بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی علیه سویه های سالمونلا جدا شده از گوشت بوقلمون در استان اصفهان

سیده ام البنین قاسمیان*[۱]، مجید غلامی آهنگران[۲] ، فرهاد لجم اورک[۳]، زهرا صادقیان[۴]

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان، بهبهان، ایران
۲- گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳- دانش آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران
۴- دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر شوشتر، ایران
***نویسنده مسئول:Ghasemian1249yahoo.com**

چکیده

این مطالعه با هدف شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلا در گوشت بوقلمون‌های کشتار شده انجام شد. از ۲۰۰ نمونه سوآب گرفته‌شده از ناحیه پشت گردن بوقلمون‌ها، ۱۶ مورد (۸٪) آلوده به سالمونلا تشخیص داده شد. شناسایی اولیه با روش‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی و تأیید نهایی با PCR صورت گرفت که در آن همه ایزوله‌ها دارای باند ۲۸۴ جفت‌بازی مربوط به ژن *invA* بودند. همچنین ۱۴ ایزوله دارای ژن *FliC* مربوط به سروتیپ تیفی‌موریوم و ۲ ایزوله واجد ژن *Prot6E* مربوط به انتریتیدیس بودند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر اکسی‌تتراسایکلین (۵۰٪) و بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین (۱۰۰٪) مشاهده شد. نتایج PCR نشان داد که ۳ سویه دارای ژن *Sul1* (۱۸/۷۵ ٪) و ۵ سویه دارای ژن *qnrA* (۳۱/۲۵ ٪) هستند، در حالی‌که هیچ‌یک حامل ژن *Act(3)-IV* نبودند. تمام سویه‌های دارای ژن‌های *Sul1* و *qnrA* در آزمون آنتی‌بیوگرام به ترتیب در برابر سولفانامید/تری‌متوپریم و انروفلوکساسین مقاومت نشان دادند. این نتایج بیانگر وجود سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گوشت بوقلمون‌های عرضه‌شده در اصفهان است که می‌تواند هشداری برای سلامت عمومی باشد.

واژگان کلیدی: سالمونلا، گوشت بوقلمون، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن مقاومت، اصفهان

مقدمه

سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای زئونوز در صنعت پرورش طیور به شمار می‌رود که به دلیل تنوع در بیماری‌زایی، گستردگی طیف میزبانی و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی متنوع، جایگاه ویژه‌ای در حوزه بهداشت دام و انسان دارد (۱). تاکنون بیش از ۲۷۰۰ سروار از این باکتری شناسایی شده‌اند که بسیاری از آن‌ها از انسان به حیوان و بالعکس قابل انتقال بوده و در دسته عوامل بیماری‌زای مشترک قرار می‌گیرند (۲). بهترین راه تشخیص سالمونلوز در طیور، کشت میکروبی از احشای داخلی مانند کبد، روده و قلب است (۳). در کنار نقش مهم سالمونلا در کاهش بهره‌وری مزارع طیور و ایجاد خسارات اقتصادی، انتقال آن به انسان از طریق محصولات آلوده مانند گوشت طیور نیز خطرات جدی برای سلامت عمومی به همراه دارد (۳).

در حال حاضر، هرچند نظارت‌ها بر گله‌های مولد طیور توسط سازمان دامپزشکی کشور صورت می‌گیرد، اما این نظارت‌ها به طور کافی در مورد گله‌های بوقلمون گوشتی اعمال نمی‌شود (۳). با توجه به این‌که پرورش بوقلمون گوشتی در مدت زمان کوتاه انجام می‌شود (۴ تا ۵ ماه)، احتمال آلودگی گوشت این پرنده در فرآیند پرورش و کشتار بالاست و اطلاعات محدودی درباره وضعیت آلودگی آن در دسترس است. لذا ضرورت دارد وضعیت آلودگی سالمونلایی در گوشت بوقلمون و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به‌صورت دقیق بررسی شود تا بتوان با اتخاذ استراتژی‌های کنترلی مناسب از گسترش آلودگی جلوگیری کرد.

مرور پژوهش‌های گذشته نیز اهمیت این موضوع را تأیید می‌کند. تیغ و همکاران در سال ۲۰۱۵ میزان آلودگی بوقلمون‌های سیستان و بلوچستان را ۸.۱۴ درصد گزارش کردند و مقاومت دارویی را نسبت به سفالکسین بالا دانستند (۴). روشن‌مرام در سال ۲۰۲۱ بیشترین مقاومت را نسبت به کلستین در بوقلمون‌های مناطق مختلف کشور ثبت کرد (۵). رحیمی و همکاران در مطالعه‌ای در اصفهان، ۷/۹ درصد آلودگی را در گوشت بوقلمون گزارش کردند که بیشترین مقاومت به تتراسایکلین مربوط بود (۶). همچنین، عزیزپور در اردبیل و زاهدی در شهرکرد نیز شیوع بالای آلودگی سالمونلایی در فرآورده‌های طیور را بیان کردند(۱، ۷).

با توجه به خسارات اقتصادی، خطرات بهداشتی و گسترش مقاومت دارویی، بررسی دقیق سویه‌های سالمونلا در گوشت بوقلمون از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی، نقشی کلیدی در بهبود برنامه‌های کنترلی و نظارتی خواهد داشت. منابع گوشت پرندگان از جمله بوقلمون، به دلیل تنوع و ارزش غذایی بالا، جایگاه قابل توجهی در سبد غذایی خانوارها دارند و بررسی اپیدمیولوژیک منظم و منطقه‌ای این منابع برای جلوگیری از انتقال عوامل بیماری‌زا به انسان ضروری است. (۸،۱)

این مطالعه با هدف بررسی شیوع سالمونلا و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در گوشت بوقلمون‌های عرضه‌شده در استان اصفهان طراحی شده است تا بتواند اطلاعات دقیق‌تری از الگوی مقاومت و میزان آلودگی در این گونه طیور ارائه دهد. نتایج این تحقیق می‌تواند در جهت بهینه‌سازی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و سیاست‌گذاری‌های بهداشتی کشور نقش مؤثری ایفا کند.

مواد و روش کار

در این مطالعه، از محیط‌های کشت اختصاصی شامل مک‌کانکی آگار (MacConkey Agar) و سالمونلا-شیگلا آگار (Salmonella Shigella Agar) ساخت شرکت Merckکشور آلمان استفاده شد. همچنین برای آماده‌سازی محیط‌ها و انجام مراحل شست‌وشو، از آب مقطر بهره گرفته شد.

از جمله تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده در مراحل مختلف آزمایش می‌توان به انکوباتور، دستگاه ترموسایکلر PCRمدلEppendorf ساخت آلمان و دستگاه ژل داکیومنتیشن ساخت شرکتUvitech کشور انگلستان اشاره کرد.

این مطالعه در بازه زمانی اردیبهشت ۱۴۰۰ تا اردیبهشت ۱۴۰۱ انجام شد. در مجموع ۲۰۰ نمونه سوآب از قسمت پشتی گردن بوقلمون‌های کشتار شده، از فروشگاه‌های عرضه گوشت بوقلمون در شهر اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت، در محیط غنی‌سازی اختصاصی سالمونلا و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا برای مراحل بعدی آزمایش آماده شوند.

جهت جداسازی و شناسایی اولیه باکتری سالمونلا از نمونه‌های جمع‌آوری شده، سوآپ‌ها ابتدا در لوله‌های حاوی محیط پپتون واتر تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۸-۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس از محیط پیش‌غنی‌سازی، با سوآب تازه برداشت شده و به محیط حاوی سلنیت Fمنتقل گردید و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از غنی‌سازی، نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی MacConkey Agar کشت داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. کلنی‌های مشکوک (شفاف، بدون تخمیر لاکتوز) توسط لوپ استریل برداشته شده و روی محیط سالمونلا-شیگلا آگار مجدداً کشت داده شدند. این محیط نیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کلنی‌های مشکوک برای شناسایی نهایی به محیط‌های افتراقی منتقل شدند و آزمون‌های بیوشیمیایی لازم بر روی آن‌ها انجام گرفت. در محیط Lysine Iron Agar (LIA)، به دلیل دکربوکسیلاسیون لیزین، رنگ ارغوانی ایجاد شد که نشان‌دهنده حضور باکتری سالمونلا است. در محیط Triple Sugar Iron Agar (TSI)، تخمیر گلوکز منجر به تغییر رنگ شیب به قرمز و ته لوله به زرد گردید و در برخی گونه‌ها، تولید H_2Sباعث سیاه شدن محیط شد. در محیط Urea broth، عدم تخمیر اوره توسط سالمونلا موجب عدم تغییر رنگ محیط گردید. در آزمون‌هایIMViC نیز الگوی بیوشیمیایی به‌صورت Indole منفی، MRمثبت، VPمنفی و تست احیای سیترات مثبت مشاهده شد که این نتایج با ویژگی‌های شناخته‌شده سالمونلا مطابقت داشت. همچنین جهت تهیه محیط کشت مناسب برای استخراجDNA ، از محیط Nutrient Brothاستفاده گردید.

برای استخراج DNA ژنومی باکتری‌های جدا شده، روش Boilingبه‌شرح زیر انجام شد: ایزوله‌های باکتریایی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محیط Nutrient Brothدر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری جوشان قرار داده شدند. پس از لیز شدن باکتری‌ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت، ۳۰ میکرولیتر از محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل شدند.

برای شناسایی قطعی باکتری *سالمونلا* و تعیین تیپ‌های سرولوژیکی آن، واکنش‌های PCR طراحی و اجرا شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید که شامل ۲۰ میکرولیتر از محلول PCR Buffer حاوی ۵۰۰ میکرومولار KCl و ۲۰۰ میکرومولارTris-HC، ۱/۲۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$با غلظت ۵۰ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase محصول شرکت (Fermentas) و ۵ میکرولیتر DNA استخراج‌شده بود. پرایمرهایی که ژن invA را مورد هدف قرار می‌دهند اختصاصی جنس سالمونلا و پرایمرهایی که ژن fliC و prot6E را مورد هدف قرار می دهند به ترتیب اختصاصی سرووارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس می باشند.

Primer Name	Primer sequence	Gene	Size of product (bp)
S139-F	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	Inv A	**284**
S141-R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی سالمونلا

Primer Name	Primer sequence	Gene	Size of product (bp)
Fli15-F	CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT	fliC	**559**
Tym-R	ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT		
Prot6e-5-F	ATATCGTCGTTGCTGCTTCC	Prot6E	**185**
Prot6e-6-R	CATTGTTCCACCGTCACTTG		

جدول۲ توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی تیپ‌های سالمونلا

انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf ساخت آلمان صورت گرفت و شرایط حرارتی آن به‌شرح زیر بود: آغازگر واکنش با دمای اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ردیابی انتریتیدیس و ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای ردیابی جنس سالمونلا و نیز گونه تیفی‌موریوم، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت می گیرد.

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ ولت و در بافر TBE انجام گرفت. مشاهده و تصویربرداری از باندها با دستگاه UV Doc (Uvitech, U.K) انجام شد. از مارکر DNA Ladder 100 bp جهت تعیین سایز باندها استفاده شد.

برای تعیین حساسیت فنوتیپی جدایه‌های *سالمونلا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، از روش انتشار دیسک در محیط کشت روش کربی بوئر[1] استفاده شد. در این روش، ابتدا جدایه‌ها در محیط مک‌کانکی آگار (MacConkey Agar) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه انتخابی از محیط مک کانکی آگار به درون لوله‌ای حاوی محیط کشت مایع TSB[2] منتقل شده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند تا کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند حاصل شود.

سوسپانسیون به‌دست‌آمده با سوآب استریل روی سطح محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت خطی داده شد. سپس دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک (ساخت شرکت پاتن طب، ایران) شامل داروهای زیر بر روی محیط قرار گرفتند: انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سولفانامید + تری متوپریم (سولتریم) (ترکیب ۷۵/۲۳ و ۲۵/۱ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، اکسی‌تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، لینکوسپکتین (ترکیب ۱۵ و ۲۰۰ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و آموکسی‌کلاو (ترکیب ۲۰ و ۱۰ میکروگرم).

پس از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در پایان، قطر هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شده و نتایج به‌دست‌آمده طبق دستورالعمل‌های کمیته استانداردهای آزمایشگاهی کلینیکی (NCCLS)تفسیر شدند.

[1] - Kirby-Bauer
[2] - Trypticase Soy Broth

جهت شناسایی **ژنوتیپی** مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلا*، ژن‌های مربوط به مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها(qnr) ، سولفانامیدها (sul1) و جنتامایسین (aac-3-IV) با روش PCRبررسی شدند. شرایط واکنش PCR شامل ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی حاوی ۲.۵ میکرولیتر بافر ×۱۰، ۱.۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰.۲ میلی‌مول از هر dNTP ، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۰.۵ میکرومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه برای ۶۰ ثانیه، هم‌دماسازی در دمای اختصاصی هر ژن برای ۹۰ ثانیه، و گسترش در ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه و مرحله نهایی گسترش در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. نتایج PCR با ژل آگارز ۱.۵ درصد(۰/۳ گرم آگارز در ۲۵ میلی لیتر بافر TBE 1X حل شد)، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و مستندسازی با دستگاه UV مورد بررسی قرار گرفتند.

اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدول (۳) ارائه شده است.

آنتی بیوتیک	ژن مقاومت	توالی	اندازه محصول	دمای همسرشت سازی	منبع
کینولون ها	qnrA	F:GGGTATGGATATTATTGATAAAG R:CTAATCCGGCAGCACTATTTA	۶۷۰	۵۰	۱۶
سولفانامیدها	Sul 1	F:TTCGGCATTCTGAATCTCAC R:ATGATCTAACCCTCGGTCTC	۸۲۲	۴۷	۳۵
جنتامایسین	Aac(3)-IV	F: CTTCAGGATGGCAAGTTGGT R:TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	۲۸۶	۵۵	

جدول۳: اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی

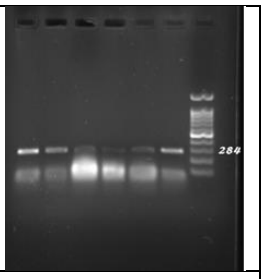
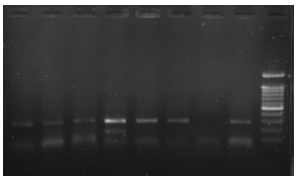
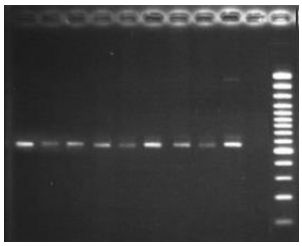
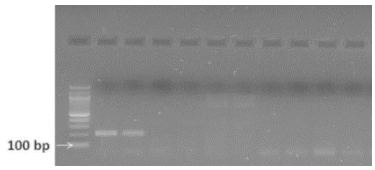
نتایج و تحلیل داده ها

در این مطالعه، از مجموع ۲۰۰ نمونه سوآب گرفته‌شده از ناحیه پشت گردن بوقلمون‌های کشتارشده، تعداد ۱۶ نمونه (۸ درصد) از طریق آزمون‌های میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی آلوده به باکتری *سالمونلا* تشخیص داده شد. رشد این ایزوله‌ها به‌صورت کلنی‌های بی‌رنگ و شفاف بر روی محیط‌های مک‌کانکی و سالمونلا-شیگلا آگار مشاهده شد.

در آزمونTSI ، نتایج به‌صورت تخمیر گلوکز (زرد) و عدم تخمیر لاکتوز (قرمز) و در برخی موارد تولید سولفید هیدروژن (رنگ سیاه) مشاهده گردید .

همچنین در محیط LIA، رنگ ارغوانی ناشی از دکربوکسیلاسیون لیزین به‌عنوان یکی از نشانه‌های تشخیصی سالمونلا دیده شد. در آزمون‌های بیوشیمیایی، اوره‌آز منفی، تست MR مثبت، VPمنفی و تست احیای سیترات مثبت بود که با الگوی بیوشیمیایی شناخته‌شده سالمونلا مطابقت داشت.

برای شناسایی مولکولی، تمام ۱۶ ایزوله در واکنش PCR توانستند باند ۲۸۴ جفت بازی مربوط به ژن invA، که ژن اختصاصی جنس سالمونلا است، را تکثیر کنند. به‌منظور تعیین تیپ، ژن‌های fliCو prot6Eنیز تکثیر شدند. نتایج نشان داد که ۱۴ ایزوله حاوی ژن fliC متعلق به سروار تیفی‌موریوم (شکل ۱-پ) و ۲ ایزوله حاوی ژن prot6E متعلق به سروار انتریتیدیس هستند (شکل۱-ت)

			
شکل۱-الف: ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی ژن *inv A* سالمونلا (مربوط به ۶ نمونه مثبت سالمونلا)	**شکل ۱-ب:** ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی ژن *inv A* سالمونلا (مربوط به ۷ نمونه مثبت سالمونلا و یک نمونه کنترل منفی)	**شکل۱-پ:** ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۵۵۹ جفت بازی ژن Fli C سالمونلا تیفی موریوم (مربوط به ۹ نمونه مثبت سالمونلا تیفی موریوم و یک نمونه کنترل منفی)	**شکل ۱-ت:** ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۱۸۵ جفت بازی ژن ***Prot6E*** سالمونلا انتریتیدیس (مربوط به ۲ نمونه مثبت سالمونلا انتریتیدیس و ۸ نمونه منفی)

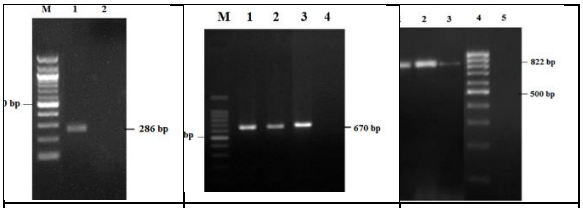
جدول ۴: نتایج مربوط به شناسایی مولکولی ایزوله‌ها و تعیین تیپ سرولوژیکی آن‌ها

برای ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سالمونلا با استفاده از روش انتشار دیسک کربی-باوئر نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به اکسی‌تتراسایکلین (۵۰٪)و کمترین میزان مقاومت مربوط به جنتامایسین، آموکسی‌کلاو، سفوتاکسیم و سفتریاکسون بود که هیچگونه مقاومتی در برابر آن‌ها مشاهده نشد. همچنین، ۶/۲۵ درصد از ایزوله‌ها به ۹ نوع آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند، و بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین (۱۰۰٪) گزارش شد.

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه مقاوم	حساس
انروفلوکساسین	۷	۳	۶
سوزلریم	۸	۴	۴
فلورفنیکل	۱۰	۴	۲
داکسی سیکلین	۱۲	۳	۱
جنتامایسین	۱۶	۰	۰
اموکسی کلاو	۱۵	۱	۰
سیپروفلوکساسین	۱۱	۲	۳
سفالکسین	۱۴	۱	۱
سفوتاکسیم	۱۵	۱	۰
سفتریاکسون	۱۵	۱	۰
لینکواسپکتین	۱۰	۳	۳
فسفومایسین	۱۴	۱	۱
اکسی تتراسایکلین	۴	۴	۸

جدول ۵: نتایج مقاومت، حساسیت و نیمه‌مقاومت ایزوله‌ها به هر آنتی‌بیوتیک را به تفصیل نشان می‌دهد

در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، نتایج حاصل از واکنش PCR نشان دادند که از میان ۱۶ ایزوله بررسی‌شده، ۳ سویه (۱۸.۷۵٪) حامل ژن Sul1(قطعه ۸۲۲ جفت بازی، شکل ۲-الف) و ۵ سویه (۳۱.۲۵٪)حامل ژن qnrAقطعه ۶۷۰ جفت بازی، (شکل ۲-ب) بودند. هیچ‌کدام از ایزوله‌ها موفق به تکثیر ژنaac(3)-IV (قطعه ۲۸۶ جفت بازی) نشدند (شکل ۲-پ).



شکل۲-الف: الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن Sul1 (ستون ۱ تا ۳: نمونه های مثبت ۸۲۲ جفت بازی، ستون ۴: مارکر، ستون ۵: کنترل منفی).	**شکل ۲-ب:** الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *qnrA* (M: مارکر، ستون ۱ تا ۳: نمونه های مثبت ۶۷۰ جفت بازی، ستون ۴: کنترل منفی)	**شکل ۲-پ:** الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن Aac(3)-IV (M: مارکر، ستون ۱: کنترل مثبت ۲۸۶ جفت بازی، ستون ۲: کنترل منفی).

جدول۶: نتایج مربوط به شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از واکنشPCR

همچنین مشاهده شد که تمامی سویه‌های دارای ژن Sul1 در آزمون فنوتیپی نسبت به سولفانامید+تری‌متوپریم مقاوم بودند و همین وضعیت برای ژن qnrAدر برابر انروفلوکساسین نیز صادق بود. از مجموع ۴ سویه با فنوتیپ مقاوم به سولفانامید، ۳ سویه (۷۵٪) حاوی ژن Sul1بودند. همچنین، از میان ۶ سویه مقاوم به انروفلوکساسین، ۵ سویه (۸۳.۳٪) حامل ژن qnrAبودند.

بحث

در مطالعه حاضر، از مجموع ۲۰۰ نمونه سوآب جمع‌آوری‌شده از پشت گردن بوقلمون‌های کشتار شده، ۱۶ نمونه (۸٪) آلوده به باکتری سالمونلا تشخیص داده شد. ویژگی‌های کلنی‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی نظیر مک‌کانکی وSS ، به صورت پرگنه‌های بیرنگ و شفاف ظاهر شده و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک نیز تطابق کامل با خصوصیات شناخته‌شده سالمونلا نشان دادند. همچنین نتایج تست PCR بیانگر حضور قطعه ۲۸۴ جفت بازی مربوط به ژن invA در تمامی ایزوله‌ها بود، که وجود سالمونلا را به‌طور قطعی تأیید می‌کند. بررسی ژن‌های اختصاصی FlicC و Prot6E نیز نشان داد که ۱۴ ایزوله واجد ژن تیفی‌موریوم و ۲ ایزوله مربوط به سروار انتریتیدیس بودند.

میزان آلودگی مشاهده‌شده در این تحقیق با نتایج برخی مطالعات پیشین در ایران مشابهت دارد. برای مثال، جهان‌تیغ و همکاران (۲۰۱۵) میزان آلودگی ۱۴/۸٪ را در بوقلمون‌های استان سیستان و بلوچستان گزارش کردند، در حالی‌که رحیمی و همکاران (۲۰۱۱) این میزان را در اصفهان ۹/۷٪ اعلام نمودند (۶). همچنین روشن مرام (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای بر روی محتویات گوارشی بوقلمون‌ها موفق به جداسازی ۷ سویه سالمونلا از میان ۴۵ نمونه شد (۵). در سایر مطالعات صورت‌گرفته بر روی طیور، میزان آلودگی در مرغ‌های گوشتی نیز بالا گزارش شده است؛ چنان‌که عزیزپور (۲۰۱۸) بیش از ۱۱٪ آلودگی را در اردبیل اعلام کرده است (۱) و زاهدی و همکاران (۱۳۹۶) این میزان را در شهرکرد بیش از ۳۰٪ گزارش نموده‌اند (۷)

در خصوص مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به اکسی‌تتراسایکلین (۵۰٪) و بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین (۱۰۰٪) وجود دارد. عدم مقاومت نسبت به داروهایی مانند جنتامایسین، آموکسی‌کلاولانیک‌اسید، سفوتاکسیم و سفتریاکسون قابل توجه است. مقاومت بالای مشاهده‌شده نسبت به انروفلوکساسین می‌تواند ناشی از مصرف گسترده این دارو در فارم‌های طیور باشد؛ موضوعی که در مطالعات سایر کشورها نیز مطرح شده است (۹). این یافته‌ها با نتایج سایر تحقیقات داخلی نیز هم‌خوانی دارد؛ از جمله مطالعه جهان‌تیغ و

همکاران (۲۰۱۵) که بیشترین مقاومت را نسبت به سفالکسین گزارش کرد (۴)، و تحقیق روشن‌مرام (۲۰۲۱) که کلستین را مقاوم‌ترین دارو معرفی کرد(۵).

با بررسی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مشخص شد که ٪۱۸.۷۵ ایزوله‌ها حامل ژن sul1و ٪۳۱.۲۵ ایزوله‌ها حامل ژن qnrAبودند. هیچ‌کدام از ایزوله‌ها حامل ژن aac(3)-IVنبودند. تمامی سویه‌های دارای ژن sul1 نسبت به سولفونامید و تری‌متوپریم، و تمامی سویه‌های حامل ژن qnrAنسبت به انروفلوکساسین مقاومت نشان دادند. با این حال، بین وجود ژن و بروز مقاومت فنوتیپی در همه موارد تطابق کامل مشاهده نشد. این یافته نشان‌دهنده آن است که مقاومت آنتی‌بیوتیکی تنها وابسته به وجود ژن نیست، بلکه بیان ژن و سایر عوامل نیز نقش دارند.

در مطالعات پیشین نیز نقش ژن‌های sul1 ، sul2و sul3در ایجاد مقاومت به سولفونامیدها در باکتری‌های گرم منفی نظیر سالمونلا و اشریشیا کلی مطرح شده است (۱۰). از سوی دیگر، ژن‌های qnr نیز نقش مهمی در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها دارند و با محافظت از آنزیم‌های هدف دارو مانند DNA gyrase و topo IV باعث خنثی شدن اثر دارو می‌شوند (۱۱، ۱۲). ژن sul1 که بخشی از اینتگرون کلاس I محسوب می‌شود، به‌عنوان رایج‌ترین ژن مقاومت در سالمونلا مطرح است (۱۳).

مطالعه حاضر نشان داد که گرچه وجود ژن sul1 نقش مهمی در بروز مقاومت دارد، اما در برخی ایزوله‌های مقاوم، این ژن حضور نداشت؛ که احتمال نقش داشتن ژن‌های دیگری مانند sul2 و sul3 را مطرح می‌کند. همچنین ردیابی همزمان ژن qnr در اکثر ایزوله‌های مقاوم به کینولون‌ها، مؤید نقش تعیین‌کننده این ژن در مقاومت دارویی است. با این حال، بررسی فنوتیپی مقاومت همچنان از حساسیت بالاتری نسبت به ردیابی ژنوتیپی برخوردار است و برای مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد می‌شود.

فلوروکینولون‌ها به‌دلیل اثربخشی بالا، مصرف گسترده‌ای در دامپزشکی دارند و مکانیسم‌های متعددی برای ایجاد مقاومت نسبت به آن‌ها مطرح شده است، از جمله جهش در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های هدف و یا اکتساب پلاسمیدهای حاوی ژن qnr یا پمپ افلاکس (۲). نتایج تحقیق عبدی و همکاران (۱۳۹۷) نیز حضور ژن‌های qnrB و qnrS را در سالمونلا انتریتیدیس جداشده از مواد غذایی با شیوع بالا گزارش کردند (۱۴).

مطالعات متعددی در زمینه شناسایی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سالمونلا در ایران انجام شده است. به عنوان مثال، نقی‌زاده و مرادلی (۱۳۹۶) از بین ۶۰ ایزوله سالمونلا، وجود ژن‌های تترا(tetA ، tetB، tetC)را در ٪۶۰ از ایزوله‌های مقاوم گزارش کردند (۱۵). همچنین، ارجمند اصل و امینی (۱۳۹۵) ژن‌های ویرولانس متعددی مانند sopB، slyA، stnو Phop/Q را در سالمونلا تیفی‌موریوم بررسی کرده و وجود آن‌ها را زنگ خطری برای انتقال افقی جزایر پاتوژنیسیتی بین سرووارهای مختلف اعلام نمودند (۱۶). مطالعه زینتی‌زاده و همکاران (۱۳۹۸) نیز نشان‌دهنده شیوع بالای ژن‌های slyA، stnو Phop/Q در سویه‌های بالینی بود(۱۷).

در مجموع، یافته‌های این تحقیق حاکی از شیوع قابل توجه سالمونلا در بوقلمون‌های کشتار شده و همچنین وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده، به‌ویژه نسبت به داروهای پرمصرف در صنعت طیور است. حضور ژن‌های مقاومت مانند sul1و qnrAمی‌تواند به‌عنوان شاخصی برای خطر انتقال مقاومت دارویی به انسان تلقی شود. این موضوع اهمیت پایش مستمر و کنترل مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را در صنعت دامپزشکی بیش از پیش روشن می‌سازد.

نتیجه گیری نهایی

به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سالمونلا جداشده از گوشت بوقلمون بسیار گسترده است و مقاومت‌های بالایی نسبت به داروهای رایج در

صنعت پرورش طیور وجود دارد. این مقاومت بالا دو نگرانی عمده ایجاد می‌کند: اول، کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری‌های عفونی طیور که می‌تواند منجر به تلفات و افزایش هزینه‌های درمانی شود؛ دوم، انتقال ژن‌های مقاومت به پاتوژن‌های انسانی که درمان بیماری‌های عفونی در انسان را پیچیده کرده و تهدیدی برای بهداشت عمومی به‌شمار می‌رود.

بنابراین، توصیه می‌شود در موارد ابتلا به بیماری‌های عفونی، حتماً تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شده و داروی مناسب بر اساس آن انتخاب شود. همچنین، رعایت دوز، مدت مصرف و اجتناب از مصرف داروهای انسانی در صنعت طیور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

منابع

۱- ارجمند اصل م، امینی ک. شناسایی مولکولی ژن های ویرولانس در سویه های بالینی سالمونلا تیفی موریوم به روش Multiplex-PCR و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها . دوماه نامه علمی ـ پژوهشی فیض. ۱۳۹۵; ۲۰ (۴) :۳۸۲-۳۷۶.

۲- اکبری مهر جعفر (۱۳۸۹). تعین گروه های سرمی سالمونلا های جدا شده از طیور و شناسایی ژن hila به روش PCR، مجله علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه ازاد اسلامی، دوره دوم، شماره ششم، صفحه ۳۳-۳۸.

۳- حسنی طباطبایی عبدالمحمد ، فیروزی، رویا.(۱۳۸۰). بیماری های باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۵۰۸.

۴- دادرس حبیب ا... ، اساسی کرامت و عالی مهر منوچهر(۱۳۸۳). راهنمای بیماری های پرندگان. انتشارات دانشگاه شیراز، صفحات ۱۸۳-۱۸۹.

۵- زاهدی مهشید، رحیمی ابراهیم، زاهدی مریم، ممتاز حسن، شجاعی حسن. بررسی شیوع آلودگی سالمونلا اینترتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم در گوشت های عرضه شده در شهرکرد سال ۱۳۹۳ . مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۱۳۹۶; ۱۹ (۲) :۹۷-۸۸.

۶- زینتی زاده م، خیرخواه ب، رنجبر زیدآبادی ح، معصومعلی نژاد ز، قاسمی ه. شناسایی ژن های سالمونلا تیفی‌موریوم و مقاومت آنتی بیوتیکی آن در نمونه های بالینی. مجله پژوهش سلامت. ۱۳۹۸; ۵ (۱) :۷-۱.

۷- عبدی ه, امینی ک, طباطبایی بفرویی ا. ۱۳۹۷. بررسی وجود ژنهای مقاومت به کینولون در سویه های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه های غذایی به روش Multiplex-PCR. دانشگاه علوم پزشکی سبزوار. ۲۵، ۲: ۱-۶.

۸- نقی زاده س، مرادلی غ. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جداسازی شده از منابع غذایی و شناسایی ژنهای مقاومت به تتراسایکلین (tetA/B/C) . مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱۳۹۶; ۱۱ (۴) :۶۴-۶۹.

9- Cattoir V, Nordmann P. (2009). Plasmid mediated quinolone resistance in gram negative bacterial species: an update. Curr Med Chem. 16(8): 1028-46. doi: 10.2174/092986709787581879.

10- Hooper, D.C., Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. Annals of the New York Academy of Sciences, 1354(1), 12.

11- Jahantigh, M., Jafari, S.M., Rashki, A. and Salari, S. (2015) Prevalence and Antibiotic Resistance of Salmonella spp. in Turkey. Open Journal of Medical Microbiology, 5, 113-117

12- Miles, T; McLaughlin, W and Brown, P (2006). Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates from broiler chickens and humans. BMC Vet. Res., 2: 2-7. DOI: 10.1186/1746-6148-2-7.

13- Rahimi, E., Amiri, M., Kazemeini, H. and Elbagi, M. 2010. prevalence and antimicrobial resistance of salmonella isolated from retail raw turkey, ostrich, and partridge meat in iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.13,1: 23.

14- Roshanmaram Kondori, P., Parvandar Asadollahi, K., Bozorgmehri Fard, M., Torabi, M., Mirzazadeh, S. (2021). Study of salmonella infection in broiler turkey carcasses in some provinces in Iran; molecular detection and antimicrobial susceptibility pattern. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, 11(1), 1423-1430.

15- Soltan Dallal MM, Taremi M, Modarressi Sh, Zolfagharian K, Zolfagharian K, Zali MR. Determining the Prevalence of Salmonella serotypes Obtained from Meat & Chicken Samples and Their Antibiotic Resistance Pattern in Tehran. Pajoohande. 2007; 12 (3) :245-252..

16- Taddele, Menghistu, H., Rathore, R., Dhama, K., and Kumar Agarwal, R.(2011)Isolation, Identification and Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of Salmonella Species from Field Materials of Poultry Origin. International Journal of Microbiology Research, 2: 135-142.

17- 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(1), 118-125.

Phenotypic and Genotypic Evaluation of Antibiotic Resistance in *Salmonella* Strains Isolated from Turkey Meat in Isfahan Province

Seyedeh Omolbanin Ghasemian[1*], Majid Gholami Ahangaran[2], Farhad Lajam Ourak[2], Zahra Sadeghian[3]

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Behbahan Branch, Behbahan, Iran
2. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine graduate, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
4. Doctor of Veterinary Medicine student, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran

***Corresponding author: Ghasemian1249yahoo.com**

Abstract

This study was conducted to identify and determine the antibiotic resistance patterns of *Salmonella* in the meat of slaughtered turkeys. Out of 200 swab samples collected from the back of the neck of turkeys, 16 samples (8%) were identified as *Salmonella*-positive. Initial identification was performed using microbiological and biochemical methods, and final confirmation was carried out by PCR, in which all isolates produced a 284 bp band corresponding to the invA gene. Additionally, 14 isolates carried the FliC gene related to *S. Typhimurium*, and 2 isolates carried the Prot6E gene associated with *S. Enteritidis*. The highest antibiotic resistance was observed against oxytetracycline (50%), while the highest sensitivity was recorded against gentamicin (100%). PCR results revealed that 3 isolates (18.75%) harbored the sul1 gene and 5 isolates (31.25%) carried the qnrA gene; none of the isolates contained the aac(3)-IV gene. All isolates carrying *sul1* and *qnrA* were phenotypically resistant to sulfonamide/trimethoprim and enrofloxacin, respectively. These findings indicate the presence of antibiotic-resistant *Salmonella* strains in turkey meat distributed in Isfahan, which may pose a potential threat to public health.

Keywords: *Salmonella*, Antibiotic resistance, Turkey meat, PCR, Isfahan