Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2022 ;Vol.46; No.1

Determination of frequency of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) of *Klebsiella* isolated from raw and school milk samples using phenotypic and genotypic Methods

Mohammad Mehdi Soltan Dallal[1], Mohammad Kazem Sharifi Yazdi[2], Zahra Rajabi[3], Gholamreza Hassanpour[4], Saeid Vahedi[5], Seyedeh Masoomeh Abrichamchian langaroodi[6], Shabnam Haghighat Khajavi[7], Sara Sharifi Yazdi[8], Mahdieh pourmoradian[9], Hedroosha Molla Agha Mirzaei[10]

1Professor, Food Microbiology Research Center/Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2Professor of Zoonosis Research Centre/Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 3 Ph.D,Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 4Asociated Professor of Parasitology, Center for Research of Endemic Parasites of Iran, Tehran University of Medical Sciences Tehran, Iran. 5Academic Instructor, Operating Room Department, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 6MSc Pathobiology Laboratory Center, No17, Gharani Alley, Valiasr Ave, Tehran, Iran. 7Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.8Student of School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 9BSc, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 10MSc, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2021/05/26 Accepted: 2021/12/05)

Abstract

Background and Aim: *Resistance to a wide range of beta-lactam family antibiotics is due to the emergence of new beta-lactamases among bacterial strains. The aim of the present study was to determine the prevalence of ESBLs in Klebsiella speices isolated from raw and pasteurized school milk using phenotypic and genotypic methods.*

Materials and Methods: *In a descriptive cross-sectional study, 200 samples of raw and pasteurized school milk were analyzed for the presence of Klebsiella spp. Samples were grown on Hektoen enteric agar medium. Suspected colonies of Klebsiella spp. were confirmed running differential tests. For the initial screening of ESBL producing organisms, the Disk Diffusion Agar method (DDA) was used. Final confirmation was done using PCR.*

Results*: Out of 200 samples tested, 44 isolates were identified as Klebsiella, 32 isolates (72.7%) from raw and 12 (27.3%) from pasteurized school milk. In general, 14 (31.8%) isolates that were resistant to at least ceftazidime or cefotaxime antibiotics were selected for confirmatory testing. In Multiplex PCR assay, 6 (3%) isolates were screened for the confirmatory test (5 raw and 1 pasteurized school milk). Out of 6 isolates, 4 (2%) and 1 (0.5%) isolates contained TEM and DHA genes, and 2 (1%) and 1 (0.5%) isolates contained SHV and CITM genes, respectively.*

Conclusion*: It is difficult to identify the enzymes producing strains through the phenotypic tests; therefore, the inclusion of molecular probes using universal primers along with phenotypic tests can be used for the detection of these types of resistance, which play a major role in infection control.*

Keywords: *Antibiotic Resistance Pattern; Wide Range of ESBLs; Klebsiella; Milk*

**Corresponding author: Mohammad Mehdi Soltan Dallal*

Email: msoltandallal@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دوره ٤٦، شماره ١، ١٤٠١، صفحات ٥٠ تا ٥٦

تعیین میزان فراوانی بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) در جدایه‌های کلبسیلا از نمونه‌های شیر خام و شیر مدرسه به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی

محمدمهدی سلطان‌دلال*[1]، محمدکاظم شریفی‌یزدی[2]، زهرا رجبی[3]، غلامرضا حسن‌پور[4]، سعید واحدی[5]، سیده معصومه ابریشمچیان لنگرودی[6]، شبنم حقیقت خواجوی[7]، سارا شریفی یزدی[8]، مهدیه پورمرادیان[9]، هدروشا ملاآقا میرزایی[10]

۱استاد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۲ استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک دام و انسان، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۳ دکتر،مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۴ دانشیار مرکز تحقیقات انگل‌های بومی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۵مربی گروه هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۶کارشناس ارشد آزمایشگاه پاتوبیولوژی مرکزی، خیابان ولیعصر، کوچه قرنی،پلاک ۷۱، تهران، ایران
۷استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۸دانشجوی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۹کارشناس بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۱۰کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۴

چکیده:

سابقه و هدف: مقاومت در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام، ناشی از ظهور بتالاکتامازهای جدیدی در میان سویه‌های باکتریایی است. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) در جدایه‌های کلبسیلا از نمونه‌های شیرخام و شیر مدرسه به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بوده است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی مقطعی، ۲۰۰نمونه شیرخام و شیر مدرسه از نظر وجود کلبسیلا روی محیط هکتون آگار بررسی شدند. کلنی‌هاي مشکوک بهکلبسیلاپس از تایید با آزمون‌های افتراقی، برای غربالگري اولیه ارگانیسم‌هاي تولیدکننده ESBL ، از آزمون روش انتشار در آگار استفاده شد. تایید نهایی با PCR انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۲۰۰ نمونه، مجموع ۴۴ کلبسیلا، ۲۳ جدایه (۲۷/۷درصد) از شیرخام و ۲۱ جدایه (۷۲/۳درصد) از شیرهای مدرسه جدا شد. بر این اساس ۴۱ (۱۳/۸درصد) جدایه که حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند، برای تست تأییدی انتخاب شدند. در آزمایشRCP xelpitluM، از میان شش(۳درصد) جدایه غربال شده در تست تأییدی(پنج شیر خام و یک شیر مدرسه)، چهار(۲درصد) و یک (۰/۵درصد) جدایه به ترتیب حاوی ژن‌های MET، AHD و دو(۱درصد) و یک (۰/۵درصد) جدایه به ترتیب حاوی ژن‌های VHS و ژن MTICبودند.

نتیجه گیری: شناسایی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها از طریق تست‌های فنوتیپی به سختی امکان‌پذیر است، بنابراین لحاظ کردن بررسی‌های مولکولی با استفاده از پرایمرهای فراگیر (lasrevinU) در کنار آزمون فنوتیپی می‌تواند در تشخیص کامل این نوع مقاومت‌ها مؤثر بوده و سهم عمده‌ای را در کنترل عفونت ایفا کنند.

واژگان کلیدی: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، طیف گسترده ESBLs ، *کلبسیلا* ، شیر

مقدمه:

طبق استاندارد ملی ایران ، شیرخام همان مایع مترشحه و دست نخورده حاصل از دوشش کامل پستان گاو سالم است که با اصول صحیح تغذیه و نگه‌داری شده باشد. در شرایط بهداشتی دوشیده شده و تحت هیچ شرایطی، آب یا ماده دیگری به آن اضافه نشده باشد. همچنین باید فاقد آغوز بوده و بلافاصله پس از دوشش، در شرایط مناسبی تا دمای چهار درجه سانتی‌گراد سرد شده و تا زمان تحویل به کارخانه در همین دما باقی بماند(۱).

شیر ماده حیاتی است که در شرایط محیطی مناسب، به دلیل دارا بودن PH

نویسنده مسئول: محمد مهدی سلطان دلال
پست الکترونیک: *msoltandallal@gmail.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]

مناسب و ترکیب‌های نظیر پروتئین، لاکتور و املاح محل مناسبی برای رشد و نمو اکثر عوامل بیماری زاست. چنانچه در روند تولید، جمع‌آوری، نگه‌داری و حمل یا فرآوری آن دقت لازم نشود، به سرعت فاسد شده و در این صورت نه تنها تامین‌کننده ارزش غذایی نبوده؛ بلکه در صورت مصرف، سبب مسمومیت غذایی می‌شود(۲).

پدیده ESBLs برای نخستین بار در سال ۱۹۸۳ از اروپا گزارش شد، اما طولی نکشید که بتالاکتامازهای طیف گسترده در ایالات متحده آمریکا و آسیا نیز شناسایی شدند. امروزه کاربرد روزافزون داروهای ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی منجر به ظهور دسته دیگری از ژن‌های بتالاکتامازی شده که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه (TEM-1, TEM-2, SHV-1) طیف فعالیت بیشتری دارند که می‌توان آن‌ها را تحت عنوان کلی (Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs نامید(۳).

تحقیق‌های زیادی در خصوص باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف گسترده از نمونه‌های بالینی انجام شده است، ولی در زمینه مواد غذایی مطالعه‌های چندانی انجام نشده است. به طور مثال: در مطالعه نهائی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در دو شهر تهران و تبریز نیز مؤید این مطلب بوده که شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBLs در کشور ما در حال افزایش است(۴). در مطالعه انجام شده توسط شاه چراغی و همکاران در سال ۱۳۸۶ از میان ۲۰۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی ، ۱۰۵ نمونه در تست تأییدی فنوتیپی به عنوان ESBLs گزارش شد که از این بین، ۱۲ جدایه حاوی bla- SHV بود (۵). در مطالعه دیگری که توسط سلطان دلال و همکاران به بررسی حضور ژن CTX-M-1 با استفاده از روش PCR بر روی جدایه‌هایی که در تست‌های تشخیصی Disk diffusion agar و Combined disk به دست آمده بود. از ۱۲۸ سویه بتالاکتامازهای طیف گسترده مثبت، ۹۹ جدایه (۷۷/۳۴درصد) حاوی ژن مورد نظر بوده است (۶). سلطان دلال و همکاران در۲۰۱۸ در مطالعه روی ۴۰۰ اسهال ناشی از طغیان غذایی، ۵۰ جدایه اشریشیاکلی نشان دادند که میزان ژنهای TEM و CTX-M1به ترتیب ۱۸درصد و ۳۸درصد بود، در حالی که ژن SHV جدا نشد(۷). درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs اغلب به دلیل مقاومت متقاطع وسیعی که با سایر داروهای ضدمیکروبی (از جمله آمینوگلیکوزیدها، کوتریموکسازول و فلوروکینولون‌ها) دارند، همواره با مشکلات فراوانی همراه بوده است. با توجه به مقاومت بالای سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، ضرورت شناسایی کامل آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBLs) توسط آزمایشگاه، شناخت مکانیسم‌های مقاومتی آنزیم‌های ESBL توسط پزشکان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دارای قدرت ممانعت کننده بتالاکتام در کاهش ظهور مقاومت بسیار مؤثرند(۸،۹).

انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق مواد غذایی بویژه شیر و فرآورده‌های لبنی می‌تواند سبب افزایش مقاومت در انسان شود. شیر هنگامی که از پستان دام سالم دوشیده شود، عاری از باکتری یا دارای تعداد بسیار کمی باکتری است. مقدار بار میکروبی کل یا شمارش کلی میکروبی در شیر ضمن اینکه به عنوان یک روش متداول و شاخص‌ترین معیار در روند ارزیابی کیفیت شیرخام است، به عنوان یکی از ملاک‌های مهم پیش‌بینی سلامت گاو و بهداشت وضعیت شیردوشی و نشانگر چگونگی حمل و نقل و نگه‌داری شیرخام نیز است(۱۰،۱۱).اهمیت موضوع به قدری است که همواره باید در پی تولید داروهای جدید با قدرت اثر بالاتر باشند، چراکه دیگر امروزه حتیّ سفالوسپورین‌های نسل سوّم و چهارم نیز کارآمد نیست. همچنین امروزه با افزودن آنتی‌بیوتیک‌های فراوان و متعدد به شیرهای مدرسه بیم این می‌رود که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بدن کودکان وسعت پیدا کرده و روز به روز افزایش یابد(۱۲). بر این اساس برای کاهش هزینه‌های درمانی، شناسایی عوامل مهّم و شایع بیماری‌زاهای بیمارستانی و تعیین الگوی دقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای کنترل شیوع این گونه عوامل مهّم به نظر می‌رسد با توجه به اینکه اعضای خانواده انتروباکتریاسه عامل عمده عفونت‌های بیمارستانی و جامعه هستند و برخی از آن‌ها به عنوان اعضای فلور طبیعی سبب ایجاد عفونت‌های فرصت طلب می‌شوند(۱۳). بنابراین اتخاذ یک استراتژی نوین در درمان و تشخیص این سویه‌ها به نظر ضروری می‌رسد. درمان آنتی‌بیوتیکی این عفونت‌ها که در سال‌های گذشته با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین به آسانی مسیر بوده، متأسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت‌ها از جمله بروز مقاومت‌های بتالاکتامازی مشکل و پر هزینه شده است(۱۴). با توجه به مطالعه‌های فراوان آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف گسترده روی باکتری اشریشیا کلی و نبود اطلاعات چندان روی باکتری کلبسیلا، هدف از این تحقیق تعیین میزان فراوانی بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) در جدایه‌های کلبسیلا از نمونه‌های شیرخام و شیر مدرسه به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بوده است.

مواد و روش‌ها:

بررسی حاضر یک مطالعه توصیفی مقطعی است که در سال ۱۳۹۸ انجام شد. در مجموع ۲۰۰ نمونه شیر شامل ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۱۰۰ نمونه شیر مدرسه از سطح شهر تهران جمع‌آوری شد. برای انتقال نمونه‌های شیرخام از سطح شهر تهران به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، از محفظه سرد استفاده شد.

با توجه به شیوع ۵۰ تا۷۰درصد کلبسیلا در شیر خام و با دقت ۷درصد و اطمینان آماری ۹۵درصد تعداد ۲۰۰ نمونه انتخاب شد.

نمونه‌های شیر طبق پروتکل FDA (۱۵)،۲۵ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر به ۲۲۵ میلی‌لیتر به برین هارت اینفیوژن (Brain-Heart Infusion broth(BHI اضافه و خوب مخلوط شد. بعد از سه ساعت نگه‌داری در دمای محیط، یک میلی‌لیتر از محلول پیش‌غنی شده BHI ، به ۲۲۵ میلی‌لیتر آبگوشت تریپتون سویا (Tryptone Soy Broth (TSB اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری کرده، سپس یک لوپ روی محیط کشت انتخابی هکتون انتریک آگار (Merck) آگار تلقیح داده شد.

در نهایت کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا با استفاده از آزمون‌های تشخیصی مختلف شامل رنگ‌آمیزی گرم، حرکت، سیمون سیترات، TSI، اندول، متیل رد (MR)، ووژ پروسکوئر (VP)، اوره، لیزین دکربوکسیلاز (LD) و SIM برای تشخیص کلبسیلا شناسایی شد. پس از تایید اولیه، از کیت((Biomerieux API-20E برای تایید نهایی و تعیین گونه کلبسیلا استفاده شد. سپس کلنی‌های مربوط به جدایه‌های مثبت کلبسیلا در 70^{oC}- در محیط (Merck) Skim milk نگه‌داری شد. پس از تأیید وجود کلبسیلا به پیشنهاد سازمان(Clinical (CLSI and Laboratory Standards Institute ، برای غربالگری اولیه ارگانیسم‌های تولیدکننده (Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL ، از آزمون روش انتشار در آگار (Disk Diffusion Agar (DDA استفاده شد.

در این روش ابتدا پس از تهیه مولرهنیتون آگار (=pH) (MERCK ۷/۴-۷/۲)، سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و توسط یک سوآپ استریل به طور کامل روی محیط مذکور پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکتMast,UK ، شامل: جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر، روی محیط مذبور قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای oC۳۷ ، با استفاده از خط کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی CLSI مقایسه شد. طبق دستورالعمل (CLSI) ، نمونه‌های مورد نظر به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش شدند. هر گونه کاهش حساسیت در این سویه‌ها می‌تواند گواهی بر وجود این نوع مقاومت باشد(۱۶).

باکتری‌های مقاوم به خانواده سفالوسپورینها برای بررسی بتالاکتامازهای طیف گسترده با روش Combined disk ، با استفاده از دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم + کلاوونیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفو تاکسیم + کلاوونیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت Mast مطالعه شد(جدول۲). تولید ESBL از طریق افزایش قطر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]

هاله به اندازه پنج میلیمتر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و یا سفوتاکسیم –کلاوولانیک مشخص شد. از طرفی به پیشنهاد CLSI ، جدایه‌هایی که در تست فنوتیپی تأییدی اثر بتالاکتامازها در آن‌ها به وسیله مهارکننده بتالاکتامازی مهار نمی‌شود، بالقوه به عنوان مولد AmpC بتالاکتاماز محسوب می‌شوند.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در ۳۵ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله باز شدن دو رشته به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمرها به مدت یک دقیقه در دمای ۶۲°C، مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲°C و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد.

شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی سویه‌های غربال شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Bioneer) استخراج شد.برای پروسه PCR ژن‌های بتالاکتامازی TEM (618bp)، SHV (764bp)، AmpC (CITM (575bp) و CTX انتخاب شدند. برای طراحی پرایمرها ، از توالی هر یک از ژن‌های مورد نظرکه در بانک ژنی ثبت شده بود، استفاده شد(۱۹-۱۷). توالی‌های هر گروه با استفاده از برنامه MEGA 4 multiple-alignment، هم تراز شده تا نواحی مشترک در زیر خانواده‌های هر گروه ژنی مشخّص شود. نواحی مشترک توالی‌های هم تراز شده برای طراحی پرایمر با استفاده از برنامه GeneRunner بررسی شد و برای اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در NCBI استفاده شد. از طرف دیگر برای ژن‌های DHA، TEM و SHV، CITM از پرایمرهای مربوطه به روش PCR Muliplex استفاده شد(جدول ۱).

پرایمرهای استفاده شده به شرح زیر است.

یافته‌ها:

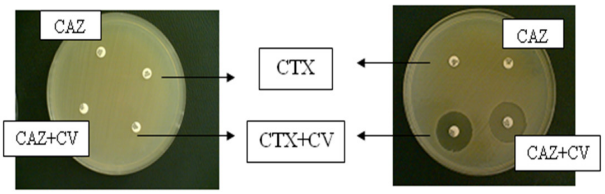
از ۲۰۰ نمونه شامل شیرخام و مدرسه، پس از مشاهده مورفولوژی وانجام آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، ۴۴ جدایه (۲۲درصد) کلبسیلا به دست آمد. با استفاده از کیت E-API۲۰، ۳۸ کلبسیلا پنومونیه، ۵ کلبسیلا اکسی توکا و یک کلبسیلا رینوس کلروماتیس شناسایی شد.

یافته‌های به دست آمده نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین و کوتریموکسازول به ترتیب با ۹۳/۲درصد و ۹۰/۹درصد به دست آمد (جدول۱). بر این اساس ۱۴ (۳۱/۸درصد) جدایه کلبسیلاکه دارای مقاومت حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم بودند، برای آزمون تأییدی آنزیم-های ESBLs از طریق آزمون Combined disk ارزیابی شدند که از این میان شش (۱۳/۶درصد) جدایه به عوان مولد ESBLs بتالاکتامازی شناسایی شدند(شکل۱).

در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از میان شش (۳درصد) جدایه غربال شده در تست تأییدیMultiplex PCR (پنج عدد شیر خام و یک عدد شیر مدرسه)، چهار (۲درصد) و یک (۰/۵درصد) جدایه به ترتیب حاوی ژن‌های TEM و DHA بود. تمامی جدایه‌های دارای ژن TEM از شیرخام بودند(شکل۲).

جدول ۱. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا بررسی شده در این مطالعه

نام آنتی‌بیوتیک	Resistant (درصد) تعداد	Inter mediate (درصد) تعداد	Sensitive (درصد) تعداد
ایمی پنم	۱ (۲/۳)	-	۴۳ (۹۷/۷)
سیپروفلوکساسین	۲۳ (۵۲/۳)	۴ (۹/۱)	۱۷ (۳۸/۶)
جنتامایسین	۱۷ (۳۸/۶)	۲ (۴/۵)	۲۵ (۵۶/۹)
کلرا مفنیکل	۱۳ (۲۹/۵)	۸ (۱۸/۲)	۲۳ (۵۲/۳)
استرپتومایسین	۳۴ (۷۷/۳)	۷ (۱۵/۹)	۳ (۶/۸)
سفوتاکسیم	۳۰ (۶۸/۲)	۲ (۴/۵)	۱۲ (۲۷/۳)
سفتازیدیم	۲۳ (۵۲/۳)	۲ (۴/۵)	۱۹ (۴۳/۲)
کوتریموکسازول	۴۰ (۹۰/۹)	۱ (۲/۳)	۳ (۶/۸)
نالیدیکسیک اسید	۳۳ (۷۵)	۳ (۶/۸)	۸ (۱۸/۲)
آموکسی سیلین	۴۱ (۹۳/۲)	۱ (۲/۳)	۲ (۴/۵)



شکل ۱. تشخیص فنوتیپی مولّدین ESBLs و AmpC . شکل سمت راست: تست فنوتیپی ESBLs مثبت، شکل سمت چپ: تست فنوتیپی AmpC مثبت، CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفتازیدیم و CV: کلاوونیک اسید.



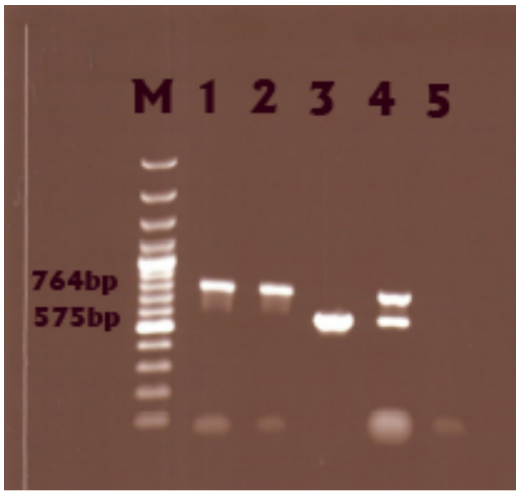
شکل ۲. نتایج الکتروفورز ژل آگارز برای Multiplex PCR. ژن TEM و DHA: M : مارکر ۱۰۰ bp، ۱: کنترل مثبت (*کلبسیلا پنومونیه ۱۷۸۱*) برای TEM، ۲: جدایه شیر مثبت برای TEM، ۳: جدایه شیرمثبت برای DHA، ۴: جدایه شیر مثبت برای TEM و DHA، ۵: کنترل منفی

مشخصات پرایمر ژن‌های استفاده شده

Target(s)	Primer	Sequence (5`to 3 ` as synthesized)	Expected Amplicon size (bp)	Reference
TEM	TEMF	AGATCAGTTGGGTGCACGAG	618	15
	TEMR	CAGTGCTG:CAATGATACCG		
SHV	SHVF	GCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGC	764	16
	SHVR	CAGATAAATCACCACAATGCGC		
DHA	DHAF	ATCGGCCTGTTTGGTGC	531	17
	DHA R (Group1)	AGGAAGCACGGTTATTACGC		
CITM	CITMF	CAGCCTCTTTCTCCACATTTGC	575	16
	CITMR	CAGTTTTAAGGTTGCAGGACG		
CTX-M-1	CTX F	CGTGGCGATGAATAAAGCTG	251	17
	CTXR (Group 1)	GGTGGTATTGCCTTTCATCC		

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]



شکل ۳. نتایج الکتروفورز ژل آگارز برای Multiplex PCR ژن SHV و CITM. M: مارکر ۱۰۰ bp، ۱: کنترل مثبت (*کلبسیلا پنومونیه ۱۷۸۱*) ۲: جایگاه شیر مثبت برای SHV، ۳: جایگاه شیر مثبت برای CITM، ۴: جایگاه شیر مثبت برای SHV و CITM و ۵: کنترل منفی

در آزمایش Multiplex PCR ، از میان شش (۳درصد) جدایه غربال شده در تست تأییدی، دو (۱درصد) و یک (۰/۵درصد) جدایه به ترتیب حاوی ژن‌های SHV و ژن CITMبود. یک جدایه حاوی ژن SHV از شیر خام و یکی هم از شیر مدرسه بوده است (شکل۳).

فرایند PCR روی DNAهای استخراج شده برای تکثیر قطعه‌هایی به طول bp۲۵۱ برای ژن CTX با استفاده از یک جفت پرایمر فراگیر انجام شد. لازم به ذکر است خانواده بتالاکتامازی CTX-M -۱واجد زیر گروه‌های متعدد بوده بنابراین برای شناسایی کامل این زیر گروه‌ها در فرایند PCR از پرایمرهای فراگیر استفاده شد. ژن CTX-M-۱ و CTXR در هیچ جدایه کلبسیلا شناسایی نشد.

بحث:

درمطالعه حاضر از میان ۴۴ جدایه کلبسیلا که در غربالگری اولیه برای تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده وارد فاز تأییدی شدند، تنها ۱۴ جدایه فنوتیپ ESBLs را نشان دادند و بر اساس توصیه سازمان جهانی CLSI، برای بررسی بیشتر و ثابت کردن این موضوع، از روش PCR استفاده شد. با مدنظر قرار دادن اینکه خانواده‌های بتالاکتامازی (SHV، CITM) واجد زیر گروه‌های متعدد بوده، بنابراین برای شناسایی کامل این زیر گروه‌ها در فرایند PCR از پرایمرهای فراگیر استفاده شد که با استفاده از برنامه BLAST این اطمینان حاصل شد که این پرایمرها می‌توانند طیف وسیعی از این زیر گروه‌ها را پوشش دهند. در ۲۰۰۷ ، Valverde و همکارانش نشان دادند که از میان ۱۱۲۷۲ نمونه اشریشیاکلی از بیمارستان سالامانسا در اسپانیا، ۱۳۰ (۱درصد) نمونه مولد آنزیم‌های ESBLs بوده‌اند(۲۰).

در مطالعه‌های انجام شده توسطVranes و همکاران که در سال ۲۰۰۸ در شهر Zagreb آلمان انجام شد، از میان ۲۴۵۱ سویه اشریشیاکلی ، ۳۹ (۱/۵۹٪) جدایه مولد ESBLs بوده است(۲۱). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با مطالعه‌های گفته شده بالا، شیوع ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs در کشور ما بیش از نتایج به دست آمده از سایر مطالعه‌های انجام شده است. به نظر می‌رسد که استفاده گسترده از داروهای بتالاکتام طیف گسترده به ویژه نسل سوم سفالوسپورین‌ها و بهره نگرفتن از راهکارها و ابزارهای مناسب کنترل عفونت، عامل عمده پیدایش و افزایش ارگانیسم‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBLs) باشد.Hong Fang و همکاران در سال‌های ۲۰۰۱ الی ۲۰۰۶ در سوئد نشان دادند که از میان ۸۷ جدایه اشریشیاکلی که از لحاظ فنوتیپی به عنوان مولدین ESBLs شناخته شده بودند، ۶۳درصد ژنوتیپ TEM بتالاکتاماز را دارند(۲۲).

امروزه شناسایی ارگانیسم‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف گسترده (ESBLs) به یکی از چالش‌های اصلی در آزمایشگاه‌ها مبدل شده است. چرا که حضور این آنزیم‌ها اغلب درتست‌های فنوتیپی تأیید نشده و همین امر مشکلاتی را در رابطه با تفسیر این نوع مقاومت ایجاد کرده است. یکی از عواملی که منجر به نتایج منفی کاذب ESBLs می‌شود، ظهور AmpC بتالاکتامازها در میان پاتوژن‌ها و تولید این دوکلاس بتالاکتامازی به طور همزمان است.(۲۳،۲۴).

در مطالعه‌هایی که در بین سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۵ در ۸ بیمارستان کره توسط Ko و دیگر همکارانش انجام گرفت، یک روند افزایش از شیوع سویه‌های انتروباکتریاسه مولد ESBLs را نشان می‌داد(۲۵).

Sudarwanto و همکاران در اندونزی در مطالعه‌ای روی ۸۰ نمونه شیر خام نشان دادند که هفت نمونه ESBLمثبت بودند، که همگی به کلبسیلا پنومونیه تعلق داشتند. آنالیزهای بعدی نشان داد که همه هفت جدایه کلبسیلا دارای ژنblaSHV و به علاوه دو جدایه همزمان دارای blaTEM-۱ and blaCTX-M-۱۵ بودند(۲۶).

نتایج ما در مقایسه با Sudarwanto از جهاتی تفاوت دارد. اول از این نظر که ما ژنCTX را در نمونه‌های شیر بررسی و شناسایی کردیم، اگرچه در نمونه‌های اندونزی هم فقط یک مورد مشاهده شد. دوم اینکه فراوان‌ترین ژن در نمونه‌های ما TEM بود و در حالی که در نمونه‌های شیر در اندونزی SHV بود. این یافته‌ها نشان می‌دهدکه پراکندگی ژن‌های مقاومت SHV,TEM, CTX,در کشورهای مختلف یکسان نبوده و نمی‌توان به عنوان یک الگوی مقاومت ثابت در همه نقاط در نظر گرفت.

سلطان دلال و همکاران از ۵۰۰ نمونه بالینی، ۲۰۰ جدایه بررسی شده (۶۴درصد)، ۱۲۸ سویه از طریق تست‌های فنوتیپی برای PCR ژن‌های TEM وAmpC انتخاب شد، ۷۴(۵۷/۸درصد) و ۵(۳/۹درصد) جدایه به ترتیب حاوی ژن‌های TEM و DHA بود.(۱۷).

در مطالعه انجام شده توسط شاه چراغی و همکاران (۱۳۸۶) از میان ۲۰۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی ، ۱۰۵ نمونه در تست تأییدی فنوتیپی به عنوان ESBLs گزارش شد که از این بین، ۱۲ جدایه حاوی bla- SHV بود (۵). در مطالعه سلطان دلال و همکاران از طریق PCR ژن‌های SHV و AmpC بررسی شد و (۵/۵درصد) ۷ و (۱۰/۲درصد) ۱۳ جدایه با اطمینان ۹۵درصد به ترتیب حاوی ژن‌های SHV و CITM بود (۱۸).در مطالعه دیگری که توسط سلطان دلال و همکاران به بررسی حضور ژن CTX-M-۱ با استفاده از روش PCR روی جدایه‌هایی که در تست‌های تشخیصی Disk diffusion agar و Combined disk به دست آمده بود، برای شناسایی ژن CTX-M-۱ انجام شد. به دست آمده از ۱۲۸ سویه بتالاکتامازهای طیف گسترده مثبت، ۹۹ جدایه (۷۷/۳۴درصد) حاوی ژن مورد نظر بوده است(۱۹).

به طور کلی شیوع ارگانیسم‌های مولد ESBLs از نمونه‌های شیر در ایران بررسی نشده و پژوهش‌ها فقط بیشتر روی اشریشیاکلی و آن هم از نمونه‌های کلینیکی انجام شده است. بنابراین نتایج این بررسی می‌تواند در آینده به عنوان یک منبع مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که در میان ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs، کلبسیلا یکی از باکتری‌هایی است که قادر به تولید این آنزیم‌ها به ویژه تیپ TEM بتالاکتامازی است. در هیچ یک از نمونه‌های شیر ژن CTX-M-۱ و CTXR از جدایه های کلبسیلا شناسایی نشد. همچنین با توجه به جداسازی تعداد۱۲ جدایه از ۴۴ کلبسیلا(۲۷/۳درصد) از شیرهای پاستوریزه مدارس می‌تواند توجه بیشتری را به مساله بهداشتی کودکان که قشر آسیب پذیرتری هستند، معطوف دارد. از طرفی جداسازی چهار سویه از پنج سویه کلبسیلا اکسی توکا از شیر مدارس و قابلیت تولید سایتوتوکسین و ایجاد مسمویت غذایی اهمیت رعایت اصول بهداشتی در تهیه و توزیع شیر مدارس را بیشتر نشان می‌دهد(۲۷). نکته قابل توجه اکثر تحقیق‌ها که در خصوص بررسی بتالاکتامازهای طیف گسترده یا ESBLs انجام شده یا روی جدایه‌های کلینیکی و یا روی شیر خام بوده است و تا کنون روی نمونه‌های شیر پاستوریزه مطالعه‌ای انجام نشده بود.

از طرفی یافته‌های به دست آمده در خصوص شیرخام و پاستوریزه و حضور ژن‌های مقاومت TEM و SHV از جنبه‌های مثبت این تحقیق و نشاگر انتقال ژن‌های مقاومت به انسان از طریق شیرخام و پاستوریزه است. اما نبود امکانات

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]

روش‌های مولکولی و کارشناس خبره در هر آزمایشگاه می‌تواند از محدودیت‌های شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی دانست.

نتیجه‌گیری:

حضور کلبسیلا پنومونیه در شیر خام و کلبسیلا اکسی توکا در شیر پاستوریزه مدارس با توجه به قابلیت سایتو توکسین آن اهمیت پایش شیرخام و شیرمدارس را بیش از پیش نشان می‌دهد. از آنجا که شناسایی سویه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازهای طیف گسترده یا ESBLs ، از طریق تست‌های فنوتیپی به سختی امکان‌پذیر است، بنابراین لحاظ کردن بررسی‌های مولکولی با استفاده از پرایمرهای فراگیر در کنار آزمون فنوتیپی می‌تواند در تشخیص کامل این نوع مقاومت‌ها مؤثر بوده و سهم عمده‌ای را در کنترل عفونت ایفا کند.

تشکر و قدردانی:

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۴۶۰۵۲ و دارای کد اخلاق ۱۳۹۸,۹۳۳.IR.TUMS.VCR.REC است. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی بودند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

منابع:

1- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI Number 164.2010. Milk and milk products – Raw milk – Specification and test methods. 1st. Revision [Full Text in Persian].

2- Godinho FMS, Krug M, Figueiredo RP, Müller A, Jank L, Tomaszewski CA et al. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. J Dairy Res. 2020;87(4):463-468.

3- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y et al. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J Mol Biol 2019; 431(18): 3472–3500.

4- Sadeghi MR,Nahaei MR,Soltan Dallal MM. Extended-Spectrum Beta-lactamase Resistance in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in In-Patient and Out-Patient Groups.Tabriz Univ Med Sci 2008;30(2):79-86 [Full Text in Persian].

5- Shahcheraghi F, Nasiri S and Naviri H. Evalouation of presence the bla-SHV and bla-TEM β-Lactamase genes in clinical isolates resistant Escherichia coli to antibiotics from Tehran hospital. Iranian J Med Microbiol 2007;1(3):1-8 [Full Text in Persian].

6- Soltan Dallal MM, Mobasseri G, Fallah Mehrabadi J, Eshraghian MR, Rastegar Lari A, Molla Aghamirzaei H , Sabbaghi A , Azarsa M. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in Escherichia coli isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). Tehran Univ Med J 2011; 69 (1): 16-21[Full Text in Persian].

7- Soltan Dallal MM , Fani F, Rajabi Z, Karami-Talab M, Molla Agha Mirzaei H. Prevalence of blaCTX-M, blaSHV and blaTEM β-Lactamase Genes Among Escherichia coli Isolates in Foodborne Outbreak in Iran. Inter J Enteric Path 2018; 6(2):48-52.

8- Akpaka PE, Vaillant A, Wilson C, Jayaratne P. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Produced by Gram-Negative Bacteria in Trinidad and Tobago. Int J Microbiol. 2021; 2021: 5582755.

9- Wilson H, Török ME. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Microb Genom. 2018;4(7):e000197.

10- Collis RM, Burgess SA, Biggs PJ, Midwinter AC, French NP, Toombs-Ruane L, Cookson AL. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Dairy Farm Environments: A New Zealand Perspective. Foodborne Pathog Dis 2019;16(1):5-22.

11- Yang Y, Peng Y, Jiang J, Gong Z, Zhu H, Wang K et al. Isolation and characterization of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae from raw cow milk in Jiangsu and Shandong provinces, China. Transbound Emerg Dis. 2021;68(3):1033-1039.

12- Nobrega DB, Calarga AP, Nascimento LC, Chande Vasconcelos CG, de Lima EM, Langoni H et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from Brazilian dairy herds. J Dairy Sci. 2021;104(6):7210-7224.

13- Cheddie P, Dziva F, Akpaka PE. Detection of a CTX-M group 2 beta-lactamase gene in a Klebsiella pneumoniae isolate from a tertiary care hospital, Trinidad and Tobago. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):33.

14- Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. J Chemother. 2017;29(sup1):2-9.

15- Food and Drug Administration of the Islamic Republic of Iran (FDA). Methods for Detection and Molecular characterization of Pathogenic Escherichia coli Co-Ordination Action Food-CT-2006-036256, ISO 16654. Iran: Tehran; Food Drug Administ Islamic Repub Iran. 2006.

16- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 27th ed. 2017.

17- Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Sabbaghi A, Eshraghian MR, et al. Molecular detection of TEM and Ampc(Dha,mox)-type broad spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli; PCR method.Tehran Univer JMed 2010; 68(6): 827-877 [Full Text in Persian].

18- Soltan Dallal MM, Sabbaghi A, Fallah Mehrabadi J,Molla Aghamirzaei H, Rastegar Lari A, Eshraghian MR, et al. Survey exsist B-lactamase Gense bla-SHV and bla-Amps (CITM,-FOX) in clinical isolates of Escherichia coli. J of Med Coun of Islamic Republic of Iran 2010; 28(3): 269-276[Full Text in Persian].

19- Soltan Dallal MM, Mobasseri G, Fallah Mehrabadi J, Eshraghian MR, Rastegar Lari A, Molla Aghamirzaei H, et al. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in Escherichia coli isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). Tehran Univ Med J. 2011;69(1):16-21[Full Text in Persian].

20- Valvered ED, Padilla TP and Hernandez AH . Prevalence of clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. producing multiple extended-spectrum beta- lactamase. Diag Micobiol Infect Dis 2007; 56:433-437.

21- Vranes J, Bedenic B and Bauernfeind A. Emergence of clonally related SHV-5 ESBL-producing Escherichia coli strains in the community. 13th Inter Cong Infect Dis Abstracts 2008;12(1).

22- Fang H, Ataker F, Hedin G and Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum β--lactamases among Escherichia coli isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol 2008;46(2): 707–712.

23- Govindaswamy A, Bajpai V, Khurana S, Aravinda A, Batra P, Malhotra R et al.
Prevalence and characterization of beta-lactamase-producing

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]

Escherichia coli isolates from a tertiary care hospital in India. J Lab Physicians. 2019;11(2):123-127.

24- Hosuru Subramanya S, Bairy I, Nayak N, Amberpet R, Padukone S, Metok Y et al.
Detection and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae from the gut of healthy chickens, Gallus gallus domesticus in rural Nepal: Dominance of CTX-M-15-non-ST131 Escherichia coli clones. PLoS One. 2020 29;15(5):e0227725.

25- Ko KS, Lee MY, Song JH, LeeH, Junge DS, JungSI and et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae isolated in Korean hospitals. Diag Microbiol Infect Dis 2008; 61(4): 453–459.

26- Sudarwanto M, Akineden Ö, Odenthal S, Gross M, Usleber E. Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing Klebsiella pneumoniae in Bulk Tank Milk from Dairy Farms in Indonesia. Foodborne Pathog Dis 2015 l;12(7):585-90.

27- Validi M, Soltan Dallal MM, Douraghi M Fallah Mehrabadi J, Rahimi Foroushani A, Frohesh Tehrani H. Identification of cytotoxin-producing Klebsiella oxytoca strains isolated from clinical samples with cell culture assays. Microbial Pathogenesis 2017; 113 1-4.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.1.10.2]