DOI: 10.22092/vj.2018.115854.1371
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی طیف اثر آنتی بیوتیکی و وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز و متالو بتالاکتاماز در جدایه‌های باسیلوس سوبتیلیس از نمونه‌های شیر خام و پنیر درسطح شهرستان اردبیل

• سیامک قضائی
دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۸-۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۱۲-۱۹
Email: ciamakghazaei@yahoo.com

چکیده

باسیلوس سوبتیلیس یک باکتری خاکزی، گرم مثبت و میله‌ای شکل می‌باشد که به صورت طبیعی مقادیر فراوانی از پروتئین‌های مختلف را با غلظت‌های بالا به درون محیط کشت ترشح می‌نماید. هدف از مطالعه حاضر بررسی فنوتیپی آنزیم‌های بتالاکتاماز و متالو بتالاکتاماز در جدایه‌های باسیلوس سوبتیلیس از نمونه‌های شیر و پنیر بود. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و پنیر از مراکز تهیه و توزیع فرآورده‌های لبنی اخذ و کشت داده شد. کلونی‌های مشکوک به باسیلوس سوبتیلیس با روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. برای سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش کربی‌بائر، آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف از روش Combination Disk و آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از روش E-test MBL استفاده شد. بالاترین میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولیدکردن آنزیم بتالاکتاماز بودند، مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۷۵ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۴۶/۲۰ درصد) است. همچنین میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولیدکردن آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، بالا بود (۱۰۰ درصد) به استثنای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۶۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۶۷/۴۰ درصد) که کمترین میزان مقاومت مشاهده شد. آلودگی مواد غذایی به سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به فلور باکتریایی روده‌ی مصرف‌کنندگان افزایش می‌دهد و باید به عنوان یک عامل خطر بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بتالاکتاماز، متالوبتالاکتاماز، باسیلوس سوبتیلیس، شیر، پنیر

Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 28-35

Phenotypic detection of beta and metallo lactamases enzymes in *Bacillus subtilis* strains isolated from raw milk and cheese samples

By: Ghazaei, *S., Department of Microbiology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

Received: 2017-11-11 Accepted: 2018-03-10

Email: ciamakghazaei@yahoo.com

Bacillus subtilis, a soil bacteria, Gram-positive, rod-shaped, which naturally secretes large amounts of various proteins with high concentrations into the culture medium. The aim of present study was to evaluate the phenotype detection of beta-lactamase and metalo-beta lactamase in *Bacillus subtilis* strains isolated from samples of milk and cheese.In this study, 100 samples of raw milk and cheese from production and distribution centers received and were cultured. Suspected *Bacillus subtilis* colonies were identified by biochemical methods. To measure the susceptibility was used Kirby-Bauer method, for broad-spectrum beta-lactamase enzymes and metalo-betalactamase was used Combination Disk and E-test MBL method respectively.The highest amount of resistance in isolates producing beta-lactamase enzyme was related to the antibiotic erythromycin (75%) and the lowest resistance to the antibiotic cefotaxim (44/60%) and cefixime(46/20%). The amount of resistance in isolates producing MBL enzymes was high (100%) with the exception of antibiotics cefotaxim (64/60%) and cefixime (67.40%),the lowest level resistance was observed.The results of this study show food contamination with strains resistant to the antibiotics increases the risk of transferring antibiotic resistance to intestinal bacterial flora of consumers.

Keywords: Beta-lactamase, MBL, *Bacillus subtilis,* Milk, Cheese

مقدمه

باسیلوس سوبتیلیس *(Bacillus subtillis)* باکتری گرم مثبتی است که بیشتر در خاک یافت می‌شودکه معمولا باعث بیماری در انسان نمي‌شود. (۱) در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی شناخته شده مانند اشریشیا کلی، باکتری باسیلوس سوبتیلیس به عنوان یک ارگانیسم (GRAS) عموما ایمن شناخته شده (در نظر گرفته می‌شود. به همین دلیل امروزه این باکتری به عنوان یک میزبان خوب به برای تولید پروتئین‌های هترولوگ ترشحی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۲). این باکتری با داشتن یک سیستم ترشحی فعال و کارآمد، قادر است پروتئین‌های متنوعی را به محیط پیرامونی خود ترشح نماید و از جمله باکتری‌هایی است که برای بررسی رشد و تمایز سلولی بسیار مناسب مي‌باشد. استفاده از این ویژگی در تولید پروتئین‌های نوترکیب باعث تسهیل تولید این پروتئین‌ها می‌شود (۳). از دیگر مزایای این میکروارگانیسم که آن را به عنوان یک میزبان مناسب در تکثیر و بیان ژن‌های هترولوگ معرفی می‌کند توان رشد سریع، سهولت دستکاری ژنتیکی در ژنوم باکتری، غیربیماری زا بودن، ژنوم مشخص و تعیین ترادف شده و ظرفیت بالا در ترشح پروتئین است (۴).

در پی درمان‌های تجربی نامناسب ارگانیسم‌های حساس نیز مقاوم می‌شوند که این امر بوسیله القاء تشکیل آنزیم‌های غیرفعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها و یا موتاسیون در ژن‌های کدکننده، کانال‌های دیواره سلولی (پورین‌های غشای خارجی)، سیستم‌های تراوشی و یا از طریق انتقال پلاسمیدی صورت می‌گیرد. مجموعه داروهای بتالاکتام در حال حاضر فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه عفونت‌های باکتریایی هستند. استفاده از آن‌ها منجر به بروز مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در سراسر جهان می‌شود. مکانیسم‌های مقاومت شامل ترشح آنزیم‌های بتالاکتامازها و مکانیسم‌های مقاومت غیر آنزیمی می‌باشند (۵). یکی از مشکل‌سازترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در رابطه با بتالاکتامازها می‌باشد. باکتری‌های مولد بتالاکتاماز با ایجاد موتان‌های جدید رو به افزایش می‌باشند (تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع مختلف بتالاکتاماز در نمونه‌های بالینی تعریف شده‌اند) (۶، ۷).

بتالاکتامازها آنزیم‌های باکتریایی و از خانواده آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند که با هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی یعنی پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها و از طریق برقراری اتصال کووالان و هیدرولیز پیوند آمیدی در حلقه بتالاکتام باعث غیرفعال شدن آن‌ها می‌شوند، در نتیجه باعث تبدیل شدن آن‌ها به مشتقات بدون فعالیت ضدباکتریایی می‌شوند (۶). با مصرف گسترده و روز افزون آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌ها، دسته‌ی دیگری از بتالاکتامازها به وجود آمدند که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه فعالیت گسترده‌تری داشتند (Extended spectrum beta-lactamase) (ESBLs) (۷). کرباپنم‌ها از جمله آنتي‌بیوتیك‌های بتالاکتامی وسیع‌الطیف، مؤثر بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به شمار مي‌روند .این آنتي‌بیوتیك‌ها، نسبت به سفالوسپورینازها و پني‌سیلینازها مقاوم هستند.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف آنزیم‌های ناشی از پلاسمید هستند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی به واسطه‌ی جلوگیری و ممانعت از کامل

شدن پپتیدوگلیکان به واسطه مهار روند تشکیل پل‌های عرضی عمل می‌کنند، که این عمل باعث اختلال در بیوسنتز دیواره سلولی و اعمال سلول و در نتیجه تغییر شکل و لیز شدن سلول می‌شود. شرط لازم برای موثر بودن یک مهارکننده بتالاکتاماز آن است که این ماده دارای حلقه بتالاکتامی باشد تا بتواند در اثر حمله آنزیمی بتالاکتامازها یک ترکیب حد واسط آسیل-آنزیم ایجاد کرده و با روندی آرام هیدرولیز گردد (۹). طبق دسته‌بندی آمبلر (Ambler) بتالاکتامازها به ۴ دسته A تا D تقسیم می‌شوند که نوع A، C و D سرین بتالاکتامازها هستند، در حالی که نوع B متالوبتالاکتامازها است (۱۰) . متالوبتالاکتامازها در جایگاه فعال خود دارای روی (Zn) به عنوان کوفاکتور می‌باشند. چند روش مختلف برای تشخیص آزمایشگاهی سویه‌های مولد متا لوبتالاکتاماز گزارش شده است. از جمله این روش‌ها، استفاده از بازدارنده‌ها است که در این میان، استفاده از EDTA که ماده‌ای غیرسمی بوده و به راحتی در دسترس است و دیسک‌های حاوی آن تا ۱۶ هفته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند، نسبت به سایر بازدارنده‌ها مناسب‌تر است. استفاده از نوار E-test روش دیگر شناسایی باکتری‌های مولد MBL است که هزینه زیادی دارد و نتایج حاصل از آن نیز از کرار پذیری کمتری برخوردار است (۱۱).

متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند سولباکتام، تازوباکتام و اسید کلاولانیک مهار نمی‌شوند. از آنجا که بر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و کرباپنم‌ها)به استثنای مونوباکتام‌ها مانند آزترئونام (مؤثرند، مشکل عمده بالینی به شمار می‌روند. کرباپنم‌ها مانند ایمی پنم و مروپنم از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی هستند که از آن‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (۱۰). مقاومت نسبت به کرپانم‌ها که از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند روز به روز در حال افزایش است.. با توجه به اینکه آلودگی مواد غذایی به سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به فلور باکتریایی روده‌ی مصرف‌کنندگان افزایش می‌دهد و باید به عنوان یک عامل خطر بیشتر مورد توجه قرار گیرد، به ویژه اینکه در چندین سال اخیر، اپیدمی‌های بسیاری از عفونت با ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در مناطق مختلف دنیا گزارش شده است. به طور کلی شناسایی گونه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌تواند اطلاعات مفیدی از الگوی مقاومت میکروارگانیزم‌های عامل عفونت‌های مختلف ارائه نموده و ما را در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب راهنمایی نماید. لذا هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت گونه باسیلوس سوبتیلیس مولد آنزیم‌های ESBL و MBL ایزوله شده از نمونه‌های شیر و پنیر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با طیف گسترش یافته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

در این پژوهش تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و پنیر گاوی (۵۰ نمونه شیر و ۵۰ نمونه پنیر) از ۵۰ مرکز تهیه و توزیع فرآورده‌های لبنی مناطق مختلف در سطح شهرستان اردبیل در مدت پنج ماه در سال ۱۳۹۵ در شرایط آسپتیک تهیه شد. در ابتدا نمونه‌ها به منظور حفظ اسپورها و حذف سلول‌های رویشی، با روش غنی‌سازی حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس با استفاده از روش سریال رقت، رقت‌های متوالی از نمونه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان ۱ میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های حاصله در پلیت استریل ریخته شد. پس از آن محیط کشت نوترینت آگار تهیه و تحت شرایط استریل به پتریدیش اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. کلنی‌های سفید رنگ، مایل به کرم با قوام کره‌ای، سطحی خشن و حاشیه‌ای مضرس انتخاب و طی کشت ۴ منطقه‌ای در محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شدند. به منظور جداسازی انحصاری باسیلوس سوبتیلیس، بررسی‌های میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت گرین برای رنگ‌آمیزی اسپور) و کاتالاز صورت گرفت. جدایه‌های باسیلی شکل، اسپوردار و کاتالاز مثبت برای آزمون‌های افتراقی انتخاب شدند. برای تشخیص تفریقی گونه باسیلوس سوبتیلیس از تست‌های بیوشیمیایی شامل هیدرولیز لستین، آزمون کاتالاز، تست ایندول، متیل رد، استفاده از سیترات، حرکت، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول و زیلوز، اوره آز، ONPG، VP، اکسیداز و هیدرولیز کازئین استفاده شد. جهت بررسی فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌ها، در محیط کشت skim milk agar ۵۰ کشت داده و به مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. وجود منطقه روشن در در اطراف کلنی در محیط کشت نشان‌دهنده پروتئولیزکننده بودن باکتری است. فعالیت لیپولیتیکی بودن باکتری با انجام کشت باکتری در محیط کشت تری بوتیرین آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳ روز و بررسی وجود هاله عدم رشد در اطراف کلنی مورد بررسی قرار گرفت. جهت تائیدیه تشخیصی باکتری از رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت گرین استفاده گردید و سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی اقدام به شناسایی جدایه‌های باکتری شد (۱۴).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از تست دیسک دیفیوژن به روش کربی– بویر (روش استاندارد انتشار دیسک در آگار) براساس پروتکل Clinical and Laboratory Standard Institue (CLSI) تعیین و نتایج پس از ۱۸ساعت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه با جداول در دسترس، خوانده و ثبت شد (۱۵, ۱۶). برای این منظور از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، کلوکساسیلین، اریترومایسین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، آگومنتین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، تتراسایکلین، پیپراسیلین، سفیکسیم، پنی سیلین و وانکومایسین استفاده شد. مراحل کار بدین صورت خواهد بود که سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند ($۱۰^{۸}$ × ۱/۵ باکتری) تهیه شد. سپس به وسیله سوآپ استریل در محیط کشت جامد مولر هینتون آگار تلقیح گردید. با استفاده از یك پنس استریل دیسك‌ها در سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت در حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. برای قرائت نتایج با استفاده از یك خط کش دقیق، قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسك بر حسب میلی‌متر اندازه گرفته شد و میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک گزارش شد.

بررسی وجود آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده

بررسی شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده با روش‌های فنوتیپی دیسک ترکیبی (Combination Disk) و روش دابل دیسک سینرژی (Double Disk Synergy) انجام شد. در این مطالعه دیسک‌های ترکیبی شامل دیسك‌های پنی‌سیلین (P: ۳۰µg)، پنی سیلین- کلاولانیك اسید (P: ۱۰µg)، وانکومایسین، وانکومایسین- کلاولانیك اسید V) (۳۰µg:، تتراسایکلین، تتراسایکلین - کلاولانیك اسید T:) (۳۰µgخریداری شده از شرکت Mast انگلستان استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند)، با سوآپ استریل در محیط مولر هینتون آگار تلقیح و دیسك‌های پنی‌سیلین، پنی‌سیلین- کلاولانیك اسید، وانکومایسین، وانکومایسین- کلاولانیك اسید، تتراسایکلین و تتراسایکلین- کلاولانیك اسید در محیط قرار داده شد. نتایج بعد از ۱۸تا ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه قرائت شد، به این ترتیب که مواردی که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسك پنی‌سیلین- کلاولانیك اسید، وانکومایسین- کلاولانیك اسید و یا تتراسایکلین- کلاولانیك اسید بیش از پنج میلی‌متر نسبت به پنی‌سیلین، وانکومایسین و تتراسایکلین افزایش داشت ، به عنوان جدایه تولیدکننده ESBL در نظر گرفته شد.

بررسی وجود آنزیم‌های متالوبتالاکتامازها

آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز به روش فنوتیپی نوارهای دو سویه E.test (ایمی پنم و ایمی پنم EDTA +) که از شرکت بیومریوکس (Bio merieux) تهیه گردیده بود، تعیین شد. یك طرف نوار حاوی غلظت‌های مختلف ایمی پنم(۰/۱۲۵-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در طرف دیگر غلظت‌های مختلف ایمی پنم $EDTA^{+}$ (۲- ۰/۰۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) وجود داشت. پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مك فارلند و تلقیح در محیط مولر هینتون آگار، نوار E.test روی محیط قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. جهت تعیین وجود آنزیم متالوبتالاکتامازها، نقطه تلاقی هاله تشکیل شده در دو سوی نوار (ایمی پنم و ایمی پنم (EDTA + به عنوان رقت مهاری (IC) در نظر گرفته شدند و با واحد میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت کمی گزارش شد. سپس، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده چنانچه رقت مهاری ایمی پنم EDTA + نسبت به ایمی پنم بیش از سه رقت کاهش داشت و یا نسبت رقت مهاری ایمی پنم بزرگتر و یا مساوی ۸ بود، به عنوان سویه تولیدکننده متالوبتالاکتامازها در نظر گرفته شد.
برای تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد) در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

نتایج

از کل ۱۰۰ ایزوله‌ی جمع‌آوری شده شیر خام (۵۰ ایزوله) و پنیر (۵۰ ایزوله) از مراکز تهیه و توزیع فرآورده‌های لبنی و پس از شناسایی و تائید سوش‌های باکتری با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی از بین ۵۰ نمونه شیر خام (غیر پاستوریزه) ۴۲ ایزوله حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس بود و از بین ۵۰ نمونه پنیر، ۳۷ ایزوله حاوی باسیلوس سوبتیلیس بودند. همچنین با بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنزیم بتالاکتاماز با استفاده از روش فنوتیپی دیسک ترکیبی (Combination Disk) و روش دابل دیسک سینرژی (Double Disk Synergy)، ۳۱ (۶۲/۵ درصد) ایزوله‌ی شیر خام قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند و ۲۵ (۴۲/۸۵ درصد) ایزوله‌ی پنیر قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند. با بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی به روش فنوتیپی نوارهای دو سویه E-test، نتایج نشان داد که ۲۵ (۷۵ درصد) ایزوله‌ی شیر خام قادر به تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند و ۱۶ (۷۱/۴۲ درصد) ایزوله‌ی پنیر قادر به تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند (شکل ۱).
نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بالاترین میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولید کردن آنزیم بتالاکتاماز بودند، مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۷۵ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۴۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۴۶/۲۰ درصد) است (نمودار۱، جدول ۱).
نتایج این بررسی نشان داد که میزان مقاومت در ایزوله‌هایی که قادر به تولیدکردن آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند، بالا بود (۱۰۰ درصد) به استثنای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۶۴/۶۰ درصد) و سفیکسیم (۶۷/۴۰ درصد) که کمترین میزان مقاومت مشاهده شد (نمودار۲، جدول ۱).

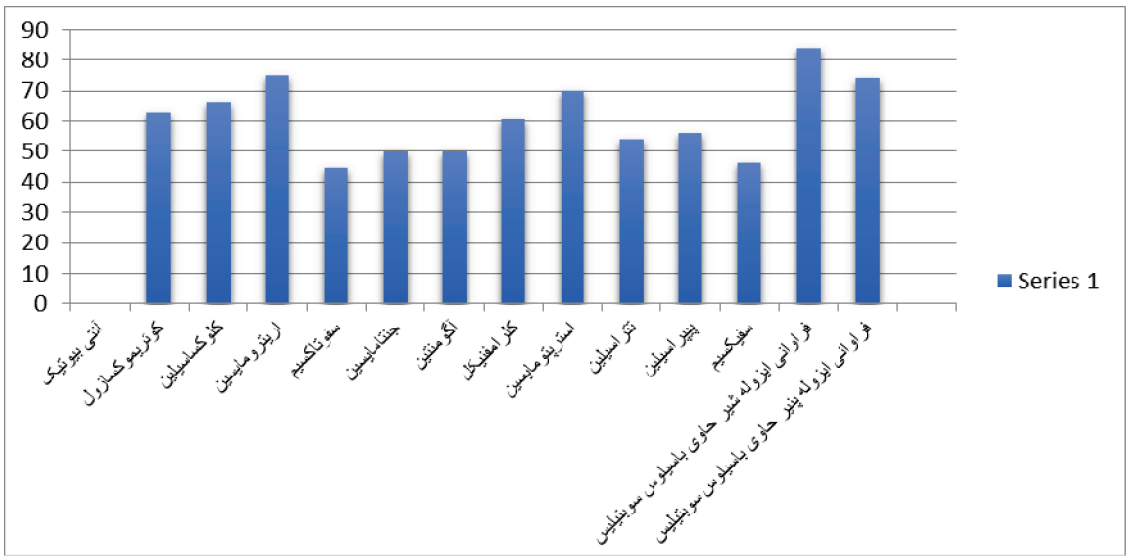
بحث

گزارشات متعددی از سرتاسر دنیا بروز عفونت‌های حاد و یا کلونیزاسیون افراد به وسیله آسینتوباکترهای مولد ESBL را تایید می‌کند (۱۷). ایزوله‌های مولد ESBL معمولا نسبت به آزترونام حساس می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌ها، عوامل ضد میکروبی

شکل ۱- بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنزیم های متالوبتالاکتامازهاز به روش فنوتیپی نوارهای دو سویه E-test

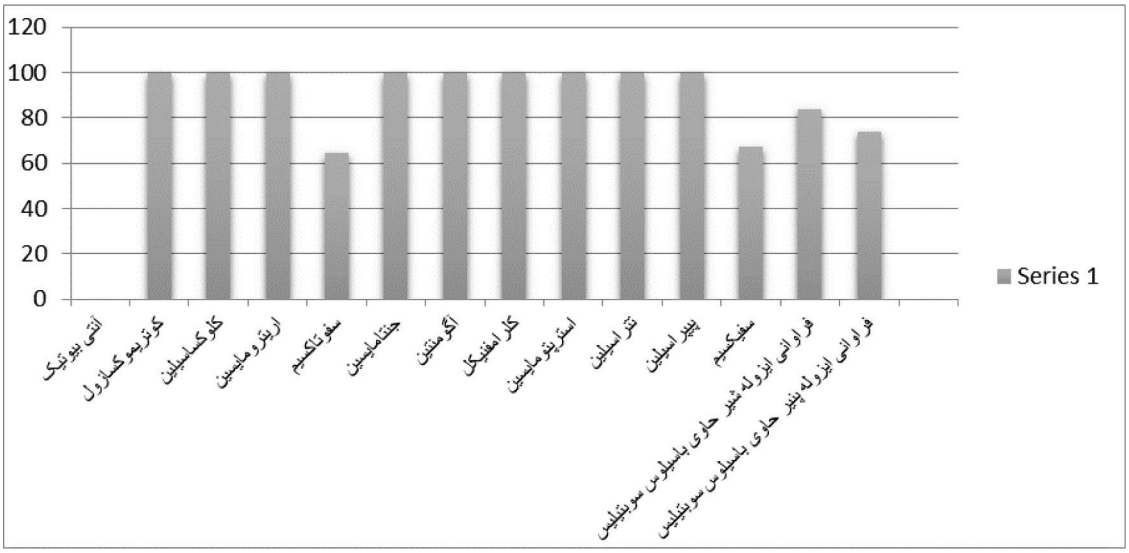
جدول ۱- حساسیت ایزوله‌های باسیلوس سوبتیلیس نسبت به آنتی‌بیوتیکهای مورد بررسی بروش دیسك دیفیوژن

	کوتریموکسازول	کلوکساسیلین	اریتروماپسین	سفوتاکسیم	جنتامایسین	آگمنتین	کلرامفنیکل	تتراسیکلین	استرپتومایسین	پنیسیلین	سیپروفلوکسیم
B. Subtillis (ESBL +)	۶۲,۵	۶۶	۷۵	۴۴,۶۰	۵۰	۵۰	۶۰,۴۵	۷۰	۵۴,۲۰	۵۶	۴۶,۲۰
B. Subtillis (MBL +)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۴,۶۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۷,۴۰



نمودار ۱- حساسیت ایزوله‌های باسیلوس سوبتیلیس ESBL مثبت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی به روش دیسک دیفیوژن (درصد مقاومت آنتی بیوتیکی)

هستند که رایج‌ترین درمان برای عفونت‌های باکتریایی می‌باشند (۱۸). از زمانی که پلاسمیدهای کدکننده ESBLs پدید آمدند ارگانیسم‌های واجد آن‌ها تا حد زیادی در هیدرولیز و غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و آزترئونام موفق بودند (۱۹). جداسازی ارگانیسم‌های مولد ESBLs می‌تواند دشوار باشد، زیرا حضور ESBLs در باکتری‌ها همواره منجر به بروز مقاومت فنوتیپی نمی‌شود. خصوصا اگر از روش‌های تعیین MIC یا دیسک دیفیوژن ساده برای تفسیر نتایج حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شود (۲۰). در نتیجه جدایه‌ای که از نظر ESBLs حساس گزارش شود باید به وسیله تست‌های فنوتیپی استاندارد آزمایش شده باشد (۲۱). تشخیص فنوتیپی صحیح ESBLs روش خوبی جهت افتراق بین جدایه‌های مولد ESBLs و جدایه‌هایی است که از دیگر مکانیسم‌ها جهت مقاومت به آنتی‌بوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌کنند (۵). از نظر آماری شیوع ESBLs در ایران نسبت به سایر کشورهای جهان و حتی آسیا چشمگیرتر می‌باشد. یکی از مهم‌ترین دلایل آن می‌تواند استفاده‌ی ناصحیح از داروهای بتالاکتام مخصوصا سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف باشد (۱۲). در یک مطالعه انجام شده بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتری‌های جدا شده از شیر گوسفند از ۳۷ مورد باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام جدا شده از شیر گوسفند از جمله باسیلوس سرئوس، ۲۷ مورد (۷۲/۹۷ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند.(۲۲) در تحقیق دیگر ناظر و همکاران نشان دادند که از ۳۳ جدایه باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام از شیر بز شامل باسیلوس سرئوس، ۲۹ جدایه (۸۷/۸۸ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند. (۲۳) نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتام بطرز قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته که مخاطرات جدی را در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ایجاد می‌کند. باسیلوس‌ها قادر به تولید اسپورهای مقاوم به حرارت بوده و اغلب از طرق مختلف وارد شیر می‌شوند. از گونه‌های مهم که دراین گروه قرار می‌گیرند شامل باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس استئاروترموفیلوس می‌باشند. در این بین، اسپور باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس استئاروترموفیلوس مقاوم به حرارت بوده و می‌توانند در شیر پاستوریزه و استریلیزه باقی بمانند. اما اسپور باسیلوس سرئوس چندان مقاوم به حرارت نمی‌باشد. بنابراین وجود باسیلوس‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز و انتقال این میکروارگانیسم‌ها از طریق مصرف شیر و فرآورده‌های آن ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف در خصوص اپیدمیولوژی گونه‌های باسیلوس در بیمارستان‌ها نشان دهنده انتشار گسترده گونه‌های باسیلوسی از جمله باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس نشات گرفته از منابع مختلف از جمله فرآورده‌های لبنی می‌باشد. در چندین سال اخیر، در سراسر دنیا اپیدمی‌های بسیاری از عفونت با ارگانیسم‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گزارش شده است. میزان این عفونت‌ها در مقایسه با عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های حساس به دارو بالا بوده و از ۴۲ تا ۱۰۰ درصد متغیر است. شناسایی جدایه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و بررسی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌تواند اطلاعات اپیدمیولوژیکی مفیدی از الگوی مقاومت میکروارگانیزم‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی و سایر عفونت‌ها را دربحث درمان و پیشگیری در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در پزشکی و دامپزشکی ارائه نموده و شرایط انتخاب صحیح آنتی‌یوتیک را فراهم می‌کند.



نمودار ۲- حساسیت ایزوله های باسیلوس سوبتیلیس MBL مثبت نسبت به آنتی بیوتیک ها ی مورد بررسی به روش دیسک دیفیوژن (درصد مقاومت آنتی بیوتیکی)

افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف متعاقب شیوع عفونت‌های بیمارستانی سبب انتشار باکتری‌های تولیدکننده ESBLs می‌شود. بنابراین یک اقدام مفید و موثر در زمینه کنترل عفونت‌های مقاوم به درمان می‌تواند استفاده صحیح از این آنتی‌بیوتیک‌ها (به استناد نتایج آنتی‌بیوگرام) و همچنین جایگزینی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر باشد.

در مطالعات انجام گرفته میزان مقاومت به جنتامایسین ۵۰ درصد و ۹۶/۶ درصد بود(۲۴). می‌توان گفت که میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای توسعه‌یافته نسبت به کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم پایین‌تر است. در همین رابطه می‌توان به اجتناب از تجویز بی مورد آنتی‌بیوتیک‌ها، تجویز کوتاه مدت آنتی‌بیوتیک‌های وریدی برای پیشگیری از عفونت در بیماران پرخطر و نیز استفاده محافظه کارانه از وسایل و تجهیزات پزشکی اشاره کرد. این آمار بالا به نظر می‌رسد به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم غالب و مولد ESBLs و الگوی درمانی وابسته به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در مواجه با بیماری‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گردیده است.

Dias Neto و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای بر روی ۱۸۸ نمونه ادرار در برزیل، اشریشیا کلی را از ۲۶ درصد موارد جدا و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به پنی‌سیلین (۲۷ درصد) گزارش دادند. در مطالعه Tankhiwale و همکاران (۲۵) در سال ۲۰۰۴ بر روی اشریشیا کلی بیشترین مقاومت را نسبت به کوتریماکسازول (۸۲ درصد) و آمپی سیلین (۷۹/۹ درصد) و و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین (۳۸ درصد) و سفتی زوکسیم (۴۱/۳ درصد) گزارش شد.

اختلاف مشاهده شده در این نتایج با سایر کشورها مربوط به الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف و مصرف ناصحیح آنتی‌بیوتیک در کشومان می‌باشد. این باکتری‌ها همانند سایر عفونت‌های بیمارستانی از طریق دست‌های آلوده پرسنل بیمارستان و تجهیزات آلوده پزشکی از جمله کاتترهای ادراری، عروقی و شریانی نیز انتقال می‌یابند. نتایج تحقیق ما با سایر مطالعات نشان می‌دهد که میزان ESBL در جدایه‌های ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد که این مساله بستگی به سیستم کنترل عفونت و نحوه درمان بیماران آن بیمارستان دارد. تشخیص سریع و کنترل عفونت اولیه بهترین استراتژی ضدمیکروبی برای مقابله با این ارگانیسم‌هاست. متالوبتالاکتامازها به علت ایجاد مقاومت به کارپانم‌ها که از موثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های باکتریایی هستند، بسیار مهم می‌باشند (۲۶).

کارپانم‌ها مانند: ایمی پنم، مروپنم، بیاپنم و ارتاپنم کلاس مهمی از داروهای بتالاکتام هستند که در برابر بتالاکتامازها مقاوم هستند (۲۷). در یک بررسی که توسط Magalhaes و همکاران (۲۸) در سال ۲۰۰۵ در برزیل انجام شد، ۴۸ نمونه سودوموناس آئروزینوزا جمع‌آوری شد که ۲۴ نمونه مقاوم به ایمی پنم بودند. در این میان ۱۵ نمونه تولیدکننده آنزیم متالوبتالاکتامازها بودند. در مطالعه‌ای که توسط Yousefi و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۱۰ در شمال غربی کشور از ۱۰۴ ایزوله، ۳۹ ایزوله در آزمون فنوتیپی دارای آنزیم متالوبتالاکتاماز بودند.

آلودگی مواد غذایی به باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به فلور باکتریایی روده‌ی مصرف کنندگان افزایش می‌دهد و باید به عنوان یک عامل خطر بیشتر مورد توجه قرار گیرد. مدیریت صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اتخاذ تدابیر لازم در رعایت استانداردهای مراقبت‌های بهداشتی می‌تواند باعث جلوگیری از گسترش مقاومت به دیگر بیماران بستری و یا وسایل بیمارستانی شود. همچنین شناسایی سریع و ردیابی جدایه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی مهم در درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها و جلوگیری از گسترش آن‌ها شود. با توجه به کم‌بودن تحقیقات در زمینه تعیین شیوع ESBLs در ایران و با توجه به گسترش روزافزون آن‌ها و اهمیت این گروه از آنزیم‌ها به خاطر اعطای سطح بالای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به خصوص سفالوسپورین‌های نسل سوم که داروهایی بسیار رایج جهت درمان عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و به منظور جلوگیری از شکست‌های درمانی و کنترل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از باکتری‌های حامل ESBLs توصیه می‌شود تحقیقات بیشتر و جامع‌تری در این زمینه انجام شود. با توجه به نتایج به دست آمده یک سری سیاست‌های کلی جهت مقابله با گسترش و توسعه این آنزیم‌ها در پیش گرفته شود. بهتر است باکتری‌هایی که در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم و کاربانم ها مقاوم بوده و همچنین این مقاومت به وسیله مهارکننده‌های آنزیم های بتالاکتاماز از جمله اسید کلاولانیک مهار نمی‌شوند، مورد بررسی مولکولی قرار گیرند و ژنوتیپ مقاومت آن‌ها مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گردیده است. بدین نوسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1. heng, J., Guan, Z., Cao, S., Peng, D., Ruan, L., Jiang, D., Sun, M., 2015. Plasmids are vectors for redundant chromosomal genes in the *Bacillus cereus* group. *BMC genomics* 16:6.

2. Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144:215-25.

3. Baquero, M.R., Nilsson, A.I., del Carmen Turrientes, M., Sandvang, D., Galan, J.C., Martinez, J.L., Frimodt-Moller, N., Baquero, F., Andersson, D.I. 2004. Polymorphic Mutation Frequencies in *Escherichia coli*: Emergence of Weak Mutators in Clinical Isolates. *J Bacteriol* 186(16): 5538-5542.

4. Bonomo, R.A., Szabo, D. 2006. Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and *Pseudomonas aeruginosa. Clin Infect Dis* 43(Suppl 2): S49-S56.

5. Rao, P.N., Prasad, S.R., 2016. Detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Indian Journal of Medical Microbiology* 34:251-2.

6. Bonomo, R.A., 2017. beta-Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3;7(1).
7. Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. 2006. Burn Wound Infections. *Clin Microbiol Rev* 19(2): 403-434.
8. Colodner, R. 2005. Extended-spectrum -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am J Infect Control* 33(2): 104-107.
9. Kazeminezhad B, Bostanmanesh Rad A, Gharib A, Zahedifard *S. blaVIM* and *blaIMP* Genes Detection in Isolates of Carbapenem Resistant P. aeruginosa of Hospitalized Patients in Two Hospitals in Iran. 2017. *Iran J Pathol*.1;12(4):392-6.
10. Dias Neto, J.A., Silva, L.D.M.d., Martins, A.C.P., Tiraboschi, R.B., Domingos, A.L.A., Suaid, H.J., Tucci Jr, S., Cologna, A.J. 2003. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. *Acta Cir Bras 18* (supple 5): 36-38.
11. Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14: 90-103.
12. El-Shouny, W.A., Ali, S.S., Sun, J., Samy, S.M. and Ali, A., 2018. Drug resistance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESβL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization. *Microb pathog* 116:301-312.
13. Pohl, S. and Harwood, C.R., 2010. Heterologous protein secretion by Bacillus species: from the cradle to the grave. *In Advances in Applied Microbiology* (Vol. 73, pp. 1-25). Academic Press.
14. Howard, C., van Daal, A., Kelly, G., Schooneveldt, J., Nimmo, G., Giffard, P.M. 2002. Identification and Minisequencing-Based Discrimination of SHV -Lactamases in Nosocomial Infection-Associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemther* 46(3): 659-664.
15. Japoni, A., Alborzi, A., Kalani, M., Nasiri, J., Hayati, M., Farshad, S. 2006. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns* 32(3): 343-347.
16. Choudhuri, A.H., Chakravarty, M. and Uppal, R., 2017. Epidemiology and characteristics of nosocomial infections in critically ill patients in a tertiary care Intensive Care Unit of Northern India. *Saudi Journal of Anaesthesia,* 11(4), 402.
17. Luzzaro, F., Endimiani, A., Docquier, J.-D., Mugnaioli, C., Bonsignori, M., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A. 2004. Prevalence and characterization of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diag Microbiol Infect Dis* 48(2):131-135.
18. Magalhães, V., Lins, A.K., Magalhães, M. 2005. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. *Braz J Microbiol* 36(2): 123-125.
19. Bahrami, A., Shamsi, M., Bahrami, A., soltani, s., Ahmadi, M., Talebimaymand, F., and Abasian, L. (2016) *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis Milk Livestock and the Study of Antibiotic Resistance, *medilam* 24:18-26
20. Persson, Y., Nyman, A.K.J. and Grönlund-Andersson, U., 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica,* 53(1):36.
21. PA W. Performance standards for antimicrobial susceptibility-testing. CLSI document M100-S25, 25th informational supplement Clinical Laboratory Standard Institute. 2015.
22. Nordmann, P., Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8(6): 321-331.
23. Pitout, J.D.D., Gregson, D.B., Poirel, L., McClure, J.A., Le, P., Church, D.L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol* 43(7): 3129-3135.
24. Quale, John M., Landman, D., Bradford, Patricia A., Visalli, M., Ravishankar, J., Flores, C., Mayorga, D., Vangala, K., Adedeji, A. 2002. Molecular Epidemiology of a Citywide Outbreak of Extended-Spectrum β-Lactamase–Producing *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Clin Infect Dis* 35(7): 834-841.
25. Gomaa, F.A.M., Helal, Z.H. and Khan, M.I., 2017. High Prevalence of blaNDM-1, blaVIM, qacE, and qacEΔ1 Genes and Their Association with Decreased Susceptibility to Antibiotics and Common Hospital Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii. Microorganisms*, 5(2):18.
26. Sinha, M., Srinivasa, H., Macaden, R. 2007. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species. *Indian j medical rese* 126(1): 63-67.
27. Tankhiwale, S.S., Jalgaonkar, S.V., Ahamad, S., Hassani, U. 2004. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian j med res* 120(6): 553-556.
28. Wang, J., Ai, X., Mei, H., Fu, Y., Chen, B., Yu, Z. and He, J., 2013. High-throughput identification of promoters and screening of highly active promoter-5′-UTR DNA region with different characteristics from *Bacillus thuringiensis*. PLoS One, 8(5): e62960.
29. Yousefi, S., Farajnia, S., Nahaei, M.R., Akhi, M.T., Ghotaslou, R., Soroush, M.H., Naghili, B., Jazani, N.H. 2010. Detection of metallo-β-lactamase–encoding genes among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in northwest of Iran. *Diag Microbiol Infect Dis* 68(3): 322-325.