نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهارو تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۵۵-۴۵

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

الگوی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی در اصفهان

شایان ارباب زاده[۱]، مجید غلامی آهنگران[۲*]، آسیه احمدی دستگردی[۳]

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

چکیده

بیماری کلی باسیلوز با عامل اشریشیاکلی یکی از بیماری های شایع عفونی در پرندگان است. فلوروکینولون ها و سولفونامیدها به طور عمده در درمان بیماری های عفونی و از جمله کلی باسیلوز در طیور و پرندگان زینتی استفاده می شوند و از نظر بهداشت عمومی نیز واجد اهمیت هستند. به منظور ارزیابی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن های اصلی دخیل در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی علیه سولفونامیدها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها، ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از کبد و قلب پرندگان زینتی جمع آوری شد. پرگنه‌های جدا شده با تست های تکمیلی میکروبی و بیوشیمیایی تایید و خالص سازی شد. کلنی های خالص بر روی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شد و با آنتی بیوتیک های تجاری دیسک گذاری شد. در مرحله بعد، از باکتری های خالص شده DNA استخراج شد و با پرایمر های اختصاصی به تکثیر ژن های *Aac(3)-IV*، *qnrA* و *Sul1* پرداخته شد. نتایج نشان داد ۸۰ درصد باکتری های جداشده به حداقل ۲ آنتی بیوتیک مقاوم هستند و ۱۲ درصد سویه ها به ۱۳ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاوم هستند. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین و انروفلوکساسین و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و لینکواسپکتین مشاهده شد. بررسی ژن های مقاومت نشان داد که حدود ۷۱ درصد سویه های مقاوم علیه انروفلوکساسین واجد ژن *qnrA* و ۶۴ درصد سویه های مقاوم علیه سولفونامیدها بعلاوه تری متوپریم حاوی ژن *Sul1* بودند. همچنین، ۳۳ درصد سویه های مقاوم علیه جنتامایسین حامل ژن *Aac(3)-IV* بودند. در این بررسی سویه های مقاوم فاقد ژن های مقاومت نیز یافت شد که نشان از اهمیت سایر ژن های مقاومت در بروز مقاومت علیه سولفونامید ها و فلوروکینولون ها است. لذا با توجه به درصد بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی در تست های معمول آنتی بیوگرام و با روش مولکولی، می توان نتیجه گیری کرد که عدم موفقیت درمان بیماری های عفونی در این پرندگان ممکن است به دلیل وجود مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده و احتمال انتشار ژن های مقاومت باشد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، پرندگان زینتی، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی

*نویسنده مسئول : مجید غلامی آهنگران

آدرس: دانشکده دامپزشکی ، واحد شهر کرد، دانشگاه ازاد اسلامی ،شهرکرد،،ایران

پست الکترونیکی : mgholami6@gmail.com

مقدمه

جنس اشرشیا، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان جزئی از فلور طبیعی در روده بزرگ انسان و حیوانات وجود دارد. اشریشیاکلی، یک باسیل گرم منفی تاژک دار و متحرک است که بعضی از سویه های آن کپسول دارند (Nolan et al., 2020). این باکتری به عنوان عضو مهم فلور طبیعی روده، در طول عمر حضور دارد. این باکتری علاوه بر مشکلات گوارشی، می تواند به صورت فرصت طلب در خارج از دستگاه گوارش سبب بیماری‌هایی مانند بیماری‌های دستگاه ادراری گردند و به عنوان یک باکتری فرصت طلب سبب عفونت های زخم، پنومونی، منتژیت و سپتی سمی در انسان شوند. در بررسی میکروبی، حضور اشریشیاکلی شاخص قابل اطمینان از آلودگی مدفوعی آب است و خطر ابتلا به بیماری های منتقله از طریق آب را نشان میدهد (Shahiri et al., 2018).

کلی باسیلوز یکی از مهم ترین بیماری های ماکیان است که توسط سویه های مختلف اشریشیاکلی ایجاد می شود. این بیماری در پرندگان عمدتا با وجود ضایعات پری کاردیت، پری هپاتیت، پری تونیت و سپتی سمی مشخص می شود. تلفات، دارو درمانی، کاهش رشد و ضریب تبدیل غذایی و نیز افزایش استعداد به سایر بیماری‌های عفونی از دیگر مشخصه‌های این بیماری است (Kashif et al., 2013; Nolan et al., 2020). آنتی بیوتیک‌ها به طور وسیع برای درمان و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در بیماری کلی باسیلوز، در پرندگان استفاده می شوند. علاوه بر آن، آنتی بیوتیک ها به عنوان محرک رشد و پیشگیری از بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند. مصرف گسترده و بعضا طولانی مدت با عدم رعایت دوزهای موثر می تواند باعث مقاومت پیش رونده علیه آنتی بیوتیک‌ها شود. مبنای ژنتیکی بروز مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص است و بیشتر بین یک گونه یا بین انواع مختلف باکتری‌ها توسط اجزای ژنتیکی پلاسمید، اینتگرون و ترانسپوزون قابل انتقال است (Miles et al., 2006). پلاسمیدها اجزای خارج کروموزومی هستند که می توانند به طور مستقل تکثیر کنند. ترانسپوزون‌ها توالی کوتاهی از مولکولDNA موجود در پلاسمید هستند که از طریق ترانسپوزیشن به سایر پلاسمیدها و یا کروموزوم ها منتقل می‌شوند (Suarez-Perez et al., 2021). فاکتورهای انتقال مقاومت می‌توانند مسئول مقاومت نسبت به یک یا چند آنتی بیوتیک باشند. به طور کلی برای انتقال افقی مواد ژنتیکی و پلاسمیدها از یک باکتری به باکتری دیگر و ایجاد مقاومت روش های مختلفی مانند القا یا جابه جایی، الحاق، تغییر شکل و تغییر محل وجود دارد که در نهایت می تواند باعث تولید یک آنزیم خاص، تغییر در نفوذ پذیری میکروارگانیسم نسبت به دارو، انتقال فعال دارو به خارج، تغییر در گیرنده‌های دارویی و تغییر مسیر متابولیکی در باکتری مقاوم و تغییر در آنزیم هدف شود (Jacoby et al., 2015; Gholami-Ahangran & Zia-Jahromi, 2014).

مقاومت به آنتی بیوتیک ها به خصوص مقاومت چند دارویی و پتانسیل دریافت فاکتورهای مقاومت توسط باکتری‌های انسانی یک نگرانی بهداشتی در تمام کشورها است. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های متنوع در طول دوره پرورش پرندگان زینتی به منظور کنترل بیماری های عفونی زمینه را برای بروز مقاومت میکروبی چندگانه فراهم کرده است (Gholami-Ahangran & Zia-Jahromi, 2014). از طرفی انتقال پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت ممکن است حامل چند ژن مقاومت باشد یا اینکه یک ژن، پروتئین های

مختلفی را کد کند که عملکرد چندگانه داشته باشند و به طور همزمان باکتری، تحمل بالایی را نسبت به چند آنتی بیوتیک نشان دهد. به عنوان مثال ممکن است ژن‌های مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها در پلاسمیدهای حاوی چند ژن مقاومتی یافت می شوند. این ژن¬ها شامل بتالاکتامازهای وسیع الطیف، آنزیم‌های ampc و کاربا‌پنم‌ها می‌باشد (Omidvar Panah et al., 2018). همچنین ژن کد کننده واریته ای از آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز به نام acc(6)-Ib-cr دارای عملکرد دوگانه است و علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در ایجاد مقاومت علیه فلوروکینولون‌ها نیز اثر دارد (Omidvar Panah et al., 2018). این ژن درون کاست‌های ژنی مرتبط با انتگرون‌های واقع در پلاسمیدهای دارای مقاومت چندگانه یافت می‌شود که انتقال این ژن‌ها به محصولات غذایی انسان می تواند باعث بروز مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده علیه آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در درمان بیماری‌های عفونی انسان مانند فلوروکینولون‌ها شود. قبلا نشان داده شده که مقاومت های چندگانه در اشریشیاکلی امکان پذیر است و گزارش‌های متفاوتی در اشریشیاکلی جدا شده از موارد بیماری پرندگان و گوشت طیور از ایران و سراسر جهان وجود دارد (Costa et al., 2009; Jafari et al., 2015) که نشان دهنده فراگیر بودن این خطر جدی است.

مقاومت باکتری نسبت به سولفامیدها معمولا توسط ژن‌های Sul1، Sul2 و Sul3 ایجاد می‌شود که در باکتری های گرم منفی مانند اشریشیاکلی در انسان و حیوان وجود دارد. این ژن‌ها ازطریق ترانسپوزون و پلاسمید های بزرگ قابل انتقال هستند (Mojaver Rostami et al., 2018). در خانواده انتروباکتریاسه مقاومت در برابر سولفونامیدها توسط ۳ ژن کنترل می‌شود. ژن Sul1 قسمتی از اینتگرون کلاس یک هست که شایع‌ترین اینتگرون جداشده از آنتروباکتریاسه ها هست به همین علت Sul1 بارزترین نقش را در ایجاد مقاومت نسبت به سولفونامیدها دارد (Horri & Gholami-Ahangaran, 2022). مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها نیز با ژن‌های مختلفی مانند qnrA، qnrB، qnrC، qnrD، qnrS و qnrV و چندین نوع دیگر ایجاد می شود. ژن¬های مقاوم نسبت به کوینولون ها در جدایه های مختلف آنتروباکتریاسه در سراسر جهان یافت شده اند که بیشترین آن در اشریشیاکلی عنوان شده است (Horn et al., 2017). پروتئین خالص شده qnr به دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ به منظور ممانعت از عمل آنتی بیوتیک¬های کینولون باند شده و از آن ها محافظت می¬کند و باعث ایجاد مقاومت می‌شود (Tran et al., 2005).

هدف از این پژوهش بررسی و تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی تلف شده در اصفهان است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

در این پژوهش مقطعی طی مدت یک سال، از فروردین ۱۴۰۰ تا فروردین ۱۴۰۱ از بین مجموع سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان زینتی تلف شده و ارجاع شده به آزمایشگاه ها و کلینیک های خصوصی دامپزشکی، ۵۰ سویه به طور تصادفی انتخاب شد. سویه های انتخاب شده از سطح قلب و کبد با علایم پرخونی، پری هپاتیت و پری کاردیت جداسازی شده بودند. پرندگان زینتی نمونه گیری شده از خانواده طوطی سانان شامل مرغ عشق، کاسکو، طوطی سبز، عروس

هلندی، و طوطی کوتوله برزیلی و از خانواده گنجشک سانان شامل قناری و فنچ بودند.

شناسایی اشریشیاکلی

به منظور شناسایی باکتری اشریشیاکلی در نمونه مورد نظر با سواب یا انس استریل در کنار شعله با تلقیح بر روی نمونه مورد نظر، بر روی محیط کشت مک کانکی بصورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در صورت رویت شدن پرگنه های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ)، با رنگ آمیزی گرم، باسیل های گرم منفی تایید شد. از پرگنه های مشکوک بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (Eosin methylene blue) EMBبصورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی کردند به صورت اولیه به عنوان باکتری اشریشیاکلی شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه ها تستهای افتراقی IMVIC انجام شد. پرگنه هایی که از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد،VP و احیای سیترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی باشند به عنوان اشریشیاکلی شناسایی می‌شوند (Gholami-Ahangaran and Zia-Jahromi, 2014).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری جدا شده نسبت به داروهای آنتی بیوتیک‌های رایج، از روش انتشار دیسکی ساده به روش استاندارد کربی بوئر استفاده شد (Hudzicki, 2009). معمولا" این روش بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری بر روی محیط کشت جامد استوار است.

در این آزمون از محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و دیسک های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب، ایران) استفاده شد که شامل: انروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، سولفونامید + تری متوپریم، فلورفنیکل(۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، اکسی تتراسیکلین(۳۰ میکروگرم)، لینکواسپکتین(۱۵/۲۰۰ میکروگرم)، داکسی سیکلین(۳۰ میکروگرم)، دیفلوکساسین(۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، نئومایسین(۳۰ میکروگرم)، کلستین (۱۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم) است.

برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری را بر روی محیط مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی TSBمنتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای تهیه کدورت نیم مک فارلند انکوبه شدند.

پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند روی محیط مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد. پس از گذشت تقریبا ۱۰ دقیقه، دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار داده شد و پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انگوبه گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک اندازه گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی قرائت شد (CLSI).

شناسایی ژن‌های مقاومت علیه آنتی بیوتیک ها

استخراج DNA

در این بررسی استخراج DNA از جدایه های مورد نظر به روش جوشانیدن طبق دستورالعمل زیر انجام شد (۱). ۵۰۰ میکرولیتر PBS را در داخل میکروتیوب یک و نیم میلی لیتری ریخته و سپس چند لوپ از کشت جامد)محیط لوریا برتانی ۲۴ ساعته) جدایه های مورد نظر به میکروتیوب اضافه و سوسپانسیون یکنواختی از آن تهیه گردید.

میکروتیوبهای حاوی سوسپانسیون در سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و بعد از این مرحله مایع رویی دور ریخته شد.

مراحل یک و دو تکرار گردید.

به میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس ادتا (Tris-EDTA; TE) اضافه شد و سپس سوسپانسیون یکنواخت گردید.

میکروتیوب حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد.

بعد از عمل لیز باکتری به وسیله جوشانیدن، میکروتیوب در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از میکروتیوب برداشته و به میکروتیوب جدید منتقل و سپس این میکروتیوب در یخچال ۲۰- درجه سانتیگراد برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری گردید.

مراحل انجام PCR

به منظور شناسایی وضعیت مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیکهای دسته فلوروکینولونها، سولفونامیدها و جنتامایسین، ژن های مربوط به مقاومت نسبت به کینولون ها (qnr)، سولفونامیدها (Sul1) و جنتامایسین (Aac-3-IV) در نمونه های مورد بررسی مورد تکثیر قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل۲/۵ میکرولیتر PCR بافر X10، 5/1 میلی مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مول dNTP، 100 نانوگرم DNA الگو، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq Polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده سازی شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر اپندورف آلمان انجام شد.

برنامه دمایی واکنش PCR به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، و ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه، همسرشت سازی در دمای ۵۰ برای تکثیر ژن (qnrA)، ۴۷ (برای تکثیر ژن Sul1) و ۵۵ (برای تکثیر ژن Aac(3)-IV) درجه سانتی گراد برای ۹۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه به همراه گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصول PCR رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (۰/۳ گرم آگارز در ۲۵ میلی لیتر بافر ۱TBE X حل شد) الکتروفورز شد و با UV doc مشاهده و ثبت شد.

جدول شماره۱- اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشریشیاکلی*

آنتی بیوتیک	ژن مقاومت	توالی (`۵ به `۳)	اندازه محصول	منبع
کینولون ها	*qnrA*	F:GGGTATGGATATTATTGATAAAG R:CTAATCCGGCAGCACTATTTA	٦٧٠	Horn et al., 2015
سولفونامیدها	*Sul1*	F:TTCGGCATTCTGAATCTCAC R:ATGATCTAACCCTCGGTCTC	٨٢٢	Van et al., 2008
جنتامایسین	*Aac(3)-IV*	F: CTTCAGGATGGCAAGTTGGT R:TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	٢٨٦	

بحث و نتیجه گیری

شناسایی اشریشیاکلی

سویه‌های مورد بررسی از جهت خصوصیات میکروسکوپی، کشت بر روی محیط مک کانکی و EMB مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تایید، تست‌های بیوشیمیایی IMVIC در مورد آنها انجام شد. تمامی ۵۰ سویه مورد بررسی به صورت باسیل گرم منفی، با ایجاد رنگ ارغوانی بر روی محیط کشت مک کانکی و ایجاد جلای سبز فلزی بر روی EMB تایید اولیه شدند و تست IMVIC را به صورت ایندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیترات منفی نشان دادند.

مقاومت آنتی بیوتیکی

پس از انجام آنتی بیوگرام، سویه های مورد نظر کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به جنتامایسین (۶ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۷۸ درصد) نشان دادند. در این بررسی ۸۰ درصد سویه ها حداقل به دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۱۲ درصد سویه‌ها به تمامی ۱۳ آنتی بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی بیوگرام، مقاومت نشان دادند. نتایج آنتی بیوگرام در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- فراوانی (درصد) مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از تلفات پرندگان زینتی در اصفهان

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
انروفلوکساسین	۳۸ (۷٦)*	۷ (١٤)	۵ (١٠)
سولفونامید+ تری متوپریم	۲۸ (٥٦)	۷ (١٤)	۱۵ (۳۰)
فلورفنیکل	۲۷ (٥٤)	٤ (٨)	۱۹ (۳۸)
تتراسایکلین	۳۹ (۷۸)	٦ (١٢)	۵ (١٠)
آمپی سیلین	۲۷ (٥٤)	۳ (٦)	۱۰ (۲۰)
جنتامایسین	۳ (٦)	۱ (۲)	٤٦ (۹۲)
نئومایسین	۳۰ (٦٠)	۱۰ (۲۰)	۱۰ (۲۰)
لینکواسپکتین	۱۹ (۳۸)	٦ (١٢)	۲۵ (٥٠)
اکسی تتراسایکلین	۳۷ (۷٤)	۳ (٦)	۱۰ (۲۰)
کلرامفنیکل	۲۲ (٤٤)	۸ (١٦)	۲۰ (٤٠)
کلستین	۲۷ (٥٤)	۱۲ (۲٤)	۱۱ (۲۲)
دیفلوکساسین	۲۳ (٤٦)	۷ (١٤)	۲۰ (٤٠)
داکسی سیکلین	۲۰ (٤٠)	۵ (١٠)	۲۵ (٥٠)

ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی

در الکتروفورز محصول PCR قطعات ژنومی ۸۲۲ (شکل ۱)، ۶۷۰ (شکل ۲) و ۲۸۶ (شکل ۳) جفت بازی مربوط به ژن های Sul1، qnrA و Act(3)-IV تکثیر شد.

الکتروفورز محصول PCR نشان می دهد از مجموع ۵۰ سویه اشریشیاکلی مورد بررسی، ۳۶ درصد سویه ها (۱۸ سویه) حاوی ژن Sul1، 54 درصد سویه ها (۲۷ سویه) حاوی ژن qnrA و ۲ درصد سویه ها (یک سویه) حامل ژن Act(3)-IV بودند (جدول ۳). در این بررسی ۶۴/۲۸ درصد سویه های مقاوم به سولفونامید بعلاوه تری متوپریم (۱۸ سویه از ۲۸ سویه) حامل ژن Sul1 و ۷۱ درصد سویه های مقاوم به انروفلوکساسین (۲۷ سویه از ۳۸ سویه) حامل qnrA و ۳۳ درصد سویه های مقاوم به جنتامایسین (یک سویه از سه سویه) حامل Act(3)-IV بودند. ۱۰ سویه از ۲۸ سویه اشریشیاکلی مقاوم به سولفونامیدها (۳۵/۷۱ درصد) حامل ژن Sul1 و ۱۰ سویه از ۳۸ سویه مقاوم به انروفلوکساسین (۲۶/۳۱ درصد) حامل ژن qnrA نبودند. همچنین ۲ سویه از ۳ سویه اشریشیاکلی مقاوم به جنتامایسین حامل ژن Act(3)-IVنبودند.

جدول ۳- ارزیابی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی آنتی بیوتیکی در سویه های *اشریشیاکلی*

دسته آنتی بیوتیکی	فنوتیپ / ژنوتیپ	فراوانی (درصد)
فلوروکینولون	فنوتیپ (انروفلوکساسین)	۳۸ (۷۶)
	ژنوتیپ (*qnrA*)	۲۷ (۵٤)
سولفونامید	فنوتیپ (سولفونامید)	۲۸ (۵٦)
	ژنوتیپ (*Sul1*)	۱۸ (۳٦)
آمینوگلیکوزید	فنوتیپ (جنتامایسین)	۳ (٦)
	ژنوتیپ (*Act(3)-IV*)	۱ (۲)

بحث

نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از موارد تلفات پرندگان زینتی در اصفهان نشان می دهد که درصد بالایی از جدایه ها به آنتی بیوتیک های معمول و رایج در درمان بیماری های عفونی پرندگان و بعضا دسته آنتی بیوتیک های مورد استفاده در کنترل بیماری‌های عفونی انسان مقاومت نشان می‌دهند. مقاومت بالای ۷۰ درصدی در تتراسایکلین و انروفلوکساسین و نیز مقاومت بالای ۵۰ درصدی در برابر سولفونامید به همراه تری متوپریم نشان دهنده مقاومت بالای جدایه‌های اشریشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف پرکاربرد است. برای مقایسه داده های بدست آمده با سایر مطالعات مشابه بر روی پرندگان زینتی مطالعه جامعی در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی در پرندگان زینتی در ایران یافت نشد اما مطالعات دیگری در خصوص پرندگان صنعتی موجود است (Jacob et al., 2014; Jafari et al., 2015; Rafie & Nasirian, 2003; Zahraei Salehi et al., 2006) که تا حدودی از الگوی مشابه تبعیت می کند و نشان از توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشریشیاکلی دارد. مصرف گسترده انروفلوکساسین به تنهایی و مصرف همزمان با برخی از خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی می تواند دلیل این مقاومت بالا باشد که در درمان بیماری های عفونی پرندگان زینتی در سراسر ایران مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر آن، مطالعات خارج از کشور نیز نشان می دهد که این آنتی بیوتیک در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است (Horn et al., 2015; Sigirci et al., 2020; Suarez-Perez et al., 2021).

در مطالعه حاضر کمترین مقاومت نسبت به جنتامایسین (۶ درصد) و بعد از آن نسبت به لینکواسپکتین (۳۸ درصد) مشاهده شده است. در سایر مطالعات در داخل کشور نیز کمترین مقاومت نسبت به لینکواسپکتین گزارش شده شده است (Bozorgmehri Fard et al., 2007; Jafari et al., 2015; Saberfar et al., 2008; Zahraei-Salehi et al., 2006). کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین در مطالعه اخیر می‌تواند به دلیل مصرف کمتر جنتامایسین در پرندگان باشد چرا که این دارو به شکل تزریقی است و کمتر در پرندگان استفاده می شود. بهرحال، وجود مقاومت بالای آنتی بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، سولفونامید به همراه متوپریم، آمپی سیلین و داکسی سایکلین می تواند به دلیل استفاده متداول از این آنتی بیوتیک ها در درمان پرندگان زینتی باشد که تجویز پی در پی این آنتی بیوتیک‌ها، بعضا بدون انجام تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی باعث ظهور و گسترش میکروارگانیسم های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها شده است.

از آنجاییکه که ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در گسترش مقاومت در بین میکروارگانیسم‌ها نقش عمده‌ای دارند در مطالعه اخیر به پایش ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولون، سولفونامید و جنتامایسین که از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت هستند پرداخته شد. در مطالعه اخیر نیز میزان مقاومت نسبت به سولفونامیدها در تست آنتی بیوگرام ۵۰ درصد بوده است که از مجموع ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده ۱۸ سویه یا به عبارتی ۳۶ درصد واجد ژن Sul1 بودند. در این مطالعه ۶۴ درصد سویه های با فنوتیپ مقاومت علیه سولفونامیدها (۱۸ سویه از ۲۸ سویه) واجد ژن Sul1 بودند. وجود ژن Sul1 در ۶۴ درصد سویه های مقاوم علیه سولفونامیدها نشان می دهد

که تنها وجود Sul1 برای بروز مقاومت کافی نیست و ممکن سایر ژن ها مثل Sul2 و Sul3 نیز نقش داشته باشند. بهر حال مطالعات گذشته نشان می‌دهد که در بین ژن های مقاومت به سولفونامیدها Sul1 از فراوانی بالاتری برخوردار هست و قبلا نیز اهمیت ژن Sul1 در ایجاد مقاومت علیه سولفونامیدها در اشریشیاکلی نشان داده شده است که حاکی از اهمیت و فراوانی بالاتر این ژن نسبت به سایر ژن های مقاومت در برابر سولفونامیدها بوده است (Costa et al., 2009). قدمت استفاده از سولفامیدها در درمان بیماریهای پرندگان و امکان مصرف همزمان این آنتی بیوتیک با سایر آنتی بیوتیک های متداول می تواند دلیل گستردگی ژن های مقاومت در بین سویه‌های اشریشیاکلی باشد.

از طرفی، درصدهای بالای ردیابی ژن های مقاومت در مطالعه اخیر دلالت بر گسترش و توسعه مقاومت در اشریشیاکلی دارد که وجود ژن‌های مقاومت و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این میکروارگانیسم به عنوان شاخصی برای ارزیابی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در انسان و حیوانات به کار برده می شود به طوری که سویه های حامل ژن های مقاومت و بیماری زا می توانند به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت در محصولات طیور و مصرف کننده نهایی یعنی انسان باشند (Gholami-Ahangaran & Zia-Jahromi, 2014).

یکی از چالش های مهم در کنترل بیماری های عفونی در انسان و حیوانات مقاومت های چند دارویی هست که در مطالعه اخیر ۸۰ درصد سویه ها حداقل به دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۱۲ درصد سویه ها به تمامی ۱۳ آنتی بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی بیوگرام، مقاومت نشان دادند. در همین رابطه، Sigirci و همکاران در سال ۲۰۲۰ با بررسی ۲۰ سواب کلواک از پرندگان زینتی به ظاهر سالم و بررسی الگوی مقاومت دارویی نشان دادند که ۶۷ درصد سویه های اشریشیاکلی نسبت به ۳ آنتی بیوتیک یا بیشتر مقاومت داشتند (Sigirci et al., 2020). علاوه بر آن، Sauarez Perez در ۱۰۳ سویه اشریشیاکلی جدا شده از قناری به مقاومت چندگانه پرداخت و نشان داد ۳۹/۸ درصد حداقل به ۳ آنتی بیوتیک مقاومت داشته اند (Suarez perez et al., 2021). Horn و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز در ۵۵/۷ درصد سویه های اشریشیاکلی جدا شده از سواب کلواک و کالبدگشایی قناری های تلف شده مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه را گزارش نمودند (Horn et al., 2015).

نتیجه گیری

بطورکلی براساس یافته های این مطالعه می توان نتیجه گرفت که مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جدا شده از تلفات پرندگان بسیار گسترده است و در واقع مقاومت های بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های متداول وجود دارد. مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع دو نگرانی را به وجود می آورد اول اینکه مقاومت بالای آنتی بیوتیکی باعث عدم کارایی آنتی بیوتیک ها در کنترل بیماری های عفونی پرندگان می شود که منجر به تلفات و هزینه های بالای دارو درمانی می گردد و از طرفی دیگر، انتقال ژن های مقاومت به پاتوژن های انسانی، درمان بیماریهای عفونی را در انسان پیچیده می کند و نگرانی های جدی برای بهداشت عمومی ایجاد می کند. لذا توصیه بر این است که حتما در موارد بیماری های عفونی حساسیت آنتی بیوتیکی سنجیده شود و براساس حساسیت آنتی بیوتیکی داروی مناسب انتخاب شود. علاوه بر آن با رعایت دوز و دوره مصرف، الزامات موجود در خصوص تجویز آنتی بیوتیک ها رعایت شود و تا حد امکان از داروهایی که در پزشکی استفاده می شود استفاده نگردد.

منابع

1. Ahmed, O. B., & Dablool, A. S. (2017). Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. *International Journal of Bioassay*s, **6**: 5347-5349.
2. Bozorgmehri Fard, M.H., Karimi, V., Fathi, E., & Behmanesh, R., (2007). Bacteriologic survey on infectious cellulitis in broiler chickens in Masjid Soleiman slaughterhouse, Iran. *Archives of Razi Institute*, **62**: 91-95.
3. Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., & Saenz, Y. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, **138**: 339-344.
4. Ghaniei, A., Mojaverrostami, S., Lotfallahzadeh, B., Darzi Lemraski, M., Sepehrnia, P., & Imani Jajarmi, A., (2014). Geographical and seasonal variation in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken carcasses in Iran. *European Journal of Experimental Biology*, **4**: 173-177.
5. Gholami-Ahangaran, M., and Zia-Jahromi, N., (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). *Toxicology and industrial health*, **30:** 724-727.
6. Horri, M. and Gholami-Ahangaran, M., 2022. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antibiotic Resistance in Escherichia coli Strains Isolated from Broiler Chickens with Suspected Colibacillosis in Isfahan Province, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, **8**(3):193-201.
7. Horn, R.V., Cardoso, W.M., Lopes, E.S., Teixeira, R.S., Albuquerque, Á.H., Rocha-e-Silva, R.C., & Bezerra, W.G., (2015). Identification and antimicrobial resistance of members from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 552-556.
8. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, **15**: 55-63.
9. Jacoby, GA., Strahilevitz, J., & Hooper, D.C., (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, **2**:100-110.
10. Jafari, R., Ghanbarpour, R., Ghorbanpour Najaf Abadi, M., Mayahi, M., & Amani, A., (2015). Determination of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from healthy and colisepticemic broiler chickens in Ahvaz. *Iran Journal of Veterinary Microbiology*,**11**: 109-117.
11. Kashif, J., Buriro, R., Memon, J., Yaqoob, M., Soomro, J., & Dongxue, D., (2013). Detection of class 1 and 2 integrons, β-lactamase genes and molecular characterization of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from poultry in China. *Pakistan Veterinary Journal*, **33**: 321-324.
12. Mooljuntee, S., Chansiripornchai, P., & Chansiripornchai, N., (2010). Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against *E. coli* isolated from Thai broilers. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, **40**: 311-315.
13. Mojaver Rostami, S., Ghaniei, A., & Mohammadi, V., (2018). Phenotypic and genotypic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens of Urmia to sulfonamides. *Iranian Veterinary Journal*, **13**: 86-91.
14. Miles, T., McLaughlin, W., & Brown, P. (2006). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, **2**: 2-7.

of antibiotic resistance pattern in *Escherichia coli* isolates from chicken meat that reared under conventional and without antibiotic condition. *Iran Journal of Food Microbiology*, **5**: 11-18.

22. Sigirci, B.D., Celik, B., Halac, B., Adiguzel, M.C., Kekec, I., Metiner, K., & Kahraman, B.B., (2020). Antimicrobial resistance profiles of Escherichia coli isolated from companion birds. *Journal of King Saud University-Science*, **32**: 1069-1073.
23. Suárez-Pérez, A., Corbera, J.A., González-Martín, M., Tejedor-& Junco, M.T., (2021). Multidrug-Resistant Phenotypes of *Escherichia coli* Isolates in Wild Canarian Egyptian Vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). *Animals*, **11**: 1692.
24. Tran, J.H., Jacoby, G.A., & Hooper, D.C., (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein *qnr* with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 118-125.
25. Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L.T., & Coloe, P.J., (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, **124**: 217-223.
26. Zahraei Salehi, T., & Farashi Bonab, S., (2006). Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *International Journal of Poultry Science*, **5**: 677-84.
15. Nolan, L.K., Vaillancourt, J., Barbieri, N.L., Logue, C.M. (2020). Colibacillosis. In: Swayne, DE; Boulianne, M; Logue, CM; McDougald, LR; Nair, V & Suarez, DL (Eds.), *Disease of Poultry*. (14th Edn.), Massachusetts, W.B. Publishing. PP. 770-790.
16. Omidvar Panah, M., Najafi, M., & Peymani, A., (2018). Plasmid-mediated quinolones resistance in clinically important bacteria. *Journal of Qazvin University of Medical Science*, **22**: 90-99.
17. Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K.E., Catry, B., Van, D., & Sanders, P., (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfers from companion animals. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **72**: 957–968.
18. Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M. E., & Khan, A.A., (2012). Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 5444-5447.
19. Rafiei Tabatabaei, R., & Nasirian, A., (2003). Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from chicken flocks. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* **2**: 39-42.
20. Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K., & Dolatshahi, F.T., (2008). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken flocks, 2005–2006. *Journal of Applied Poultry Research*, **17**: 302-304.
21. Shahiri, M., Gholami-Ahangaran, M., & Rahimi, E., (2018). The comparing

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

The phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from companion birds in Isfahan

Shayan Arbabzadeh[1], Majid Gholami-Ahangaran[2], Asiye Ahmadi-Dastgerdi[3]

1. Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Assistance Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch,

Received:6October 2022 *Accepted: 29 May 2023*

Abstract

Fluoroquinolones and sulfonamides are mainly used in the treatment of infectious diseases of poultry and pet birds and are also important in public health. To evaluating the level of antibiotic resistance and the main genes involved in antibiotic resistance against sulfonamides, aminoglycosides and fluoroquinolones, 50 strains of Escherichia coli (E. coli) isolated from the liver and heart of pet birds were collected. The isolates were confirmed and purified with additional microbial and biochemical tests. After that, the pure colonies were cultured on Mueller Hinton's medium and disked with commercial antibiotics. In the next step, DNA was extracted from the purified bacteria and Aac (3)-IV, qnrA and Sul1 genes were amplified with specific primers. The results showed that 80% of the isolated bacteria are resistant to at least 2 antibiotics and 12% of the strains are resistant to 13 antibiotics. In this study, the highest antibiotic resistance to tetracycline and enrofloxacin and the lowest antibiotic resistance to gentamicin and lincospectin were observed. Examination of resistance genes showed that about 71% of the strains resistant to enrofloxacin contained the qnrA gene and 64% of the strains resistant to sulfonamides and trimethoprim contained the Sul1 gene. Also, 33% of gentamicin resistant strains carried the Aac(3)-IV gene. In this study, resistant strains without resistance genes were also found, which shows the importance of other resistance genes in the occurrence of resistance against sulfonamides and fluoroquinolones. Therefore, it concluded that the failure to treat infectious diseases in pet birds may be due to the presence of widespread antibiotic resistance and the possibility of the spread of resistance genes.

Keywords: Escherichia coli, Pet birds, Antibiotic resistance genes

** Corresponding author: Majid Gholami-Ahangaran*
Address: Department of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
Email: mgholami6@gmail.com