

Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Pattern Changes and Antibiotic Resistance Genes of *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated in 2012-2015 Outbreaks in Iran Referred to Reference Laboratory Using Phenotypic and Molecular Methods

Saboorian R¹, Rahbar M², Rahnamaye Farzami M*², Saffarian P¹

1. Department of biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Iranian Health Reference Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +982166740040, Fax: +982166728121, E-mail: marjan.farzami@gmail.com

Received: Feb 19, 2019 Accepted: Jun 20, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* is a crucial matter in the world. Objective of this study was the improvement of cholera surveillance by assessing the antimicrobial resistance pattern and bacterial resistance genes in *V. cholerae* O1 isolates, referred to Iranian Reference Health Laboratory, in cholera outbreaks during 2012- 2015.

Methods: This study is a cross sectional- descriptive research. Antimicrobial susceptibility test (AST) to 8 antibiotics was performed on 113 *V.cholerae* O1 isolates using E-test method. For all isolates, conventional PCR method was used to detect the presence of tetracycline resistance genes (*tetA*, *tetB* and *tetC*) and the sulfamethoxazole-trimethoprim resistance genes (*sul2* and *dfrA1*).

Results: All isolates were sensitive to ampicillin, temocillin, ciprofloxacin and cefixime and 64% of strains showed intermediate susceptibility to erythromycin. The resistance rate of nalidixic acid, sulfamethoxazole-trimethoprim and tetracycline were 90%, 71% and 50% respectively. However, the frequency of multidrug resistant (MDR) strains varied across the years. The frequency of resistance genes (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *sul2* and *dfrA1*) were 70%, 34%, 58%, 66% and 70% respectively.

Conclusion: AST should be used to determine the resistance profile at the beginning of a cholera outbreak and to monitor the resistance profile of circulating strains as part of surveillance of the disease. A prominent association was observed between phenotypic resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim and presence of *dfrA1* gene. Determining the presence of resistance genes is necessary for understanding the epidemiology and routes of transmission of antibiotic resistance genes.

Keywords: *Vibrio cholera*; Cholera; Antibiotic Resistance; Genes; Iran

بررسی تغییرات الگوی حساسیت ضد میکروبی و تعیین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های ویبریو کلرا / O1 جدا شده از طغیان‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۴ در ایران ارسالی به آزمایشگاه مرجع سلامت با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی

رقیه صبوریان^۱، محمد رهبر^۲، مرجان رهنمای فرزامی^{۲*}، پروانه صفاریان^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. بخش میکروبی‌شناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۰۴۰۰۲۱۶۶۷۴، فاکس: ۰۹۱۲۳۷۸۱۸۹۹، پست الکترونیک: marjan.farzami@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی ویبریو کلرا یک موضوع مهم در دنیا است. در این تحقیق با هدف بهبود نظام مراقبت بیماری وبا، الگوی مقاومت میکروبی و شیوع ژن‌های مقاومت در ایزوله‌های ویبریو کلرا / O1 ارجاع شده به آزمایشگاه مرجع سلامت در طغیان‌های وبا در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: مطالعه حاضر، مطالعه مقطعی-توصیفی است. حساسیت ضد میکروبی در ۱۱۳ ایزوله ویبریو کلرا / O1 برای ۸ آنتی‌بیوتیک به روش MIC E-Test تعیین و سپس وجود ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA*، *tetB*، *tetC*) و تریمتوپریم-سولفامتو کسازول (*sul2*، *dfrA1*) به روش PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: همه ایزوله‌ها به آمپی‌سیلین، تموسیلین، سیپروفلوکساسین و سفیکسیم حساسیت و ۶۴ درصد آنها به اریترومایسین حساسیت بینابینی داشتند. مقاومت به نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول و تتراسیکلین به ترتیب ۹۰، ۷۱ و ۵۰ درصد و فراوانی سویه‌های MDR در سال‌های مختلف، متفاوت بود. فراوانی ژن‌های مقاومت (*tetA*، *tetB*، *tetC*، *sul2* and *dfrA1*) به ترتیب ۷۰، ۳۴، ۵۸، ۶۶ و ۷۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تغییر الگوی مقاومت ضد میکروبی ویبریو کلرا / O1 آزمایش تعیین حساسیت به عنوان قسمتی از برنامه مراقبت بیماری در شروع هر طغیان و پایش آن، برای سویه‌های در حال چرخش انجام شود. در این مطالعه بین حضور ژن *dfrA1* و مقاومت فنوتیپی به تری متوپریم-سولفامتو کسازول ارتباط معناداری مشاهده گردید. تعیین حضور ژن‌های مقاومت برای مشخص نمودن اطلاعات اپیدمیولوژیک و نحوه انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی لازم است.

واژه‌های کلیدی: ویبریو کلرا، وبا، مقاومت ضد میکروبی، ژن‌ها، ایران

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

مقدمه

انسان (بزرگسالان و کودکان) را آلوده می‌کند و یک مشکل جدی جهانی است. این بیماری سبب اسهال آبکی شدید شده و در صورت عدم درمان سریع، می‌تواند به سرعت باعث از دست رفتن شدید آب و در نهایت

وبا^۱ بیماری اسهالی خطرناک و قدیمی است که عامل آن باکتری *Vibrio cholerae* تولیدکننده سم بوده،

^۱ Cholera

منجر به مرگ شود. ویبریو کلرا/ انتروتوکسینی به نام Cholerae Toxin (CT) تولید می‌کند که مسئول ظهور بیماری وبا می‌باشد [۱]. بیماری وبا یکی از شدیدترین بیماری‌های اسهالی است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه گسترش یافته است. این بیماری در حال حاضر بصورت اندمی، اپیدمی و پاندمی وجود دارد [۲]. طغیان‌های وبا معمولاً زمانی که آب آشامیدنی و سیستم بهداشت عمومی در حوادث طبیعی مانند سیل، زلزله، سونامی یا در کمپ‌های جنگی دچار بحران می‌شود، رخ می‌دهد. از طرفی در بعضی کشورها ارتباط فصلی در طغیان‌های وبا مشاهده شده است. این بیماری هولناک تاریخی هنوز به صورت یک مسئله بزرگ بهداشت عمومی در بسیاری از مناطق افریقا، آسیا و آمریکای لاتین باقی مانده است. وبا در گروه بندی سازمان جهانی بهداشت در گروه بیماری‌های بازپدید و نوپدید آمده است. از دیدگاه سازمان جهانی بهداشت بیماری وبا به عنوان یک تهدید جهانی برای بهداشت عمومی و یکی از شاخص‌های کلیدی در توسعه اجتماعی محسوب می‌شود [۳، ۴]. از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۶ کشورهایی که بیماری وبا را به سازمان جهانی بهداشت گزارش کردند، ۳/۴ میلیون مورد وبا و ۶۵۶۰۰ مورد مرگ و میر را گزارش نمودند [۵]. در ایران نیز بیماری وبا اندمی است. به طور مثال در سال ۱۳۹۲ در کل کشور در ۱۲ استان ۲۵۷ مورد وبا بوسیله مسئولین امر گزارش شد، که میزان مرگ و میر در این سال ۱/۹۵ درصد بوده است [۶]. درمان اصلی و با جایگزینی آب و الکترولیت‌ها می‌باشد، اما نشان داده شده است مصرف آنتی بیوتیک‌ها در موارد شدید و در شرایط اپیدمی حائز اهمیت هستند. درمان آنتی بیوتیکی می‌تواند طول دوره اسهال را به نصف یا بیشتر و همچنین حجم مدفوع را به نصف تا دو سوم کاهش دهد، که موجب کاهش چرخه انتقال بیماری در مواقع اپیدمی می‌گردد [۷، ۲، ۱]. اخیراً مقاومت دارویی ویبریو کلرا در کشورهای در حال توسعه و ظهور

سویه‌های MDR^۱ در بسیاری از نقاط دنیا به یک مسأله جدی تبدیل شده است [۳]. افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از بیماران یک نگرانی جدی است، زیرا باعث اختلال در سیاست‌های کنترل اپیدمی می‌شود. بنابراین مقاومت آنتی بیوتیکی می‌تواند گستردگی اپیدمی، مدت زمان آن و میزان مرگ و میر ناشی از وبا را افزایش دهد. پایش مداوم تعیین حساسیت ضد میکروبی و همچنین ردیابی سویه در سیاست‌های پذیرفته شده برای کنترل وبا در سطح ملی و جهانی بسیار حائز اهمیت است [۸].

هدف از این تحقیق تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش فنوتیپی در سویه‌های ویبریو کلرا ارجاع شده به آزمایشگاه مرجع سلامت و بررسی تغییرات آن در طی طغیان‌های سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴ در ایران، بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به روش PCR و ارتباط آنها با مقاومت میکروبی جهت اصلاح پروتکل درمانی کشور در راستای مراقبت‌های اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی بیماری وبا می‌باشد.

روش کار

مطالعه حاضر، مقطعی- توصیفی است. مطالعه گذشته‌نگر صورت گرفته در سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۹۲ در ایران، محققین را به این موضوع هدایت کرد که الگوی مقاومت میکروبی سویه‌های ویبریو کلرا O1 جدا شده از طغیان‌های اخیر و ژن‌های مقاومت آنها مورد بررسی و پایش قرار گیرند.

جداسازی و تشخیص سویه‌های ویبریو کلرا

در تحقیق حاضر از سویه‌هایی استفاده گردید که آزمایشگاه‌های مراکز بهداشت دانشگاه‌های علوم پزشکی کل کشور که طی سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در آنها طغیان بیماری وبا رخ داده بود، جهت تایید تشخیص به آزمایشگاه مرجع سلامت^۲ ارسال

^۱ Multidrug Resistant

^۲ واقع در تهران، خیابان حافظ، نرسیده به تقاطع جمهوری، کوچه زرتشتیان، کوچه شاهرخ، شماره ۴۸

کرده بودند. از سویه‌های مورد مطالعه ۴۰ سویه از استان سیستان و بلوچستان، ۱۸ سویه از استان کردستان، ۸ سویه از استان قم، ۷ سویه از استان خوزستان، ۷ سویه از استان کرمان، ۷ سویه از استان اصفهان، ۶ سویه از استان گرگان، ۵ سویه از استان تهران، ۴ سویه از استان آذربایجان غربی، ۳ سویه از استان قزوین، ۲ سویه از استان البرز، ۱ سویه از استان کرمانشاه، ۱ سویه از استان بوشهر، ۱ سویه از استان خراسان رضوی، ۱ سویه از استان هرمزگان، ۱ سویه از استان سمنان و ۱ سویه از استان گیلان جدا گردید.

۱۱۳ ایزوله ویبریو کلرا با استفاده از روش‌های استاندارد شامل آزمون اکسیداز و آزمون رشته^۱، آزمون‌های بیوشیمیایی KIA^۲، LIA^۳ و SIM^۴ تعیین هویت گردیدند. سویه‌های اکسیداز مثبت، آزمون رشته مثبت، واکنش KIA منظره Alk/Acid و بدون گاز، LIA مثبت، SH₂ منفی، اندول مثبت و حرکت مثبت به عنوان ویبریو کلرا تشخیص داده شدند. سپس جهت تایید و تعیین سروتایپ آزمون سرولوژی به روش آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از آنتی‌سرم‌های ویبریو کلرا پلی‌والن O1 و آنتی‌سرم‌های مونو‌والن O1 و Inaba و Ogawa (Difco, USA) انجام گردید. این ایزوله‌ها بعد از تشخیص و تایید، جمع‌آوری و به روش ذخیره‌کردن در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی

در این تحقیق همه سویه‌های ویبریو کلرا تایید شده (۲۹ سویه) در سال ۱۳۹۱، ۵۵ سویه از ۱۰۳ سویه تایید شده در سال ۱۳۹۲ و همه سویه‌های ویبریو کلرا تایید شده در سال ۱۳۹۴ (۲۹ سویه)، (در مجموع ۱۱۳ ایزوله ویبریو کلرا O1) برای انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی انتخاب شدند. انتخاب

آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) استخراج DNA سویه‌ها با استفاده از کیت استخراج (Roche, Germany) و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. آزمایش PCR برای تعیین ژن‌هایی که مقاومت به تتراسیکلین (*tetA*, *tetB*, *tetC*)، سولفامتو کسازول (*sul2*) و تری متوپریم (*dfra1*) را

⁵ Clinical and Laboratory Standard Institute

⁶ Minimum Inhibitory Concentration

⁷ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

⁸ British Society for Antimicrobial Chemotherapy

¹ String Test

² Kligler Iron Agar

³ Lysine Iron Agar

⁴ SH₂-Indol-Motility

استفاده در این تحقیق در جدول ۲ آمده است. رسم نمودارهای نتایج بدست آمده و بررسی نتایج آماری با محاسبه P-value با استفاده از نرم افزار Excel و SPSS نسخه 2016 انجام گردید.

کد می کنند، طراحی گردید (جدول ۱). واکنش PCR برای ۱۱۳ ایزوله ویبریو کلرا با حجم واکنش ۲۵µl، حاوی ۱۳µl PCR master mix، ۱µl از هر پرایمر و ۱۰µl DNA الگو انجام شد. توالی پرایمرهای مورد

جدول ۱. برنامه واکنش PCR برای تعیین ژن های *tetA tetB tetC tetA* و *dfra1* و *sul2*

مراحل:		واسرشت اولیه		واسرشت		اتصال پرایمر		گسترش		گسترش انتهایی	
تعداد سیکل:		۱ سیکل		۳۵ سیکل		۳۵ سیکل		۳۵ سیکل		۳۵ سیکل	
ژن	دما (°C)	زمان (min)	دما (°C)	زمان (min)	دما (°C)	زمان (min)	دما (°C)	زمان (min)	دما (°C)	زمان (min)	دما (°C)
<i>tetA</i>	۹۵	۴	۹۵	۱	۵۸	۱	۷۲	۱	۷۲	۷	۷۲
<i>tetB</i>	۹۵	۴	۹۵	۱	۵۸	۱	۷۲	۱	۷۲	۷	۷۲
<i>tetC</i>	۹۴	۵	۹۴	۱	۵۷	۱	۷۲	۱	۷۲	۳	۷۲
<i>sul2</i>	۹۴	۵	۹۴	۱	۶۰	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰	۷۲
<i>dfra1</i>	۹۴	۲	۹۴	۱	۶۰	۱	۷۲	۱	۷۲	۱۰	۷۲

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تعیین ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی

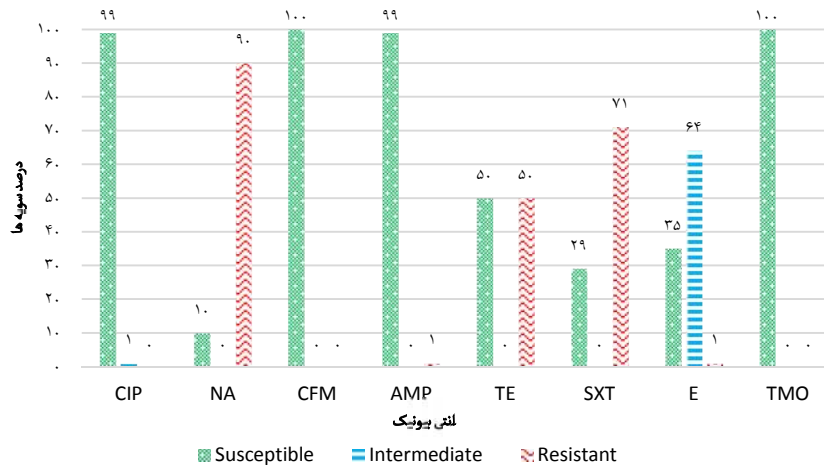
پرایمر	توالی (5'-3')	ژن هدف	اندازه (bp)	مرجع
tetA-F	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	<i>tetA</i> , tetracyclin resistance	502	Lanz R., et al. (2003)
tetA-R	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA			
tetB-F	CATTAATAGGCGCATCGCTG	<i>tetB</i> , tetracyclin resistance	930	Lanz R., et al. (2003)
tetB-R	TGAAGGTCATCGATAGCAGG			
tetC-F	GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	<i>tetC</i> , tetracyclin resistance	505	Schmidt, et al. (2001)
tetC-R	CCTCTTGCGGGATATCGTCC			
sul2-F	TGTGCGGATGAAGTCAGCTCC	<i>sul2</i> , sulfonamides resistance	626	Hochhut, et al. (2001)
sul2-R	AGGGGGCAGATGTGATCGAC			
dfra1-F	CAAGTTTACATCTGACAATGAGAACGTAT	<i>dfra1</i> , trimethoprim resistance	278	Falbo, et al. (1999)
dfra1-R	ACCCTTTTGCCAGATTTGGTA			

یافته ها

برای مجموع ۱۱۳ سویه ویبریو کلرا جدا شده در سال های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در جدول ۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است. مقایسه درصد سویه های مقاوم ویبریو کلرا جدا شده در سال های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در نمودار ۲ آمده است. در نهایت درصد (تعداد) ایزوله های MDR در مجموع ۱۱۳ سویه جدا شده در سال های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در جدول ۴ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش های بیوشیمیایی و سرولوژی در این مطالعه ایزوله های سال ۱۳۹۱ تعداد ۷ سویه سروتایپ Inaba و ۲۲ سویه سروتایپ Ogawa، ایزوله های سال ۱۳۹۲ تعداد ۱۰۰ سویه سروتایپ Inaba و ۳ سویه سروتایپ Ogawa و ایزوله های سال ۱۳۹۴ تعداد ۲۳ سویه سروتایپ Inaba و ۶ سویه سروتایپ Ogawa تشخیص داده شد (جدول ۳).

نتایج به دست آمده از آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی برای آنتی بیوتیک های مورد مطالعه



AMP, Ampicillin; CFM, Cefixime; CIP, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; NA, Nalidixic acid; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; TE, Tetracycline; TMO, Temocillin

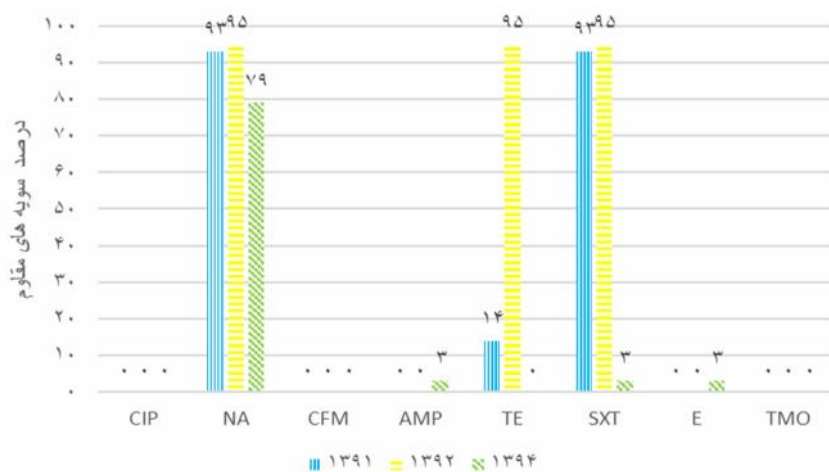
نمودار ۱. نتایج آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی مجموع ایزوله‌ها (۱۱۳ ایزوله) در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ به روش Etest

جدول ۳. مقادیر MIC به دست آمده در آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی برای آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه به تفکیک سروتایپ، سال و استان جداسازی هر سویه

Sample No.	Year	Province	Serotype	MIC (µg/mL)							
				TE	SXT	E	CIP	NA	CFM	AMP	TMO
91-1	2012	Khuzestan	Ogawa	3	0.064	2	0.004	0.75	0.064	3	4
91-2	2012	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.125	3	4
91-3	2012	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.125	4	4
91-4	2012	Bushehr	Ogawa	3	0.032	3	0.094	1.5	0.064	3	4
91-5	2012	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	6	4
91-6	2012	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	4	3
91-7	2012	Kordestan	Ogawa	3	32	1.5	0.5	256	0.19	4	8
91-8	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	2	0.5	256	0.125	6	8
91-9	2012	Kordestan	Ogawa	1.5	32	2	0.25	256	0.25	6	8
91-10	2012	Kordestan	Ogawa	3	32	2	0.5	256	0.19	6	8
91-11	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	1.5	0.5	256	0.19	6	8
91-12	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	2	0.38	256	0.19	6	8
91-13	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	2	0.5	256	0.19	6	8
91-14	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	1.5	0.5	256	0.19	6	8
91-15	2012	Kordestan	Ogawa	3	32	1.5	0.38	256	0.19	6	8
91-16	2012	Kordestan	Ogawa	1	32	2	0.38	256	0.25	6	8
91-17	2012	Kordestan	Ogawa	4	32	1.5	0.5	256	0.125	6	6
91-18	2012	Kermanshah	Ogawa	2	32	4	0.5	256	0.19	6	8
91-19	2012	West Azarbayjan	Ogawa	3	32	1.5	0.5	256	0.019	6	8
91-20	2012	West Azarbayjan	Ogawa	4	32	1.5	0.5	256	0.38	2	8
91-21	2012	West Azarbayjan	Ogawa	3	32	1.5	0.75	256	0.125	6	8
91-22	2012	West Azarbayjan	Ogawa	3	32	1.5	0.5	256	0.19	6	6
91-23	2012	Kordestan	Inaba	3	32	1.5	0.5	256	0.125	6	8
91-24	2012	Kordestan	Inaba	4	32	1.5	0.38	256	0.19	8	8
91-25	2012	Kordestan	Inaba	3	32	1.5	0.5	256	0.19	6	6
91-26	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	1.5	0.5	256	0.19	6	8
91-27	2012	Kordestan	Ogawa	3	32	1.5	0.38	256	0.19	6	6
91-28	2012	Kordestan	Ogawa	2	32	1.5	0.5	256	0.19	6	8
91-29	2012	Kordestan	Ogawa	3	32	1.5	0.38	256	0.19	4	8
92-1	2013	Kashmar	Ogawa	1	0.047	3	0.094	1	0.094	3	4
92-2	2013	Golestan	Ogawa	0.5	0.064	4	0.094	1	0.094	3	3
92-3	2013	Esfahan	Ogawa	0.5	0.064	6	0.006	0.75	0.094	3	3
92-4	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	4

92-5	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.064	3	4
92-6	2013	Qom	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	3	4
92-7	2013	Hormozgan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	4
92-8	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.064	3	4
92-9	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	3	6
92-10	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	3	4
92-11	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.125	3	6
92-12	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	6
92-14	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.125	3	4
92-15	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.125	3	6
92-16	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	3	6
92-18	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	2	6
92-19	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	4	4
92-23	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.064	3	6
92-24	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.064	3	6
92-25	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	2	6
92-26	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.75	256	0.094	3	6
92-30	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.064	2	4
92-31	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	2	6
92-32	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.047	3	6
92-35	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.047	3	6
92-39	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	2	6
92-40	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.064	3	6
92-43	2013	Ghazvin	Inaba	16	32	2	0.5	256	0.094	3	6
92-44	2013	Qom	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.125	3	6
92-45	2013	Alborz	Inaba	16	32	4	0.38	256	0.125	3	6
92-46	2013	Gorgan	Inaba	16	32	4	0.5	256	0.094	4	4
92-47	2013	Gorgan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.094	3	4
92-48	2013	Gorgan	Inaba	16	32	2	0.38	256	0.064	2	4
92-49	2013	Tehran	Inaba	16	32	2	0.25	256	0.064	2	4
92-50	2013	Tehran	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	4
92-51	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.125	3	4
92-53	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.064	3	4
92-55	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.125	4	4
92-57	2013	Kerman	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.125	3	6
92-61	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.064	2	4
92-62	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.064	2	4
92-63	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	2	4
92-64	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	3	4
92-65	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	3	6
92-66	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.094	2	4
92-67	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	4	0.38	256	0.125	3	6
92-68	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	4	0.5	256	0.094	2	6
92-69	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	1	256	0.125	2	4
92-70	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	4	0.5	256	0.094	3	6
92-72	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.125	3	4
92-73	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	2	6
92-74	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	4	0.38	256	0.094	4	6
92-75	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	4
92-77	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.38	256	0.094	3	6
92-78	2013	Sistan & Baluchestan	Inaba	16	32	3	0.5	256	0.064	3	4
94-1	2015	Khuzestan	Ogawa	1.5	0.064	4	0.094	6	0.094	3	4
94-2	2015	Khuzestan	Ogawa	1	0.064	3	0.094	4	0.047	4	4
94-3	2015	Khuzestan	Ogawa	1.5	0.064	6	0.006	1	0.064	4	3
94-4	2015	Khuzestan	Ogawa	1.5	0.047	8	0.006	2	0.064	3	3
94-5	2015	Khuzestan	Ogawa	1.5	0.064	8	0.006	2	0.064	4	4
94-6	2015	Semnan	Ogawa	1	0.064	4	0.094	3	0.064	3	3
94-7	2015	Kerman	Inaba	1	0.023	3	1	256	0.064	6	4
94-8	2015	Kerman	Inaba	1	0.023	8	0.75	256	0.094	6	4
94-9	2015	Kerman	Inaba	1	0.032	4	0.75	256	0.094	8	6
94-10	2015	Tehran	Inaba	1.5	0.032	6	0.75	256	0.125	6	4
94-11	2015	Ghazvin	Inaba	1.5	0.023	3	0.75	256	0.125	4	6
94-12	2015	Qom	Inaba	1	0.023	6	0.75	256	0.094	6	4
94-13	2015	Qom	Inaba	1.5	0.023	8	0.75	256	0.125	8	4

94-14	2015	Khuzestan	Inaba	1	0.047	4	0.75	256	0.125	6	6
94-15	2015	Alborz	Inaba	1.5	0.023	6	0.75	256	0.094	8	6
94-16	2015	Qom	Inaba	1	0.023	8	0.75	256	0.064	6	4
94-17	2015	Tehran	Inaba	1.5	0.032	6	0.75	256	0.094	8	4
94-18	2015	Qom	Inaba	1	0.032	4	0.75	256	0.064	8	6
94-19	2015	Qom	Inaba	1	0.032	6	0.75	256	0.094	8	4
94-20	2015	Qom	Inaba	1.5	0.023	4	0.75	256	0.032	6	4
94-21	2015	Tehran	Inaba	1	0.023	4	0.5	256	0.064	6	4
94-22	2015	Ghazvin	Inaba	1	6	256	2	256	0.064	256	4
94-23	2015	Gilan	Inaba	1.5	0.023	3	0.5	256	0.064	4	4
94-24	2015	Esfahan	Inaba	1	0.032	6	0.5	256	0.094	6	4
94-25	2015	Esfahan	Inaba	1	0.023	8	0.75	256	0.064	8	6
94-26	2015	Esfahan	Inaba	1	0.023	6	0.75	256	0.064	6	6
94-27	2015	Esfahan	Inaba	0.75	0.032	4	0.75	256	0.094	6	4
94-28	2015	Esfahan	Inaba	1	0.032	4	0.5	256	0.064	6	4
94-29	2015	Esfahan	Inaba	1.5	0.032	4	0.5	256	0.064	6	4



AMP, Ampicillin; CFM, Cefixime; CIP, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; NA, Nalidixic acid; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; TE, Tetracycline; TMO, Temocillin

نمودار ۲. مقایسه درصد سویه‌های مقاوم و بی‌ریوکلا جدا شده در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه به روش Etest

جدول ۴. درصد (تعداد) سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴

سال	درصد (تعداد) سویه‌های حساس به همه آنتی بیوتیک‌ها	درصد (تعداد) سویه‌های مقاوم به ۱ خانواده آنتی بیوتیکی	درصد (تعداد) سویه‌های مقاوم به ۲ خانواده آنتی بیوتیکی	درصد (تعداد) سویه‌های مقاوم به ۳ یا بیشتر از ۳ خانواده آنتی بیوتیکی (MDR)
۱۳۹۱	۷ (۲)	۰	۷۹ (۲۳)	٪۱۴ (۴)
۱۳۹۲	۵ (۳)	۰	۰	٪۹۵ (۵۲)
۱۳۹۴	۲۱ (۶)	۷۶ (۲۲)	۰	٪۳ (۱)
مجموع	۹/۷ (۱۱)	۱۹/۵ (۲۲)	۲۰ (۲۳)	۵۰/۵ (۵۷)

فراوانی ژن‌های *tetA tetB tetC tetD* در سویه‌های مورد مطالعه و بی‌ریوکلا جدا شده در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در جدول ۵ آورده شده است. فراوانی ژن‌های *tetA tetB tetC tetD* و *dfrA1* در ۱۱۳ سویه و بی‌ریوکلا O1 به تفکیک ایزوله‌های مقاوم و حساس در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ در جدول ۶ آورده شده است.

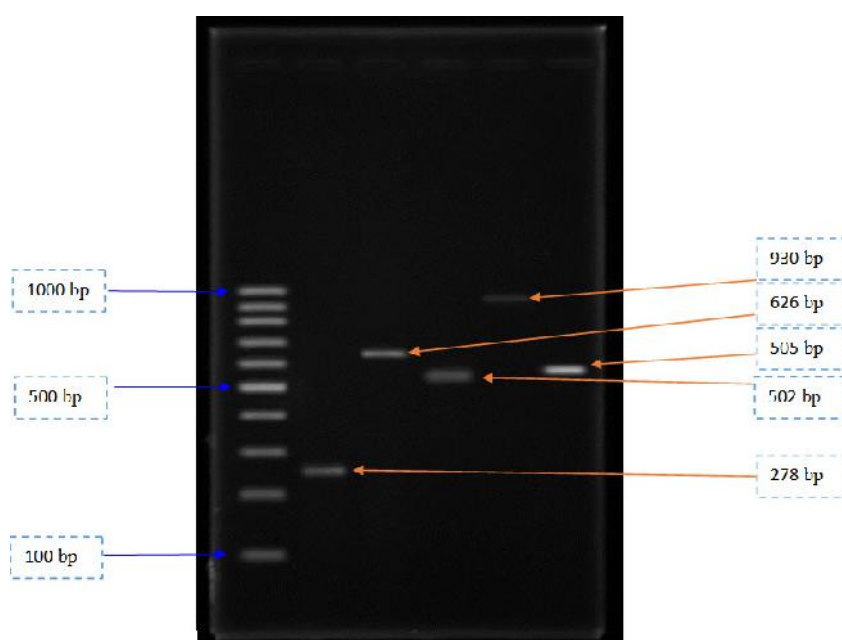
مقدار P-value محاسبه شده برای ژن‌های *tetA tetB tetC tetD* و *dfrA1* به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۳۰، ۰/۷۴، ۰/۸۱ و 10^{-8} × ۴/۷۴ می‌باشد. یک نمونه از نتایج PCR ژن‌های *tetA* با طول ۵۰۲ bp، *tetB* با طول ۹۳۰ bp، *tetC* با طول ۵۰۵ bp، *sul2* با طول ۶۲۶ bp و *dfrA1* با طول ۲۷۸ bp در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۵. فراوانی ژن‌های *tetA tetB tetC sul2* و *dfrA1* در سویه‌های ویبریو کلا *O1* جدا شده در سالهای ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴

<i>dfrA1</i>	<i>Sul2</i>	<i>tetC</i>	<i>tetB</i>	<i>tetA</i>	ژن
۹۴ (۲۷)	۹۴ (۲۷)	۳۸ (۱۱)	۵۱ (۱۵)	۷۲ (۲۱)	۱۳۹۱
۹۴ (۵۲)	۴۹ (۲۷)	۵۸ (۳۲)	۳۶ (۲۰)	۷۴ (۴۱)	۱۳۹۲ درصد (تعداد) در سال
۰ (۰)	۷۲ (۲۱)	۷۹ (۲۳)	۱۰ (۳)	۵۹ (۱۷)	۱۳۹۴

جدول ۶. فراوانی ژن‌های *tetA tetB tetC sul2* و *dfrA1* در سویه‌های ویبریو کلا به تفکیک ایزوله‌های مقاوم و حساس در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴

<i>dfrA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tetC</i>	<i>tetB</i>	<i>tetA</i>	ژن
٪۹۷/۵(۷۸)	٪۶۷/۵(۵۴)	٪۶۰/۷ (۳۴)	۳۹ (۲۲)	٪۷۸/۵(۴۴)	درصد (تعداد) در ایزوله‌های مقاوم
۳ (۱)	٪۶۳/۶(۲۱)	٪۵۶ (۳۲)	۲۸ (۱۶)	٪۶۱/۴(۳۵)	درصد (تعداد) در ایزوله‌های حساس



شکل ۱. نمونه ای از نتایج PCR ژن‌های مورد مطالعه - از چپ به راست، ستون ۱: لدر؛ ستون ۲: محصول تکثیر ژن *dfrA1* ستون ۳: محصول تکثیر ژن *sul2* ستون ۴: محصول تکثیر ژن *tetA* ستون ۵: محصول تکثیر ژن *tetB* ستون ۶: محصول تکثیر ژن *tetC* سویه‌های ویبریو کلا *O1*

بحث

در مورد آنتی بیوتیک اریترومايسين نیز سویه مقاوم به این آنتی بیوتیک جدا نشد (به استثناء تنها یک سویه (۳٪) در سال ۱۳۹۴). اما الگوی مقاومت ایزوله‌ها به این آنتی بیوتیک در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ متفاوت و به ترتیب ۱۰، ۷۵ و ۹۷ درصد سویه‌ها به اریترومايسين حساسیت بینایی داشتند. در مورد آنتی بیوتیک تتراسیکلین نیز در طی‌ان‌های سال‌های متوالی مورد مطالعه، الگوی مقاومت متفاوتی مشاهده شد. در سال ۱۳۹۱، ۱۴ درصد سویه‌ها به تتراسیکلین مقاوم بوده، سپس در سال ۱۳۹۲، مقاومت به ۹۵ درصد سویه‌ها افزایش یافت، اما در سال ۱۳۹۴ این

مقایسه درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ با یکدیگر نشان می‌دهد در سه سال طی‌ان متوالی، در الگوی مقاومت ایزوله‌ها به سفیکسیم، سیپروفلوکساسین، تموسیلین، آمپی سیلین و نالیدیکسیک اسید تغییری مشاهده نشد. همه سویه‌ها به سفیکسیم، سیپروفلوکساسین، تموسیلین و آمپی سیلین حساس بودند، در حالی که نالیدیکسیک اسید تنها آنتی بیوتیکی است که در همه سال‌های مورد مطالعه درصد بالایی از ایزوله‌ها (به ترتیب ۹۳، ۹۵ و ۷۹ درصد) به آن مقاوم بودند.

مقاومت ناپدید شده و همه سویه‌ها به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند. در مورد آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم سولگامتو کسازول نیز الگوی مقاومت تقریباً متغیر بوده است، به گونه‌ای که در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ به ترتیب ۹۳ و ۹۵ درصد سویه‌ها مقاوم بودند، اما در سال ۱۳۹۴ این مقاومت ناپدید شده و فقط یک سویه (۳٪) از ۲۹ ایزوله به آن مقاوم بوده است.

نتایج مطالعات گذشته در خصوص مقاومت ایزوله‌های بالینی ویبریو کلرا O1 به عوامل ضد میکروبی مورد استفاده در درمان وبا در ایران و سایر کشورهای بومی این بیماری که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند، در جدول ۷ خلاصه شده است.

آمپی‌سیلین: تمامی سویه‌های ویبریو کلرا O1 در سال‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، به آمپی‌سیلین حساس بوده و هیچ‌گونه مقاومتی به این آنتی‌بیوتیک مشاهده نشد. در نقاط مختلف دنیا الگوی مقاومت ایزوله‌های ویبریو کلرا O1 به آمپی‌سیلین متفاوت است (جدول ۷). الگوی مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در ایران تا قبل از سال ۱۳۹۱، حساس و بعد از آن مقاوم می‌باشد. مطابق مطالعات رهبر و همکاران روی ایزوله‌های سال ۱۳۸۴ در استان‌های مختلف و همچنین رنجبر و همکاران روی ایزوله‌های ۱۳۸۷ در کرج، حاجیا و همکاران در سال ۱۳۹۰ در ۱۶

استان مختلف ایران (از جمله استان البرز) همه سویه‌ها به آمپی‌سیلین حساس بودند، در حالی‌که براتی و همکاران در همین سال میزان مقاومت را در میان ایزوله‌های استان البرز ۴۶ درصد گزارش کردند. مطابق مطالعات انجام شده توسط طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۹۲، ۵۶/۳ درصد ایزوله‌های استان سیستان و بلوچستان مقاوم گزارش شدند. اما در همین سال در مطالعه حاضر ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها حساس بودند، که از میان آنها ۶۵ درصد سویه‌ها از استان سیستان و بلوچستان جدا شده بودند (جدول ۷). تموسیلین: تمامی سویه‌های ویبریو کلرا O1 در سال‌های مورد مطالعه، به تموسیلین همانند آمپی‌سیلین حساس بوده و هیچ‌گونه مقاومتی به این آنتی‌بیوتیک مشاهده نشد. بر اساس مطالعه رهبر و همکاران این آنتی‌بیوتیک علیه ویبریو کلرا O1 برای اولین بار در دنیا و در ایران مورد آزمایش قرار گرفت [۳۵]، و هیچ مطالعه دیگری در این مورد یافت نشده است. از آنجایی‌که این آنتی‌بیوتیک پایداری قابل توجهی به اکثر بتالاکتام‌ها و همه آنزیم‌های AmpC دارد، شاید بتوان از آن در موارد مشاهده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در درمان آنتی‌بیوتیکی وبا استفاده نمود. البته این امر مستلزم بررسی‌های بیشتر و مطالعه در شرایط *in vivo* می‌باشد [۳۶].

جدول ۷. نتایج مطالعات گذشته در مقاومت ایزوله‌های بالینی ویبریو کلرا O1 به عوامل ضد میکروبی مورد بررسی در تحقیق حاضر

نویسنده و مرجع	محل، کشور	سال جداسازی سویه	تعداد سویه مورد آزمایش	درصد سویه‌های مقاوم								
				Ap	CEP*	Cip, (NOR or OFL)	E	NA	SXT	Te	TMO	MDR
Chen [۱۴]	Guangdong, China	۱۹۶۱-۲۰۱۳	۳۶۰	< ۱۰	۱۳/۳ (CFX)	< ۱۰	-	< ۱۰	-	< ۱۰	-	۲۵/۹
Jabeen [۱۵]	Pakistan	۱۹۹۳-۲۰۰۵	۲۴۵	۰	-	۰ (OFL)	-	-	۱۰۰	۰	-	-
Rahim Shah [۱۶]	Pakistan	۱۹۹۸ ۱۹۹۹	۱۷۲	- ۵۸	- (CTX)	۳/۸۵ (NOR) ۰	۰ ۱۵/۷	۳۳/۸۵ ۶۵/۷	۱۰۰ ۱۰۰	- ۹/۹	- -	- -
Kingston [۱۷]	Chennai, India	۲۰۰۲-۲۰۰۵	۵۱	۳۲	۷ (CN)	۰	۶۸	۹۷	۹۲	۰	-	۳۳
Torane [۱۸]	Mumbai, India	۲۰۰۴	۷۹	۳۳	۶۶	۵/۱	-	۹۶/۲	۹۱/۱	۲/۵	-	۹۶/۲
		۲۰۱۰	۵۲	۵۴	۲۷	۵/۸	-	۹۴/۲	۷۳/۱	۱۵/۴	-	۵۱/۹
		۲۰۱۳	۲۰	۱۰۰	۷۵	۱۰	-	۱۰۰	۹۰	۵	-	۹۰

Rashed [۱۹]	Dhaka, Bangladesh	۲۰۰۶-۲۰۱۱	۵۴	-	.	.	۳۳-	-	۱۰۰	۰/۳-۳۳	-	-
Shukla Das [۲۰]	Delhi, India	۲۰۰۷	۵۸	-	۸/۶	۴۸/۲	-	۱۰۰	۹۱/۳	۵۸/۶	-	-
		۲۰۰۸	۸۵	-	.	۳۴/۱	-	۱۰۰	۸۵/۸	۳/۵	-	-
		۲۰۰۹	۹۵	-	.	۳۱/۵	-	۱۰۰	۸۹/۴	۴/۲	-	-
					(CTX)							
Huu Dat Tran [۲۱]	Hanoi, Vietnam	۲۰۰۷-۲۰۱۰	۱۰۰	-	-	.	۱	۱۰۰	۱۰۰	۲۹	-	۹۲
Mercy [۲۲]	Various regions of Kenya	۲۰۰۷-۲۰۱۰	۴۴	-	.	.	(NOR)	-	-	۱۰۰	.	-
					(CRO)							
Mandal [۲۳]	Puduchery, India	۲۰۰۸-۲۰۱۰	۱۵۴	۶۴/۳	۲	۳/۲	-	-	-	۱۶/۹	-	-
					(CRO)							
kumar Kar [۴]	Odisha, India	۲۰۱۰	۳۵	۱۰۰	-	.	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	-	۱۰۰
Sjolund-Karlsson [۲۴]	Haiti	۲۰۱۰-۲۰۱۱	۱۲۲	-	-	-	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
Eibachl [۲۵]	Ghana	۲۰۱۱	۱۸	.	-	.	-	.	۱۰۰	-	-	.
		۲۰۱۲	۱۲	۹۱/۷	-	۹۱/۷	-	۹۱/۷	۸۳/۸	-	-	۹۱
		۲۰۱۴	۶۲	۹۵/۲	-	۹۸/۴	-	۱۰۰	۹۶/۸	-	-	۹۷
Smith [۲۶]	Guinea DR Congo Togo Ivory Coast Mozambique	۲۰۱۲	۱۲۵	۰/۷	۹۸/۵	.	-	-
		۲۰۱۱	۳۶	.	.	.	۵/۳	۱۸/۴	۹۷/۴	.	-	-
		۲۰۱۰-۲۰۱۲	۴۲	۹۰/۵	۱۰۰	.	-	-
		۲۰۱۲	۲۸	۱۰۰	۹۶/۶	.	-	-
		۲۰۱۲-۲۰۱۳	۲۶	۱۰۰	۱۰۰	.	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۸/۱	-	-
					(CRO)							
Gupta [۳]	Nepal	۲۰۱۲	۳۱	۱۰۰	-	۶/۴۵	-	-	۱۰۰	.	-	۶/۴۵
Shrestha [۲۷]	Kathmandu, Nepal	۲۰۱۲	۲۲	۱۰۰	۲/۱۸	۱/۹	۹/۹۰	۱۰۰	۱۰۰	.	-	۱۰۰
					(CTX)							
Uppal [۲۸]	North India	۲۰۱۲	۲۸	۱۰۰	۲۵	۳۲/۱	-	۱۰۰	-	-	-	-
		۲۰۱۳	۸۶	۹۳	۴۳	۵۳/۵	-	۹۶/۵	-	-	-	-
		۲۰۱۴	۵۲	۹۶/۲	۴۲/۳	۵۳/۸	-	۹۶/۲	-	-	-	-
		۲۰۱۵	۷۰	۹۲/۹	۴۱/۴	۵۵/۷	-	۹۴/۳	-	-	-	-
[۲۹] رهبر	ایران	۱۳۸۴	۱۰۰	.	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
[۷] رنجبر	ایران، کرج	۱۳۸۷	۷۰	۱۰۰	۷	.	۶۵	۱۰۰	۹۶	۲۸	-	-
[۳۰] رهبر	ایران	۱۳۸۷	۲۲۰	-	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
سلیمی خورشاد [۳۱]	ایران، استان سیستان و بلوچستان	۱۳۸۷	۲۹	۱۰۰	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
		۱۳۸۸	۱۷	۱۰۰	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
		۱۳۸۹	۱۰	۱۰۰	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
		۱۳۹۰	۳۵	۱۰۰	-	.	.	۱۰۰	۱۰۰	.	-	-
											(I=۱۰۰)	
[۳۲] براتی	ایران، استان البرز	۱۳۹۰	۲۳۹	۴۶	-	.	۵/۴	-	۹۵/۴	۱۵/۱	-	-
[۳۳] حاجیا	ایران، ۱۶ استان	۱۳۹۰	۶۱	.	.	.	۵۹	۹۱/۸	۹۶/۷	۱۹/۶	-	-
												(CFM)
طباطبایی [۳۴]	ایران، استان سیستان و بلوچستان	۱۳۹۲	۴۸	۵۶/۳	.	.	۲۲/۹	۴۳/۸	۸۹/۶	۶۰/۴	-	-
												(CRO)

* CEP: Cephalosporin agent, including CFX, Cefoxitin; CTX, Cefotaxime; CN, Cefalexin; CXM, Cefuroxime; CRO, Ceftriaxone; CFM, Cefixime

Ap, Ampicillin; Cip, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; I, Intermediate; MDR, Multidrug resistant; NA, Nalidixic acid; NOR, Norfloxacin; OFL; Ofloxacin; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; Te, Tetracycline; TMO, Temocillin

اریترومایسین: در سال‌های ۱۳۹۱، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ به ترتیب ۱۰، ۷۵ و ۹۷ درصد سویه‌های ویبریو کلرا O1 به اریترومایسین حساسیت بینابینی داشتند. در نقاط مختلف دنیا الگوی مقاومت، متفاوت است (جدول ۷). بر اساس مطالعات صورت گرفته در ایران فقط در سال ۱۳۹۰ الگوی مقاومت به این آنتی بیوتیک مشابه با مطالعه حاضر بوده، ضمن اینکه در بعضی سال‌ها در مطالعات مختلف نتایج متناقضی مشاهده می‌شود. بر اساس مطالعات دکتر رهبر و همکاران در سال ۱۳۸۴ و ۱۳۸۷ روی ایزوله‌های استان‌های مختلف ایران، همه سویه‌ها به اریترومایسین حساس بودند. اما رنجبر و همکاران در سال ۱۳۸۷ با مطالعه روی ایزوله‌های کرج ۶۵ درصد سویه‌ها را به این آنتی بیوتیک مقاوم گزارش شدند. مطابق مطالعات براتی و همکاران روی ایزوله‌های استان البرز در سال ۱۳۹۰، ۵/۴ درصد سویه‌ها مقاوم و ۹۲ درصد آنها با حساسیت بینابینی گزارش شدند، اما دکتر حاجیا و همکاران در همان سال روی ایزوله‌های ۱۶ استان مختلف ایران میزان مقاومت به اریترومایسین را ۵۹ درصد گزارش نمودند. مطابق مطالعات دکتر طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی ایزوله‌های استان سیستان و بلوچستان ۲۳ درصد ایزوله‌ها مقاوم و ۶۹ درصد آنها با حساسیت بینابینی گزارش شدند، در حالیکه بر اساس نتایج مطالعه حاضر در همان سال هیچ سویه مقاومی جدا نشده و ۷۵ درصد سویه‌ها به این آنتی بیوتیک حساسیت بینابینی داشتند (جدول ۷).

تتراسیکلین: در طغیان‌های سال‌های متوالی مورد مطالعه حاضر، الگوی مقاومت متفاوتی برای تتراسیکلین مشاهده شد. در سال ۱۳۹۱، ۱۴ درصد سویه‌ها به تتراسیکلین مقاوم بوده، سپس در سال ۱۳۹۲، مقاومت به ۹۵ درصد سویه‌ها افزایش یافت، اما در سال ۱۳۹۴ این مقاومت ناپدید شده و همه سویه‌ها به این آنتی بیوتیک حساس بودند. علت افزایش مقاومت به تتراسیکلین در سال ۱۳۹۲ و تفاوت

سفیکسیم: تمامی سویه‌های ویبریو کلرا O1 در سال‌های مورد مطالعه، به سفیکسیم حساس بوده و هیچ‌گونه مقاومتی به این آنتی بیوتیک مشاهده نشد. در نقاط مختلف دنیا الگوی مقاومت به سفیکسیم تقریباً شبیه یکدیگر و شبیه مطالعه حاضر بوده و در اکثر کشورها مقاومتی دیده نشد، یا مقاومت به میزان پایین بوده است (جدول ۷). مطالعات صورت گرفته در ایران در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۲ به روش Disk Diffusion Agar نیز بیانگر تشابه در الگوی مقاومت به این آنتی بیوتیک با مطالعه حاضر می‌باشد (جدول ۷).

سیپروفلوکساسین: تمامی سویه‌های ویبریو کلرا O1 در سال‌های مورد مطالعه، به سیپروفلوکساسین حساس بوده و هیچ‌گونه مقاومتی به این آنتی بیوتیک مشاهده نشد. در نقاط مختلف دنیا الگوی مقاومت تقریباً شبیه یکدیگر و مطالعه حاضر بوده و در اکثر کشورها مقاومتی گزارش نشد یا مقاومت به میزان پایین بوده، به استثناء چند کشور مانند هند، غنای جنوبی و زیمبابوه (جدول ۷). مطالعات صورت گرفته در ایران نیز بیانگر تشابه در الگوی مقاومت سیپروفلوکساسین با مطالعه حاضر می‌باشد. مطابق گزارش رهبر، رنجبر، براتی، حاجیا و طباطبایی و همکاران در سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۹۲ همه ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند (جدول ۷).

نالیدیکسیک اسید: نالیدیکسیک اسید تنها آنتی بیوتیکی است که در همه سال‌های مورد مطالعه درصد بالایی از ایزوله‌ها به آن مقاوم بودند. در نقاط مختلف دنیا الگوی مقاومت تقریباً شبیه یکدیگر و شبیه مطالعه حاضر بوده است. به استثناء چند کشور شامل غنا در سال ۲۰۱۱ و گینه در سال ۲۰۱۲ که مقاومتی گزارش نشد (جدول ۷). مطالعات صورت گرفته در ایران نیز بیانگر تشابه در الگوی مقاومت به این آنتی بیوتیک با مطالعه حاضر می‌باشد (جدول ۷).

الگوی مقاومت در سال‌های دیگر را می‌توان به استفاده غیرمنطقی و زیاد تتراسیکلین در طغیان‌های قبلی و همچنین وجود کلون جدید ویبریو کلرا/ از کشورهای همسایه نسبت داد [۶]. در اکثر نقاط دنیا مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک گزارش نشده است، اما در بعضی کشورها مانند تایلند، هند و موزامبیک مقاومت مشاهده شده است (جدول ۷). مطالعات صورت گرفته در ایران نیز بیانگر الگوی مقاومت متفاوت در سال‌های مختلف بوده، ضمن اینکه در بعضی سال‌ها در مطالعات مختلف نتایج متناقضی مشاهده می‌شود. مطابق مطالعات براتی و همکاران روی ایزوله‌های استان البرز در سال ۱۳۹۰، ۱۵/۱ درصد سویه‌ها مقاوم گزارش شدند، و مشابه آن حاحیا و همکاران در همان سال روی ایزوله‌های ۱۶ استان مختلف ایران میزان مقاومت به تتراسیکلین را ۱۹/۶ درصد گزارش نمودند. در حالی که بر اساس مطالعات سلیمی خورشاد و همکاران روی ایزوله‌های استان سیستان و بلوچستان همه ایزوله‌های سال ۱۳۹۰ با حساسیت بینابینی گزارش شدند (جدول ۷).

تریمتوپریم سولفامتو کسازول: الگوی مقاومت در بین ایزوله‌های ویبریو کلرا/ O1 در سال‌های مورد مطالعه برای آنتی بیوتیک تریمتوپریم سولفامتو کسازول متفاوت بوده است. به گونه‌ای که در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ به ترتیب ۹۳ و ۹۵ درصد سویه‌ها مقاوم بودند، اما در سال ۱۳۹۴ این مقاومت ناپدید شده است. الگوی مقاومت در نقاط مختلف دنیا تقریباً شبیه یکدیگر بوده و در اکثر کشورها ایزوله‌ها به این آنتی بیوتیک مقاوم می‌باشند (جدول ۷). مطالعات صورت گرفته در ایران نیز بیانگر تشابه در الگوی مقاومت به این آنتی بیوتیک با سایر کشورهای دنیا می‌باشد. تا سال ۱۳۹۱ اکثر ایزوله‌ها مقاوم و الگوی مقاومت مشابه کشورهای دیگر و مشابه سایر مطالعات در ایران است، اما بر اساس مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۴ الگوی مقاومت به تریمتوپریم

سولفامتو کسازول کاملاً تغییر کرده و مقاومت تقریباً ناپدید شده است (جدول ۷).

دلایل وجود تناقض در گزارشات الگوی مقاومت برای اریترومايسين و تتراسیکلین در ایران را می‌توان به تفاوت در تعداد سویه‌های مورد آزمایش و جداسازی آنها از مناطق جغرافیایی مختلف، استفاده از دو روش مختلف در انجام آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی (Disk Diffusion و E-Test)، عدم انجام آزمایش کنترل کیفیت محیط کشت مولر هیتون آگار و دیسک‌های آنتی بیوتیک یا نوارهای E-Test مورد استفاده و یا استفاده از معیارهای تفسیر (بریک پوینت‌ها)ی متفاوت به دلیل عدم وجود معیار تفسیر برای اریترومايسين در آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی ویبریو کلرا/ در دستورالعمل‌های بین‌المللی مانند CLSI نسبت داد.

مقاومت به چند دارو (MDR): بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و مطابق تعریف سویه MDR (مقاوم به ۳ خانواده آنتی بیوتیکی یا بیشتر) در سال ۱۳۹۱، (۴) ۱۴٪ سویه‌ها MDR و به سه آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین و تریمتوپریم سولفامتو کسازول مقاوم بودند. این درصد در سال ۱۳۹۲ به (۵۲) ۹۵ درصد رسید که به سه آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین و تریمتوپریم سولفامتو کسازول مقاوم و فقط (۳) ۵ درصد سویه‌ها به همه آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش حساس بودند. اما در سال ۱۳۹۴ فقط (۱) ۳ درصد سویه‌ها MDR بوده که الگوی مقاومت نیز تغییر کرده و سویه‌ها به چهار آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، تریمتوپریم سولفامتو کسازول، اریترومايسين و آمپی‌سیلین مقاوم بودند. بر اساس مطالعات انجام شده، اپیدمی‌های وبای MDR در نقاط مختلف دنیا (در مناطقی که بیماری وبا اندمی می‌باشد) با درصد بالایی گزارش شده است (جدول ۷). به عنوان مثال در مطالعه‌ای در چهار منطقه در بنگلادش در سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ همه سویه‌ها به اریترومايسين

و تتراسیکلین، یک سوم به تتراسیکلین و یک چهارم به آزیترومایسین مقاوم بودند [۷]. همچنین در موزامبیک در سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳ اکثر ایزوله‌های ویبریو کلرا همزمان به آمپی سیلین، سفتریاکسون، کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول و نیمی از سویه‌ها به تتراسیکلین مقاوم بودند. در روند درمانی تنها آزیترومایسین موثر بود و فلوروکینولون نیز پاسخ بالینی کمتری داشت [۷]. مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در درمان وبا و سایر بیماری‌های روده ای منجر به ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه‌های ویبریو کلرا می‌شود. MDR در ویبریو کلرا را می‌توان به موتاسیون خودبخودی یا انتقال افقی ژن‌های مقاومت بین کلی فرم‌های روده‌ای یا سایر میکروفلور موجود در روده و ویبریو نسبت داد [۲۷]. همچنین مکانیسم اصلی گسترش سویه‌های MDR در ویبریو کلرا اکتساب عنصر SXT است. SXT عنصری است که در یک ICE متعلق به خانواده SXT/R391 که غالباً در چندین گونه خانواده ویبریوناسه و انتروباکتریاسه وجود دارد. ICE‌ها در کروموزوم میزبان قرار گرفته و از طریق هم یوغی بین باکتری‌ها منتقل می‌شود. عنصر SXT می‌تواند ژن‌های مقاومت به سولفامتوکسازول (*sul2*)، تریمتوپریم (*dfra1* & *dfra18*)، استرپتومایسین (*strB*)، کلرامفنیکل (*floR*) و تتراسیکلین (*tetA*) را حمل کند [۳۷].

بررسی ژن‌های *tetA*، *tetB*، *tetC* بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق در بین ۵۶ سویه مقاوم به تتراسیکلین ژن *tetA* با فراوانی ۷۸/۵ درصد بیشترین شیوع را داشت و سپس ژن‌های *tetB* و *tetC* به ترتیب با فراوانی ۶۰/۷ و ۳۹ درصد قرار داشتند. الگوی فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در بین ۵۷ سویه حساس به تتراسیکلین نیز مشابه سویه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک بود، بدین گونه که ژن *tetA* با فراوانی ۶۱/۴ درصد بیشترین شیوع را در بین سویه‌های حساس داشت و بعد از آن ژن‌های *tetC* و

tetB به ترتیب با فراوانی ۵۶ و ۲۸ درصد قرار داشتند. بنابراین بین مقاومت فنوتیپی به تتراسیکلین و حضور ژن‌های *tetA*، *tetB* و *tetC* همبستگی معنا داری مشاهده نشد. مشابه تحقیق حاضر، اودیووارا^۱ و همکاران نشان دادند که در بین ۲۰ سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس جدا شده از آب و غذاهای دریایی که به تتراسیکلین مقاوم بودند، فقط یک سویه دارای ژن‌های *tetA*، *tetB*، *tetC* و *tetE* بود [۳۸]. همچنین رادر^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی حضور ژن‌های *tetA* و *tetB* در ۳۹ ایزوله باسیلوس سرئوس مقاوم به تتراسیکلین نشان دادند که این دو ژن به ترتیب در ۳۶ و ۱۲ سویه وجود داشتند، ولی ۳ سویه مقاوم به تتراسیکلین فاقد ژن‌های *tetA* و *tetB* بودند [۳۹]. عدم حضور ژن‌های *tet* در سویه‌ها با وجود مقاومت فنوتیپی آنها به تتراسیکلین ممکن است به دلیل حضور سایر ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین مانند *tetM* و *tetL* در این سویه‌ها باشد. همچنین وجود حساسیت فنوتیپی به تتراسیکلین با حضور ژن‌های مقاومت به این آنتی بیوتیک در سویه‌ها می‌تواند به دلیل عدم بیان ژن‌های *tetA*، *tetB* و *tetC* در این سویه‌ها یا به دلیل وجود موتاسیون در ژن‌های مذکور، یا وجود سیستم‌هایی مانند ناقلین چند دارو^۳ یا سدهای نفوذپذیر^۴ باشد [۴۰]. از طرفی شاید ژن‌های تعیین کننده مقاومت به تتراسیکلین به جای کروموزوم در پلاسمید واقع شده باشند. چنان که فلاستر^۵ و همکاران با بررسی روی ایزوله‌های ویبریو کلرا در هائیتی به روش PCR و WGS^۶ نشان دادند که یک ست منحصر به فرد از ژن‌های تعیین کننده مقاومت (*aac(3)-IIa*، *bla*، *dfra15*، *mpha*، *sul1*، *tetA*) و یک کپی دوم از ژن‌های مقاومت *floR*، *strAB* و *sul2*

¹ Udyavara

² Rather

³ Multidrug Transporters

⁴ Permeability Barriers

⁵ Folster

⁶ Whole Genome Sequencing

[۱۲]. نتایج فوق نشان می‌دهد روش‌های ژنتیکی ممکن است حضور ژن‌های اختصاصی مقاومت به تریمتوپریم سولفامتو کسازول را تایید کنند، با این وجود ممکن است که ژن‌های مقاومت بیان نشوند [۴۰].

این مطالعه با محدودیت‌هایی نیز مواجه بود که شامل عدم دسترسی به همه سویه‌های ویبریو کلا/ جداشده از مناطق جغرافیایی مختلف در هر طغیان و عدم دسترسی به اطلاعات دموگرافیک دقیق همه ایزوله‌ها و اطلاعات بالینی لازم و کافی بیماران بوده است. این امر منجر به محدود شدن مطالعات بیشتر در زمینه طراحی و تفسیر روش‌های مولکولی و ژنوتیپی در این تحقیق شده است. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی تغییرات الگوی حساسیت ضد میکروبی و تغییرات ژنوتیپی بر روی سویه‌های جداشده از نمونه‌های آب و غذا به همراه ایزوله‌های انسانی و ارتباط آنها در طغیان‌ها مورد بررسی و پایش قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های ویبریو کلا/ عامل طغیان وبا در ایران در سال‌های متفاوت همیشه ثابت نیست. الگوی مقاومت می‌تواند بر اساس کاهش فشار عامل ضد میکروبی، منشأ سویه عامل طغیان (سویه بومی یا خارجی) و عوامل دیگر متفاوت باشد و یک آنتی‌بیوتیک موثر در یک سال، در سال دیگر در درمان موثر نباشد. بنابراین آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی در شروع هر طغیان و همچنین پایش مداوم و پیگیری سویه‌ها برای بررسی تغییر احتمالی الگوی مقاومت آنها در طی یک طغیان و مقایسه نتایج حاصل از آن با طغیان‌های سال‌های قبل جهت اتخاذ سیاست‌های مناسب توسط نظام سلامت کشور و حوزه مدیریت بیماری‌های تحت مراقبت وبا برای کنترل این بیماری در سطح ملی و منطقه‌ای بسیار مهم است. همچنین

باید راهنمای ملی برای برخورد با مقاومت در طی طغیان توسط سازمان‌های مسئول تهیه گردد. در حال حاضر از نسل سوم سفالوسپورین‌ها و سیپروفلوکساسین می‌توان به عنوان خط اول درمان وبا استفاده نمود، اما تعیین پاسخ کلینیکی به سیپروفلوکساسین و همچنین ماکرولیدها بسیار مهم می‌باشد. از آنجایی که تتراسیکلین به طور معمول به عنوان خط اول درمان آنتی‌بیوتیکی در درمان وبا مورد استفاده قرار می‌گیرد و سازمان جهانی بهداشت آن را به عنوان انتخاب ارجح پیشنهاد می‌کند، قبل از تعیین الگوی مقاومت ایزوله‌ها در هر طغیان، پزشکان به عنوان درمان تجربی^۱ باید با احتیاط از آن به عنوان خط اول درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده کنند.

از سوی دیگر سخت گیرانه بودن استانداردهای آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی و حتی انتخاب شرکت سازنده نوارهای E-Test و یا دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و محیط کشت مولر هینتون آگار به دلیل کیفیت متفاوت آنها و همچنین به کارگیری مراجع تفسیری یکسان و صحیح، حساسیت این آزمایش مهم را بیشتر می‌کند. به دلیل گزارش نتایج الگوی مقاومتی متناقض از مراکز آکادمیک در نقاط مختلف کشور که بحث بسیار حساسی است، قویاً توصیه می‌شود آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی در یک آزمایشگاه مرجع کشوری مانند آزمایشگاه مرجع سلامت صورت گیرد و سیاست‌های صحیح وزارت بهداشت از نظر ارسال ایزوله‌ها متناسب با پراکندگی زمانی و منطقه جغرافیایی در کشور در نظر گرفته شود. همچنین نتایج حاصل از آن پس از بررسی در کمیته‌های علمی و اجرایی مرتبط، به مراجع و نشریات ملی و بین‌المللی گزارش گردد.

در این مطالعه بین مقاومت فنوتیپی به تتراسیکلین و حضور ژن‌های *tetA*، *tetB* و *tetC* همبستگی معناداری مشاهده نشد. همچنین بین مقاومت به تریمتوپریم سولفامتو کسازول و حضور ژن *sul2* همبستگی

¹ Empiric

مقاومت آنتی بیوتیکی در محدوده وسیعی از باکتری‌های پاتوژن و کومنسال در هر دو نمونه محیطی و بالینی بسیار حائز اهمیت است [۴۳].

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است. نویسندگان از آقای دکتر علیرضا دولتیار کارشناس بخش مولکولی آزمایشگاه مرجع سلامت جهت همکاری علمی در انجام این تحقیق نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

معناداری وجود ندارد. اما بین مقاومت به این آنتی بیوتیک و حضور ژن *dfrA1* همبستگی بالایی وجود دارد. بنابراین حضور ژن‌های مقاومت به تنهایی بیانگر مقاومت سویه‌ها نمی‌باشد و می‌توان از این اطلاعات ژنتیکی برای مطالعات اپیدمیولوژی و پی‌بردن به نقش انتقال ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیک‌ها استفاده نمود. این ژن‌ها اغلب روی عناصر ژنتیکی متحرک مستقر هستند و می‌توانند آزادانه بین میکروبیوتای کومنسال و پاتوژن‌ها حتی بین میکروبیوتای بالینی و محیطی حرکت کنند. بنابراین توسعه و پیشرفت روش‌های ژنوتایپینگ برای تعیین سریع، صحیح و حساس ژن‌های

References

- 1- Mandal S, Mandal M.D, Kumar Pal N. Cholera a great global concern. Asian Pac J Trop Med. 2011 Jul; 4(7): 573-580.
- 2- Banerjee R, Das B, Nair G.B, Basak S. Dynamics in genome evolution of *Vibrio cholerae*. Infect Genet and Evol. 2014 Jan; 23: 32-41.
- 3- Gupta PK, Pant N.D, Bhandari R, Shrestha P. Cholera outbreak caused by drug resistant *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype ElTor serotype Ogawa in Nepal. Antimicrob Resist Infect Control. 2016 Jun; 5(1): 23.
- 4- Kar SK, Pal BB, Khuntia HK, Achary KG, Khuntia CP. Emergence and spread of tetracycline resistant *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant during 2010 cholera epidemic in the tribal areas of Odisha, India. Int J Infect Dis. 2015 Apr; 33: 45-49.
- 5- World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2017 Sep; 36: 521-536. Available from: <http://www.who.int/wer>
- 6- Rahnamaye Farzami M, Hajia M, Dolatyar A, Imani M, Saburian R, Mohamad Rahbar M. Correlation of the native inaba strain with the dominant isolated strains obtained from outbreaks in 2013 in Iran. Int J Enteric Pathogens. 2016 Nov; 4(4).
- 7- Mayers DL, Sobel JD, Ouellette, Kaye KS, Marchaim D. Antimicrobial resistance, clinical and epidemiological aspects, 2nd ed. Switzerland: Springer, 2017: 969-982
- 8- Jain M, Kumar P, Goel AK. Emergence of tetracycline resistant *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor serotype ogawa with classical ctxB gene from a cholera outbreak in Odisha, eastern India. J pathog. 2016 Jan; 2016: 6.
- 9- Perilla M.J, Ajello G, Bopp C, Elliot J, Facklam R, Knapp JS. 2003. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. Centers for Disease Control and World Health Organization: Atlanta, Georgia, USA, 2003: 141-160
- 10- Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. October 2015; M45, 3rd edition.
- 11- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for standard susceptibility testing. 2016 Jan; M100, 26th edition.

- 12- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusions recommended by EUCAST. 2016; Version 6.1.
- 13- British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC to actively support the EUCAST Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing in preference to the current BSAC Disc Diffusion Method. 2015; Version 14.0.
- 14- Chen RF. Investigation of antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* O1/O139 recovered in Guangdong. 2017; Available from: URL: <https://www.globethesis.com>
- 15- Jabeen K, Zafar A, Hasan R. Increased isolation of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba over serotype Ogawa in Pakistan. East Mediterr Health J. 2008 May-Jun; 14(3): 564-570.
- 16- Shah R, Parveen G, Shoukat M, Khalid S, Hameed A. Isolation, identification, characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* during 1998-99. Int J Biosci. 2017 Sep; 11(3): 135-147.
- 17- Kingston JJ, Thavachelvam K, Tuteja U, James T, Janardhanan B. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Vibrio cholerae* from cholera outbreaks in Chennai. Indian J Microbiol. 2009 Mar; 49: 84–88.
- 18- Torane V, Kuyare S, Nataraj G, Mehta P, Dutta S, Sarkar B. Phenotypic and antibiogram pattern of *V. cholerae* isolates from a tertiary care hospital in Mumbai during 2004–2013: a retrospective cross-sectional study. BMJ Open. 2016 Nov; 6(11).
- 19- Rashed SM, Mannan SB, Johura F, Tarequl Islam M, Sadique A, Watanabe H, et al. Genetic characteristics of drug-resistant *Vibrio cholerae* O1 causing endemic cholera in Dhaka, 2006–2011. J Med Microbiol. 2012 Dec; 61(12): 1736–1745.
- 20- Das S, Choudhry S, Saha R, Ramachandran VG, Kaur K, Sarkar BL. Emergence of multiple drug resistance *Vibrio cholerae* O1 in East Delhi. J Infect Dev Ctries. 2011 Mar; 5(4): 294-298.
- 21- Tran HD, Alam M, Trung NV, Kinh NV, Nguyen HH, Pham VC, et al. Multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1 variant El Tor isolated in northern Vietnam between 2007 and 2010. J Medical Microbiol. 2012 Mar; 61(3): 431–437.
- 22- Mercy N, Mohamed AA, Zipporah N, Chowdhury G, Pazhani GP, Ramamurthy T, et al. Phenotypic and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolated from various regions of Kenya between 2007 and 2010. Pan Afr Med J. 2014 Sep; 19: 8.
- 23- Mandal J, Dinoop KP, Parija SC. Increasing Antimicrobial Resistance of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Strains Isolated in a Tertiary-care Centre in India. J Health Popul Nutr. 2012 Mar; 30(1): 12-16.
- 24- Sjölund-Karlsson M, Reimer A, Folster JP, Walker M, Dahourou GA, Batra DG. Drug-Resistance Mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 Outbreak Strain, Haiti, 2010. Emerg Infect Dis. 2011 Nov; 17(11): 2151-2154.
- 25- Eibach D, Herrera-Le n S, Gil H, Hogan B, Ehlkes L, Adjabeng M, et al. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* associated with a large cholera outbreak in Ghana in 2014. PLoS Negl Trop Dis. 2016 May; 10(5).
- 26- Smith AM, Njanpop-Lafourcade BM, Mengel MA, Sauvageot D, Bidjada B, Miwanda BN. Comparative characterization of *Vibrio cholerae* O1 from five sub-saharan african countries using various phenotypic and genotypic techniques. PLOS ONE. 2015 Nov; 10(11).
- 27- Shrestha UT, Adhikari N, Maharjan R, Banjara MR, Rijal KR, Basnyat SR. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city. BMC Infectious Diseases. 2015 Feb; 15:104.
- 28- Uppal B, Mehra B, Panda PS, Kumar SK. Changing epidemiology and antimicrobial resistance pattern of *Vibrio cholerae* isolates at a tertiary care health laboratory in North India (2011–2015). Trop J Med Res. 2017 July-Dec; 20(2): 132-138.

- 29- Rahbar M, Saboorian R, Saremi M, Abbasi M, Masoumi Asl H, Soroush M. Evaluation of epidemiological aspect antibiotic resistance of *Vibrio cholerae*, biotype El Tor, serotype Inaba in the outbreak summer of 1384 in Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2007; 7(1): 41-45. (Full text in Persian)
- 30- Rahbar M, Zahraei M, Omidvarnia A, Afshani M.T, Ghalami M, Sabourian R. Survey of epidemiology and bacteriology features of cholera in Iran. Asian Pac J Trop Med. 2010 Jan; 3(1): 45-47.
- 31- Salimi-Khorashad A, Tabatabaee M, Amirabadi A, Roudbar-Mohamadi S. *Vibrio cholerae* and changing of microbial resistance patterns in sistan and balouchestan province. zjrms. 2012 Jun; 14(8): 63-66.
- 32- Barati H, Moradi G, Aziz Rasouli M, Mohammadi P. Epidemiologic and drug resistance pattern of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, serotype ogawa, in the 2011 cholera outbreak, in Alborz province, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015 Nov; 8(11).
- 33- Hajia M, Rahbar M, Rahnamye Farzami M, Masoumi H, Dolatyar A, Imani M. Assessing clonal correlation of epidemic *Vibrio cholerae* isolates during 2011 in 16 provinces of Iran. Curr Microbiol. 2015 Mar; 70(3): 408-414.
- 34- Rafiei Tabatabaei S, Salimi-Khorashad A. Antimicrobial resistance patterns of *Vibrio cholerae* strains isolated from afghan and iranian patients in Iran. Int J Infect. 2015 Jan; 2(1).
- 35- Rahbar M, Saboorian R, Van de Velde S, Rahnamaye Farzami M, Mardani M. In vitro activity of temocillin and other antibiotics againts *Vibrio cholerae* isolates from Iran. 28th ECCMID. 2018; Poster n. 1143.
- 36- Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. J Antimicrob Chemother. 2009 Feb; 63(2): 243-245.
- 37- Mala W, Faksri K, Samerpitak K, Yordpratum U, Kaewkes W, Tattawasart U. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand. Infection, Genetics and Evolution. 2017 Aug; 52: 89-95.
- 38- Udyavara V, Sivadasan SM, Muthappa DM, Shivakumaraswamy SK, Venugopal MN. Prevalence and genomic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from molluscan shellfish and their inhabiting water of coastal karnataka, India. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016 Nov; 5(11): 173-182.
- 39- Rather MA, Aulakh RS, Singh Gill JP, Mir AQ, Hassan MN. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. Asian Pac J Trop Med. 2012 Sep; 5(9): 709-712.
- 40- Michalova E, Novotna P, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. Vet Med. 2004 Mar; 49(3): 79-100.
- 41- Folster JP, Katz L, McCullough A, Parsons MB, Knipe K, Sammons SA. Multidrug-Resistant IncA/C Plasmid in *Vibrio cholerae* from Haiti. Emerg Infect Dis. 2014 Nov; (20)11: 1951-1953.
- 42- Ramachandran D, Bhanumathi R, Singh DV. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae*. J Med Microbiol. 2007 Mar; 56(3): 346-351.
- 43- Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Mehboob A, Mackie RI. Detection of tetracycline resistance genes by PCR methods. Methods Mol Biol. 2004; 268: 3-13.