بررسی مقاومتهای آنتی‌بیوتیکی قابل انتقال در باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) و تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین در گوسفند و بز

دکتر عبداله‌حسین خان‌ناظر* دکتر حبیب‌اله دادرس** دکتر سیدجواد احمدپناهی***

خلاصه :

در این بررسی الگوهای مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی، انتقال فاکتور مقاومت و تشخیص آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین در باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه جدا شده از گوسفند و بز مورد مطالعه قرار گرفت.

در مجموع ۷۳۸ مورد باکتری عضو خانواده انتروباکتریاسه از ۵۰۰ راس گوسفند و بز جدا گردید که شامل ۶۷/۷۵ درصد ایشریشیاکلی، ۲۳/۰۴ درصد پروتئوس، ۶/۳۶ درصد کلبسیلا و ۲/۸۵ درصد سالمونلا بود. ۲۰۰ نمونه (۲۷/۱ درصد) از باکتریها نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و فورازولیدون و کمترین مقاومت نسبت به تتراسیکلین بود.

۱۴۴ سویه (۷۲ درصد) قادر به انتقال تمام یا قسمتی از فاکتور مقاومت خود به سویه آزمایشگاهی E. coli-k12 بودند و این انتقال در سویه‌های با مقاومت چندگانه به مراتب بیشتر از سویه‌های با مقاومت ساده بود.

۸۵/۵ درصد از سویه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که به دو روش کاپیلری و اسیدیمتری مورد آزمایش قرار گرفتند. ۹۲/۸۶ درصد به روش کاپیلری و ۶۶/۰۷ درصد به روش اسیدیمتری پاسخ مثبت دادند.

مقدمه :

مصرف بیش از حد و مداوم آنتی‌بیوتیکها در حیوانات سبب گسترش و توسعه تعداد و نوع مقاومتهای میکروبی در سویه‌های مقاوم شده است و این امر خود باعث بروز اشکال در درمان بیماری در انسان می‌شود. واتاناب در سال ۱۹۶۳ و اسمیت در سال ۱۹۷۷ در گزارشات خود ذکر کرده‌اند که استفاده از جیره غذائی حاوی آنتی‌بیوتیک برای حیوانات، سلامت جوامع انسانی را با خطر مواجه می‌سازد (۱۳ و ۱۷).

در سال ۱۹۵۰ اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌ها به جیره غذائی در سراسر جهان گسترش یافت. همزمان با این تحول تعداد زیادی از باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک که بیماریزا نیز می‌باشند، از دستگاه گوارش حیوانات اهلی که آنتی‌بیوتیک دریافت داشته‌اند، در محیط اطراف انسان رها شده و گسترش یافتند. در سال ۱۹۵۲ میزان مقاومت

* - گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذائی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
** - گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
*** - دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

شیگلا[1] به آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین[2]، تتراسکیلین[3] و کلرامفنیکل[4] در حدود ۴۰ درصد بود، در حالیکه ۲۰ سال بعد شدت این مقاومت بمیزان ۹۰ درصد رسید (۴).

تولید مقاومت باکتریائی در مقابل آنتی‌بیوتیکها از این جهت مهم است که در بسیاری از موارد در هنگام بروز بیماری و زمانی که درمان با آنتی‌بیوتیک الزامی است، میکروارگانیزم‌های مقاوم شده به درمان پاسخ نگفته و درمان بیماری با شکست مواجه می‌شود. برای مثال می‌توان عدم موفقیت در درمان اکثر اورام پستان را نام برد که طبق تحقیق انجام شده در سال ۱۹۵۵ در کشور فنلاند $\frac{3}{4}$ سوشهای استافیلوکوکوس‌ارئوس[5] که از مبتلایان به اورام پستان جدا شده بود، کاملاً به پنی‌سیلین مقاوم بودند (۶).

فلور طبیعی گرم منفی هوازی دستگاه گوارش، از باکتریهایی تشکیل شده که همگی قادر به گرفتن کد ژنتیکی مقاومت داروئی فاکتور - آر[6] - از باکتریهای مقاوم شده هستند (۹).

در میان راه‌های مختلف ایجاد مقاومت، فاکتور مقاومت یا فاکتور - آر - از همه مهمتر است. عامل مقاومت نه تنها به اعضای همان گونه، بلکه به سلولهای گونه دیگر منتقل می‌شود. گروهی از ارگانیزمها که می‌توانند به عنوان میزبان فاکتور مقاومت عمل کنند متعلق به خانواده انتروباکتریاسه[7] هستند که عامل مهمی در بیماریهای عفونی بشمار می‌روند. در ابتدا فقط باکتری استافیلوکوک آنزیم بتالاکتاماز[8] را تولید می‌کرد، ولی در حال حاضر سویه‌های باکتریهای بیماریزای دیگر، از قبیل گونه‌های باسیلوس[9]، پسودوموناس[10] مایکوباکتریا[11]، یرسینیا[12]، نیسریاگونوره‌آ[13] و باسیل‌های گرم منفی روده‌ای که عوامل سببی عمده عفونت‌های باکتریائی می‌باشند، نیز قادر به تولید این آنزیم هستند (۱).

با توجه به تولید آنزیم بتالاکتاماز توسط باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه، افزایش تعداد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای واجد حلقه بتالاکتام اهمیت زیادی به آنزیم بتالاکتاماز بخشیده است. اهمیت درمانی آنتی‌بیوتیک‌های واجد حلقه بتالاکتام در درمان عفونتهای گرم مثبت و گرم منفی، جداسازی سویه‌هایی که آنزیم بتالاکتاماز را تولید می‌کنند و تشخیص آنها از طریق وجود و تولید این آنزیم، خود کمک شایانی در درمان عفونت‌های باکتریایی است (۱).

در مورد انتقال عامل مقاومت تحقیقات عمدتاً بر روی حیوانات تک معده‌ای و طیور صورت گرفته است

1 - Shigella
2 - Streptomycin
3 - Tetracyclin
4 - Chloramphenicole
5 - Staphylococcus aureus
6 - R - Factor
7 - Enterobacteriaceae
8 - Beta - Lactamase
9 - Bacillus
10 - Pesudomonas
11 - Mycobacteria
12 - Yersinia
13 - Neisseria - gonorrhoeae

(۱۱)، اما در نشخوارکنندگان نیز ارگانیزم‌های مقاوم وجود دارد که ممکن است بعنوان مخازن مهمی از این ارگانیزمهای حاوی فاکتور مقاومت عمل نموده و آنرا به جوامع انسانی منتقل نمایند، بویژه در مورد گوشت که به مصرف انسانها می‌رسد دیده شده که آلودگی با سوشهای ایشریشیاکلی مقاوم به آنتی‌بیوتیکها وجود دارد (باب کوک و همکاران در سال ۱۹۷۳ از آمریکا و والتون در سال ۱۹۷۰ از انگلستان) (۲ و ۱۶)

با توجه به گسترش روزافزون مقاومت داروئی و اهمیت آن در درمان بیماریها و نجات جان بیماران و تأثیر بسزائی که فاکتور مقاومت در ایجاد مقاومت در بین ارگانیزم‌های بیماریزا ایفا می‌کند و همچنین با توجه به تولید آنزیم بتالاکتاماز از طریق فاکتور مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکهای واجد حلقه بتالاکتام، بعنوان تحقیقی در این زمینه موضوع مقاله مزبور انتخاب گردید. اهداف مورد نظر در این تحقیق عبارتند از :

۱) تعیین میزان و نوع باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه جدا شده از گوسفند و بز و تعیین درصد مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای مورد آزمایش.

۲) بررسی و تعیین میزان مقاومتهای آنتی‌بیوتیکی قابل انتقال در همین خانواده.

۳) تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین در همین خانواده.

مواد و روش کار :

نمونه‌گیری: تعداد ۵۰۰ نمونه مدفوع از گوسفندان و بزانی که سالم بوده و تحت درمان آنتی‌بیوتیک نبودند گرفته شد. جداسازی و تشخیص گونه‌های مختلف باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه بر طبق روشهای ادوارد وایونگ (۱۹۷۲) و الازهاری (۱۹۷۲) انجام پذیرفت. تتراتیونات (Oxoid CM 29) و سلنیت F (Oxoid CM 365) به عنوان محیطهای غنی‌کننده و آگار سبز درخشان (Oxoid CM 263)به عنوان محیط انتخابی برای کشت سالمونلا بکار گرفته شد. برای جداسازی ایشریشیاکلی از محیط آبگوشت مکانکی (Oxoid CM 5) و ائوزین‌متیلن‌بلوآگار (Oxoid CM 69) (EMB) استفاده گردید. جهت جداسازی دیگر باکتریهایخانواده انتروباکتریاسه از محیط مکانکی‌آگار استفاده شد.

آزمایش آنتی‌بیوگرام: جهت آزمایش تست حساسیت ابتدا گونه‌های باکتریهای مختلف جدا شده را در محیط آبگوشت (Tryptone soya broth Oxoid CM 129).T.S.B کشت داده و پس از ۶ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی محیط (Diagnostic Sensitivity test Agar Oxoid CM 261)D.S.T گسترده و سپس بر روی هر محیط از دیسکهای آنتی‌بیوتیکی ذیل قرار داده می‌شد:

Furazolidon (FR-200 μg), Chloramphenicol (C-50 μ g), Ampicillin (Am-25 μ g), Streptomycin (St-25 μ g), Tetracycline (Te-50 μ g), Kanamycin (K-30 μ g), Nalidixic acid (Na-30 μg), Gentamycin (G-10 μ g).

روش استاندارد بوئو و همکاران ۱۹۶۶ براساس قطر حاله حساسیت در اطراف دیسکها بکار گرفته شد (۳). در این مطالعه گونه‌هایی از باکتریها که مقاومت به دیسکهای آنتی‌بیوتیک را نشان داده بودند جهت مطالعه فاکتور R بکار گرفته شدند.

روش انتقال فاکتور R : همجواری سلولهای دهنده فاکتور R و گیرنده فاکتور R به روشی است که قبلاً توسط ناظر ۱۹۸۰ توصیف گردیده است. بطور خلاصه روش

انتقال فاکتور مقاومت عبارت است از همجوار نمودن سلولهای دهنده (باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه) با سلولهای گیرنده (حساس نسبت به تمام آنتی‌بیوتیکها بجز اسیدنالیدیکسیک E.coli K12 - Na^R) در محیط آبگوشت TSB و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، جدا نمودن E.coli K12 از محیط TSB و انجام تست آنتی‌بیوگرام بر روی E.coli K12 جهت مشخص نمودن انتقال فاکتور R از سلول دهنده به سلول گیرنده.

روش تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز - آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های باکتریهای مقاوم به آمپی‌سیلین در خانواده آنتروباکتریاسه به دو روش کاپیلری (زوزن و همکاران ۱۹۷۲) و اسیدومتری (سنگ و همکاران ۱۹۸۱) انجام پذیرفت (۱۲ و ۱۴).

روش تهیه محلول پنی‌سیلین - برموکرزول پورپول[1]: ابتدا محلول با فرفسفات ۰/۰۵ مول در لیتر و PH = ۸ تهیه شد، بدین ترتیب که ۳۷/۵ میلی‌گرم از KH_2PO ۸۴۲ میلی‌گرم از $Na_2HPO_4.2H_2O$ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده توسط پ.هاش.متر، pH آن بر روی ۸ تنظیم گردید. سپس به آن ۵ درصد کریستالین‌بنزیل پنی‌سیلین اضافه شد (۵ گرم = ۸۳۳۰۰۰۰ واحد) سپس ۰/۲ درصد معرف برموکرزول‌پورپول نیز به آن اضافه و پس از حل شدن کامل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و استفاده شد. لازم به توضیح است که جهت نگهداری محلول فوق باید آنرا به قسمتهای کوچک تقسیم نموده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود و بهنگام استفاده دمای آنرا به ۴ درجه سانتیگراد رسانید.

روش تهیه محلول پنی‌سیلین - فنل‌رد[2]: ابتدا به یک میلیون واحد پنی‌سیلین - جی[3] - تزریقی که حاوی نمک پتاسیم بود، به میزان ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یکنواخت فنل‌رد ۰/۵ درصد اضافه گردید. سپس قطره‌قطره به آن سودیک‌مولار اضافه شد تا رنگ محلول از قرمز به بنفش تغییر و همچنین pH آن نیز معادل ۸/۵ گردید. در این حالت محلول آماده استفاده بود.

تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز: وقتی بتالاکتاماز، بنزیل پنی‌سیلین را هیدرولیز می‌کند، پنی‌سیلوئیک اسید[4] تولید می‌شود که می‌توان با استفاده از یک رنگ مشخص کننده و با اندازه‌گیری تغییرات pH و یا با اندازه‌گیری مقدار ید تولید شده و همچنین تغییر رنگ آبی بوجود آمده در اثر ترکیب نشاسته باید، وجود آنزیم را تأیید نمود. روش دیگر این است که وقتی آنزیم حلقه بتالاکتام یک سفالوسپورین رنگ‌زا (مانند نیتروسفین[5]) را هیدرولیز می‌کند، وجود آنرا برحسب تغییر رنگ از زرد به قرمز تأیید نمود.

آزمایش تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز، بر روی گونه‌های مقاوم نسبت به آمپی‌سیلین و به دو روش زیر صورت می‌گرفت:

روش کاپیلری: این روش براساس تغییر رنگ فنل‌رد در لوله موئین در اثر کاهش pH استوار است. ابتدا لوله موئین را در داخل محلول پنی‌سیلین - فنل‌رد، که قبلاً تهیه شده بود قرار داده تا ارتفاع ۱ الی ۲ سانتی‌متر از لوله با

1 - Crystalline benzyl penicillin
2 - Penicillin - Phenol red
3 - Potassium Penicillin - G.
4 - Penicilloic acid
5 - Nitrocefin

معرف پر شود. سپس نوک لوله موئین را از طرف محلول پنی‌سیلین - فنل‌رد، بر روی چند پرگنه از باکتری مورد آزمایش قرار داده تا نوک لوله توسط باکتری‌ها مسدود شود. سپس انتهای خالی لوله روی شعله بسته شده و لوله در وضعیت قائم قرار می‌گرفت. نتایج مثبت، پس از ۵ الی ۱۵ دقیقه قرار گرفتن لوله در دمای آزمایشگاه، بصورت پیدایش رنگ زرد مشخص می‌شدند.

روش اسیدیمتری: این روش براساس تغییر رنگ معرف بروموکرزول‌پورپول، روی کاغذ صافی در اثر کاهش pHاستوار است. ابتدا یک قطعه کاغذ صافی واتمن شماره یک را در داخل یک پتری‌دیش استریل قرار داده، روی آن از محلول پنی‌سیلین بروموکرزول‌پورپول که قبلاً تهیه شده بود ریخته تا کاغذ صافی مزبور از محلول اشباع شود. سپس توسط یک لوب استریل شده تعدادی از کلنی‌های مورد آزمایش بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف در منطقه‌ای به قطر ۵ میلی‌متر پخش می‌گردید. آنگاه پلیت مزبور به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. در صورت مثبت بودن نتیجه آزمایش در محل پخش باکتری، رنگ زرد مشاهده می‌شد. در صورت منفی یا ضعیف بودن نتیجه مجدداً پلیت مزبور بمدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت و سپس نتایج کنترل می‌گردید.

نتایج :

در مجموع از ۵۰۰ راس گوسفند و بز مورد آزمایش، ۷۳۸ نمونه باکتری متعلق به خانواده انتروباکتریاسه جدا گردید و جمعاً ۵۰۰ مورد (۶۷/۷۵ درصد) اشریشیاکلی، ۱۷۰ مورد (۲۳/۰۴ درصد) پروتئوس، ۴۷ مورد (۶/۳۶ درصد) کلبسیلا و ۲۱ مورد (۲/۸۵ درصد) سالمونلا شناسائی گردید.

تست حساسیت نسبت به ۸ نوع آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش نشان داد که از مجموع ۷۳۸ باکتری، تعداد ۵۳۸ مورد (۷۲/۹۰ درصد) نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های فوق حساس بوده و ۲۰۰ مورد (۲۷/۱۰ درصد) به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱ - میزان باکتریهای مقاوم به یک یا چند آنتی‌بیوتیک جدا شده از بزها و گوسفندهای مورد آزمایش

نوع باکتری	موارد جدا شده	درصد	مورد مقاوم	درصد
E. Coli	۵۰۰	۶۷/۷۵	۶۰	۱۲
Proteus	۱۷۰	۲۳/۰۴	۱۰۸	۶۳/۵۳
Klebsiella	۴۷	۶/۳۶	۲۵	۵۳/۱۹
Salmonella	۲۱	۲/۸۵	۷	۳۳/۳۳
Total	۷۳۸	۱۰۰	۲۰۰	۲۷/۱۰

از ۲۰۰ مورد باکتری مقاوم فوق، ۱۳۱ مورد (۶۵/۵ درصد) نسبت به آمپی‌سیلین، ۹۹ مورد (۴۹/۵ درصد) نسبت به کلرامفنیکل، ۳۹ مورد (۱۹/۵ درصد) نسبت به فورازولیدن، ۱۱ مورد (۵/۵ درصد) نسبت به تتراسیکلین، ۲۲ مورد (۱۱ درصد) نسبت به کانامایسین و ۱۹ مورد (۹/۵ درصد) نسبت به استرپتومایسین مقاومت نشان دادند در حالیکه همه باکتریها نسبت به جنتامایسین و اسیدنالیدیکسیک حساس بودند (جدول ۲).

جدول ۲ - نتایج حاصل از تست حساسیت به ۸ نوع آنتی‌بیوتیک در بین باکتریهای جدا شده از گوسفند و بز

نوع باکتری / نوع آنتی‌بیوتیک		E.Coli		Proteus		Klebsiella		Salmonella		Total	
		مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد
(Am)	آمپی‌سیلین	۱۳	۲۱/۶۷	۹۲	۸۵/۱۹	۲۲	۸۸	۴	۵۷/۱۴	۱۳۱	۶۵/۵
(Ch1)	کلرامفنیکل	۵۲	۸۶/۶۷	۲۹	۲۶/۸۵	۱۵	۶۰	۳	۴۲/۸۶	۹۹	۴۹/۵
(Fu)	فورازولیدون	۵	۸/۳۳	۳۲	۲۹/۶۳	۱	۴	۱	۱۴/۲۹	۳۹	۱۹/۵
(Ka)	کاناماپسین	۵	۸/۳۳	۱۱	۱۰/۱۹	۳	۱۲	۳	۴۲/۸۶	۲۲	۱۱
(Te)	تتراسیکلین	۷	۱۱/۶۷	-	-	۳	۱۲	۱	۱۴/۲۹	۱۱	۵/۵
(St)	استرپتومایسین	۴	۶/۶۷	۹	۸/۳۳	۳	۱۲	۳	۴۲/۸۶	۱۹	۹/۵
(Ga)	جنتامایسین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Na)	اسیدنالیدیکسیک	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

در این بررسی ۱۶ نوع الگوی مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدست آمد (جدول ۳). باکتریهای با الگوی مقاومت ساده بیشترین میزان را در این بررسی بخود اختصاص دادند و هر چه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیچیده‌تر می‌شد میزان شیوع آن نیز کمتر می‌گردید، بطوریکه از ۲۰۰ مورد باکتری مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیکهای مورد آزمایش، ۱۱۷ مورد (۵۸/۵ درصد) الگوی مقاومت یگانه، ۴۹ مورد (۲۴/۵ درصد) الگوی مقاومتی دوگانه، ۲۹ مورد (۱۴/۵ درصد) الگوی مقاومتی سه گانه، ۳ مورد (۱/۵ درصد) الگوی مقاومتی چهارگانه و ۲ مورد (۱ درصد) الگوی مقاومتی پنجگانه نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۳ - الگوهای مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتریهای جدا شده در گوسفند وبز

بز	گوسفند
Am.St.Ka.Chl.	Am.St.Ka.Chl.Te
Am.St.Ka.	Am.St.Ka.Chl.
Am.Chl.Fu.	Am.Chl.Fu.
Am.Chl.	Am.Chl.Ka
Aj.Fu.	Am.St.Ka.
Am.Ka.	Chl.St.Ka.
Chl.Fu.	Am.Chl.
Chl.Te.	Am.Fu.
Am.	Am.Ka.
Chl.	Chl.Fu.
Fu.	Chl.Te.
Te.	Fu.Te.
	Am.
	Chl.
	Fu.

Am.= Ampicilin
Chl.= Chloramphenicol
Fu.= Furazolidon
Te.= Tetracyclin
St.= Streptomycin
Ka.=Kanamycin

در این بررسی تمام باکتریهای با الگوی مقاومت چهارگانه و پنجگانه (۱۰۰ درصد) قادر به انتقال تمام یا قسمتی از فاکتور مقاومت خود را به سویه آزمایشگاهی E.Coli - K12 بودند، در حالیکه ۶۵/۸۱ درصد با الگوی مقاومت ساده، ۶۹/۳۹ درصد با الگوی مقاومت مضاعف و ۹۶/۵۶ درصد با الگوی مقاومت سه گانه، قادر به انتقال فاکتور مقاومت به سویه گیرنده حساس بودند (جدول ۵).

از ۲۰۰ مورد باکتری مقاوم جدا شده از گوسفندان و بزهای مورد آزمایش، ۱۳۱ مورد (۶۵/۵ درصد) نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم بودند که به دو روش کاپیلری و

جدول ۴ - میزان فراوانی الگوهای مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتریهای جدا شده از گوسفند و بز

نوع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	گوسفند		بز		مجموع	
	موارد مقاوم جدا شده	درصد	موارد مقاوم جدا شده	درصد	موارد مقاوم جدا شده	درصد
یگانه	۶۵	۵۴/۶۲	۵۲	۶۴/۲	۱۱۷	۵۸/۵
مضاعف	۲۷	۲۲/۶۸	۲۲	۲۷/۱۶	۴۹	۲۴/۵
سه‌تائی	۲۳	۱۹/۳۴	۶	۷/۴۱	۲۹	۱۴/۵
چهارتائی	۲	۱/۶۸	۱	۱/۲۳	۳	۱/۵
پنج‌تائی	۲	۱/۶۸	-	-	۲	۱
مجموع	۱۱۹	۱۰۰	۸۱	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰

اسیدیمتری از نظر وجود آنزیم بتالاکتاماز مورد آزمایش قرار گرفتند و در مجموع از ۱۳۱ مورد مقاوم به آمپی‌سیلین، ۱۱۲ مورد (۸۵/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند. از این میان ۱۰۴ مورد (۹۲/۸۶ درصد) به روش کاپیلری و ۷۴ مورد (۶۶/۰۷ درصد) به روش اسیدیمتری پاسخ مثبت دادند (جدول ۶).

جدول ۵ - میزان فراوانی الگوهای مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل انتقال در باکتریهای مقاوم جدا شده از گوسفند و بز

نوع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	گوسفند		بز		مجموع	
	موارد ناقل فاکتور مقاومت	درصد	موارد ناقل فاکتور مقاومت	درصد	موارد ناقل فاکتور مقاومت	درصد
یگانه	۴۲	۶۴/۶۲	۳۵	۶۷/۳۱	۷۷	۶۵/۸۱
دوگانه	۱۹	۷۰/۳۷	۱۵	۶۸/۱۸	۳۴	۶۹/۳۹
سه‌تائی	۲۲	۹۵/۶۵	۶	۱۰۰	۲۸	۹۶/۵۶
چهارتائی	۲	۱۰۰	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
پنج‌تائی	۲	۱۰۰	-	-	۲	۱۰۰
مجموع	۸۷	۷۳/۱۱	۵۷	۷۰/۲۷	۱۴۴	۷۲

جدول ۶ - میزان قدرت تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتریهای مقاوم به آمپی‌سیلین جدا شده از گوسفندها و بزهای مورد آزمایش به دو روش کاپیلری و اسیدیمتری

نوع باکتری	موارد مقاوم به آمپی‌سیلین	بتالاکتاماز(+)		بتالاکتاماز(-)		روی کاپیلری(+)		روش اسیدیمتری(+)	
		مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد
E. coli	۱۳	۹	۶۹/۲۳	۴	۳۰/۷۷	۸	۶۱/۵۳	۶	۳۸/۴۷
Proteus	۹۲	۷۹	۸۵/۸۶	۱۳۰	۱۴/۱۴	۷۲	۷۸/۲۶	۴۸	۲۱/۷۴
Klebsiella	۲۲	۲۰	۹۰/۹	۲	۹/۱	۲۰	۹۰/۹	۱۷	۹/۱
Salmonella	۴	۴	۱۰۰	۰	۰	۴	۱۰۰	۳	۱۰۰
Total	۱۳۱	۱۱۲	۸۵/۵	۱۹	۱۴/۵	۱۰۴	۹۲/۸۶	۷۴	۶۶/۰۷

بحث :

به طور کلی اهداف مورد نظر در این تحقیق شناسائی باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه، بررسی مقاومتهای داروئی در این گروه از باکتریها و تشخیص آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین در گوسفند و بز بود.

در این بررسی از کشت مدفوع ۵۰۰ راس گوسفند و بز جمعاً ۷۳۸ مورد باکتری متعلق به خانواده انتروباکتریاسه جدا شده که چهار جنس مختلف شامل ۶۷/۷۵ درصد ایشریشیاکلی، ۲۳/۰۴ درصد پروتئوس، ۶/۳۶ درصد کلبسیلا و ۲/۸۵ درصد سالمونلا شناسائی گردید (جدول ۱). ناندی نیز در سال ۱۹۷۷، باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه را از روده گوسفند جدا نمود. این ارگانیزمها شامل: ۹۱/۱ درصد پروتئوس‌میرابیلیس، ۹/۲۸ درصد پروتئوس‌وولگاریس، ۴/۴ درصد پروتئوس رتگری، ۷۳/۳ درصد ایشریشیاکلی، ۶۸/۹ درصد کلبسیلاپنومونیا، ۱۷/۸ درصد انتروباکترکوئی‌فاسینس، ۴/۴ درصد سیتروباکترایینترمدیوم و ۴/۴ درصد سالمونلاانتریتیدیس بود. در مطالعه ناندی از هر نمونه مدفوع چند باکتری از خانواده انتروباکتریاسه جدا گردیده است (۱۰).

باکتریهای جدا شده در این تحقیق باستثنای سالمونلا که بیماریزا است، جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش گوسفند و بز می‌باشند. بهمین دلیل نیز میزان سالمونلای جدا شده کمتر از سایر ارگانیزمها بود.

همانطور که ملاحظه می‌شود در این بررسی، چهار جنس از خانواده انتروباکتریاسه جدا گردید. بعضی از جنسهای این خانواده از قبیل، شیگلا که فقط در انسان بیماریزاست، اروینیا که در گیاهان ایجاد بیماری می‌کند و یرسینیا که یک ارگانیزم بیماریزا می‌باشد، بندرت از حیوانات جدا شده‌اند و انتظار جدا شدن آنها نیز در این بررسی وجود نداشت.

در نتیجه تست حساسیت به ۸ آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش، ۲۰۰ مورد (۲۷/۱۰ درصد) به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. این آنتی‌بیوتیکها شامل آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، کانامایسین، استرپتومایسین، تتراسیکلین و فورازولیدون بودند. در این میان بیشترین مقاومت، نسبت به آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل (به ترتیب ۶۵/۵ و ۴۹/۵ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به تتراسیکلین (۵/۵ درصد) بود (جدول ۲). در سال ۱۹۷۸،

دیویس و استوارت بر روی باکتریهای روده‌ای جدا شده از انسانهای بیمار و حیوانات اهلی خانگی تحقیق کردند و دریافتند که بیش از $\frac{1}{3}$ ارگانیزیم‌ها جدا شده از حیوانات اهلی خانگی نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌باشند که بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل (به ترتیب ۲۳ و ۱۳ درصد در مورد انسان و ۲۱ و ۱۸ درصد در مورد حیوانات) و کمترین مقاومت نسبت به اسیدنالیدیکسیک و کانامایسین (به ترتیب ۴ و ۳ درصد در مورد انسان و ۱ و ۵ درصد در مورد حیوانات) بود. این دو محقق دلیل کاهش مقاومت را استفاده ناچیز از این داروها در دامپزشکی اعلام کردند و همچنین اظهار داشتند که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیک بین سویه‌های جدا شده از انسان و حیوان متفاوت بوده و این تفاوت بدلیل اختلاف آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی و دامپزشکی است (۵).

به نظر می‌رسد پائین بودن میزان باکتریهای مقاوم در گوسفندها و بزهای مورد آزمایش، استفاده کم آنتی‌بیوتیک در این حیوانات باشد، زیرا برخلاف طیور که در طول رشد از جیره حاوی آنتی‌بیوتیک استفاده می‌کنند، در این حیوانات بجز در موارد بیماریها و عفونت‌ها که از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود، جیره حاوی آنتی‌بیوتیک مصرف نمی‌نمایند.

در این بررسی هیچکدام از ۷۳۸ مورد باکتری جدا شده نسبت به اسیدنالیدیکسیک و جنتامایسین مقاومتی از خود نشان ندادند. با توجه به استفاده از ناچیز از این آنتی‌بیوتیکها در این دامها، عدم مقاومت به آنها امری طبیعی می‌نماید.

با توجه به اینکه استفاده از آنتی‌بیوتیکهای کلرامفنیکل، فورازولیدون، استرپتومایسین و کانامایسین در مورد گوسفند و بز ناچیز است، در این بررسی نیز انتظار می‌رفت که مقاومت به این آنتی‌بیوتیکها کم باشد و در عوض چون استفاده از تتراسیکلین در مورد این حیوانات بسیار زیاد است، انتظار می‌رفت مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک بسیار زیاد باشد. همچنین با توجه به اینکه پنی‌سیلین مصرف کمتری نسبت به تتراسیکلین در این حیوانات دارد، مقاومت حدواسطی نسبت به آمپی‌سیلین قابل انتظار بود. مطابق انتظار، مقاومت نسبت به استرپتومایسین و کانامایسین بسیار کم بود (به ترتیب ۹/۵ و ۱۱ درصد)، اما نسبت به کلرامفنیکل و فورازولیدون و آمپی‌سیلین مقاومت بسیار زیاد بود (به ترتیب ۴۹/۵، ۱۹/۵ و ۶۵/۵ درصد).

افزایش مقاومت نسبت به این داروها می‌تواند به دلیل آلودگی محیط دامداری به مدفوع طیور باشد. لازم به ذکر است که در نزدیکی بعضی از گوسفندداریها، مرغداری نیز وجود داشت و با توجه به اینکه استفاده از این داروها بعنوان مکمل رشد در جیره طیور و همچنین جهت درمان بیماریها بصورت گسترده در آنها بکار می‌رود، بنابراین می‌توان انتظار داشت که سویه‌های مقاوم به این داروها در طیور زیاد باشد (۱۱). آلودگی محیط گوسفندداری به مدفوع طیور و یا در ارتباط بودن کارگران مرغداری با گوسفندداری و یا برعکس و یا حتی تماس بین کارگران مرغداری و گوسفندداری می‌تواند سبب انتقال سویه‌های مقاوم از طیور به گوسفندان شود. علاوه بر این انتقال مقاومت داروئی از باکتریهای گرم منفی به این باکتریها نیز می‌تواند سبب مقاوم شدن آنان گردد.

اوپادهیای نیز در سال ۱۹۶۸ متوجه شد که تمام سویه‌های سالمونلاولتوردن جدا شده از بوفالو، بز، خوک و طیور نسبت به باسیتراسین و داروهای دیگری که در بز

وبوفالو استفاده نمی‌شد کاملاً مقاوم بودند و دلیل آنرا انتقال مقاومت داروئی از باکتریهای گرم منفی به این سویه ذکر می‌کند (۱۵).

در این بررسی ۱۶ نوع الگوی مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدست آمد که بیشترین مقدار آنرا الگوی مقاومت ساده آنتی‌بیوتیکی (۵۹/۵ درصد) و کمترین مقدار آنرا الگوی مقاومت پنجگانه (۱ درصد) تشکیل می‌داد (جدول ۳ و ۴)، همچنین از میان باکتریهای مقاوم، ۷۲ درصد قادر به انتقال تمام یا قسمتی از الگوی مقاومت خود به سویه حساس E.coli-Kl2 بودند. در این میان الگوی مقاومت چهارگانه و پنجگانه بیشترین مقدار و الگوی مقاومت ساده آنتی‌بیوتیکی کمترین مقدار انتقال را بخود اختصاص دادند (به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ و ۶۵/۸۱ درصد)، همچنین ۶۹/۳۹ درصد بصورت الگوی دوگانه و ۹۶/۵۶ درصد بصورت الگوی سه گانه انتقال یافتند (تابلوی ۵).

لاخوتیا و استیفنس نیز در سال ۱۹۷۳ گزارش کرده‌اند که ۵۰ درصد سویه‌های سالمونلای جدا شده از طیور، استعداد انتقال تمام یا قسمتی از الگوی مقاومت خود را به سویه حساس آزمایشگاهی E.coli-Kl2 داشته‌اند و این استعداد در سویه‌های با مقاومت چندگانه بیشتر از سویه‌های با مقاومت ساده بوده است (۸). کینجو نیز در سال ۱۹۷۹ در تحقیقات خود بر روی ۲۵۶۳ نمونه مدفوع حیوانات و انسانهای سالم و بررسی مقاومت داروئی نسبت به ۶ نوع آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، اکسی‌تتراسیکلین، کاناماسین، کلرامفنیکل و سولفادی‌متوکسین دریافت که قابلیت انتقال فاکتور مقاومت در سویه‌های دارای مقاومت چندگانه بمراتب بیشتر از سویه‌های دارای مقاومت یگانه است (۷).

با توجه به جدول ۵ و گزارشات لاخوتیا و کینجو می‌توان نتیجه گرفت که استعداد انتقال در سویه‌های با الگوی مقاومت ساده به مراتب کمتر از سویه‌های با الگوی مقاومت چندگانه است و می‌توان گفت احتمالاً مقاومت سویه‌های با الگوی مقاومت ساده بیشتر از نوع مقاومت با منشاء کروموزومی و مقاومت سویه‌های با الگوی مقاومت چندگانه بیشتر از نوع مقاومت با منشاء خارج کروموزومی است.

از ۱۳۱ مورد باکتری مقاوم به آمپی‌سیلین، ۱۱۲ مورد (۸۵/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند و ۱۹ مورد (۱۴/۵ درصد) قادر به تولید این آنزیم نبودند.

در سال ۱۳۶۷، نهائی و جلالی نیز بیان کردند که نتایج حاصل از تجسس تولید آنزیم بتالاکتاماز در ۸۲۱ سویه آزمایشی از جنسهای مختلف فامیل انتروباکتریاسه (شامل سالمونلا، ایشریشیاکلی، کلبسیلا، شیگلا پروتئوس، سراسیا، انتروباکتروسیتروباکتر) جدا شده از موارد مختلف پاتولوژیک انسانی که با خصوصیت عمومی مقاومت در برابر آمپی‌سیلین انتخاب شده بودند نشانگر تولید آنزیم فوق بوسیله سویه‌های متعلق به کلیه جنسهای مزبور بود. در مجموع از ۸۲۱ سویه انتروباکتریاسه مقاوم به آمپی‌سیلین، تعداد ۵۵۲ سویه (۶۷ درصد) قادر به تولید آنزیم بوده و تعداد ۲۶۹ سویه (۳۳ درصد) قادر به تولید آنزیم نبودند (۱).

این موضوع نشانگر این حقیقت است که تولید آنزیم بتالاکتاماز بعنوان یکی از دفاع‌های اصلی این ارگانیزمها در مقابل آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام می‌باشد. اگر چه در اجرام گرم منفی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکها تنها مربوط به پرده بیرونی نیست، بلکه مجموعه فعالیت بتالاکتامازی و سد نفوذپذیری مربوط به پرده بیرونی در این کار مؤثر است که از ورود آنتی‌بیوتیک تا حدی ممانعت

بعمل می‌آورد.

در مقایسه دو روش کاپیلری و اسیدیمتری اگر چه روش اسیدیمتری ساده‌تر، آسان‌تر و سریعتر است اما روش کاپیلری از دقت و حساسیت بیشتری برخوردار است، زیرا همانطور که قبلاً ذکر گردید ۹۲/۸۶ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز با روش کاپیلری نتیجه مثبت را نشان دادند در حالیکه این میزان در روش اسیدیمتری ۶۶/۰۷ درصد بود.

تشکر و قدردانی :

هزینه مربوط به این پروژه(۷۰-VE-۶۶۳-۳۵۶) توسط شورای محترم تحقیقات دانشگاه شیراز تأمین گردیده است که بدینوسیله قدردانی می‌گردد.

منابع :

۱) نهائی، محمدرضا، جلالی، علی و نیکوش، سولماز ۱۳۶۷: بررسی دو روش سریع برای تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در انتروباکتریاسه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین و رابطه آن با MIC. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، شماره پنجم، سال بیست و دوم، صفحه ۷۶-۵۶.

References :

2) Babcook, G.F., Berryhill, D.L. and Marsh, D.H. 1973: R - factor of Escherichia coli from dressed beef and humans. Applied Microbilogy 25: 21-30.

3) Bauer, A.H., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M. 1966: Antibiotic suseqtibility testing by a standardized single sisc method. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496.

4) Betina, v. 1983: The chemistry and biology of antibiotics. Elsvier scientific publishing company. Amsterdam. pp: 431-433.

5) Davies, M. and Stewart, P.R. 1978: Transferable drug resistance in human and animals: Genetic relationship between R - plasmids in enterobacteria from man and domestic pets. Aust. Vet. J. 54(11): 507-512.

6) Jones, L.M., Booth, N.H. and Medonal, L.E. 1982: Veterinary Pharmacology and therapeutics. 5th Ed. Ames. The Jowa State University Press. pp: 736-739.

7) Kinjo, T. 1979: Drug resistance and R - plasmids in Escherichia coli isolated from feaces of various animals and man in Okinawa. Jap. J. Zoo. Sci. 50(8): 542-548.

8) Lakhotia, R.L. and Stphens, J.F. 1973: Incidence of drug resistance and R - factor among Salmonella isolated from poultry. Poultry Sci. 52: pp: 2266-9270.

9) Marsik, F.J., Parsi, J.T. and Blenden, D.C. 1975: Transmissible drug resistance of E.coli and their rural environments. J. Inf. Dis. 32(3): 296-302.

10) Muralidhara, R.N. and Nandy, S.C. 1977: Organisms of enterobacteriaceae family associated with animal by - products. Ind. J. Anim. Sci. 47(6): 344-348.

11) Nazer, A.H.K. 1980: Transmissible drug resistance in E.coli isolated from poultry and their carcasses in Iran. Cornell Vet. J. 70: 365-371.

12) Rosen, IRA.G., Jacobson, J. and Rudderman, 1972: Rapid capillary tube Method for Detcting Penicillin Resistance in Staphylococcus aureus. Applied Microbiology, 23: 649-650.

13) Smith, H.W. 1977: Antibiotics in clinical practice. Third Ed. Pitman Medical. PP: 19-20.

14) Sng, E.H., Yeo, K.L. and Rajan, V.S. 1981: Simple method for detecting Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae and Staphylococcus aureus. Br. J. Veneral Dis. 57: 141-142.

15) Upadhyay, K.N. and Misra, D.S. 1978: Antibiotic resistance pattern of Salmonella wleteverden isolated from buffalo, goat, pig and pultry. Ind. Vet. J. 55(2): 128-132.

16) Walton, J.R. 1970: Contamination of meat carcasses by antibiotic coliform bacteria. Lancet, 561-3.

17) Watanabe, T. 1963: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bact. Rev. 27: 87-115.

Antibiotic resistance patterns, transmission of r-factor and determination of beta-lactamase production in ampicillin resistant strains of enterobacteriaceae isolated from sheep and goats

Khan Nazer, A.H.* Dadras, H. Ahmadpanahi, S.J.*****

Summary :

In this study, 738 isolates including 500 coli (67.75 percent), 170 Proteus (23.04 percent), 47 Klebsiella (6.36 percent) and 21 Salmonella (2.85 percent) were identified in the faeces of 500 sheep and goats.

200 strains of these organismes were resistant against one or more antibiotics. The most resistance was against Ampicillin, Chloramphenicol and Furazolidon. Minimum resistance was against Tetracyclin.

114 Strains (72 percent) of resistant strains were capable of transfering either a part or the entire resistance pattern to sensitive recipient strain (E.coli K12). Multiple - drug - resistant strains were more efficient in transfering their resistance patterns than were sigle - drug - resistnat strains.

The capillary and the acidimetric methods were used to examine the Ampicillin resistant strains for Beta-lactamase production. The capillary method was able to detect Beta-lactamase production in 92.86% of the isolates while the acidimetric method showed 66.07% positive reaction.

* - Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.

** - Department of Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.

*** - Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.