

## بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از موارد اسهال کودکان (۲-۱۰ ساله) در شهرستان شهرکرد و بررسی پدیده انتقال مقاومت به باکتری E.Coli k<sub>12</sub>

دکتر علی شریف زاده\*، دکتر فرید همت زاده\*، دکتر عبدالرسول نامجو\*\*، دکتر آذر دانش\*\*\*

### چکیده:

زمینه و هدف: بر اساس یافته های موجود و گزارشات مکرر مبنی بر حضور چشمگیر عفونت های سالمونلایی ناشی از سویه های مقاوم و بیضی های سالمونلا، تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آنها و نحوه انتقال مقاومت به باکتری E. Coli k<sub>12</sub> در شهرستان شهرکرد، این بررسی از ابتدای بهار ۷۸ تا اواخر پاییز ۷۹ صورت پذیرفت. مواد و روشها: در کل این دوره زمانی ۴۰۰ نمونه مدفوع مربوط به کودکان مبتلا به اسهال اخذ شده و به روش کلاسیک جستجوی سالمونلاها در محیط های کشت باکتریایی کشت و پس از جدا سازی و تشخیص، به روش کافمن وایت تعیین سروتیپ شده و در نهایت در آزمون بیوگرام به روش دیسک انتشاری تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی گردیدند. نتایج: از بین نمونه های اخذ شده تعداد ۷ نمونه سالمونلا جدا گردید که متعاقب تایپینگ سالمونلاهای جدا شده مشخص گردید که یک نمونه سالمونلا تیپ ۶ و ۶ نمونه دیگر سالمونلا پاراتیپ B می باشد. جهت انجام آزمون آنتی بیوگرام از دیسک های آنتی بیوتیکی که بیشتر در درمان اسهال کودکان کار برد دارند استفاده گردید و نتایج حاکی از آن بود که سفتی زوکسیم، سفتریاکسون، سفازولین سدیم و کلرامفنیکل هم چنان کارآیی لازم را بر سالمونلاهای مورد مطالعه در این تحقیق داشته اند. هم چنین در انتقال تجربی عوامل مقاومت از سالمونلاهای جدا شده به باکتری E.Coli k<sub>12</sub> مشاهده شد که مقاومت به پنی سیلین و آمپی سیلین در تمامی موارد مطالعه منتقل گردیده بود. نتیجه گیری: نتایج این تحقیق خود تائید دیگری بر منع تجویز بی رویه داروها که از اصلی ترین علل گسترش مقاومت دارویی است می باشد.

واژه های کلیدی: اسهال کودکان، انتقال مقاومت، سالمونوز، مقاومت آنتی بیوتیکی.

### مقدمه:

بررسی های سری بر روی سویه های سالمونلا در سال ۱۳۷۳، ۱۳۷۴، ۱۳۷۵ و ۱۳۷۶ در شهرستان شهرکرد نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در کودکان زیر دو سال مبتلا به اسهال سالمونلا را جدا کرد ولی اهمیت آنها در پزشکی و دامپزشکی از دیدگاه مقاومت آنتی بیوتیکی بر کسی پوشیده نیست و به علت تنوع میزبانی بسیار گسترده سالمونلاها، حضور شرایط مطلوب ایجاد انتقال مقاومت در دستگاه گوارش حیوانات خونگرم و حضور، ظهور و گسترش ناگهانی و تدریجی سالمونلاهای واجد مقاومت یگانه یا چندگانه آنتی بیوتیکی در بیماری های عفونی انسان باید توجه کافی به آن مبذول داشت (۶،۵،۴،۳،۲).

سالمونوز به سویه های سری تیپ بر روی روبروی بهمن در طیف وسیعی از موجودات موجب بروز بیماری های مختلفی می گردد. عفونت سالمونلایی ممکن است در انسان به صورت انتروکولیت حاد، تب روده ای (تیفوئید یا پاراتیفوئید) و باکتری می با بدون وجود نشانه های بالینی بروز کند. انتروکولیت سالمونلایی را باید از تمام موارد اسهال حاد که شامل باکتری های مهاجمی چون کمپیلوباکتر ژرونی گونه های شیگلا، اشریشیا کلی مهاجم، یرسینیا انتروکولیتیکا و غیره می باشد افتراق داد (۱۲،۱۰،۹،۸). گرچه سالمونلاها به عنوان فراوان ترین عوامل اسهال کودکان مطرح نمی باشند چنانکه

\* عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد: رحمتیه - دانشگاه آزاد اسلامی - دانشکده دامپزشکی - تلفن: ۰۳۱۱-۳۳۳۰۲۱۰ (مؤلف مسئول).

\*\* عضو هیات علمی گروه پاتولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد. \*\*\* استادیار گروه زنان و زایمان-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

در این تحقیق با در نظر گرفتن  $P=0.05$  و  $d=0.05$  از ۴۰۰ نمونه مدفوع کودکان کمتر از دو سال واجد اسهال آبکی یا خونی که بـه بـخـشـشـ کـودکـان بیمارستان آیت ا... کاشانی شهر کرد مراجعه می کردند نمونه گیری صورت می گرفت. نمونه گیری به روش برداشت مستقیم از مدفوع و با سوپ رکتال تهیه شده و بلافاصله در شرایط ترجیحاً استریل به محیط کشت سلنیت f منتقل می گردید. در مورد هر نمونه اطلاعاتی مثل سن، جنس، تاریخ نمونه گیری، درجه حرارت و سابقه احتمالی ابتلاء یا درمان، تعداد فرزندان، نوع تغذیه و محل سکونت اخذ و در فرم های خاص ثبت می گردید. محیط های کشت بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می شدند. در روز دوم از محیط کشت سلنیت f در محیط مک کانکی کشت و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می گردید. پس از طی این مدت کلیه پرگنه های تشکیل شده در روی محیط مک کانکی مشاهده شده و در صورت وجود پرگنه بی رنگ عمل خالص سازی در مورد پرگنه مشکوک در روی محیط مک کانکی انجام شده و به همین منظور محیط های تجدید کشت یافته مجدداً در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می گردید. در روز سوم از هر کشت خالص در شرایط استریل روی محیط های سه قندی آهن دار، اوره، سترات، MRVP، آب پپتونه کشت داده و محیط های کشت به مدت ۲۴-۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می گرفتند پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی افتراقی مذکور آزمون سروتایپینگ به روش کلاسیک کافمن وایت و آزمون آنتی بیو گرام به روش دیسک انتشاری بر روی سالمونلاهای جدا شده انجام می گرفت. آزمایش سرمی جهت مشخص نمودن آنتی ژن O با آنتی سرم مربوطه زمانی مثبت قلمداد می گردید که در مخلوط مورد آزمایش به مدت ۲-۱ دقیقه آگلوتیناسیون ایجاد گردد ولی در نمونه شاهد که حاوی تعلیق باکتری در محلول نمکی است آگلوتیناسیون دیده نشود و در زمانی که در هیچ یک از محلول های مورد آزمایش و محلول نمکی هیچگونه آگلوتیناسیونی مشاهده نمی گردید. آزمون سرمی منفی قلمداد می گردید. جهت انجام آگلوتیناسیون H نیز روش آگلوتیناسیون لوله ای روی تعلیق حاصل از کشت یک روزه باکتری غیر فعال شده با فرمالین انجام می گرفت. مجموعه آنتی سرم های مورد استفاده ساخت شرکت دینکو بوده و مطابق دستورالعمل آزمون مربوطه انجام می گرفت. در نهایت نتایج حاصل از سروتایپینگ سالمونلاها توسط بخش میکروبیولوژی

یکی از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت ناشی از موتاسیون های کروموزومی است که در غیاب آنتی بیوتیک نیز رخ می دهد منتسب به تغییرات ژنتیکی است که غالباً به وسیله پلاسمیدها ایجاد می شود این فاکتورهای مقاومت خارج کروموزومی در باکتری های گرم منفی فاکتور R نامیده می شوند. این گونه مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، نومایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، فورازولیدون و هم چنین سولفانامیدها نیز گزارش شده است که پلاسمیدها این نوع مقاومت را به باکتری های مختلف سرایت می دهند. تماس باکتری های فلور طبیعی روده ای با آنتی بیوتیک ها سبب می شود تا اجرام حامل عامل R رشد کرده و سیطره یابند. متعاقب عفونت یافتن با گونه های بیماریزا، این باکتری های غیر بیماری زای مقاوم در برابر داروها (Normal Flora) ممکن است مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها را باکتری های حاد (Pathogenic bacterial) انتقال دهند و لذا وقتی آنتی بیوتیک ها را برای درمان باکتری های بیماری زا به کار ببرند تأثیر نخواهد داشت و گونه های بیماری زای مقاوم به کلی جای گونه های حساس را می گیرند. متأسفانه وقوع این نوع انتقال مقاومت دارویی در روده انسان و حیوانات به اثبات رسیده است (۳). پدیده مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری ها روز به روز در حال افزایش است. Harold در تحقیقی که در روی ۷۱۸ سالمونلای جدا شده از موارد انسانی و ۶۱۸ سالمونلای جدا شده از موارد دامی انجام داد به این نتیجه رسید که مقاومت به تتراسایکلین، کانامایسین و آمپی سیلین افزایش یافته است. هم چنین وی نشان داد که غالب سویه های واجد فاکتور R که به آمپی سیلین، استرپتومایسین، سولفی سوکسازول، تتراسایکلین، کانامایسین و کلرامفنیکل مقاوم بودند توانسته بودند این عامل مقاومت را به E.Coli k<sub>12</sub> انتقال دهند. وی معتقد بود که مقاومت به آمپی سیلین در موارد انسانی شایع تر و مقاومت به تتراسایکلین، سولفانامیدها و استرپتومایسین در موارد دارویی شایع تر است (۱۱).

## مواد و روشها:

پس از انجام آزمون های باکتریولوژیک از بین ۴۰۰ نمونه مورد مطالعه ۷ عدد سالمونلا جدا گردید که حاکی از جدا سازی سالمونلا از ۱/۷۵ درصد موارد اسهال کودکان می باشد. متعاقب تایپینگ سالمونلا های جدا شده مشخص گردید که یک مورد سالمونلا تیفی و شش مورد سالمونلا پارا تیفی B می باشد. همچنین در این تحقیق از ۱۵۹ (۳۹/۷۵٪) موارد، ارگانیزم های غیر سالمونلایی و از ۲۳۴ (۵۸/۸٪) موارد هیچگونه ارگانیزمی جدا نگردید.

همچنین در آزمون آنتی بیوگرام مشخص گردید که سفتی زوکسیم، سفتریاکسون، سفازولین سدیم و کلرامفنیکل، هم چنان کارایی لازم را بر سالمونلا های مورد مطالعه در این تحقیق داشته اند. در آزمون انتقال مقاومت نیز در بین سالمونلا های جدا شده در این تحقیق مشاهده گردید که مقاومت نسبت به پنی سیلین و آمپی سیلین از این باکتری ها به E.Coli k12 منتقل شده بود.

#### بحث:

با توجه به اطلاعات حاصله از مراحل مختلف این پژوهش می توان موارد زیر را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. نکته اول آنکه با وجودی که تنها ۷ مورد سالمونلا از ۴۰۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال جدا شده است که حاکی از وفور حدود دو درصدی سالمونلا در موارد اسهال کودکان است ولی نظر به طبیعت خاص سالمونلا ها و مشکلات موجود در راه جدا سازی مستقیم از مدفوع به ویژه در هفته اول بیماری و مصارف داروهای آنتی بیوتیکی قبل از مراجعه به بیمارستان و هم چنین عدم تکرار و تداوم نمونه گیری از بیماران مشکوک به سالمونلوز که در صورت منفی بودن ممکن است در نمونه گیری های بعدی مثبت گردد، به نظر می رسد که وفور آلودگی سالمونلایی به ویژه در موارد اسهال کودکان زیاده تر از میزان فوق الذکر باشد.

نکته دوم نتایج حاصل از آزمون آنتی بیوگرام می باشد که بر این اساس به نظر می رسد که کلرامفنیکل، سفازولین سدیم، سفتریاکسون و سفتی زوکسیم هم چنان کارایی لازم را بر سالمونلا های مورد مطالعه در این تحقیق داشته اند هر چند که کلرامفنیکل به دلیل بروز عارضه آنمی آپلاستیک در درمان سایر بیماری های عفونی منع مصرف داشته و عملاً به عنوان داروی عفونت های سالمونلایی مصرف نمی گردد. همچنین با توجه به نتایج آنتی بیوگرام مشخص گردید که برخی از سالمونلا های جدا شده در این تحقیق نسبت به سفوتاکسیم و سفالوتین مقاومت کامل و یا نسبت به جنتامایسین و کانامایسین مقاومت نسبی از خود نشان داده اند که

مؤسسه رازی تأیید گردید. همچنین به طور همزمان روی نمونه های سالمونلای جدا شده تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک انتشاری انجام می گرفت. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق شامل کلرامفنیکل، سفازولین سدیم، سفتریاکسون، سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم، سفالوتین، جنتامایسین، کانامایسین، آمپی سیلین و پنی سیلین بود. جهت انجام آزمون آنتی بیوگرام از هر کدام از نمونه ها یک پرگنه بزرگ برداشت کرده و به محیط آبگوشت برین هارت منتقل و پس از حدود یک شب گرمخانه گذاری، نیم میلی لیتر از این تعلیق باکتریایی روی سطح محیط مولر هیتون منتقل و در تمام سطح محیط کشت پخش می گردید. پس از خشک شدن نسبی سطح محیط در شرایط استریل و با استفاده از پنس استریل دیسک های آنتی بیوتیکی در سطح محیط قرار می گرفت. پلیت ها یک شب گرمخانه گذاری شده و سپس با توجه به قطر منطقه ممانعت، مقاومت و یا حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های مورد نظر مشخص می گردید (۱۱،۷،۴).

برای انجام آزمون انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی مطابق دستورالعمل ابتدا هر یک از سالمونلا ها به عنوان باکتری دهنده عامل مقاومت و باکتری E.Coli k12 به عنوان باکتری پذیرنده عامل مقاومت در محیط آبگوشت برین هارت قرار می گرفت. سپس در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از لوله های حاوی سالمونلا با ۰/۹ میلی لیتر از لوله حاوی باکتری E.Coli k12 در یک لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر آبگوشت برین هارت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می شد. پس از گذشت این زمان، از این محیط روی محیط EMB و اجسد آنتی بیوتیک های مناسب (پنی سیلین، آمپی سیلین، تتراسایکلین، سفالوتین، سفوتاکسیم، آمیکاسین) به همراه ۱۰۰ µg/ml نالیدیکیسک اسید کشت داده می شد. مشاهده پرگنه های سبز با جلالی فلزی بر روی محیط EMB واجد آنتی بیوتیک مبین انتقال عامل مقاومت از سالمونلای مقاوم به E.Coli k12 بود (۱۱).

#### نتایج:

اگر قبول کنیم که یکی از عوامل بروز مقاومت دارویی استفاده و مصرف بی رویه یک داروی ضد میکروبی باشد می توان پیش بینی نمود که چنانچه هر چه زودتر نظارت و کنترل صحیحی در مصرف آنتی بیوتیک ها انجام نگیرد علاوه بر آمینوگلیکوزیدهای مورد استفاده در این تحقیق، سفالوسپورین ها نیز دیر یا زود بی ارزش گردند. نکته سوم آنکه سالمونلاهایی که در مورد آنها آزمون آنتی بیوگرام انجام شده همگی نسبت به پنی سیلین و آمپی سیلین مقاومت کامل نشان داده و حتی در آزمون انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی نیز توانسته اند این مقاومت را به باکتری *E. Coli k<sub>12</sub>* انتقال دهند که نتیجه این تحقیق با نتایج پژوهشگران دیگر در این زمینه همخوانی دارد. چنانچه همت زاده نیز در مطالعاتی که روی ۷۵ نمونه سالمونلای جدا شده از ۱۲۹۴ نمونه انسانی انجام داد مشاهده کرد که مقاومت به استرپتومایسین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل در تمامی موارد مطالعه منتقل گردیده بود (۱۲) و یا Harold نیز نشان داد که غالب سویه های واجد فاکتور R که به آمپی سیلین، استرپتومایسین، سولفی سوکسازول، تتراسایکلین، کانامایسین و کلرامفنیکل مقاوم بودند توانسته اند عامل مقاومت را به *E. Coli k<sub>12</sub>* انتقال دهند (۱۱).

توجه به نکات فوق از زوایای مختلف بویژه درمان موارد اسهال، مسئله انتقال مقاومت ها در داخل و بین گونه های مختلف باکتری ها و در نهایت آلوده شدن انسان به باکتری واجد مقاومت بسیار حائز اهمیت است. درمان موارد عفونت های ناشی از سالمونلاهای مقاوم نه تنها مخاطرات بهداشتی فراوانی را در پی دارد بلکه زیان های اقتصادی شدیدی را نیز به دنبال خواهد داشت چون استفاده مکرر و مداوم از آنتی بیوتیک های معمولی که مواردی از مقاومت در آنها دیده شده است باعث انتخاب ارگانسیم مقاوم و گسترش این ارگانسیم در افراد جوامع می گردد. زمینه های دیگری که به تکوین و گسترش سوش های مقاوم می انجامد استفاده از آنتی بیوتیک ها در دامپزشکی است که هم به جهت درمان بیماری های عفونی و هم به عنوان عامل رشد به جیره غذایی طیور و حتی دام های پرواری افزوده می شود و این در حالی است که در

اکثر موارد مصرف آنتی بیوتیک ها در این گونه موارد بی رویه و بدون مطالعه می باشد بنابراین می توان گفت که به علت تکثیر بسیار سریع سوش های مقاوم در عفونت های سالمونلایی متاسفانه دست پزشکان در تجویز آنتی بیوتیک مناسب چندان باز نمی باشد و اگر به دلایلی چون گرانی و یا عدم دسترسی کافی به برخی داروها پزشک تصمیم بگیرد که بیمار خود را با آنتی بیوتیک های رایج در بازار درمان کند باید اولاً نتیجه قطعی آزمون تعیین حساسیت را در اختیار داشته باشد ثانیاً با پیگیری بیمار از بهبودی وی اطمینان حاصل کند چرا که به خصوص در رابطه با تیفوئید و شبه تیفوئید تجویز آنتی بیوتیک نامناسب می تواند دوره دفع باکتری از راه مدفوع در دوران نقاهت را طولانی تر کند که این امر بی شک موجب انتشار عفونت ناشی از سوش های مقاوم در جامعه می شود. گر چه بارها از تجویز بی رویه دارو و خود درمانی سخن رفته ولی این مسئله مهم یکی از اصلی ترین علل گسترش مقاومت دارویی است و در صورت استفاده بی رویه از سفالوسپورین های نسل سوم حتی فلوروکینولون ها در آینده نه چندان دور شاهد خواهیم بود که سروتپ های مختلف سالمونلا نسبت به این داروها مقاوم شوند.

### تشکر و قدردانی:

نگارندگان بدینوسیله از همکاری و مساعدت جناب آقای دکتر مجید آویژگان، جناب آقای مهندس مجید ریاحی، سرکار خانم هایده حیدری، جناب آقای سهراب صفری و پرسنل زحمتکش بخش کودکان و آزمایشگاه بیمارستان آیت ا... کاشانی شهر کرد قدردانی می نمایند.

## منابع:

۱. باقری علی. سازمان برنامه و بودجه استان چهار محال و بختیاری. گزارش اقتصادی و اجتماعی استان چهار محال و بختیاری. ۱۵-۳، ۱۳۷۷.
۲. برجیان سیف. . . . عوامل اسهال های باکتریال اطفال زیر دو سال در بیمارستان بروجن. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۱(۱): ۲۰-۱۳، ۱۳۷۸.
۳. تاجبخش حسن. باکتری شناسی عمومی. فصل ژنتیک باکتری ها. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۳۶، ۵۶۹، ۵۵۵-۵۵۷، ۵۳۵، ۲۸۴-۱۳۷۰، ۲۸۳.
۴. تاجبخش حسن. ژنتیک باکتری ها. فصل انتقال ژن ها. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۳، ۱۳۶۷.
۵. زهرائی صالحی تقی. سالمونلا. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۹۲-۷، ۲۱۹، ۱۴۳، ۱۵۹، ۱۴۱، ۱۳۸، ۴۶-۷، ۲۷، ۱۳۷۸.
۶. صائبی اسماعیل. بیماری های عفونی در ایران (بیماری های باکتریال). چاپ پنجم. شرکت انتشارات علمی فرهنگی. ۶۲۹، ۹۲۳، ۹۲۱، ۱۳۷۳.
۷. همت زاده فرهید؛ سالمی اردشیر. معرفی سالمونلا های جدا شده از موارد انسانی و دامی به همراه نگرش اپیدمیولوژی به سالمونلوز در استان چهارمحال و بختیاری. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۴۹(۲-۱): ۸۳-۹، ۱۳۷۳.
8. Bhattacharrya SS.; Das UA. Steady decrease in occurrence of *Salmonella typhi* infection in rourkela. rissa: Indian J Pathol Microbiol, 46(3): 227-36, 2004.
9. Ciftci E.; Guriz H.; Derya A. Ince E.; et al. Salmonella bacteraemia in Turkish children: Ann Tropicaediatr, 24(1): 75-80, 2004.
10. Glynn MK.; Reddy V.; Hutwagner L.; Rabatsky T.; et al. Prior antimicrobial agent use increase the risk of sporadic infectious with multidrug-resistant *Salmonella enterica serotype typhimurium*. Clin Infect dis, 15(3): 227-36, 2004.
11. Harold CN.; Charles EC.; Elaine DL.; Longo BF.; et al. Antimicrobial resistance and R-factor transfer among Isolates of salmonella in the northeastern unitad states: a comparison of human and animal isolates. J Infect Dis, 132(6): 617-22, 1975.
12. Hemmatzadeh FA. Study on antibiotic susceptibility and R-Factor transmissibility among resistance of salmonella from human and animals 3rd European congeress of chemotherapy. Spain Madrid, 7-12, 2000.

