

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سیتروباکتر فروندی جدا شده از گوشت طیور در شهرستان شهرکرد

حسین خدابنده^۱، شهرکی^۱، الهه تاج بخش^{۱*}، فهام خامسی پور^۲، حسن ممتاز^۱، منوچهر مومنی شهرکی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری هیداتید ایران، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول: استاد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران

ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

سیتروباکتر فروندی یک پاتوژن غذایی در حال ظهور است که دارای اهمیت بهداشت عمومی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی فنوتیپی و ژنوتیپی در ایزوله های سیتروباکتر جدا شده از گوشت طیور در شهرستان شهرکرد انجام شد. در این مطالعه مقطعی - توصیفی ۳۰۰ نمونه گوشت مرغ، بلدرچین و بوقلمون در سال ۱۴۰۳ در شهرستان شهرکرد از نظر آلودگی به سیتروباکتر فروندی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه ها با روش های بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد و ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از روش های بیوشیمیایی ۲۴ ایزوله (۸ درصد) سیتروباکتر فروندی جدا شد که با روش مولکولی نیز تأیید شدند. آلودگی در گوشت بلدرچین ۱۲ درصد، در گوشت مرغ ۷ درصد و در گوشت بوقلمون ۵ درصد گزارش شد. پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون های میکروبیولوژی و مولکولی و انجام آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول (۷۰/۸۳ درصد) گزارش شد. تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفتریکسون، سیپروفلوکساسین، کانامایسین و سفوتاکسیم حساس بودند. وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های سیتروباکتر فروندی در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه ذکر شده نشانگر استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان دام و طیور است که بسته به نوع منطقه و نحوه تجویز آنتی بیوتیک الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نیز متفاوت خواهد بود.

کلمات کلیدی: سیتروباکتر فروندی، مقاومت آنتی بیوتیکی، گوشت طیور.

مقدمه:

جدا شده است. گونه‌های سیتروباکتر به‌عنوان یک باکتری آلوده‌کننده تا حدودی مسئول و علت بیماری‌های منتقله غذایی بوده و اغلب از طریق غذا و آب انتقال می‌یابند (Liu et al., 2015). برای این اساس افرادی که در بهداشت شخصی ضعیف هستند می‌توانند منبع بالقوه این میکروارگانیسم‌ها باشند سیتروباکتر از طیف وسیعی از مواد غذایی جدا شده است (Li et al., 2019).

بیماری‌های اسهالی عمدتاً ناشی از پاتوژن‌های میکروبی با مواد غذایی یا آب هستند، عامل اصلی بیماری و مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و سالانه به میزان ۱/۹ میلیون نفر در سطح جهانی کشته می‌شوند. حتی در کشورهای توسعه‌یافته، حدود یک‌سوم جمعیت در هر سال تحت تأثیر بیماری میکروبیولوژی غذایی قرار می‌گیرند تقریباً ۱/۷ موارد بیماری در هر سال گزارش می‌شود (Dasenaki et al., 2023). با توجه به این‌که تا کنون تحقیقی در مورد جداسازی سیتروباکتر فروندی از گوشت طیور انجام نشده است، در این تحقیق بر آن شدیم با ضمن جداسازی سیتروباکتر فروندی از گوشت طیور به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی فراوانی ژن‌های ویروالانس در این باکتری بپردازیم.

جنس سیتروباکتر یک گروه از باکتری‌های گرم منفی هوازی بی‌هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه است. گونه‌ی سیتروباکتر ساکن روده می‌باشد و اغلب در مدفوع یافت می‌شود. همچنین گونه‌های سیتروباکتر در آب، خاک، فاضلاب، غذا و مدفوع حیوانات یافت می‌شوند (Lavigne JP et al., 2007). گونه سیتروباکتر دارای فلاژل پری تریش و متحرک، اکسیداز منفی هستند و از سیترات به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کند (Samonis G et al., 2009). جنس سیتروباکتر شامل ۱۱ گونه است که جدایه‌های یافت شده از نمونه‌های کلینیکی بیشتر شامل سیتروباکتر کوسری^۱، سیتروباکتر فروندی^۲، سیتروباکتر آمالانیتیکوس^۳، سیتروباکتر باراک^۴ و سیتروباکتر یانگای^۵ می‌باشد. جنس سیتروباکتر پاتوژن‌های فرصت طلب هستند و یا طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل عفونت‌های دستگاه ادراری، گاستروانتریت، عفونت زخم پنومونی، آبسه‌های مغزی، سپتی سمی، مننژیت و اندوکاردیت همراه است، به‌خصوص در نوزادان و مبتلایان به نقص ایمنی عفونت ایجاد می‌کنند. سیتروباکتر فروندی شایع‌ترین گونه سیتروباکتر است که باعث عفونت می‌شود (Bai L., 2012). سیتروباکتر فروندی یکی از عوامل طغیان گاستروانتریت و طغیان‌های مواد غذایی می‌باشد. مسمومیت غذایی اسهال ناشی از غذاهای آلوده به سیتروباکتر گزارش شده است (Ifeadike CO et al., 2012 -). Siammanco GM et al., 2011). سیتروباکتر از نمونه‌های گوشت خام و گوشت خوک و فراورده‌های آن

^۴ *Citrobacter Rocky*^۵ *Citrobacter Angii*^۱ *Citrobacter cocci*^۲ *Citrobacter Freundi*^۳ *Citrobacter amalaniticus*

مواد و روش کار:

جداسازی باکتری

در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه ی گوشت مرغ، بوقلمون و بلدرچین عرضه شده به بازار مصرف شهرستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از فرمول کوکران حجم جامعه آماری به تعداد ۳۰۰ نمونه محاسبه گردید. به منظور جداسازی باکتری از نمونه ی گوشت طیور، ابتدا ۵ گرم از هر نمونه گوشت توزین و با ۱۰ میلی لیتر بافر PBS مخلوط و یکنواخت گردید. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی XLD آگار پخش گردید و به مدت

۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط ها از نظر وجود سیتروپاکتر فروندی مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی های سیاه با کانون سیاه یا بدون کانون سیاه ایجاد شده روی محیط XLD انتخاب شدند. به منظور تایید تشخیص از تست هایی نظیر IMViC، اوره و لیزین دکربوکسیلاز استفاده شد. تست های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی سیتروپاکتر فروندی در جدول نشان داده شده است (Namaki et al., 2019). از سویه استاندارد سیتروپاکتر فروندی (ATCC13316) به عنوان کنترل کیفی انجام آزمایشات استفاده شد.

جدول ۱: تست های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی باکتری سیتروپاکتر فروندی

نوع تست					
تولید اندول	متیل رد	وورژس پروسکائر	سیترات	H ₂ S	اوره
-	+	+	+	+	-

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی-بیوتیک ها از روش کربی-بایر^۱ بر طبق دستورالعمل CLSI (مندرج در راهنمای ارائه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد.

تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند

برای تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقدار ۵/۵ میلی لیتر از محلول ۱/۱۷۵ درصد کلرور باریم به اسید سولفوریک ۱ درصد اضافه شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی مقداری از کلونی مورد آزمایش را در لوله حاوی محیط کشت TSB کشت داده و به مدت ۱-۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد تا زمانی که کدورت آن به اندازه کدورت لوله استاندارد برسد.

برای تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی-بیوتیک ها از روش کربی-بایر^۲ مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ۲۰۲۴ استفاده شد. دیسک های آنتی-بیوتیک در این آزمایش شامل: کوتریموکسازول (۱،۲۵

². Kirby Bauer

¹ Kirby Bauer

باکتری رشد یافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود(هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل^۲ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد.

کیفیت و کمیت سنجی DNA

جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل ۲ درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بیوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

تأیید ایزوله‌ها با استفاده از PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن 23srRNA سیتروپلاکتر فروندی که در جدول ۲ نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد (Imam et al., 2020).

میکروگرم تری متوپریم و ۲۳,۷۵ میکروگرم سولفامتوکسازول (SXT)، آمیکاسین (AN 30)، سفوتاکسیم (CTX 30)، سفتریاکسون (CRO 30)، سفالوتین (CF 30)، سفنازیدیم (CAZ 30)، سیپروفلوکساسین (CP 5)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، نورفلوکساسین (NOR 10)، تتراسایکلین (TE30)، جنتامایسین (GM10)، کانامایسین (K)، اریترومایسین (E) و کلرامفنیکل (C 30) از شرکت پادتن طب-ایران مورد استفاده قرار گرفتند.

برای انجام آنتی-بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI ۳ تا ۴ کلنی از باکتری مورد نظر را برداشته و به محیط TSB انتقال داده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی معادل نیم مک فارلند حاصل شود سپس با استفاده از سواب استریل از باکتری برداشته و به صورت فشرده بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های مورد نظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس اندازه هاله‌های ممانعت از رشد، براساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد.

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

به منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن^۱ بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر ساخت شرکت مرک آلمان، به عنوان منبع برای استخراج DNA، مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ میکرولیتر از محیط پپتون واتر که حاوی

^۲ Distilled Water

^۱ Boiling

جدول ۲: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *23srRNA* در ایزوله های سیتروباکتر فروندی

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵' - ۳')	ژن
۱۸۹	F: GAAGAATCCGGACAAACATC R: CCAGGATAGGAAACATCCAG	<i>23srRNA</i>

تعیین فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های سیتروباکتر فروندی

تتراسیکلین، *qnr* (مقاومت به فلوروکینولون ها)، *aac(3) IIa* (مقاومت به جنتامایسین) و ژن *sul1* (مقاومت به سولفونامیدها) از زوج پرایمر های معرفی شده در جدول (۳) استفاده شد. (Santosa et al., 2017)

در راستای ردیابی ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل ژن های، *tetA* و *tetB* (مقاومت به

جدول ۳: پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های

سیتروباکتر فروندی

اندازه (جفت باز)	توالی	ژن مقاومت	آنتی بیوتیک
۸۸۸	F: GTGAAACCCAACATACCCC R: GAAGGCAAGCAGGATGTAG	<i>tetA</i>	تتراسایکلین
۷۷۴	F: CCTTATCATGCCAGTCTTGC R: ACTGCCGTTTTTTCGCC	<i>tetB</i>	
۵۱۶	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	<i>qnr</i>	فلوروکینولون ها
۷۴۰	F: CGGAAGGCAATAACGGAG R: TCGAACAGGTAGCACTGAG	<i>aac(3)IIa</i>	جنتامایسین
۴۳۳	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	<i>sul1</i>	سولفونامیدها

جدول ۴: برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت ردیابی ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سیتروباکتر فروندسی

نام ژن	برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرز
<i>tetA</i> و <i>tetB</i>	۱ سیکل
	۹۴ درجه ----- ۵ دقیقه
	۳۰ سیکل
	۹۴ درجه ----- ۱۵ ثانیه
	۵۸ درجه ----- ۶۰ ثانیه
	۷۲ درجه ----- ۶۰ ثانیه
	یک سیکل
<i>aac(3)IIa</i> و <i>qnr</i>	۷۲ درجه ----- ۵ دقیقه
	یک سیکل
	۹۵ درجه ----- ۵ دقیقه
	۳۰ سیکل
	۹۵ درجه ----- ۳۰ ثانیه
	۵۹ درجه ----- ۳۰ ثانیه
	۷۲ درجه ----- ۶۰ ثانیه
<i>Sul1</i>	یک سیکل
	۹۴ درجه ----- ۵ دقیقه
	۳۴ سیکل
	۹۴ درجه ----- ۵ دقیقه
	۶۵ درجه ----- ۲ دقیقه
	۷۲ درجه ----- ۹۰ ثانیه
	یک سیکل
	۷۲ درجه ----- ۸ دقیقه

آزمایش PCR از الکتروفورز محلول PCR روی ژل
آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز محصولات به دست آمده
به منظور تأیید وجود قطعه تکثیر شده در

آنالیز آماری

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی-بیوتیکی استفاده از آزمون مربع کای (Chi-Square test) و با نرم افزار SPSS شماره ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

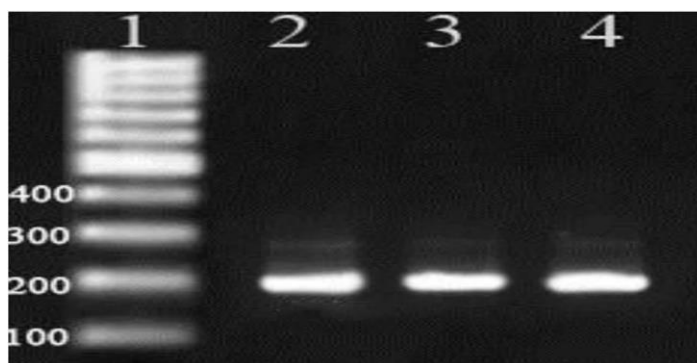
نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی

در این تحقیق از مجموع ۳۰۰ نمونه مورد بررسی ۲۴ نمونه (۸ درصد) از نظر سیتروباکتر فروندی مثبت بودند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مربع کای بین نوع نمونه و آلودگی ارتباط آماری معنادار

مشاهده گردید. آلودگی در گوشت بلدرچین ۱۲ درصد، در گوشت مرغ ۷ درصد و در گوشت بوقلمون ۵ درصد گزارش شد.

نتایج مربوط به ردیابی ژن *23srRNA* باکتری سیتروباکتر فروندی

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری سیتروباکتر فروندی و حضور توالی ژن *16srRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۸۹ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۴-۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن *23srRNA* سیتروباکتر فروندی. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز. ستون ۲: کنترل مثبت ستون‌های ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت واجد باند ۱۸۹ جفت بازی.

نتایج مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی

پس از تأیید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی و انجام آنتی بیوگرام، بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول (۷۰/۸۳ درصد) گزارش شد. تمامی سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتریکسون، سیپروفلوکساسین، کانامایسین و سفوتاکسیم حساس بودند.

جدول ۶: نتایج مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سیتروباکتر فروندی جدا شده از گوشت طیور

آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
TE	۱۵	۶۲/۵	۳	۰	۶	۲۵
GM	۰	۰	۰	۰	۲۴	۱۰۰
STX	۱۷	۷۰/۸۳	۳	۱۲/۵	۴	۱۶/۶۶
NA	۱۲	۵۰	۲	۸/۳۳	۱۰	۴۱/۶۶
CP	۰	۰	۰	۰	۲۴	۱۰۰
NOR	۴	۱۶/۶۶	۷	۲۹/۱۶	۱۳	۵۴/۱۶
CF	۵	۲۰/۸۳	۴	۱۶/۶۶	۱۵	۶۲/۵
CAZ	۶	۲۵	۶	۲۵	۱۲	۵۰
CRO	۰	۰	۰	۰	۲۴	۱۰۰
CTX	۰	۰	۰	۰	۲۴	۱۰۰
E	۱۸	۷۵	۵	۲۰/۸۳	۱	۴/۱۶
C	۳	۱۲/۵	۳	۱۲/۵	۱۸	۷۵
K	۰	۰	۳	۱۲/۵	۲۱	۸۷/۵
AN	۰	۰	۰	۰	۲۴	۱۰۰

B برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در تتراسیکلین، ژن *sul 1* برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در کوتریموکسازول و از ژن *aac(3)IIa* برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی به جنتامایسین مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج در جدول ۷ نشان داده شده است.

نتایج مربوط به فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های سیتروباکتر فروندی

توزیع انواع ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های سیتروباکتر فروندی به روش PCR ردیابی گردید. ژن *qnr* برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در آنتی بیوتیک های کینولونی (نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین)، ژن *tet A* و *tet*

جدول ۷. نتایج مربوط به ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی

ژن تعداد	qnrA	qnrB	qnrS	tetA	tetB	ant(3)Ia	aac(3)IIa	Sul1
۲۴	۱۰	۷	۴	۱	۱	۱۳	۱۴	۱۶
درصد	۱۶۶	۲۹/۶	۱/۶۶	۴۱/۱	۶۶	۵/۱۶	۵/۳۳	۱۵۰
۵	۴۱		۶			۴	۸	۶۲

بحث

انواع گوشت (گوشت قرمز، طیور و آبزیان) یکی از با ارزش‌ترین و مفیدترین منابع غذایی است که علاوه بر کربوهیدرات‌ها از پروتئین، اسیدهای آمینه، نمک‌های معدنی، چربی‌ها، اسیدهای چرب و ویتامین‌ها تشکیل شده است. گوشت خام ۹۰ درصد در انتقال پاتوژن‌ها نقش دارد که عامل بیماری‌های منتقله از طریق غذا در انسان به‌ویژه عوامل باکتریایی به‌دلیل ویژگی‌های شیمیایی آن است که منجر به گسترش طیف گسترده‌ای از جوامع میکروبی می‌شود. به‌طور معمول، گوشت حیوانات سالم استریل است. بنابراین کیفیت میکروبیولوژیکی گوشت به سلامت و وضعیت فیزیکی حیوان بستگی دارد. آلودگی باکتریایی گوشت خام می‌تواند از هر دو منبع درون‌زا و برون‌زا باشد، درون‌زا ناشی از عفونت خون و دستگاه گوارش حیوان یا پوست، و برون‌زا ناشی از آلودگی لاشه گوشت در طی کشتار و فرآوری است، که فرآیندی اجتناب‌ناپذیر است. آلودگی گوشت از طریق روش‌های کشتار، پرکنی، فرآوری و ذخیره‌سازی، دست و لباس‌های کارکنان، تجهیزات و آب مورد استفاده برای شستشوی لاشه‌ها و

هم‌چنین گرد و غبار و هوا امکان‌پذیر است سیتروباکتر فروندی از پاتوژن‌های غذایی مرتبط با چندین عفونت فرصت‌طلب، مانند اسهال شدید، اسهال کودکان، کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک همولیتیک، عفونت‌های دستگاه ادراری، ذات‌الریه، مننژیت نوزادی و عفونت‌های مرتبط با آبسه مغزی در انسان و بیماران دچار نقص ایمنی و هم‌چنین، مسئول شیوع بیماری‌های بیمارستانی توسط جدایه‌های مقاوم به دارو است (Hashim et al., 2018).

در تحقیق حاضر در میان انواع گوشت طیور، گوشت بلدرچین در ۱۲ نمونه (۱۲ درصد) بیشترین فراوانی سیتروباکتر فروندی را به‌خود اختصاص داده است. مطالعات زیر یافته‌های مطالعه حاضر در مورد شیوع باکتری سیتروباکتر فروندی در نمونه‌های گوشت خام را تأیید می‌کنند. مطالعه در تحقیق Awad و همکاران در سال ۲۰۲۲، که بر روی ۱۵۰ نمونه گوشت خام گاو و گوسفند و نمونه‌های ماهی کپور جمع‌آوری شده از بازارهای محلی و قصابی‌های مختلف در منطقه الرصافه شهر بغداد با هدف جداسازی، تشخیص مولکولی سیتروباکتر فروندی انجام شد، نتایج نشان داد

جهت پرکنی طیور باشد. استفاده کنترل شده از آنتی-بیوتیک‌های مجاز تحت نظر دامپزشک، رعایت دوره منع مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از کشتار، رعایت کامل اصول بهداشتی در طول مرحله کشتار، کنترل و نظارت دائمی کشتارگاه‌ها و افزایش آگاهی‌های عمومی در خصوص رعایت مسائل بهداشتی در منازل و مراکز عرضه غذا و پخت کامل مواد غذایی خام می‌تواند در کاهش خطرات آلودگی سیتروباکتر فروندی مفید باشد (Shawish et al., 2020)

با توجه به نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر و مطالعات مشابه در این زمینه می‌توان این گونه بیان کرد که آلودگی گوشت‌های دام و طیور بررسی شده می‌تواند یکی از عوامل انتقال سیتروباکتر فروندی به انسان و شیوع آن باشد. با وجود این که سیتروباکتر فروندی به خشکی و دما حساس می‌باشد اما در صورت پخت نامناسب گوشت یا بروز آلودگی‌های ثانویه احتمال انتقال این باکتری به انسان و ایجاد بیماری زیاد وجود دارد. در ایران بررسی‌های بسیار اندکی در خصوص آلودگی گوشت دام و طیور به سیتروباکتر فروندی صورت گرفته است. اکثر تحقیقات مربوط به بررسی شیوع سیتروباکتر فروندی در نمونه‌های بالینی است. اما یافته‌های به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که گوشت‌های دام و طیور توزیع شده در سطح فروشگاه‌های شهر شهرکرد می‌تواند منبع قابل توجهی جهت انتشار آلودگی باشد. حضور گونه‌های سیتروباکتر در مدفوع، گوشت و سایر فرآورده‌های مرتبط با طیور و دام در ایران و جهان باید مورد توجه قرار بگیرد و نیازمند بررسی‌های بیشتر در این زمینه است.

امروزه نقش بالا و تعیین کننده ی تولیدات طیور در تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز جوامع بیش از هر زمان دیگری مشهود است. پایین بودن نسبی

که ۲۳ نمونه (۱۵/۳۳ درصد) آلوده به سیتروباکتر فروندی می‌باشند (Awad et al., 2022). درصد شیوع سیتروباکتر فروندی در مطالعه آواد و همکاران بالاتر از پژوهش حاضر بوده است.

در پژوهش Uzeh و همکاران در سال ۲۰۲۱، از مجموع ۸۰ نمونه گوشت گوسفند، خوک، گوشت گاو و مرغ مورد بررسی در نیجریه، ۱۴ جدایه (۱۲/۷ درصد) سیتروباکتر فروندی جدا گردید (Uzeh et al., 2021) درصد شیوع سیتروباکتر فروندی در مطالعه یوزه و همکاران بالاتر از پژوهش حاضر بوده است.

مطالعه منصور و همکاران در سال ۲۰۲۱، به-منظور بررسی آلودگی باکتریایی گوشت گوسفند در مغازه‌های گوشت در شهر بنغازی، شمال شرقی لیبی، انجام شد. از مجموع ۳۵ نمونه گوشت جمع‌آوری شده، ۷ جدایه (۲۰ درصد) سیتروباکتر فروندی گزارش شده است (Mansour et al., 2019)

درصد شیوع سیتروباکتر فروندی در مطالعه Mansour و همکاران بالاتر از پژوهش حاضر بوده است. مطالعه ی Al-Asbahi و همکاران در سال ۲۰۲۲، برای تعیین فراوانی آلودگی سیتروباکتر در گوشت طیور در کشور یمن منطقه معین-صنعا انجام شد از مجموع ۱۵۰ نمونه گوشت طیور، ۱۰۶ جدایه (۳۵/۱ درصد) سیتروباکتر فروندی گزارش شد (Al-Asbahi et al., 2022) درصد شیوع سیتروباکتر فروندی در مطالعه اسبهی و همکاران بالاتر از پژوهش حاضر بوده است.

به‌نظر می‌رسد تفاوت شیوع سیتروباکتر فروندی در گوشت دام و طیور در مطالعات مختلف مربوط به رعایت نامناسب اصول بهداشتی در خط کشتار دام و طیور، تخلیه صحیح امعا و احشا، غوطه‌وری در آب گرم

خانواده‌ی انتروباکتریاسه با توجه به فراوانی بسیار بالای آن‌ها در جوامع مختلف، دارای اهمیت بیشتری می‌باشند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این خانواده، با مکانیسم‌های مختلفی ایجاد می‌شود. مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سیتروباکتر ممکن است تا حدودی به دلیل عدم درمان آنتی‌بیوتیک تجربی بی اثر باشد. (Giammanco et al., 2011).

در تحقیق انجام شده توسط نمکی و همکاران که به منظور بررسی فراوانی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های سیتروباکتر جدا شده از طغیان های مواد غذایی صورت گرفت، بیشترین فراوانی (۷۰/۲۰ درصد) مربوط به سیتروباکتر فروندی بود. (نمکی و همکاران، ۱۳۹۸) در بررسی Samonis و همکاران هم فراوانی سیتروباکتر فروندی (۷۱ درصد) گزارش گردید (Samonis et al., 2009).

در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای توسط Pepperell انجام شد که تست حساسیت سویه‌های سیتروباکتر و مقاومت در برابر طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها را مورد بررسی قرارداد. همه‌ی سویه‌ها به سفالوسپورین-های نسل چهارم مقاوم بودند هم‌چنین بیشترین میزان شیوع ژن‌های ESBL (ارتباط فنوتیپ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف) مربوط به SHV (۲۲/۲ درصد) بوده است و در ژاپن میزان شیوع آن ۱۹/۳ درصد و در کره جنوبی ۴/۹ درصد گزارش شده است. (Pepperell et al., 2002).

نتیجه گیری:

وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های سیتروباکتر فروندی در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه ذکر شده نشانگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان دام و طیور است که بسته به نوع منطقه و نحوه تجویز

هزینه‌های تولید، بالا بودن بازدهی غذایی، عدم وجود بیماری‌های مشترک جدی (در مقایسه با سایر دام‌ها)، برتری غذایی گوشت سفید بر گوشت قرمز از ابعاد مختلف و ملاحظات تغذیه‌ای، کوتاه بودن دوره‌ی پرورش و درنهایت سرعت بالا و بی نظیر رشد در مقایسه با سایر دام‌ها و آبزیان جملگی سبب گردیده تا جایگاهی رفیع، بدون رقیب و یکه تاز در عرصه‌ی تولید پروتئین حیوانی فراهم آید.

با توجه به رشد بسیار سریع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، به دلیل استفاده بی‌رویه از داروها به ویژه در کشورهای در حال پیشرفت، نیاز به ارزیابی الگوی مقاومت ارگانیزم‌های بیماری‌زا و به ویژه گونه‌های مرتبط با عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و شناسایی ارگانیزم‌های دارای مقاومت چند دارویی و نیز انتخاب رژیم درمانی صحیح بر این اساس، ضروری است. امروزه یکی از مشکلات موجود در مورد سیتروباکتر فروندی ظهور سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی است که به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی از جمله آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها و کوتریموکسازول مقاومت نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های گوشت طیور به-ترتیب در اریترومايسين در ۱۸ جدایه (۷۵ درصد)، کوتریموکسازول در ۱۷ جدایه (۷۰/۸۳ درصد)، تتراسایکلین در ۱۵ جدایه (۶۲/۵ درصد) و نالیدیکسیک اسید در ۱۲ جدایه (۵۰ درصد) مشاهده شده است. به سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا، سیتروباکتر به عنوان یک نگرانی در جامعه بهداشتی محسوب می‌شود.

مقاومت

باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها جز مهم‌ترین خطرات تهدیدکننده‌ی بهداشت جهانی توسط سازمان بهداشت جهانی معرفی شده‌است. باکتری‌های موجود در

آنتی بیوتیک الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نیز متفاوت خواهد بود.

حضور عوامل باکتریایی از جمله سیترو باکتر در مواد غذایی، از دو جنبه واجد اهمیت است. از یک طرف با ایجاد عوارض و بیماری در دام باعث تلفات و کاهش راندمان تولید می شوند و می توانند هزینه های تولید را افزایش دهند و از طرفی با انتقال ژن های مقاومت و بقایای دارویی در گوشت و تخم مرغ سلامت مصرف کنندگان را در معرض خطر قرار دهند. عموماً بیماری های باکتریایی با استفاده از آنتی بیوتیک ها در مقاطعی از دوره پرورش کنترل می شوند اما گاهی اوقات در سویه های حاد و یا مقاوم برای کنترل مناسب بیماری لازم می شود چند دوره از آنتی بیوتیک های متنوع مصرف شود. آنتی بیوتیک ها مهم ترین گروه مواد ضد میکروبی هستند که به طور وسیع برای انسان و حیوان تجویز می گردند. سالانه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار تن آنتی بیوتیک در سطح جهان تولید می شود. متأسفانه استفاده از آنتی بیوتیک ها در دامپزشکی منجر بر جا گذاشتن باقی مانده هایی در گوشت شیر و تخم مرغ می گردد (Henchion et al., 2014).

- 1- Al-Asbahi A.A. 2022. Prevalence and Bacteriological Study of Gram-negative bacteria especially *Citrobacter* spp. in Poultry meat from Maeen Area-Sana'a, Yemen. *Journal of Appl Vet Sci.* 7(4), 62-66.
- 2- Awad N and Al-Saadi M.J. 2022. Isolation and molecular diagnosis of *Citrobacter freundii* in raw meat (beef, mutton and fish) in AL-Rusafa district of Baghdad city. *Int J Health Sci.* 6(S8), 1482-1491.
- 3- Bai L., Xia S., Lan R., Liu L., Ye C., Wang Y., Jin D., Cui Z., Jing H., Xiong Y., Bai X. 2012. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS One.* 21; 7(3):e33054.
- 4- Basra P., Koziol A., Wong A., Carrillo CD. 2015. Complete genome sequences of *Citrobacter braakii* strains GTA-CB01 and GTA-CB04, isolated from ground beef. *Genome Announcements.* 26; 3(1). e01307-3014.
- 5- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 26th informational supplement. Wayne, PA: CLSI. 2023.
- 6- Dasenaki M.E., Kritikou A.S., Thomaidis N.S. 2023. Meat safety: II Residues and contaminants. *Lawrie's Meat Sci.* 591-626.
- 7- Giammanco GM, Aleo A, Guida I, Mammina C. Molecular epidemiological survey of *Citrobacter freundii* misidentified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) and *Enterobacter hormaechei* isolated from powdered infant milk formula. *Foodborne Path and Dis.* 2011; 8(4):517-525.
- 8- Hashim M.H. and AlKhafaji M.H. 2018. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from chicken meat samples using cultural and molecular techniques. *Iraqi. J.Sc.* 1216-1224.
- 9- Henchion M., McCarthy M., Resconi VC., Troy D. 2014. Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat. Sci.* 98 (3): 561-568.
- 10- Ifeadike C.O., Ironkwe O.C., Adogu P.O., Nnebue C.C., Emelumadu O.F., Nwabueze S.A., Ubajaka C.F. 2012. Prevalence and pattern of bacteria and intestinal parasites among food handlers in the Federal Capital Territory of Nigeria. *J. Nigeria. Med.* 53 (3):166-205.
- 11- Imran Z.A.K., Angham J.M.A., Shareef H.K. 2020. Isolation and Molecular Identification of *Citrobacter freundii* from Diarrheal Patient in Babylon Province, Iraq. *Plant Arch.* 20 (1): 2861-2865.
- 12- Lavigne J.P., Defez C., Bouziges N., Mahamat A., Sotto A. 2007. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. infections in a French university hospital. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* 1; 26(6):439-441.
- 13- Liu H.W., Chang C.J., Hsieh C.T. 2015. Brain abscess caused by *Citrobacter koseri* infection in an adult. *Neurosciences.* 20 (2):170-178.
- 14- Li Y., Pei X., Zhang X., Wu L., Liu Y., Zhou H., Yang D.A. 2019. surveillance of microbiological contamination on raw poultry meat at retail markets in China. *Food. Control.* 104; 99-104.
- 15- Mansour A.M.A., Ishlak A.M.M., Haj-Saeed B.A. 2019. Evaluation of bacterial contamination on local and imported mutton in meat markets in

- Benghazi-Libya. Int. J. Agri. Sci. 4; 77-83.
- 16- Namaki F., Rajabi Z., Soltan Dalal M.M. 2019. Antimicrobial resistance pattern of *Citrobacter* species isolated from food outbreaks. Razi J Med Sci. 26; (5): 9-17.
- 17- Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A, Burrows LL. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002; 1;46(11):3555-3560.
- 18- Saba C.K., Gonzalez-Zorn B. 2012. Microbial food safety in Ghana: a meta-analysis. J. Infect. Develop. Countries. 16; 6(12):828-835.
- 19- Santosa C., Ramalheirab E., Da Silvaca G., 2017. Mendo S. Genetically unrelated multidrug and carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* detected in outpatients admitted to a Portuguese hospital. J Glob Antimicrob Resist. 8: 17-22.
- 20- Shawish R.R., El-Bagory A.R.M., Elnahriry S.S., Wafy H.A., Sayed H.H. 2020. Incidence of antibiotic resistant coliforms in poultry meat in Menoufia Governorate, Egypt. PSM. Microbiol. 5(1); 7-13.
- 21- Uzeh R.E., Adewumi F., Odumosu B.T. 2021. Antibiotic resistance and plasmid analysis of Enterobacteriaceae isolated from retail meat in Lagos Nigeria. One Health Outlook, 3, 1-6.

Antibiotic resistance pattern in *Citrobacter freundii* strains isolated from poultry meat in Shahrekord city

Hossein Khodabandeh shahraki¹, Elaheh Tajbakhsh^{1*}, Faham Khamesipour², Hassan Momtaz¹,
Manochehr Momeni shahraki³

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Research Center for Hydatid Disease in Iran, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Citrobacter freundii is an emerging foodborne pathogen of public health importance. The present study aimed to investigate the prevalence and phenotypic and genotypic antibiotic resistance of *Citrobacter* isolates isolated from poultry meat in Shahrekord city. In this cross-sectional-descriptive study, 300 chicken, quail and turkey meat samples were examined for *Citrobacter freundii* contamination in Shahrekord city in 2024. The samples were examined by biochemical and molecular methods. The disc diffusion method was used to determine the sensitivity of bacteria to antibiotics, and antibiotic resistance genes were examined using specific primers. Using biochemical methods, 24 isolates (8%) of *Citrobacter freundii* were isolated, which were also confirmed by molecular methods. The contamination was reported to be 12% in quail meat, 7% in chicken meat, and 5% in turkey meat. After confirming the bacteria using microbiological and molecular tests and performing an antibiogram, the highest resistance was reported to co-trimoxazole (70.83%). All strains were sensitive to the antibiotics gentamicin, ceftriaxone, ciprofloxacin, kanamycin, and cefotaxime. The presence of antibiotic resistance in *Citrobacter freundii* isolates in the present study and similar studies mentioned indicates the use of antibiotics in the treatment of livestock and poultry, which will vary depending on the type of region and the method of antibiotic administration.

Keywords: Antibiotic resistance, *Citrobacter freundii*, poultry meat.