) ایمی‌پنم ۱۰ µg، (CL) کلرامفنیکل ۳۰ µg و (CIP) سیپروفلوکساسین ۵ µg استفاده نمودیم. با تطابق قطر هاله‌ها با جدول استاندارد و مقایسه با سویه‌ی استاندارد E.coli ATCC® ۲۵۹۲۲™ (طبق دستورالعمل شرکت سازنده و CLSI)، نتایج به صورت حساس و مقاوم گزارش شد (۲۹–۲۸).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC): از نوارهای آنتی‌بیوتیکی استاندارد E-test (Sweden، Dalvägen، AB Biodisk)، جهت بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی رشد استفاده گردید (۲۹–۲۸).

بررسی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف: طبق دستورالعمل ارایه شده توسط NCCLS (CLSI)، برای اطمینان از وجود صفت فنوتیپی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف، از دیسک‌های ESBL CTX، که به همین منظور تولید می‌شوند استفاده نمودیم (Mast Group Ltd., UK). دیسک‌ها حاوی سفوتاکسیم ۳۰ µg و سفوتاکسیم ۳۰ µg+ کلاولانیک اسید ۱۰ µg بودند؛ در این تست مبتنی بر هم افزایی (سینرژی) Double-disk از دو دیسک در فاصله‌ی ۳۰ mm از یکدیگر به طور همزمان برای بررسی وجود ESBL در باکتری استفاده گردید (۳۰، ۲۸).

بررسی مولکولی ژن Bla-ctx-m-type: پس از تعیین ایزوله‌هایی که از نظر فنوتیپیک مثبت بودند (تولید ESBL)، ایزوله‌ها مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. برای این منظور، ابتدا پلاسمید را استخراج نمودیم (کیت استخراج پلاسمید، شرکت سیناژن، ایران). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط جفت



www.mui.ac.ir

پرایمر یونیورسالی، که سکانسی حفاظت شده با طول تقریبی ۵۵۰ bp را در داخل ژن Bla-ctx-m-type (با طول ۸۷۹–۸۷۷ جفت باز) تکثیر می‌کرد، انجام گرفت (http://www.lahey.org/Studies/). شرایط بهینه برای انجام PCR به این شرح بود:

CTX-M-U1; 5' ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC(Y = C/T, R = A/G, K = G/T)

CTX-M-U2; 5' TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG(R = A/G, S = G/C, Y = C/T)

۴/۵ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس ۳۰ دور از: ۵۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵۰ دور در ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵۵ دور در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد.

پس از طی فرایند PCR، برای اطمینان از تولید محصول و همچنین برای تأیید صحت و سقم قطعه‌ی تکثیر یافته، محصول را بر روی ژل آگارز ۰/۸ تا ۱ درصد، الکتروفورز نمودیم. برای تعیین وزن مولکولی محصول، از مارکر وزن مولکولی با قطعات ۱۰۰ جفت باز (۱۰۰ bp) استفاده کردیم (Fermentas، USA). در نهایت به منظور تأیید و اطمینان از نتایج PCR، محصولات PCR را جهت تعیین توالی (Sequencing) ارسال نمودیم (شرکت فزاپژوه، ایران).

## یافته‌ها

در کل تعداد ۹۶ سویه‌ی بالینی سالمونلا انتریکا از مدفوع بیماران شناسایی گردید، نتایج سروتایپینگ حاکی از وجود ۳۵ مورد Typhimurium، ۲۲ مورد Enteritidis، ۱۱مورد Typhi، ۸ مورد Parathyphi B، ۴ مورد Newport، ۳مورد Derby، ۱ مورد Virchow، ۱ مورد Infantis و ۱۱ مورد Untypable بود.

در مورد حساسیت دارویی این نتایج به دست آمد: ۳۶ مورد از ایزوله‌ها به تمامی آنتی بیوتیک‌ها حساس بودند ولی در ۶۰ مورد، مقاومت به حداقل یک نوع آنتی بیوتیک دیده می‌شد؛ از این میان، ۴۵ مورد واجد مقاومت دارویی چندگانه بودند. بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین دیده شد، این در حالی بود که هیچ مقاومتی نسبت به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین وجود نداشت. میزان مقاومت ضد سفالوسپورین‌های مصرفی نیز بسیار پایین بود (جداول ۱ و ۲).

**جدول ۱. تعداد سویه‌های مقاوم و نوع مقاومت‌های موجود در آن‌ها**

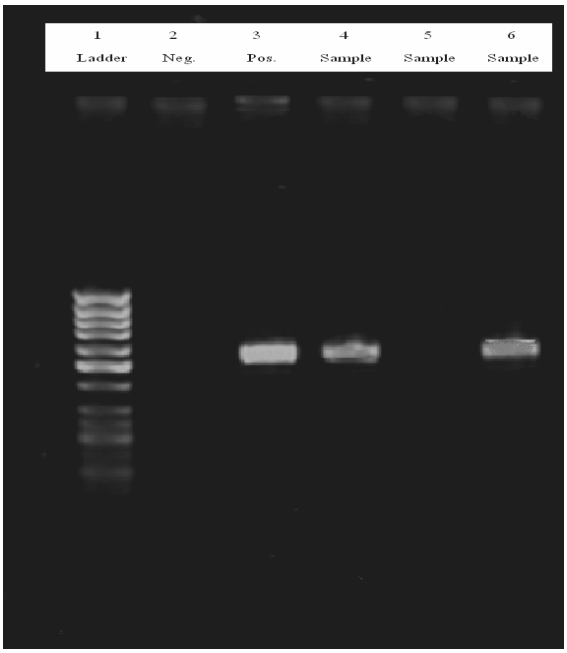
| آنتی بیوتیک | تعداد مقاومت | تعداد سویه |
|---|---|---|
| - | ۰ | ۳۶ |
| AMP | ۱ | ۱۵ |
| NA | ۱ | ۱۰ |
| AMP SXT | ۲ | ۱۰ |
| AMP SXT CL | ۳ | ۸ |
| AMP NA CL | ۳ | ۵ |
| AMP NA SXT | ۳ | ۳ |
| AMP NA CTX | ۳ | ۳ |
| AMP NA CL | ۳ | ۳ |
| AMP NA CTX | ۳ | ۲ |
| CL SXT CFZ | ۳ | ۱ |



www.mui.ac.ir

جدول ۲. میزان مقاومت به هر کدام از آنتی بیوتیک‌های مصرفی

| | | |
|---|---|---|
| تعداد مقاومت به AMP | ۴۷ نمونه | ۴۹ درصد |
| تعداد مقاومت به NA | ۲۳ نمونه | ۲۴ درصد |
| تعداد مقاومت به SXT | ۲۴ نمونه | ۲۵ درصد |
| تعداد مقاومت به CL | ۱۷ نمونه | ۱۸ درصد |
| تعداد مقاومت به CTX | ۵ نمونه | ۵ درصد |
| تعداد مقاومت به CFZ | ۴ نمونه | ۴ درصد |
| تعداد مقاومت به CIP | ۰ | ۰ |
| تعداد مقاومت به IPM | ۰ | ۰ |




**شکل ۱. نتایج PCR، از چپ به راست: (۱) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، (۲) شاهد منفی، (۳) شاهد مثبت، (۴، ۵ و ۶) نمونه‌های بالینی (۴، مثبت، سروتایپ ورشو؛ ۵، منفی، سروتایپ تایفی موریوم؛ ۶، مثبت، سروتایپ تایفی)**

نتایج به دست آمده از E-test نیز همگی مؤید وجود مقاومت در مورد سویه‌های مقاوم از نظر تست آنتی بیوگرام بودند. مقادیر مقاومت در مورد میزان MIC هر یک از آنتی بیوتیک‌ها، طبق استانداردهای (CLSI) NCCLS در مورد سویه‌های بالینی سالمونلا بدین شرح بود: (CIP ≤ ۰/۱۲ µg/ml، NA ≤ ۴ µg/ml، SXT ≤ ۴ µg/ml، AMP ≤ ۳۲ µg/ml، CL ≤ ۳۲ µg/ml، CTX ≤ ۶۴ µg/ml، CFZ ≤ ۳۲ µg/ml و CFZ ≤ ۱۶ µg/ml).

نتایج بررسی فنوتیپی تولید ESBL: از میان ایزوله‌ها، تعداد ۵ مورد مقاومت نسبت به سفوتاکسیم وجود داشت که تولید ESBL در این ایزوله‌ها با استفاده از دیسک‌های ESBL ارزیابی و تأیید گردید. از این میان ۱ مورد ورشو، ۲ مورد تایفی، ۱ مورد تایفی موریوم و ۱ مورد اینفانتیس واجد بتالاکتاماز نوع CTX بود.

نتایج PCR: از میان ۵ سویه‌ی مثبت فنوتیپی، ۲ مورد از حیث وجود قطعه‌ی پلاسمیدی ژنی



www.mui.ac.ir

Bla-ctx-m-type مثبت بود که یک مورد سروتایپ تایفی و یک مورد سروتایپ ورشو بود (شکل ۱). طول قطعه‌ی محصول به دلیل تفاوت‌های جزیی در بازهای ژن Bla-ctx-m-type در حدود ۵۵۰ bp بود. پس از دریافت جواب تعیین توالی (سکانس ژنی)، آن را از طریق برنامه‌ی BLAST، موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، مورد تجزیه و تحلیل قرار دادیم که نتیجه‌ی آن مشابهت ۹۸ درصدی نمونه ما با سکانس ژنی ژن Bla-ctx-m-type بود.

## بحث

در اکثر مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته، بیشترین درصد آلودگی توسط S. Typhimurium و S. Enteritidis گزارش شده است که در تحقیق ما نیز این قضیه صادق است (۳۱، ۲-۱). بیشترین میزان شیوع در سویه‌هایی که قابل تیپ بندی بودند به ترتیب شامل تایفی موریوم ۳۵ مورد، انتریدیس ۲۲ مورد، تایفی ۱۱ مورد، پاراتیفی B ۸ مورد، نیوپورت ۴ مورد، دربی ۳ مورد و ورشو و اینفانتس هر کدام ۱ مورد بود.

از نظر مقاومت‌های دارویی، الگوی مقاومتی در سروتایپ‌های مختلف و مکان‌های مختلف بسیار متفاوت است و نمی‌توان یک الگوی مقاومتی ویژه در مورد *سالمونلا* ارایه نمود، ولی در کل بیشترین مقاومت‌ها در سروتایپ تایفی موریوم گزارش گردیده است (۳۴-۳۲). در بررسی ما نیز، اعم از مقاومت به یک آنتی بیوتیک یا بیشتر، ۷۴ درصد مقاومت در سروتایپ تایفی موریوم، ۵۴ درصد مقاومت در سروتایپ انتریتیدیس، ۵۴ درصد مقاومت در سروتایپ تایفی، ۳۷ درصد مقاومت در سروتایپ پاراتایفی B، ۵۰ درصد مقاومت در سروتایپ نیوپورت، ۳۳ درصد مقاومت در سروتایپ دربی، ۱۰۰ درصد مقاومت در سروتایپ ویرشو و اینفانتیس و ۷۲ درصد در غیر قابل تیپ بندی‌ها دیده شد که با آمار ارایه شده با سایر تحقیقات تا حدود زیادی مطابقت دارد (۳۳-۳۲، ۱)؛ البته اگر چه در بررسی ما در صد مقاومت در سروتایپ ورشو و اینفانتیس بالاترین است؛ اما این قضیه به دلیل شیوع کم این دو سروتایپ در این تحقیق بوده است و تا بررسی‌های جامع‌تر اپیدمیولوژیک صورت نگیرد، نتایج حاصل در مورد این دو سروتایپ قابل تعمیم نخواهد بود.

با وجود این که تاکنون میزان گزارش و شیوع ESBL، که اغلب به راحتی قابلیت انتقال توسط پلاسمید بین جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتریایی را دارند، در جنس *سالمونلا* کم بوده است، اما مانند سایر مقاومت‌های ایجاد شده در سایر باکتری‌ها، افزایش مقاومت دور از انتظار نخواهد بود (۲۰-۱۹). در بررسی ما ۵ سویه‌ی مقاوم به سفوتاکسیم (که توسط دیسک‌های ESBL نیز تولید بتالاکتاماز تأیید گردید) شناسایی شد. همان طور که اشاره گردید در میان ایزوله‌های واجد فنوتیپ مقاوم به سفوتاکسیم، در بررسی توسط PCR، نشان داده شد که همگی واجد CTX-M نبوده‌اند. دلیل این امر، گستردگی طیف عمل ESBLها است؛ بدین معنی که یک باکتری می‌تواند از طریق تولید ESBLهایی به جز آنزیم CTX-M، سفوتاکسیم را هیدرولیز نماید. همچنین هر چند که تأثیر CTX-M تا حدودی اختصاصی برای سفوتاکسیم می‌باشد، ولی توانایی هیدرولیز سایر آنتی بیوتیک‌های خانواده‌ی سفالوسپورین‌ها را نیز دارد (۲۶-۲۳).



www.mui.ac.ir

طبق مطالعات انجام شده در سایر کشورها و مناطق، نوپدیدی آنزیم CTX-M در *سالمونلا*، در سال‌های اخیر تشخیص داده شده است (۳۹-۳۵). در بررسی ما نیز، ارزیابی وجود این آنزیم در *سالمونلا* احتمالاً برای اولین بار در ایران انجام و گزارش شده است که مشابه سایر مطالعات، نشان دهنده‌ی میزان شیوع پایین این آنزیم در سروتایپ‌های *سالمونلا* است.

ایجاد مقاومت‌های دارویی در سویه‌های غیر تیفوئیدی از نظر این که شیوع بیشتری در طبیعت و حیوانات دارند و قابل سرایت به انسان نیز هستند، حایز اهمیت بیشتری است؛ چرا که انتقال مقاومت در این سویه‌ها به دلیل نرخ بالای شیوع آلودگی در حیوانات با میزان بالاتری انتشار می‌یابد؛ از طرفی، به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در پرورش دام و طیور، میزان سویه‌های با میزان مقاومت بالا نیز افزایش می‌یابد (۴۴-۴۰). در بررسی ما نیز همان طور که ذکر شد میزان شیوع مقاومت در سویه‌های غیر تیفوئیدی بالا بود.

## نتیجه‌گیری

شناسایی مقاومت‌های دارویی و جلوگیری از انتشار آن‌ها، قطعاً یکی از مسایل عمده در درمان عفونت‌ها و بهداشت جامعه است. بررسی و ارزیابی مداوم این مقاومت‌ها به خصوص در سطوح ملی و منطقه‌ای امری بدیهی است؛ پس چه بهتر که بتوانیم با استفاده از روش‌های متعدد غربالگری، مقاومت‌های دارویی و با تدابیر خاصی که در میزان و نوع مصرف بالینی آنتی بیوتیک‌ها در نظر می‌گیریم، از شیوع و انتشار مقاومت تا حدود زیادی جلوگیری به عمل آوریم تا بدین وسیله به میزان زیادی از دغدغه‌های درمانی جامعه‌ی پزشکان و پیراپزشکان بکاهیم.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را از همکار آزمایشگاهی خانم حاتمی دارند.

## References


1. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid Salmonella serotypes: a global challenge. Clin Infect Dis 2004; 39(4): 546-51.
2. Tauxe RV, Pavia AT. Salmonellosis: nontyphoidal. In: Brachman PS, Evans AS, Editors. Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control. 3rd ed. New York: Springer; 1998. p: 613-30.
3. Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. Epidemiol Infect 2002; 129(1): 1-8.
4. Edelman R, Levine MM. Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev Infect Dis 1986; 8(3): 329-49.
5. Mermin JH, Townes JM, Gerber M, Dolan N, Mintz ED, Tauxe RV. Typhoid fever in the United States, 1985-1994: changing risks of international travel and increasing antimicrobial resistance. Arch Intern Med 1998; 158(6): 633-8.
6. Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, Besser JM, Wicklund JH, Smith KE, et al. Use of molecular subtyping in surveillance for Salmonella enterica serotype typhimurium. N Engl J Med 2001; 344(3): 189-95.
7. Popoff MY, Le Minor L. Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Paris: Pasteur Institute; 1997.
8. Miller SI, Pegues DA. Salmonella species, including Salmonella typhi. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of infectious diseases. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2000. p. 2344-63.
9. Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV, et al. The changing epidemiology of salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. J Infect Dis 2001; 183(5): 753-61.
10. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium DT104 infections in the United States. N




www.mui.ac.ir

Engl J Med 1998; 338(19): 1333-8.
11. Holmberg SD, Wells JG, Cohen ML. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. Science 1984; 225(4664): 833-5.
12. Mandal BK. Modern treatment of typhoid fever. J Infect 1991; 22(1): 1–4.
13. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, et al. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. N Engl J Med 2000; 342(17): 1242-9.
14. Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2006. 19th ed. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Inc; 2006.
15. Ercis S, Gulay Z, Gur D, Erdem B, Hascelik G, Tunger A, et al. Types of extended-spectrum beta-lactamases in Salmonella spp. and decreased susceptibility to fluoroquinolones. Proceedings of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2006 April 4; Nice, France.
16. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control 2006; 34(5 Suppl 1): S20-8; discussion S64-73.
17. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 557-84.
18. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. Microbes Infect 2000; 2(10): 1225-35.
19. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant Salmonella from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. J Antimicrob Chemother 2005; 56(1): 115-21.
20. Govinden U, Mocktar C, Moodley P, Sturm AW, Essack SY. Geographical evolution of the CTX-M β-lactamase– anupdate. African Journal of Biotechnology 2007; 6(7): 831-9.
21. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-51.
22. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14(2): 137-42.
23. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of Salmonella typhimurium in Latvia. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(8): 1980-4.
24. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1936-42.
25. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a Salmonella typhimurium clone found in St Petersburg, Russia. J Antimicrob Chemother 1998; 41(1): 119-21.
26. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 1-14.
27. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. Villanova, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 3rd ed. Villanova, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1993.
30. Sirot J. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion. Clin Microbiol Infect 1996; 2(Suppl 1): S35-S39.
31. Varma JK, Greene KD, Ovitt J, Barrett TJ, Medalla F, Angulo FJ. Hospitalization and antimicrobial resistance in Salmonella outbreaks, 1984-2002. Emerg Infect Dis 2005; 11(6): 943-6.
32. Parry CM. Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(5): 467-72.
33. Shannon K, French G. Multiple-antibiotic-resistant salmonella. Lancet 1998; 352(9126): 490.
34. Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria: annual report, 2002. Atlanta: The Centers for Disease Control and Prevention; 2004.
35. Rotimi VO, Jamal W, Pal T, Sovenned A, Albert MJ. Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase-producing Salmonella spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 7): 881-6.
36. Romero L, López L, Martínez-Martínez L, Guerra B, Hernández JR, Pascual A. Characterization of the first CTX-M-14-producing Salmonella enterica serotype Enteritidis isolate. J Antimicrob Chemother 2004; 53(6): 1113-4.
37. Jin Y, Ling JM. CTX-M-producing Salmonella spp. in Hong Kong: an emerging problem. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 9): 1245-50.



www.mui.ac.ir

**38.** Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of Salmonella enterica isolated in France and Senegal. FEMS Microbiol Lett 2004; 238(2): 353-8.
**39.** Bouallègue-Godet O, Ben Salem Y, Fabre L, Demartin M, Grimont PA, Mzoughi R, et al. Nosocomial outbreak caused by Salmonella enterica serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1037-44.
**40.** Govinden U, Mocktar C, Moodley P, Sturm AW, Essack SY. CTX-M-37 in Salmonella enterica serotype Isangi from Durban, South Africa. Int J Antimicrob Agents 2006; 28(4): 288-91.
**41.** Shivhare S, Sharda R, Sharma V, Reddy AG. Some aspects of molecular epidemiology & characterisation of Salmonella Typhimurium isolated from man & animals. Indian Journal of Comparative Microbiology Immunology and Infectious Diseases 2000; 21(1): 76-8.
**42.** Rahman H. Some aspects of molecular epidemiology & characterisation of Salmonella Typhimurium isolated from man & animals. Indian J Med Res 2002; 115: 108-12.
**43.** Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ, Shipman LD. Plasmid analysis and epidemiology of Salmonella enteritidis infection in three commercial layer flocks. Avian Dis 1992; 36(4): 844-51.
**44.** Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, García-Peña J, Frias N, Usera MA. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. J Antimicrob Chemother 2001; 47(3): 315-21.



www.mui.ac.ir

**Journal of Isfahan Medical School** **Original Article**

**Vol 28, No 116, 4th week, January 2011** Received: 31.8.2010 Accepted: 28.10.2010

# Emergence of *Bla-ctx-m-type* Gene in *Salmonella Enterica* Serotypes Isolated from Patients Stool

Abbas Abdollahi MSc[1], Ali Mohammadi[2], Mahdi Fasihi[3], Raheleh Shayan MSc[4], Raheleh Radmanesh MSc[5]

## Abstract

**Background:** Salmonellosis is one of the most important prevalent bacterial infections, after a decade of its recognition. Antibiotic therapy in salmonellosis is restricted to typhoid fever and acute infections. After the first reporting of resistance in S. Typhimurium DT 104, nowadays, developing resistance in Salmonella, specially, ESBL (such as CTX-M) species is an important issue in salmonellosis. In this study, we evaluated bla-ctx-m-type gene in clinical isolates of Salmonella enterica.

**Methods:** In this cross-sectional study, we collected clinical isolates of patients in 18 months. Initially, we surveyed drug sensitivity with disk diffusion method, and then determined MIC of resistant isolates with E-test stripes. The existence of ESBL (extended spectrum beta-lactamase) enzymes was examined by ESBL disks in Double Disk method, and these resistances was evaluated with PCR by using a pair of universal primers.

**Finding:** 36 isolates were sensitive to all of antibiotics, but, in 60 isolates there was at least one resistance. In 45 isolates, there were multi drug resistance (MDR) phenotypes. Resistance to ampicilin was the highest percent, whereas, there was not any resistance to imipenem and ciprofloxacin, which were improved with E-test strips. ESBL evaluation, showed producing cefotaxime ESBL in 5 isolates and ceftazidim ESBL in 4 isolates; 2 isolates of these had bla-ctx-m-type gene in plasmid.

**Conclusion:** Detection of MDR trait, especially extended spectrum beta-lactamases in resistant clinical Salmonella isolates, point to the attention in usage of extended spectrum cephalosporins and detection of resistance rate in a nation level.

**Key words:** Salmonella, Extended spectrum beta-lactamase (ESBL), Multi drug resistance (MDR), CTX-M enzyme.

[1] Instructor, Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, (Member of Young Researchers Club, Islamic Azad University), Shiraz, Iran.
[2] Student, Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Student of PhD, Research Center of Molecular Biology, School of Medicine, Baqiyatallah University, Tehran, Iran.
[4] Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
[5] Pediatric Infectious Diseases Research Center, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
**Corresponding Author:** Abbas Abdollahi MSc, Email: a_abdollahi1360@yahoo.com



www.mui.ac.ir