نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۱۲۵-۱۱۱

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی مقاومت داروئی جدایه‌های *اشریشیا کلای* از ضایعات تیپیک کلی باسیلوز طیور و جستجوی ژن‌های مقاومت به فلورفنیکل (*floR, fexA, cfr*) و کلیستین (*mcr-1*) در بین جدایه‌ها

پگاه والی تبار[۱]، سید مصطفی پیغمبری*[۲]، جمشید رزم یار[۳]، عباس برین[۴]، اعظم یزدانی[۵]، فتانه نادری نژاد[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه بیماری‌های طیور ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- استاد گروه بیماری‌های طیور ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار گروه بیماری‌های طیور ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- استادیار گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵- کارشناس گروه بیماری‌های طیور ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷

چکیده

اشریشیا کلای، عامل بیماری کلی‌باسیلوز در طیور می‌باشد که خسارات سنگینی را به صنعت طیور تحمیل می‌نماید و از دلایل اصلی مصرف دارو و رخداد بیشتر مقاومت داروئی است. به منظور کاهش مقاومت داروئی به عنوان یک مشکل جهانی و برقراری هر چه بیشتر سلامت انسان، حیوان و محیط زیست، بررسی دوره‌ای میزان مقاومت‌های داروئی ضروری است. هدف از این مطالعه بررسی میزان مقاومت جدایه‌های *اشریشیا کلای* طیور گوشتی به ترکیبات ضدمیکروبی و همچنین ردیابی ژن‌های مقاومت فلورفنیکل (*cfr, fexA, floR*) و کلیستین(*mcr-1*) در بین جدایه‌ها بود. تعداد ۱۰۰ جدایه از *اشریشیا کلای* به‌دست آمده از جراحات تیپیک کلی‌باسیلوز از طیور ارجاع شده به یک آزمایشگاه خصوصی شهر تهران و بانک ذخیره‌ی دانشگاه جمع‌آوری و مقاومت داروئی به ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی شامل آمپی‌سیلین، نئومایسین، جنتامایسین، انروفلوکساسین، فلومکوئین، دی‌فلوکساسین، کلرامفنیکل، فلورفنیکل، فوزباک، اریترومایسین، کلیستین، تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین، تری متوپریم+سولفا، لینکواسپکتین و داکسی‌سایکلین، با روش دیسک دیفیوژن انجام پذیرفت. سپس، DNA کروموزومی و پلاسمیدی جدایه‌ها استخراج و ژن‌های مقاومت فلورفنیکل (*floR, fexA, cfr*) و کلیستین (*mcr-1*) در بین تمامی جدایه‌ها با روش PCR ردیابی شد. بر اساس نتایج آزمایش حساسیت داروئی، بیشترین میزان مقاومت به‌دست آمده مربوط به اریترومایسین، داکسی‌سایکلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به سه ترکیب لینکواسپکیتن، جنتامایسین و فوزباک بود. همه‌ی جدایه‌ها حداقل به یک ترکیب ضدمیکروبی و ۱۰٪ جدایه‌ها حداقل به ۱۲ ترکیب ضدمیکروبی مقاوم بودند. در این مطالعه ۱۶٪ از جدایه‌ها دارای الگوی مقاومت یکسان و ۳۵٪ جدایه‌ها هرکدام دارای الگوی مقاومت جداگانه‌ای بودند. همچنین از بین ۸۵ جدایه در این مطالعه، ۴۰٪ و ۵۲/۹۴٪ جدایه‌ها ژن مقاومت به *floR* را، به ترتیب، بر روی پلاسمید و کروموزوم خود داشتند و هیچ جدایه‌ای از نظر وجود ژن‌های مقاومت *fexA* ، *cfr* و *mcr-1* مثبت نبود. نتایج این مطالعه مقاومت بالای جدایه‌های *اشریشیا کلای* به‌دست آمده از موارد کلی‌باسیلوز طیور را به ترکیبات رایج ضدمیکروبی در صنعت طبور ایران نشان داد. ردیابی ژن‌های مقاومت آگاهی محققین را در خصوص اپیدمیولوژی مقاومت داروئی افزایش می‌دهد. این اطلاعات لزوم اجرای برنامه‌های مدیریتی صحیح برای مرغداری‌ها و مصرف درمانی منطقی ترکیبات ضدمیکروبی را در کنار پایش دوره‌ای میزان مقاومت‌ها خاطرنشان می‌سازد.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلای*، فلورفنیکل، کلی باسیلوز، کلیستین، مقاومت داروئی

*نویسنده مسئول: سید مصطفی پیغمبری
آدرس: گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیک: mpeigham@ut.ac.ir

مقدمه

کلی باسیلوز نام کلی عارضه ای است که به صورت موضعی یا سیستمیک در طیف وسیعی از پرندگان توسط باکتری *اشریشیا کلای* ایجاد می‌شود. این عارضه در طیور گوشتی به علت دستکاری‌های ژنتیکی به منظور گوشت دهی بیشتر و در نتیجه همسان نبودن روند رشد با سطح ایمنی و مستعد شدن پرنده به درگیری‌های تنفسی بروز بیشتری دارد. از جمله عفونت‌های ایجاد شده توسط *اشریشیا کلای* در طیور می‌توان به التهاب بند ناف کلیفرمی، عفونت کیسه زرده، سلولیت کلیفرمی، سندرم کله بادی (Swollen head syndrome)، بیماری اسهال، کلی باسیلوز مقاربتی، سالپنژیت و پریتونیت کلیفرمی، التهاب بیضه و اپیدیدیم کلیفرمی که به صورت موضعی، و کلی سپتی‌سمی که به صورت سیستمیک بروز می کند، اشاره کرد (۲۱،۲۰). باکتری *اشریشیا کلای* فلور طبیعی روده پرندگان و پستانداران بوده و در اثر یک عامل مستعد کننده‌ی در میزبان یا محیطی از جمله استرس مراحل مختلف پرورش و همچنین وجود فاکتورهای حدت در باکتری می‌تواند منجر به بروز بیماری حاد شود و خسارت اقتصادی زیادی به بار آورد. برخی فاکتورهای حدت از جمله چسبندگی به مخاطات، تولید همولیزین، تولید آئروباکتین، تولید کپسول پلی‌ساکارید k1، توانایی تولید کلیسین، پروتکتین‌ها، تولید توکسین‌ها، وجود پلاسمیدهای با وزن مولکولی زیاد، عوامل اتصالی، مقاومت دارویی و غیره سبب حدت هر چه بیشتر این باکتری می شوند و به بقای این باکتری در بدن میزبان کمک می کنند. این بیماری ضرر و زیان اقتصادی بالائی را به صنعت طیور وارد می کند که همین امر زمینه ساز مصرف هر چه بیشتر ضدمیکروبی‌ها به منظور درمان و پیشگیری می‌باشد (۲۱،۲۰). مصرف غیر اصولی ضدمیکروبی‌ها از نظر غلظت، مدت زمان مصرف و نوع داروی ضد میکروبی مصرفی، زمینه ساز بروز مقاومت داروئی و مشکلات بهداشتی برای صنعت طیور، محیط زیست و سلامت انسان‌ها می‌شود و علاوه بر ضررهای اقتصادی، سبب غالب شدن جدایه‌های مقاوم می گردد البته با وجود همه‌ی این ضررها نمی‌شود از استفاده‌ی درست و درمانی ضدمیکروبی‌ها غافل شد که بدین منظور می‌بایست تجویز دارو به صورت اصولی و با شناخت کافی از میکروارگانیسم و نتایج آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی باشد (۱۸). اگر درمان داروئی برای یک میکروارگانیسم موفق نباشد و علت این عدم موفقیت نیز تنها به رابطه‌ی بین دارو و میکروارگانیسم مربوط باشد، جرم بیماری‌زا در اصطلاح مقاوم شده است. بروز مقاومت در باکتری می‌تواند ناشی از جهش‌های کروموزومی و یا تبادلات ژنتیکی باشد که به علت اجزای ژنتیکی متحرک رخ می‌دهد (۱۸). بعد از ممنوعیت استفاده از کلرامفنیکل، فلورفنیکل که فاقد مشکلات مرتبط به کلرامفنیکل بود، توسعه یافت اما به تدریج ژن‌های مقاومت فلورفنیکل در جدایه‌های گوناگون باکتری‌ها از جمله *اشریشیا کولای* پیدا شد (۲۸). کلیستین، آنتی‌بیوتیکی از نوع پلی‌میکسین E می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای بر علیه عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی با مقاومت چندگانه و تولیدکننده کاربانپنمار به کار می‌رود. البته در سالهای اخیر گزارش های مقاومت به کلیستین و وجود ژن مقاومت *mcr* در بین باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از سراسر جهان گزارش شده است (۱۹،۱۴،۱۱،۴،۳).

در این مطالعه نیز سعی بر آن است که میزان مقاومت به داروهای مختلف ضدمیکروبی سنجیده شود و همچنین با ردیابی ژن‌های مقاومت فلورفنیکل (*cfr,fexA,floR*)

و کلیستین (*mcr-1*)، به شناسائی ژن‌های دخیل در بروز مقاومت در این دو ترکیب ضدمیکروبی پرداخته شود.

مواد و روش کار

نمونه گیری، کشت باکتری‌شناسی و ذخیره سازی: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلای* از ضایعات تیپیک کلی باسیلوز طیور مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۴۳ جدایه از نمونه‌های متعلق به گله‌های طیور از شهرهای مازندران، تبریز و بابل بوده که از موارد پری هپاتیت از ناحیه‌ی کبد بدست آمد. اکثر این گله‌ها متعلق به طیور گوشتی بوده (۳۳ جدایه) و به تعداد کم از گله‌های طیور تخم گذار (سه جدایه) و مادر گوشتی (هفت جدایه) تهیه شدند. مابقی جدایه‌ها به تعداد ۵۷ جدایه از دیگر گله‌های موجود در کل ایران بوده که از قبل در بانک ذخیره‌ی آزمایشگاه گروه بیماریهای طیور دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۲ جمع آوری شده بود که از ضایعات پریکاردیت یا پری هپاتیت گله‌های گوشتی (۳۱ جدایه) و تخم گذار (پنج جدایه) و بوقلمون (هشت جدایه) و قرقاول (یک جدایه) بدست آمده بودند. برای جداسازی *اشریشیا کولای* از روش‌های استاندارد کشت باکتری استفاده شد و جدایه های حاصله پس از خالص سازی مجدد در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) کشت و سپس در گلیسرول ۵۰٪ به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد به منظور استفاده‌ی بعدی منتقل شدند (۱۲).

تعیین الگوی مقاومت داروئی: برای تعیین الگوی مقاومت داروئی تعداد ۱۰۰ جدایه‌ی *اشریشیا کلای* از طیور صنعتی، از روش کیفی دیسک دیفیوژن استفاده شد (۹،۸). تعداد ۱۶ عامل ضدمیکروبی مورد آزمایش و غلظت بالقوه آن‌ها (بر حسب میکروگرم) عبارت بودند از: اریترومایسین (۱۵)، انروفلوکساسین (۵)، فوزباک (۲۰۰)، فلومکوئین (۳۰)، نئومایسین (۳۰)، آمپی سیلین (۱۰)، تری متوپریم + سولفا (۱۲۵/۲۳/۷۵)، تتراسایکلین (۳۰)، اکسی تتراسایکلین (۳۰)، داکسی سایکلین (۳۰)، کلیستین (۱۰)، فلورفنیکل (۳۰)، کلرامفنیکل (۳۰)، دی فلوکساسین (۱۰)، جنتامایسین (۱۰)، لینکواسپکتین (۲۰۰/۱۵). تمامی دیسک‌های ضدمیکروبی از شرکت پادتن طب (بهار آزما، تهران) تهیه شدند به جز دیسک فوزباک که متعلق به شرکت Bedson (اسپانیا) بود.

جستجوی ژنهای مقاومت فلورفنیکل و کلیستین با روش Polymerase Chain Reaction (PCR): برای ردیابی ژن‌های مقاومت به فلورفنیکل (*fexA, floR, cfr*)، با توجه به این که این ژن‌ها در هر دو ناحیه‌ی کروموزوم و پلاسمید قرار دارند، DNA کروموزومی و پلاسمیدی همه جدایه ها استخراج شد. به منظور استخراج DNA کروموزومی باکتری جهت انجام PCR از روش جوشاندن استفاده شد (۲۲). هر جدایه اشریشیا کلای در محیط مک کانکی آگار کشت داده شد و سپس یک کلنی تک از باکتری به محیط آبگوشت LB منتقل شده و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. مقدار یک میلی لیتر از محیط‌های LB تلقیح شده به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه (B. Braun, Biotech- International, USA) سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی تخلیه و میزان ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به رسوب ته میکروتیوب اضافه و ورتکس شد. سپس محلول میکروبی ۱۰ دقیقه جوشانده و نهایتا به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه مجددا سانتریفیوژ شد. مایع روئی را که حاوی کروموزوم باکتری بود به میزان ۵۰ میکرولیتر در میکروتیوب استریل ذخیره و به منظور استفاده‌های بعدی در فریزر قرار داده شد.

به منظور استخراج پلاسمید جدایه‌ها، پروتکل کیت تجاری استخراج پلاسمید شرکت Molecular Biological System Transfer (تهران، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت برای هر جدایه ۵۰ میکرولیتر از بافر محتملا حاوی پلاسمید بدست آمد که به منظور استفاده‌ی بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

مخلوط واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های مقاومت فلورفنیکل شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse و شش میکرولیتر از آب دیونیزه عاری از DNase و سه میکرولیتر از DNAکروموزومی استخراج شده بود. مخلوط واکنش PCR برای ردیابی ژن مقاومت کلیستین (*mcr-1*) نیز شامل ۲۱ میکرولیتر مسترمیکس، نیم میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای Forward و Reverse و سه میکرولیتر از DNA پلاسمیدی استخراج شده بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. تمامی پرایمرها و مسترمیکس از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) تهیه شدند. روند سیکل‌های گرمایی برای انجام آزمون PCR برای رد یابی ژن‌های مقاومت فلورفنیکل به صورت زیر تنظیم گردید: مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه با ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال برای هر کدام از ژن‌های *floR*، *fexA* و *cfr* به ترتیب ۵۵ درجه، ۵۸ درجه و ۴۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه بود و در انتها نیز یک مرحله منفرد طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱).

روند سیکل‌های گرمایی برای انجام آزمون PCR برای ردیابی ژن مقاومت به کلیستین در دستگاه ترموسایکلر (SensoQuest, Germany) به صورت زیر تنظیم گردید: مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در انتها نیز یک مرحله منفرد طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱۹). نمونه های کنترل مثبت (۲۲) و کنترل منفی (dH2O به جای DNA) در هر واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp) فراورده PCR	منبع
flo	flo-F: 5'-ATGGCAGGCGATATTCATTA-3' flo-R: 5'-AAACGGGTTGTCACGATCAT-3'	۳۲۰	Adesoji and Call, 2020
fex	fex-F: 5'-GTACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA-3' fex-R: 5'-CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC-3'	۱۲۷۲	
cfr	cfr-F: 5'-TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA-3' cfr-R: 5'-ACCATATAATTGACCACAAGCAGC-3'	۷۴۶	
mcr-1	col-F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' col-R: 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	۳۰۸	Bista et al., 2020

ژل الکتروفورز: الکتروفورز فرآورده های PCR بر اساس روش های قبلا توصیه شده انجام شد (۲۳). بدین منظور از ژل آگارز ۱٪ برای ژن‌های مقاومت فلورفنیکل و ۱/۲ ٪ برای ژن مقاومت کلیستین حاوی رنگ SafeStain (یکتا تجهیزآزما، تهران، ایران) استفاده شد. جهت تعیین وزن ملکولی باند های مشاهده شده بر روی هر ژل از مارکر تجاری 100 bp DNA ladder (یکتا تجهیزآزما) استفاده شد با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (پایاپژوهش، تهران، ایران) و بافر TBE 1x جریانی به ظرفیت ۷۰ ولت به مدت به مدت ۱/۵ ساعت از ژل عبور داده شد. سپس باند های DNA روی ژل، بلافاصله با استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل (کیاژن، تهران، ایران) تصوبرداری شدند.

نتایج

تعیین الگوی مقاومت داروئی: نتایج حاصل از تست حساسیت داروئی جدایه‌ها، طیف گسترده‌ای از مقاومت داروئی را به ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی مورد آزمایش در این مطالعه نشان داد (جدول ۲). بیش‌ترین میزان مقاومت به اریترومایسین (۹۳٪) و داکسی سایکلین (۸۳٪) و تتراسایکلین (۷۵٪) مشاهده شد، البته میزان مقاومت بالا به سایر ترکیبات مانند اکسی تتراسایکلین (۶۹٪)، دی فلوکساسین (۶۷٪)، انروفلوکساسین (۶۳٪) و فلومکوئین (۶۲٪) نیز قابل توجه بود. همچنین کمترین میزان مقاومت مربوط به لینکواسپکتین (۰٪) و جنتامایسین (۱٪)، فوزباک (۲٪) و کلیستین (۱۳٪) می‌باشد. با بررسی ۱۰ آنتی بیوتیک پر مصرف در صنعت طیور شامل نئومایسین، فلورفنیکل، فوزباک، کلیستین، انروفلوکساسین، فلومکوئین، لینکواسپکتین، داکسی سایکلین، تری متوپریم سولفا و تتراسایکلین نیز مشخص گردید که تمامی جدایه‌ها به شش ترکیب از این ۱۰ ترکیب مقاومت بالای ۵۰٪ نشان دادند که این مقدار بسیار قابل توجه است. همه‌ی جدایه‌ها حداقل به یک ترکیب ضدمیکروبی مقاوم بودند. بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها حداقل به چهار ترکیب ضدمیکروبی از جمله اریترومایسین، داکسی‌سایکلین، تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین مقاوم بودند و ۱۰٪ جدایه‌ها حداقل به ۱۲ ترکیب از ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی مورد استفاده مقاومت نشان دادند (جدول ۳). یک جدایه به ۱۳ ترکیب از ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی مقاوم بود. با توجه به داده‌های موجود در جدول۴، ۵۳ الگوی مقاومت مختلف برای این ۱۰۰ جدایه وجود دارد. در ۱۶٪ از جدایه‌ها، الگوی شماره‌ی ۱ مشاهده شد و ۳۵٪ از جدایه‌ها هر کدام از یک الگوی متفاوت پیروی کردند. بقیه جدایه‌ها نیز همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده به بیش از یک الگو تعلق داشتند.

جدول ۲. نتایج آزمایش تعیین حساسیت داروئی ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلای مورد مطالعه

ردیف	دارو	مقاوم (٪)	حساسیت متوسط (٪)	حساس (٪)
۱	اریترومایسین	۹۳	۷	۰
۲	داکسی سایکلین	۸۳	۱۲	۵
۳	تتراسایکلین	۷۵	۲۵	۰
۴	اکسی تتراسایکلین	۶۹	۲۸	۳
۵	دی فلوکساسین	۶۷	۶	۲۷
۶	انروفلوکساسین	۶۳	۱۰	۲۷
۷	فلومکوئین	۶۲	۸	۳۰
۸	کلرامفنیکل	۵۱	۲	۴۷
۹	تری متوپریم سولفا	۵۰	۱	۴۹
۱۰	فلورفنیکل	۴۷	۶	۴۸
۱۱	آمپی سیلین	۴۶	۳۳	۲۱
۱۲	نئومایسین	۲۸	۴۴	۲۸
۱۳	کلیستین	۱۳	۶۱	۲۶
۱۴	فوزباک	۲	۲	۹۶
۱۵	جنتامایسین	۱	۱	۹۸
۱۶	لینکواسپکتین	۰	۲	۹۸

جدول ۳. الگوی مقاومت چندگانه به ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی در بین ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلای مورد مطالعه

تعداد ترکیب ضدمیکروبی	تعداد جدایه مقاوم (٪)
حداقل ۱	۱۰۰ (٪۱۰۰)
>۱	۹۷ (٪۹۷)
>۲	۹۱ (٪۹۱)
>۳	۸۳ (٪۸۳)
>۴	۷۲ (٪۷۲)
>۵	۶۵ (٪۶۵)
>۶	۶۱ (٪۶۱)
>۷	۵۳ (٪۵۳)
>۸	۵۰ (٪۵۰)
>۹	۴۴ (٪۴۴)
>۱۰	۲۱ (٪۲۱)
>۱۱	۱۰ (٪۱۰)
>۱۲	۱ (٪۱)
>۱۳	۰ (٪۰)

جدول ٤. الگوهای مقاومت داروئی در بین ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلای مورد مطالعه

شماره الگوی مقاومت	الگوی مقاومت	تعداد جدایه	شماره‌ی جدایه‌ها
۱	CHL, FFN, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۱۶	۹، ۱۳، ۱۵، ۲۱، ۲۲، ۴۶، ۴۸، ۵۱، ۵۷، ۶۳، ۷۰، ۷۵، ۷۹، ۹۲، ۹۴، ۹۶
۲	AMP, NEO, CHL, FFN, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۸	۶، ۴۷، ۵۳، ۵۵، ۵۹، ۷۱، ۷۲، ۷۷
۳	NEO, CHL, FFN, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۵	۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴
۴	AMP, ERY, DOX, TET	۵	۱۸، ۲۵، ۲۶، ۳۳، ۳۵
۵	AMP, ERY, DOX	۵	۲۵، ۲۳، ۲۸، ۳۰، ۳۶
۶	ERY	۲	۱، ۲
۷	ERY, DOX	۲	۳، ۸۵
۸	DIF, ERY, NFX, FLU, DOX, OTC, TET	۲	۴۴، ۹۹
۹	NEO, CHL, FFN, FOS, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۲	۴، ۷
۱۰	AMP, ERY	۲	۲۷، ۳۱
۱۱	AMP, ERY, DOX, OTC, TET	۲	۲۹، ۳۲
۱۲	AMP, CHL, FFN, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۲	۴۰، ۵۶
۱۳	CHL, FFN, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, TET	۲	۴۲، ۸۰
۱۴	AMP, COL, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۲	۴۴، ۹۹
۱۵	AMP, NEO, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۲	۵۰، ۷۸
۱۶	NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, TET	۲	۵۴، ۶۰
۱۷	CHL, FFN, DIF, NFX, FLU	۲	۶۱، ۶۶
۱۸	AMP, DIF, NFX, ERY, FLU, DOX, OTC, SXT, TET	۲	۸۸، ۹۸
۱۹-۵۳	۳۵ جدایه دیگر هر کدام به یک الگوی متفاوت تعلق داشتند.		

AMP = Ampicillin, CHL = Chloramphenicol, COL = Colistin, DIF = Difloxacin, DOX = Doxycycline, NFX = Enrofloxacin, ERY = Erythromycin, FFN = Florfenicol, FLU = Flumequine, FOS = Fosbac, GEN = Gentamicin, LSP = Lincospectin, NEO = Neomycin, OTC= Oxytetracycline, TET = Tetracycline, SXT= Trimethoprim+Sulphamethoxazole

آزمون PCR برای ردیابی ژن‌های مقاومت:

نتایج در ارتباط با ردیابی ژن‌های مقاومت دو آنتی بیوتیک فلورفنیکل و کلیستین به این صورت بود که از بین ۸۵ جدایه در این مطالعه، ۴۰٪ و ۵۲/۹۴٪ جدایه‌ها ژن مقاومت به *floR* (شکل ۱) را، به ترتیب، بر روی پلاسمید و کروموزوم خود داشتند. نتایج برای ژنهای مقاوم به *fexA* و *cfr* بر روی پلاسمید و کروموزوم و *mcr-1* بر روی پلاسمید کاملا منفی بود.

شکل ۱. الکتروفورز فرآورده PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ برای تائید حضور ژن *floR* . باندهای تکثیرشده ۳۲۰ جفت باز در ستون‌های ٤، ٥، ٧، ٨ و ١٠ نشان داده شده‌اند. ستون‌های ١، ٢ و ٣ به‌ترتیب نشان‌دهنده مارکر تجاری (100 bp DNA Ladder) ، کنترل منفی و کنترل مثبت می‌باشند. ستون‌های ٦ و ٩، نتایج منفی برای حضور ژن *floR* را نشان می‌دهند.

بحث

کلی باسیلوز، یک عفونت موضعی یا سیستمیک ناشی از باکتری اشریشیا کلای است که اشکال مختلفی از این بیماری در طیور مشاهده شده است. (۲۱). به طور کلی عفونت‌های ناشی از بیماری کلی باسیلوز ضرر و زیان اقتصادی بالایی را به صنعت طیور به خصوص پرورش جوجه‌های گوشتی وارد می‌کند و همین امر زمینه ساز این شده است که بیش‌ترین مصرف دارو در صنعت طیور برای درمان این بیماری زیان بار باشد. با توجه به فراوانی مصرف داروهای ضد میکروبی به منظور درمان و پیشگیری از بیماری کلی باسیلوز، ایجاد مقاومت‌های داروئی بسیار محتمل شده است. مصرف غیر اصولی داروهای ضد میکروبی بدون رعایت غلظت و مدت زمان کافی برای اثر گذاری آن‌ها می‌تواند ضررهای بالایی را علاوه بر هزینه‌ی بسیار زیاد آن ایجاد کند که از جمله آن‌ها می‌توان به عواقب وخیم برای گله‌ی تحت درمان، صنعت طیور، محیط زیست و سلامت انسان‌ها اشاره کرد. ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم و افزایش آن‌ها به عنوان جمعیت غالب از بدترین عواقب حاصله از مصرف غیر اصولی داروهای ضد میکروبی می‌باشد. به طور کلی مصرف دارو هزینه بر بوده و همچنین متابولیسم آن در بدن نیز عوارضی را به همراه دارد. البته با وجود همه‌ی این عوارض نمی‌توان مصرف اصولی دارو به منظور درمان را نادیده گرفت که بدین منظور می‌بایست تجویز دارو به صورت اصولی و با شناخت کافی از میکروارگانیسم و نتایج تست حساسیت میکروبی باشد.

نتایج مطالعه حاضر گستره‌ی بالایی از مقاومت در تمامی جدایه‌ها به ۱۶ ترکیب ضدمیکروبی مورد مصرف در این تحقیق را نشان داد که بسیار نگران کننده است. همه‌ی جدایه‌ها حداقل به یک ترکیب ضدمیکروبی مقاوم بودند. مقاومت چندگانه در بیش از نیمی از جدایه‌ها مشاهده شد که حداقل به ۹ ترکیب ضدمیکروبی مقاوم بودند که سطح بالایی از مقاومت را نشان می‌دهد. با بررسی الگوهای مقاومت ایجادی در بین این ۱۰۰ جدایه از باکتری اشریشیا کلای، تعداد ۵۳ الگوی مختلف مقاومت به دست آمد. این تنوع در الگوهای مقاومت که حتی در یک مرغداری هم قابل مشاهده است به سرعت بالای ایجاد مقاومت اشاره دارد و همچنین شرایط را برای برنامه ریزی یک پروتکل

درمانی خاص حتی برای هر مرغداری را دچار مشکل می‌کند. گزارشات سالهای اخیر از سایر نقاط جهان و ایران نیز مقاومت بالا به ترکیبات ضدمیکروبی در میان جدایه‌های اشریشیا کلای طیور را نشان داده است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲، حساسیت ۹۴۳ جدایه مربوط به باکتری اشریشیا کلای به پنج ضدمیکروبی رایج در صنعت طیور ایران مورد ارزیابی قرار گرفت که به ترتیب ۳۵/۲، ۶۰/۶، ۴۲/۷ ، ۳۴/۳ و ۶۷/۴ درصد از جدایه‌ها به کلیستین، داکسی‌سایکلین، انروفلوکساسین، فلورفنیکل، تری متوپریم+سولفا مقاوم بودند(۱۰). در ۲۰۱۴، حساسیت ۲۵ جدایه‌ی اشریشیا کلای نسبت به آموکسی‌سیلین، انروفلوکساسین، جنتامایسین، فلومکوئین، نئومایسین، داکسی‌سایکلین، اکسی‌تتراسایکلین، تری‌متوپریم+سولفا و کلیستین مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که همه‌ی جدایه‌ها مقاومت بالای ۵۰٪ و اکثر آن‌ها مقاومت بالای ۸۰٪ را به ترکیبات مورد آزمایش نشان دادند (۱۷). مقاومت بالا نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، تری‌متوپریم+سولفا و کلرامفنیکل در جدایه‌های اشریشیاکلای طیور در مطالعه آواد و همکاران در ۲۰۱۶ نیز مشاهده شد (۲). اخیرا لی و همکاران (۲۰۲۰) در ناحیه‌ای در جنوب چین نیز مطالعه ای بر روی ۱۰۶ جدایه‌ی باکتریایی (۹۱ جدایه مربوط به باکتری اشریشیا کلای) انجام دادند (۱۳). درصد مقاومت به ترکیبات فلورفنیکل، آمپی‌سیلین، انروفلوکساسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، کلیستین و جنتامایسین به ترتیب ۱۰۰، ۹۸/۱۱، ۹۳/۳۹، ۹۱/۵۱٪، ۸۸/۶۸، ۳/۷۷ و ۶۱/۳۲ درصد گزارش شد (۱۳). بر طبق این گزارش بیشترین مقاومت به ترتیب مربوط به فلورفنیکل، آمپی‌سیلین و تتراسایکلین بود و کمترین میزان مقاومت را کلیستین به خود اختصاص داد (۱۳). علت چنین مقاومت‌های بالا به ترکیبات ضدمیکروبی در گله‌ها را می‌توان به مصرف پیشگیرانه و درمانی خودسرانه و شرایط مدیریتی و نحوه برقراری امنیت زیستی در گله ها نسبت داد. همچنین این روند می‌تواند به علت تفاوت در مناطق جغرافیایی و نوع آنتی‌میکروبیال مصرفی در آن ناحیه، تفاوت در قیمت آنتی‌میکروبیال و تفاوت در سال‌های بررسی این مقاومت‌ها باشد.

به دنبال منع مصرف کلرامفنیکل در صنعت طیور و معرفی فلورفنیکل به صنعت و رایج شدن مصرف آن در صنعت طیور به تدریج مقاومت به این آنتی بیوتیک در بین جدایه‌های باکتریائی گزارش شد. در ۱۹۹۶، اولین گزارش از مشاهده ژن *floR* در پاستورلا پیسیسیدای پاتوژن در ماهی به ثبت رسید و از آن زمان به بعد در برخی دیگر از باکتری‌ها از جمله اشریشیا کلای نیز مشاهده شده است (۲۸). پروتئین FloR یک پمپ خروجی نیرو محرکه پروتون است که توسط ژن *floR* کد می‌شود و روند ایجاد مقاومت توسط آن به این صورت است که به طور فعال کلرامفنیکل و فلورفنیکل را از سلول‌های باکتریایی خارج می‌کند (۶). از دیگر روش‌های ایجاد مقاومت به فلورفنیکل می‌توان به جریان‌های کدگذاری شده توسط *fexA* و *fexB* اشاره کرد و همچنین مقاومت چند داروئی کدگذاری شده توسط *cfr* نیز از دیگر موارد می‌باشد که در برابر فنیکل‌ها و چهار گروه دیگر از آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۱۵). اخیرا یک ژن دیگر مقاومت برای این دارو با نام *optrA* در انتروباکتریاسه‌ها و استافیلوکوکوس‌های با منشا انسانی و حیوانی مشاهده شده که در برابر فنیکل‌ها و اگزازولیدینون‌ها مقاومت ایجاد می‌کند (۲۶). با ردیابی تعدادی از ژن‌های مقاومت به فلورفنیکل (*floR, fexA, cfr*) در این مطالعه، در هیچ جدایه‌ای ژن های به *fexA* و *cfr* مشاهده نشد ولی به ترتیب ۵۲/۹۴٪ و ۴۰٪ جدایه‌ها ژن مربوط به *floR* را بر

روی کروموزوم و پلاسمید خود داشتند که این میزان در رابطه با جدایه‌های با فنوتیپ مقاومت به فلورفنیکل به ترتیب ۹۷/۷۲ و ۶۱/۳۶ درصد در کروموزوم و پلاسمید بود. اخیرا در مطالعه‌ای در هیچ جدایه‌ای از سایر باکتری‌ها، ژن های *fexA* و *cfx* مشاهده نشدند و تنها ژن *floR* که در ۴۳/۳٪ جدایه‌های باکتری سودوموناس و در ۳/۳٪ جدایه های باکتری پرووویدنسیا مشاهده گردید (۱). در مطالعه‌ای دیگر توسط لی و همکاران (۲۰۲۰)، میزان ۹۵/۶۰ و ۲/۲۰ درصد از جدایه‌های اشریشیا کلای به ترتیب ژن‌های *floR* و *cfr* را نشان دادند ولی در هیچکدام از جدایه‌ها ژن *fexA* مشاهده نشد (۱۳). آن‌ها همچنین مشاهده کردند که بسیاری از انتروباکتریاسه‌ها مانند اشریشیا کلای و پروتئوس می‌توانند ژن‌های مقاومت را به سایر باکتری‌ها منتقل کنند (۱۳). در مطالعه‌ای بر روی جدایه‌های پروتئوس مشخص شد که همه‌ی شش جدایه‌ی پروتئوس دارای ژن *floR* می‌باشند و فقط یک جدایه از نظر ژن *cfr* مثبت شده است. در این مطالعه سایر ژن‌های مقاومت مربوط به فلورفنیکل یافت نشد (۲۸). با توجه به این که فلورفنیکل از جمله داروهای پرمصرف در صنعت طیور ایران می‌باشد، امروزه به علت مصرف نابجای این دارو، مقاومت داروئی به این آنتی‌بیوتیک افزایش یافته و همچنین ژن‌های مقاومت مربوط به این دارو در کروموزوم و پلاسمید جدایه‌های باکتریایی موجود در حیوانات از جمله طیور، خصوصا در رابطه با ژن *floR* زیاد شده است.

ظهور ژن‌های *mcr-1* و *mcr-2* مرتبط با مقاومت به کلیستین در انتروباکتریاسه با توجه به پتانسیل آن به عنوان تهدیدی برای سلامت انسان توجه بین المللی را به خود جلب کرده است زیرا این ارگانیسم‌ها توانایی مقاومت در برابر کلیستین که از آخرین داروهای انسانی می‌باشد را کسب کرده‌اند. کلیستین مدت‌هاست که در حیوانات به عنوان یک داروی درمانی یا افزودنی خوراک استفاده می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که این ژن به انسان از طریق حیوانات منتقل شده است. گزارش‌هایی از ایالات متحده آمریکا، *mcr-1* را در جدایه‌های انسانی اشریشیا کلای از یک بیمار مبتلا به عفونت مجاری ادراری شناسایی کرده است (۱۶) و گزارش بعدی مرتبط با یک کیس بالینی می‌باشد (۷). به همین دلایل شناسایی ژن‌های مقاومت به کلیستین از اهمیت بالایی در تحقیقات برخوردار است. در مطالعه حاضر، با بررسی ۸۵ جدایه‌ی اشریشیا کلای، در هیچ جدایه‌ای ژن *mcr-1* مربوط به مقاومت به کلیستین مشاهده نشد. در چین، پژوهشی طی سال‌های ۱۹۷۰ تا ۲۰۱۴ بر روی ۱۶۱۱ جدایه اشریشیا کلای به صورت گذشته نگر انجام شد که نتایج قابل توجهی از آن به‌دست آمد (۲۴). ژن *mcr-1* در سه جدایه مربوط به سال ۱۹۸۰ یافت شد که همزمان با شروع استفاده از کلیستین در غذای حیوانات تولید کننده غذا بود. سپس در طی دو دهه این ژن در هیچ جدایه‌ای یافت نشد (۲۴). سپس در طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ وقوع پراکنده‌ای از این ژن به ثبت رسید. میزان شیوع اشریشیا کلای دارای ژن *mcr-1* در مرغان از ۵/۲ درصد در ۲۰۰۹ به تدریج به ۳۰ درصد در ۲۰۱۴ رسیدکه نشان از سرعت بالای ظهور این ژن دارد (۲۴). در تحقیقی دیگر در چین (۱۴)، ژن *mcr-1* در جدایه های باکتریائی حاصل از ۷۸ نمونه (۱۵٪) از ۵۲۳ نمونه‌ی گوشت خام، ۱۶۶ نمونه (۲۱٪) از ۸۰۴ حیوان در طی سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ و ۱۶ نمونه (۱٪) از ۱۳۲۲ انسان بستری شده به علت عفونت در بیمارستان شناسایی شد (۱۴). در یک مطالعه گذشته نگر در مناطق مختلف جهان (۴)، از بین ۹۸۰ جدایه‌ی اشریشیا کلای، ۱۲ جدایه (۱/۲۲ درصد)

از نظر ژن *mcr-1* مثبت بودند. هشت جدایه از این ۱۲ جدایه طیور دارای علائم کلی‌باسیلوز در چین و ۴ جدایه در مصر شناسایی شده بودند (۴). هیچ جدایه‌ای از ایالات متحده آمریکا و سایر کشورهای مورد مطالعه در این تحقیق از نظر این ژن مثبت نبودند (۴). همچنین در جدایه‌هایی که از نظر ژن *mcr-1* مثبت بودند مشخص گردید که حداقل به ۱۰ ترکیب ضدمیکروبی مقاوم هستند که این می‌تواند بسیار نگران کننده باشد زیرا که می‌تواند به میکروارگانیسم‌های انسانی نیز منتقل شود. در مطالعه باربری و همکاران (۲۰۱۷)، همچنین ژن *mcr-2* مورد ارزیابی قرار گرفت که تمامی جدایه‌ها فاقد این ژن بودند (۴). همچنین در مطالعاتی دیگر که توسط اعظم و همکاران (۲۰۱۷) در پاکستان و ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) در چین صورت پذیرفت، سرعت شیوعی مشابه مطالعه قبلی مشاهده شد (۳،۲۷). ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی‌های خود بر روی طیور، اردک و خوک، مشاهده کردند که ۳۱/۸ درصد از جدایه‌ها دارای ژن *mcr-1*، ۵/۵ درصد دارای ژن *mcr-2* و ۵/۲ درصد از جدایه‌ها نیز دارای ژن *mcr-3* در طیور بودند (۲۷). در گزارشی دیگر توسط جاشی و همکاران (۲۰۱۹)، ۲۲/۸ درصد از جدایه‌ها دارای ژن *mcr-1* بودند (۱۱). بیستا و همکاران (۲۰۲۰) نیز ژن *mcr-1* را در ۴۳/۹ درصد از جدایه‌های مقاوم به کلیستین مشاهده نمودند (۵). این سرعت بالای شیوع ژن مقاومت به کلیستین می‌تواند ناشی از مصرف زیاد آن در مرغداری‌ها باشد که تهدیدی بالقوه برای انتقال این ژن مقاومت به عوامل بیماری‌زای انسانی است. در بسیاری از مناطق جهان که پرورش خوک رایج است استفاده از کلیستین برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی و همچنین به عنوان ترکیب افزودنی به جیره رایج است (۲۵). اما در سالهای اخیر با افزایش مقاومت به کلیستین در بین باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه، بروز ژن‌های مقاومت کلیستین (mcr) در انسان و حیوانات مختلف افزایش یافته است، بویژه در *اشریشیا کولای* جداشده از بچه خوک‌های درگیر اسهال بعد از دوره شیرخواری، سطوح بالای ژن‌های مقاومت کلیستین مشاهده شده است (۲۵). گسترش این ژن ها در باکتری‌های ایجاد کننده بیماری در حیوانات تولید کننده غذا گسترش جهانی آن ها را به دنبال دارد.

نتیجه گیری: الگوهای مقاومت داروئی در هر کشور و منطقه با دیگر مناطق تفاوت دارد و استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی با ملاک قرار دادن الگوی مقاومت سایر مناطق جایز نیست. زیرا این الگوها با توجه به مکان و زمان‌های مختلف تغییر می‌یابد. با تجویز داروهای ضدمیکروبی روند الگوهای مقاومت عوض می‌شود و نیاز به پایش دوره‌ای بررسی مقاومت‌های ضدمیکروبی را ضروری می‌گرداند. البته آزمون تعیین حساسیت میکروبی به تنهایی ملاک انتخاب نبوده و دستیابی به حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در بافت مورد بررسی نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. باید دقت نمود که ژن مقاومت به یک ترکیب ضدمیکروبی همانطور که در بحث مقاومت داروئی مطرح است می‌تواند از طریق عناصر متحرک و پلاسمیدها به باکتری‌های حساس منتقل شود و جمعیت باکتری‌های مقاوم را با روند افزایشی مواجه سازد که همین امر درمان و مدیریت صحیح بیماری‌ها را در صنعت طیور با مشکل مواجه می‌سازد. از طرفی با مصرف گوشت طیور، ژن های مقاومت می تواند به باکتری های درگیرکننده انسانی منتقل شود و سلامت انسان را نیز به خطر بیاندازد. همانطور که می‌دانیم برخی داروهای مورد استفاده در دامپزشکی، آنالوگ انسانی نیز دارند و باکتری‌ها با مقاوم شدن در برابر آن ترکیب داروئی،

می‌توانند نسبت به آنالوگ انسانی آن ترکیب نیز مقاوم شوند. بنابراین ردیابی ژن‌های مقاومت به هر دارو از اهمیت بالائی در حفظ سلامت دام و انسان برخوردار است. می‌توان به منظور بررسی‌های بیشتر با توجه به وجود مقاومت در فلورفنیکل و کلیستین به صورت فنوتیپی و فقدان برخی ژن‌های فلورفنیکل از جمله *cfr* و *fexA* و ژن *mcr-1* در کلیستین در جدایه‌ها، در مطالعات بعدی به جستجوی سایر ژن‌های مقاومت به این ترکیبات، خصوصا *mcr-2* تا *mcr-10* و همچنین *optrA* و *fexB* پرداخت. با ایجاد برنامه‌های مدیریتی صحیح برای مرغداری‌ها و مصرف درمانی به جا و مناسب ترکیبات ضدمیکروبی و تقویت ایمنی بدن طیور با پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها و همچنین سایر ترکیبات تقویت کننده ایمنی در کنار پایش دوره‌ای میزان مقاومت‌ها، می‌توان در جهت حفظ سلامت دام، محیط زیست و انسان عمل کرد.

سپاسگزاری

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۷۵۰۸۰۰۷-۶-۴۳ شورای پژوهشی دانشگاه تهران تامین و پرداخت شده است.

ORCID
Seyed Mostafa Peighambari: https://orcid.org/0000-0001-9166-1303
Jamshid Razmyar: https://orcid.org/0000-0002-1247-4591

تعارض

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Adesoji, A.T., Call, D.R. (2020). Molecular analysis of florfenicol-resistant bacteria isolated from drinking water distribution systems in Southwestern Nigeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **23:** 340-344. http://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.10.005
2. Awad, A., Arafat, N., Elhadidy, M. (2016). Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **15:** 59. http://doi.org/10.1186/s12941-016-0174-9
3. Azam, M., Ehsan, I., Sajjad Ur, R., Saleemi, M.K., Javed, M.R., Mohsin, M. (2017). Detection of the colistin resistance gene *mcr-1* in avian pathogenic *Escherichia coli* in Pakistan. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **11:** 152–153. http://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.012
4. Barbieri, N.L., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S.G., Logue, C.M. (2017). *mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One*, **12:** e0172997. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172997
5. Bista, S., Shrestha, U.T., Dhungel, B., Koirala, P., Gompo, T.R., Shrestha, N., Adhikar, N., Joshi, D.R., Banjara, M.R., Adhikari, B., Rijal, K.R. Ghimire, P. (2020). Detection of plasmid-mediated colistin resistant *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from infected chicken livers in Nepal. *Animals (Basel)*, **10:** 2060. http://doi.org/10.3390/ani10112060

Veterinary Medicine, University of Tehran, **59:** 233-240.
13. Li, P., Zhu, T., Zhou, D., Lu, W., Liu, H., Sun, Z., et al. (2020). Analysis of resistance to florfenicol and the related mechanism of dissemination in different animal-derived bacteria. *Frontiers in Cellular* and *Infection Microbiology*, **10:** 369. http://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00369
14. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, **16:** 161–168. http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7
15. Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B. (2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50:** 2500–2505. http://doi.org/10.1128/AAC.00131-06
16. McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A.C., Clifford, R., et al. (2016). *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the USA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60:** 4420-4421. http://doi.org/10.1128/AAC.01103-16
17. Mohamed, M.A., Shehata, M.A., Rafeek, E. (2014). Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. *Veterinary Medicine International*, **2014:** 195189. http://doi.org/10.1155/2014/195189
6. Braibant, M., Chevalier, J., Chaslus-Dancla, E., Pagès, J.M., Cloeckaert, A. (2005). Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump FloR belonging to the major facilitator superfamily. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49:** 2965–2971. http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2965-2971.2005
7. Castanheira, M., Griffin, M.A., Deshpande, L.M., Mendes, R.E., Jones, R.N., Flamm, R.K. (2016). Detection of *mcr-1* among *Escherichia coli* clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY antimicrobial surveillance program in 2014 and 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60:** 5623–5624. http://doi.org/10.1128/AAC.01267-16
8. CLSI. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA.
9. CLSI VET. (2018). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI VET01. Wayne, PA, USA.
10. Ghaniei, A., Peighambari, S.M. (2012). Antimicrobial susceptibility of one thousand bacterial isolates to five antibacterial agents commonly used in the Iranian poultry industry. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, **6:** 1-5. http://doi.org/10.22059/ijvm.2012.24617
11. Joshi, P.R., Thummeepak, R., Leungtongkam, U., Pooarlai, R., Paudel, S., Acharya, M., Dhital, S., Sitthisak, S. (2019). The emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in chicken meats in Nepal. *FEMS Microbiology Letters*, **366:** fnz237. http://doi.org/10.1093/femsle/fnz237
12. Khoshkhoo, P.H., Peighambari, S.M. (2004). Characteristics of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Journal of Faculty of*

18. Nair, D.V.T., Venkitanarayanan, K., Kollanoor, J.A. (2018). Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, **7:** 167. http://doi.org/10.3390/foods7100167
19. Newton-Foot, M., Snyman, Y., Maloba, M.R.B., Whitelaw, A.C. (2017). Plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli* and Klebsiella spp. clinical isolates from the Western Cape region of South Africa. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, **6:** 78. http://doi.org/10.1186/s13756-017-0234-8
20. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Abdul-Aziz, T.A., Logue, C.M., Vaillancourt, J.P. (2015). Colibacillosis. In: Brugère-Picoux, J. et al. (eds), *Manual of Poultry Diseases*, 1st edition. AFAS. Paris, France. p. 300-315.
21. Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P., Barbieri, N.L., Logue, C.M. (2020). Colibacillosis. In: Swayne, D.E. et al. (eds), *Diseases of Poultry*, 14th edition.Wiley-Blackwell Publication. NJ, USA. p. 770-830.
22. Peighambari, S.M., Sorahi Nobar, M., Morshed, R. (2015). Detection of *Salmonella entrica s*erovar Infantis among serogroup C *Salmonella* isolates from poultry using PCR and determination of drug resistance patterns. *Iranian Veterinary Journal*, **11:** 54-60. http://doi.org/10.22055/ivj.2015.10112
23. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, NY.
24. Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., Wu, C. (2016). Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases*, **16:** 293. http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X
25. Usui, M., Nozawa, Y., Fukuda, A., Sato, T., Yamada, M., Makita, K., Tamura, Y. (2021). Decreased colistin resistance and mcr-1 prevalence in pig-derived Escherichia coli in Japan after banning colistin as a feed additive. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **24:** 383-386. http://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.01.016.
26. Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., et al. (2015). A novel gene, optrA, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70:** 2182–2190. http://doi.org/10.1093/jac/dkv116
27. Zhang, P., Shen, Z., Zhang, C., Song, L., Wang, B., Shang, J., Yue, X., Qu, Z., Li, X., Wu, L., et al. (2017). Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008–2015. *Veterinary Microbiology*, **203:** 49–55. http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.008
28. Zhua, T., Liu, S., Ying, Y., Xu, L., Liu, Y., Jin, J., et al. (2020). Genomic and functional characterization of fecal sample strains of *Proteus cibarius* carrying two *floR* antibiotic resistance genes and a multi resistance plasmid-encoded *cfr* gene. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **69:** 101427. http://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101427

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

Drug resistance among *Escherichia coli* isolates from typical lesions of poultry colibacillosis and detection of florfenicol (*floR, fexA, cfr*) and colistin (*mcr-1*) resistance genes

Pegah Valitabar[1], Seyed Mostafa Peighambari[2*], Jamshid Razmyar[3], Abbas Barin[4], Azam Yazdani[5], Fattaneh Naderinejad[5]

1- Doctorate Candidate, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

5- MSc., Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 29 December2021 Accepted: 27 February2022

Abstract

Escherichia coli is the causative agent of colibacillosis in poultry leading to heavy economic losses and increased antibacterial use in poultry flocks with a consequence of increased drug resistance. In order to reduce drug resistance, as a global problem, and to establish better health among humans, animals and environment, a periodical monitoring of drug resistance rate is required. The aims of this study were to investigate the resistance of Escherichia coli isolates to different antimicrobial agents and also to detect florfenicol (cfr, fexA, floR) and colistin (mcr-1) resistance genes among isolates. One hundred Escherichia coli isolates originated from typical lesions of colibacillosis were collected from poultry referred to a private laboratory in Tehran and University bacterial collection and the drug resistance of isolates to 16 antimicrobial agents including ampicillin, neomycin, gentamicin, enrofloxacin, flumequine, difloxacin, chloramphenicol, florfenicol, Fosbac, erythromycin, colistin, tetracycline, oxytetracycline, trimethoprime+sulfa, linco-spectin and doxycycline was determined by using disk diffusion method. Then, the chromosomal and plasmid DNA were extracted and florfenicol (cfr, fexA, floR) and colistin (mcr-1) resistance genes were detected among all isolates by using polymerase chain reaction test (PCR). Based on antimicrobial susceptibility test, the highest resistance was observed to erythromycin, doxycycline and tetracycline and the lowest resistance rate was found to linco-spectin, gentamicin and Fosbac. All isolates were resistant to at least one and 10% of isolates were resistant to at least 12 antimicrobial agents. The 16% of the isolates belonged to one identical pattern and 35% of isolates each belonged to a separate pattern. Among 85 tested isolates, 40 and 52.94% of the isolates showed floR gene on their plasmid and chromosomal locations, respectively. However, no isolate was positive for fexA, cfr and mcr-1 resistance genes. The findings of this study demonstrated the high frequency of resistance to commonly used antimicrobial agents among E. coli isolated from colibacillosis. Detection of resistance genes increases the researchers' knowledge on the epidemiology of drug resistance. This information indicates the necessity for implementation of the right management programs for poultry farms and rational antimicrobial therapy besides periodic antimicrobial susceptibility monitoring.

Keywords: Colibacillosis, Colistin, Drug resistance, Escherichia coli, Florfenicol

**Corresponding author: S. M. Peighambari*

Address: Department of Avian Disease ,Faculty of Veterinary Medicine,University of Tehran,Tehran, Iran

E. mail: mpeigham@ut.ac.ir