

مقاله پژوهشی

تعیین و مقایسه فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* جدا شده از گوشت مرغ در فارم‌های مبتلا به کلی‌باسیلوز و به ظاهر سالم

هانیه شفیعی^۱، مجید غلامی آهنگران^{۱*}، آسیه احمدی دستگردی^۲

۱- گروه دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران

*مسئول مکاتبات: mgholami6@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱

DOI: 10.22034/ascij.2023.1985124.1488

چکیده

کلی باسیلوز طيور یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ناشی از *اشریشیا کلی* است که موجب خسارات اقتصادی زیادی به صنعت پرورش مرغ می‌شود. با توجه به گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری و ظهور سویه‌های مقاوم *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) این مطالعه باهدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از مرغ‌های با سابقه و بدون سابقه کلی باسیلوز در استان اصفهان انجام گرفت. در این مطالعه به منظور ردیابی ژن‌های مقاومت علیه فلوروکینولون-ها و سوافانامیدها، ۵۰ سویه باکتری از مواد پریکاردیت و پری هپاتیت جوجه‌های گوشتی جداسازی شد و با تست‌های میکروبی و بیوشیمیایی، کلنی‌های *اشریشیا کلی* تایید شد. سپس با روش معمول آنتی‌بیوگرام، مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری انروفلوکساسین و سولفانامید+تری متوپریم بررسی شد. علاوه بر آن، با روش جوشاندن، ژنوم باکتری استخراج شد و با پرایمرهای اختصاصی به تکثیر ژن‌های *qnrA* و *sul1* جهت ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه فلوروکینولون‌ها و سولفانامیدها پرداخته شد. پس از تایید باکتری و انجام آنتی‌بیوگرام، سویه‌های جدا شده از مرغ‌های با سابقه کلی باسیلوز کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به جنتامایسین (۷ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۷۱ درصد) نشان دادند. در این بررسی ۵۹/۵ درصد این سویه‌ها حداقل به دو آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند و حدود ۹/۵ درصد سویه‌ها به تمامی ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی‌بیوگرام، مقاومت نشان دادند. همچنین الکتروفورز محصول PCR سویه‌های جدا شده از مرغ‌های با سابقه کلی باسیلوز نشان داد ۱۰ و ۱۵ و یک سویه از ۴۲ سویه مورد بررسی توانستند قطعات ۸۲۲، ۶۷۰ و ۲۸۶ جفت بازی را تکثیر کنند و به ترتیب، حامل ژن‌های *Sul1*، *qnrA* و *Act(3)-IV* باشند. به عبارتی ۲۳/۸ درصد سویه‌ها حاوی ژن *Sul1*، ۳۵/۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن *qnrA* و ۲/۴ درصد سویه‌ها حامل ژن *Act(3)-IV* بودند.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، گوشت مرغ، ژن‌های مقاومت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به مبارزه با آنها نمی‌باشند. امروزه از ترکیبات ضد باکتریایی برای اهداف مختلفی در تولید و پرورش دام، طیور و آبزیان استفاده می‌شود که این اهداف می‌تواند شامل افزایش رشد، پیشگیری و درمان

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی یکی از بزرگترین و مهمترین مشکلات سازمان‌های مرتبط با سلامت انسان و دام در سطح جهان است. در مکانیسم مقاومت، ارگانیزم‌های مقاوم تغییراتی را در خود بوجود آورده‌اند که دیگر

بیماری‌ها باشد (۷). مصرف بی‌رویه و بلند مدت آنتی-بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها و افزایش رشد در حیوانات باعث شده‌است که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها بویژه در *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) افزایش پیدا کند (۸). اشریشیاکلی انتشار جهانی داشته و جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش در انسان و حیوانات است (۱، ۱۸) و به آسانی از طریق غذا و آب (۲) و نیز تخم پرندگان در اکوسیستم‌های مختلف انتشار می‌یابد. بعضی از سویه‌های گوارشی آن در پرندگان از پاتوژن‌های فرصت‌طلب هستند که اغلب به دنبال عوامل مستعدکننده عفونی یا غیرعفونی موجب جراحات موضعی یا عمومی گردیده و خسارات سنگینی را به صنعت طیور وارد می‌کنند (۱۵). در انسان نیز، این باکتری باعث عفونت خارج روده‌ای مثل عفونت ادراری و مننژیت می‌شوند. در سه دهه گذشته، موارد متعددی از مقاومت به کوئینولون و فلورفینیکل در انسان و دام گزارش شده‌اند و یکی از دلایل بروز مقاومت در انسان استفاده گسترده این داروها در فارم-های پرورشی طیور ذکر گردید (۱۱). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت و حتی در یک ناحیه ممکن است متفاوت باشد. این تفاوت احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف ترکیبات آنتی‌باکتریال است (۲) و بیشتر انواع مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌ها به دنبال تغییر ساختار ژنتیکی در باکتری‌های مقاوم بروز می‌کند. این مقاومت‌ها می‌توانند به دو صورت کروموزومی و یا خارج کروموزومی بررسی شوند در حدود ۹۰ درصد مقاومت‌های قابل مشاهده در موارد درمانگاهی را مقاومت‌های خارج کروموزومی و کمتر از ۱۰ درصد را مقاومت‌های کروموزومی شامل می‌شوند (۴). حال با این تفاسیر و اهمیت این بیماری در صنعت طیور و سلامت جامعه در مطالعه اخیر به تعیین و مقایسه فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی*

جدا شده از گوشت مرغ در فارم‌های مبتلا به کلی‌باسیلوز و به ظاهر سالم پرداختیم. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های بهداشتی و درمانی در صنعت طیور مورد استفاده‌ی سیاست‌گذاران این بخش قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در تابستان ۱۴۰۰، به مدت ۶ ماه، ۲۰ مرغداری واقع در استان اصفهان، که به شکل عادی پرورش جوجه گوشتی داشتند پایش شدند که از مجموع ۲۰ فارم پرورشی ۶ فارم در طول دوره پرورش سابقه ابتلا به بیماری کلی‌باسیلوز داشتند و ۱۴ فارم فاقد سابقه بیماری کلی‌باسیلوز بودند. سپس در پایان دوره پرورش در محیط کشتارگاه از تمامی فارم‌های با سابقه کلی‌باسیلوز (۶ فارم) و ۱۰ فارم فاقد سابقه کلی‌باسیلوز و مجموعاً ۱۶ فارم نمونه‌گیری شد. به ازای هر فارم ۱۰ قطعه پرنده به شکل تصادفی نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها شامل یک قطعه عضله سینه مرغ بود که پس از تخلیه امعاء و احشا اقدام به نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها در ظروف مجزا جمع‌آوری شد و در کنار یخ منتقل گردید. **شناسایی / اشریشیا کلی:** به منظور شناسایی باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه مورد نظر با سواب یا انس استریل در کنار شعله با تلقیح بر روی نمونه مورد نظر بر روی محیط کشت مک کانگی بصورت خطی کشت داده می‌شود و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. در صورت رویت شدن پرگنه‌های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ)، از پرگنه‌های مشکوک بر روی محیط EMB بصورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود. پرگنه‌های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی نموده‌اند به صورت اولیه به‌عنوان باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی می‌گردند. سپس بر روی این پرگنه‌ها تست‌های افتراقی

IMVIC انجام می‌شود. در صورتی که از لحاظ تست-های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سیترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی باشند به عنوان /شریشیا کلی شناسایی می‌گردند (۶).

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای تعیین حساسیت باکتری جدا شده نسبت به داروهای آنتی‌باکتریال رایج، از روش انتشار دیسکی ساده به روش استاندارد کربی بوئر استفاده شد. معمولاً این روش بر اساس انتشار آنتی‌بیوتیک بر روی محیط جامد و ممانعت از رشد باکتری حساس در محوطه حرکت استوار است. در این آزمون از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک-های آنتی‌بیوتیکی شرکت پادتن طب ایران استفاده شد که شامل: انروفلوکساسین (۵ میکروگرم/دیسک)، سولفانامید + تری‌متوپریم، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، اکسی-تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، لینکوسپکترین (۱۵/۲۰۰ میکروگرم/دیسک)، داکسی‌سیکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، دیفلوکساسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم/دیسک)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، کلستین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم/دیسک) است. برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری را بر روی محیط مک‌کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط مک‌کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی TSB منتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای تهیه کدورت ۰/۵ مک فارلند انکوبه شدند. پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی ۰/۵ مک فارلند روی محیط مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد. پس از گذشت تقریباً ۱۰ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر

هینتون تلقیح شده قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک اندازه‌گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی CLSI قرائت شد.

استخراج DNA: در این بررسی DNA از جدایه‌های موردنظر به روش جوشانیدن و طبق پروتکل قبلی (۷) استخراج شد. سپس ژنوم استخراج شده در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

مراحل انجام PCR: به منظور شناسایی وضعیت مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دسته فلوروکینولون‌ها، سولفانامیدها و جنتامایسین، ژن‌های مربوط به مقاومت نسبت به کوینولون‌ها (qnr)، سولفانامیدها (Sul 1) و جنتامایسین (aac-3-IV) در نمونه‌های مورد بررسی مورد تکثیر قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی-مول dNTP، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq Polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده‌سازی شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر اپندورف آلمان انجام شد. برنامه دمایی واکنش PCR به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه برای ۳ دقیقه، و ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه برای ۶۰ ثانیه، هم-سرشت سازی در دمای Annealing (جدول ۱) برای ۹۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه به همراه گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (۰/۳ گرم آگارز در ۲۵ میلی لیتر بافر 1XTBE حل شد) الکتروفورز شد و با UV doc مشاهده و ثبت شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *شریشیا کلی* (۱۱)

آنتی‌بیوتیک	ژن مقاومت	توالی	اندازه محصول	دمای همسرشت سازی
کینولون‌ها	qnrA	F: GGGTATGGATATTATTGATAAAG R: CTAATCCGGCAGCACTATTTA	۶۷۰	۵۰
سولفانامیدها	Sul 1	F: TTCGGCATTCTGAATCTCAC R: ATGATCTAACCCTCGGTCTC	۸۲۲	۴۷
جنتامایسین	Aac(3)-IV	F: CTTCAAGGATGGCAAGTTGGT R: TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	۲۸۶	۵۵

نتایج

شناسایی /شریشیا کلی: سویه‌ها از جهت خصوصیات کشت بر روی محیط مک‌کانکی و EMB مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تایید، تست‌های بیوسیمیایی IMViC در مورد آنها انجام شد. از ۱۰۰ نمونه اخذ شده از مرغ‌های بدون سابقه کلی‌باسیلوز ۴۰ سویه و از ۶۰ نمونه با سابقه کلی‌باسیلوز ۴۲ سویه /شریشیا کلی جدا شد. تمامی ۸۲ سویه مورد بررسی با ایجاد رنگ ارغوانی بر روی محیط کشت مک‌کانکی و ایجاد جلای سبز فلزی بر روی EMB تایید اولیه شدند و تست IMViC را به صورت ایندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سترات منفی نشان دادند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: پس از تایید باکتری و انجام آنتی‌بیوگرام، سویه‌های جدا شده از مرغ‌های با سابقه کلی‌باسیلوز کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به جنتامایسین (۷ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۷۱ درصد) نشان دادند. در این بررسی ۵۹/۵ درصد این سویه‌ها حداقل به دو آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند و حدود ۹/۵ درصد سویه‌ها به تمامی ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی-بیوگرام، مقاومت نشان دادند. نتایج آنتی بیوگرام در جدول ۲ آمده است.

ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی: الکتروفورز محصول PCR سویه‌های جدا شده از مرغ‌های با سابقه

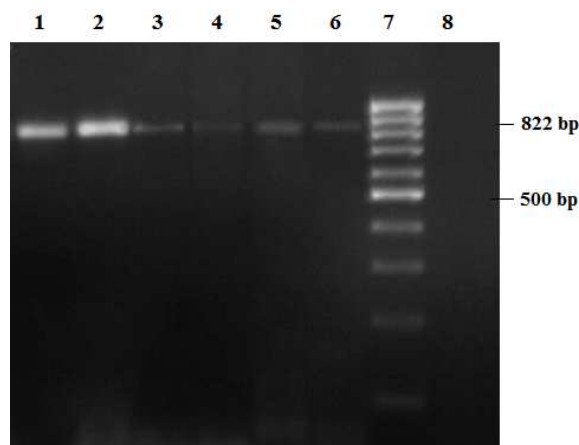
کلی‌باسیلوز نشان داد ۱۰ و ۱۵ و یک سویه از ۴۲ سویه مورد بررسی توانستند قطعات ۸۲۲ (شکل ۱)، ۶۷۰ (شکل ۲) و ۲۸۶ (شکل ۳) جفت بازی را تکثیر کنند و به ترتیب، حامل ژن‌های qnrA، Sul1 و Act(3)-IV باشند. به عبارتی ۲۳/۸ درصد سویه‌ها حاوی ژن Sul1، ۳۵/۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن qnrA و ۲/۴ درصد سویه‌ها حامل ژن Act(3)-IV بودند. در این بررسی ۴۷/۶ درصد سویه‌های مقاوم به سولفانامید به علاوه تری متوپریم (۱۰ سویه از ۲۱ سویه) حامل ژن Sul1 و ۵۱/۷ درصد سویه‌های مقاوم به انروفلوکساسین (۱۵ سویه از ۲۹ سویه) حامل qnrA و ۳۳ درصد سویه‌های مقاوم به جنتامایسین (یک سویه از ۳ سویه) حامل Act(3)-IV بودند. در این بررسی هیچ سویه‌ای یافت نشد که حامل ژن‌های مقاومت باشد اما از نظر فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان ندهد اما سویه‌هایی که از نظر فنوتیپی مقاوم شناخته شدند همگی واجد ژن‌های مقاومت نبودند. به عبارتی ۱۱ سویه از ۲۱ سویه مقاوم به ترکیبات سولفانامیدی (۵۲/۴ درصد)، ۱۴ سویه از ۲۹ سویه مقاوم به انروفلوکساسین (۴۸/۳ درصد) و ۲ سویه مقاوم به جنتامایسین (۶۶/۶ درصد) از نظر فنوتیپی مقاوم بودند اما حامل ژن‌های مورد بررسی نبودند.

جدول ۲- درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های /شریشیا کلی جدا شده از مرغ‌های با سابقه (الف) و بدون سابقه کلی باسیلوز (ب)

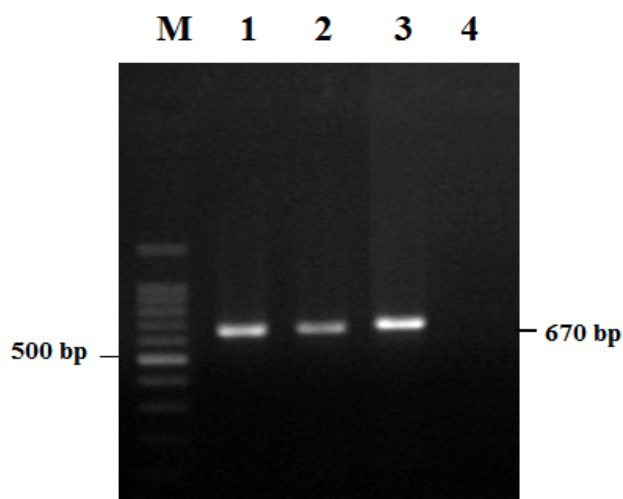
آنتی‌بیوتیک		الف (۴۲ سویه)		ب (۴۰ سویه)	
		درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
انروفلوکساسین		۶۹	۲۹	۲۰	۸
سولفانامید + تری‌متوپریم		۵۰	۲۱	۱۰	۴
فلورفنیکل		۴۲/۸	۱۸	۱۰	۴
تتراسایکلین		۷۱/۴	۳۰	۱۵	۶
آمپی سیلین		۵۹/۵	۲۵	۵	۲
جنتامایسین		۷/۱	۳	۰	۰
نتومایسین		۵۹/۵	۲۵	۲۰	۸
لینکواسپکتین		۲۸/۵	۱۲	۱۰	۴
اکسی تتراسایکلین		۶۴/۲	۲۷	۱۰	۴
کلرامفنیکل		۳۵/۷	۱۵	۱۰	۴
کلستین		۵۷/۱	۲۴	۱۵	۶
دیفلوکساسین		۳۳/۳	۱۴	۱۲/۵	۵
داکسی سیکلین		۴۵/۲	۱۹	۱۲/۵	۵

جدول ۳- فراوانی ژن‌های مقاومت در سویه‌های /شریشیا کلی جدا شده از مرغ‌ان با سابقه کلی باسیلوز طیور

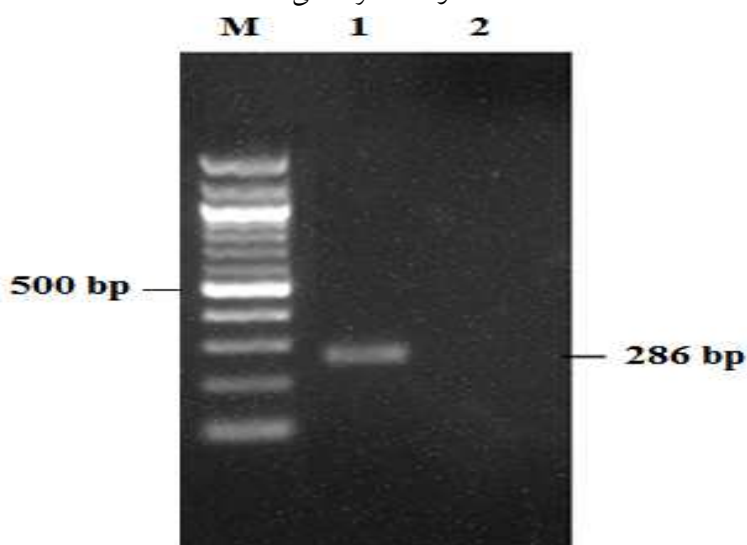
ژن هدف	<i>Sul1</i>	<i>qnrA</i>	<i>Aac(3)-IV</i>
درصد ردیابی (n = ۴۲)	۲۳/۸ درصد (۱۰ سویه)	۳۵/۷ درصد (۱۵ سویه)	۲/۴ درصد (۱ سویه)
درصد ردیابی در سویه‌های مقاوم به سولفانامید + تری‌متوپریم (n = ۲۱)	۴۷/۶ درصد (۱۰ سویه)	-	-
درصد ردیابی در سویه‌های مقاوم به انروفلوکساسین (n = ۲۹)	-	۵۱/۷ درصد (۱۵ سویه)	-
درصد ردیابی در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین (۳ = n)	-	-	۲ درصد (۱ سویه)



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *Sul1* (ستون ۱ تا ۶: نمونه‌های مثبت ۸۲۲ جفت بازی، ستون ۷: مارکر، ستون ۸: کنترل منفی).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *qnrA* (M: مارکر، ستون ۱ تا ۳: نمونه‌های مثبت ۶۷۰ جفت بازی، ستون ۴: کنترل منفی).



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *Aac(3)-IV* (M: مارکر، ستون ۱: نمونه مثبت ۲۸۶ جفت بازی، ستون ۲: کنترل منفی).

بحث

کلی‌باسیلوز یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در گله‌های طيور می‌باشد که به منظور کنترل آن آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف استفاده می‌گردد که این اقدام باعث افزایش راندمان مواد غذایی و افزایش وزن‌گیری می‌شود. در استفاده طولانی مدت آنتی‌بیوتیک‌ها، تنوع و درجات وسیعی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های مختلف باکتری ایجاد می‌گردد که در نهایت منجر به عدم کارایی آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌گردد (۱۳). در این مطالعه کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به جتامایسین (۷ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۷۱ درصد) نشان دادند. در این بررسی ۵۹/۵ درصد این سویه‌ها حداقل به دو آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند و حدود ۹/۵ درصد سویه‌ها به تمامی ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی‌بیوگرام، مقاومت نشان دادند. در این راستا، در مطالعه رجائیان و همکاران نیز که لاشه‌های طيور گوشتی اطراف شیراز را مورد بررسی قرار دادند، بیشترین حساسیت نسبت به تتراسایکلین گزارش کردند (۲۱). اگر چه همان طور که اشاره شد الگوی مقاومت میکروبی جدایه‌های مناطق مختلف ممکن است با یکدیگر متفاوت باشد اما نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج نامبردگان تا حدی مطابقت دارد. حقیقی خشخو و علی‌نژاد در سال ۱۳۸۸ در نمونه‌های جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز طيور استان تهران، بیشترین مقاومت را به نالیدیکسیک‌اسید، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، کلستین، تتراسایکلین گزارش نمودند (۱۰). اگرچه همان‌طور که اشاره شد الگوی مقاومت میکروبی جدایه‌های مناطق مختلف ممکن است با یکدیگر متفاوت باشد (۵) اما سایر مطالعات در ایران مربوط به استان‌های فارس، تهران، خوزستان و آذربایجان شرقی نشان می‌دهد که این الگو تا حدود زیادی مشابه است و نشان از توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های

شریشیا کلی دارد. در همین رابطه، جعفری و همکاران (۱۳۹۴) بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در جدایه‌های /شریشیا کلی طيور در اهواز با ۹۰ درصد مقاومت نسبت به انروفلوکساسین مشاهده کردند (۱۲). Diarra و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۷۹۱ جدایه‌های /شریشیا کلی همزیست بدست آمده از جوجه گوشتی در طی ۵۳ روز تحت تیمار با انواع محرک رشد مشاهده کردند که تقریباً تمام جدایه‌ها درجات متفاوتی از مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک را نشان دادند. همچنین میزان مقاومت به تتراسایکلین را ۸۶/۵ درصد گزارش کردند که دارای بیشترین فراوانی بود. همچنین حدود نیمی از جدایه‌ها به آموکسی‌سیلین، سفتیوفور، اسپکتینومایسین و همچنین سولفانامید مقاومت نشان دادند (۳). رفیعی و همکاران (۲۰۰۳) در تهران بیشترین مقاومت را مربوط به تتراسایکلین (۹۴ درصد) و سپس سولتریم (۵۶ درصد) و انروفلوکساسین با ۴۴ درصد گزارش کردند (۲۰). زهرایی صالحی و همکاران (۲۰۰۶) در تبریز نیز بیشترین مقاومت را نسبت به داکسی‌سایکلین گزارش کردند (۸۸ درصد) اما مقاومت در برابر انروفلوکساسین نیز با ۷۶ درصد در رده سوم قرار داشت (۲۵). مصرف گسترده انروفلوکساسین به تنهایی و مصرف هم‌زمان با برخی از خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند دلیل این مقاومت بالا باشد که در فارم‌های پرورش طيور در سراسر ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، مطالعات خارج از کشور نیز نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است. در بررسی Gregova و همکاران (۲۰۱۲) در اسلواکی (۹) و یانگ و همکاران (۲۰۰۴) در چین (۲۴) نیز بیشترین مقاومت در جدایه‌های /شریشیا کلی طيور نسبت به انروفلوکساسین گزارش شده است. وجود

مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، سولفونامید به همراه متوپریم، فلورنیکل و داکسی-سایکلین می‌تواند به دلیل استفاده متداول از این آنتی-بیوتیک‌ها در کنترل بیماری کلی‌باسیلوز باشد که تجویز پی‌درپی این آنتی‌بیوتیک‌ها بعضاً بدون انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی باعث ظهور و گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. از آن جایی که که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گسترش مقاومت در بین میکروارگانیسم‌ها نقش عمده‌ای دارند و اخیراً برای شناسایی سویه‌های مقاوم بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، الکتروفورز محصول PCR این مطالعه سویه‌های جدا شده از مرغ‌های با سابقه کلی‌باسیلوز نشان داد ۱۰ و ۱۵ و یک سویه از ۴۲ سویه مورد بررسی به ترتیب، حامل ژن‌های *Sul1*، *qnrA* و *Act(3)-IV* بودند. به عبارتی ۲۳/۸ درصد سویه‌ها حاوی ژن *Sul1*، ۳۵/۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن *qnrA* و ۲/۴ درصد سویه‌ها حامل ژن *Act(3)-IV* بودند. در این بررسی ۴۷/۶ درصد سویه‌های مقاوم به سولفانامید به‌علاوه تری متوپریم (۱۰ سویه از ۲۱ سویه) حامل ژن *Sul1* و ۵۱/۷ درصد سویه‌های مقاوم به انروفلوکساسین (۱۵ سویه از ۲۹ سویه) حامل *qnrA* و ۳۳ درصد سویه‌های مقاوم به جنتامایسین (یک سویه از ۳ سویه) حامل *Act(3)-IV* بودند. در این بررسی هیچ سویه‌های یافت نشد که حامل ژن‌های مقاومت باشد اما از نظر فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان ندهد اما سویه‌هایی که از نظر فنوتیپی مقاوم شناخته شدند همگی واجد ژن‌های مقاومت نبودند. به عبارتی ۱۱ سویه از ۲۱ سویه مقاوم به ترکیبات سولفانامیدی (۵۲/۴ درصد)، ۱۴ سویه از ۲۹ سویه مقاوم به انروفلوکساسین (۴۸/۳ درصد) و ۲ سویه مقاوم به جنتامایسین (۶۶/۶ درصد) از نظر فنوتیپی مقاوم بودند اما حامل ژن‌های مورد بررسی نبودند. در همین راستا در مطالعات قبلی در خصوص بررسی ژن‌های مقاومت

در برابر سولفانامیدها، مجاور رستمی و همکاران (۱۳۹۶) میزان مقاومت به سولفادیازین را در سویه‌های /شریشیا کلی جدا شده از موارد کلی‌باسیلوز جوجه‌های گوشتی در ارومیه حدود ۴۵ درصد گزارش کردند و بیان کردند که حدود ۵۷ درصد از جدایه‌های /شریشیا کلی دارای ژن *sul* و ۵ جدایه که حامل ژن *sul* بودند نسبت به سولفانامید مقاومت نشان ندادند (۱۴). نتایج مطالعه اخیر با مطالعه مجاور و همکاران در این خصوص هم‌خوانی دارد. Soufi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی ژن‌های مقاومت در گوشت ماکیان گزارش کردند که در ۱۶۶ جدایه /شریشیا کلی بدست آمده از گوشت ماکیان ۲۸ جدایه حامل ژن *tet A/B* و همچنین ۸۶ جدایه حامل ژن *1sul* و ۷۳ جدایه از این ۸۶ جدایه واجد ایتنگرون کلاس ۱ حامل ژن *1sul* بودند. همچنین این ایتنگرون حامل *2sul* و *3sul* نیز بودند که نشان می‌دهد /شریشیا کلی جدا شده از غذای انسان به‌عنوان مخزنی از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حامل ژن‌های مقاومت سولفانامید و ایتنگرون‌ها به شمار می‌رود (۲۳). Ponce-Rivas و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که حدود ۵۲ درصد از جدایه‌های /شریشیا کلی واجد ژن *qnrA* بوده و در مجموع حدود ۷۳ درصد از جدایه‌ها یکی از ژن‌های مقاومت کوینولون را دارا بودند که در بسیاری از جدایه‌ها ژن‌های *qnr* همراه با کلاس یک ایتنگرون ردیابی نمودند (۱۹). مطالعات گسترده‌ای در نقاط مختلف جهان از جمله ایران بر سویه‌های /شریشیا کلی طیور و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنها انجام شده است. در این مطالعه روش کار به‌گونه‌ای برنامه‌ریزی شد تا بتوان از نتایج بدست آمده برای مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی‌های تکمیلی سرولوژیکی و ژنوتیپی در آینده استفاده گردد، تا بتوان سیاست پیشگیری و درمانی مناسبی در منطقه اتخاذ نمود. الگوی مقاومت دارویی در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت و حتی در یک ناحیه ممکن است

محیطی باشد و یا اینکه در نتیجه فشار انتخابی و رشد بیش از حد سویه‌هایی باشد که پیش از ورود جوجه به مزرعه در دستگاه گوارش آنها حضور داشته‌اند (۱۶).

نتیجه‌گیری

بنابراین بررسی الگوی مقاومت در مناطق و زمان‌های مختلف جهت اخذ سیاست‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با روند روبه گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی لازم است با رعایت اصول مناسب تغذیه و بهداشت نظیر استفاده از شیوه‌های مدیریتی مناسب مانند انتخاب جوجه‌ی سالم، تغذیه مناسب، بهسازی بستر، معدوم سازی جوجه‌های مبتلا و جلوگیری از ورود بیماری به فارم و همچنین واکسیناسیون به موقع از ابتلا طیور به بیماری‌های عفونی تا حد زیادی جلوگیری کرد تا به طبع آن از مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف کاسته شده و به سمت تولید فراورده‌های بدون آنتی‌بیوتیک گام برداریم.

تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در نمونه‌گیری و انجام آزمایشات مساعدت داشتند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Ansari Cheharsughi M. S., Ahmadi-Dastgerdi A., Gholami-Ahangaran M. 2020. Antibacterial effect of *Capparis spinosa* (*Capparis spinosa*) and *Pistacia atlantica* (*Pistacia atlantica*) extracts on growth of *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Iranian Veterinary Clinical Pathology*, 14(54):115-126.
2. Dehghani G.S., Gholami-Ahangaran M., Rahimi E. 2017. The comparison of *Escherichia coli* contamination rate in meat of conventional and without antibiotic chickens. *Iranian Journal of Food Microbiology*, 4(3):93-100.
3. Diarra Moussa S., Fred G., Silversides F., Diarrassouba J., Pritchard L., Masson R., Brousseau C. 2007. Impact of feed

متفاوت باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف ترکیبات آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. با این وجود الگوی مقاومت دارویی یک نشانگر مفید برای جدایه‌های باکتریایی یک منطقه به شمار می‌رود (۲۲). گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت سویه‌های پاتوژن /شریشیا کلی نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال در حال افزایش است و الگوی مقاومت دارویی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می‌باشد (۵). بطور کلی پلاسمیدها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به باکتری‌ها اعطا می‌کنند. عوامل R یا پلاسمیدها حامل ژن‌هایی هستند که کد کننده آنزیم‌های تخریب کننده یا تغییردهنده آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. برخی از این پلاسمیدها فقط یک ژن مقاومت را دارا هستند در حال که تعدادی از آنها قادرند تا هشت ژن مقاومت را علیه داروها با خود حمل کنند. اغلب ژن‌های مقاومت دارویی درون ترانسپوزن‌ها قرار دارند و از این‌رو برخی از سویه‌های باکتریایی همچون /شریشیا کلی قادرند پلاسمیدهای مقاومت چندگانه را به سرعت تولید کنند. به عبارتی دیگر پلاسمیدهای مقاومت چندگانه دارویی از تجمع ترانسپوزن در یک پلاسمید منتج می‌شوند و چون ترانسپوزن‌ها بین پلاسمیدها و کروموزوم‌های اولیه تردد می‌کنند، ژن‌های مقاومت دارویی می‌توانند بین این نواحی به راحتی جابجا شوند که در نهایت منجر به گسترش بیشتر مقاومت دارویی می‌گردد. از این رو، بی‌تردید حضور پلاسمیدهای مقاومت چندگانه در باکتری‌هایی همچون /شریشیا کلی، درمان بیماری را با مشکلات جدی‌تری مواجه می‌سازد (۱۷). دستگاه گوارش ماکیان نیز محیطی مناسب برای انتقال ژن‌های کدکننده مقاومت دارویی از جدایه‌های مقاوم به جدایه‌های حساس /شریشیا کلی می‌باشد، که می‌تواند دلیل افزایش مقاومت در مزارع با مصرف آنتی‌بیوتیک و نیز در مزارع فاقد مصرف آنتی‌بیوتیک باشد که ممکن است ناشی از کلونیزاسیون جوجه‌ها با /شریشیا کلی مقاوم

10. Haghighi Khoshkhoo P., Ali-Nezhad I. 2010. Antibacterial Resistance Patterns of *Escherichia coli* isolated from Broilers Colibacillosis of Broilers chicks in Golestan Province. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Research*, 1(1):39-47.
11. Horri M., Gholami-Ahangaran M. 2022. Phenotypic and Genotypic Characterization of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Suspected Colibacillosis in Isfahan Province, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 8(3):193-201.
12. Jafari R., Ghanbarpour R., Ghorbanpour Najaf Abadi M., Mayahi M., Amani A. 2015. Determination of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from healthy and colisepticemic broiler chickens in Ahvaz. *Iranian Journal of Veterinary Microbiology*, 11(2):109-117 [In Persian].
13. Kilonzo-Nthenge A., Samuel N., Nahashon F., Nathaniel A. 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in chicken and guinea fowl. *Poultry Sciences*, 87(9):1841-1848.
14. Mojaver Rostami S., Ghaniei A., Mohammadi V. 2018. Phenotypic and genotypic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens of Urmia to sulfonamides. *Iranian Veterinary Journal*, 13(4):86-91.
15. Nolan L.K., Vaillancourt J., Barbieri N.L., Logue C.M. 2020. Colibacillosis. In: Swayne, DE; Boulianne, M; Logue, CM; McDougald, LR; Nair, V and Suarez, DL (Eds.), *Disease of Poultry*. (14th Edn.), Massachusetts, W.B. Publishing. PP. 770-790.
16. Ozaki H., Hidetake E., Kouhei T., Akira I., Yasutaka N., Azusa S., Norio H., Toshiyuki M. 2011. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Veterinary Microbiology*, 150(1-2):132-139.
- supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Applied Environmental Microbiology*, 73(20):6566-6576.
4. Emond-Rheault J., Jérémie Hamel J., Jeukens L., Freschi I., Kukavica-Ibrulj B., Boyle S. 2020. The *Salmonella enterica* plasmidome as a reservoir of antibiotic resistance. *Microorganisms*, 8(7):1016.
5. Ghaniei A., Mojaverrostami S., Lotfallahzadeh B., Darzi Lemraski M., Sepehrnia P., Imani Jajarmi A. 2014. Geographical and seasonal variation in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken carcasses in Iran. *European Journal of Experimental Biology*, 4:173-177.
6. Gholami-Ahangaran M., Zia-Jahromi N. 2014. Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). *Toxicology and Industrial Health*, 30(8):724-727.
7. Gholami-Ahangaran M., Ahmadi-Dastgerdi A., Karimi-Dehkordi M. 2020. Thymol and carvacrol: as antibiotic alternative in green healthy poultry production. *Planta Biotechnology Persa*, 2(1):22-25.
8. Gholami-Ahangaran M., Moravvej A.H., Safizadeh Z., Sadeghi Nogooriani V., Zokaei M., Ghasemian S.O. 2021. The evaluation of ESBL genes and antibiotic resistance rate in *Escherichia coli* strains isolated from turkey meat and intestinal contents in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 22(4):318- 325.
9. Gregova G., Kmetova M., Kmet V., Venglovsky J., Feher A. 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 19:75-77.

22. Shahiri M., Gholami-Ahangaran M., Rahimi E. 2018. The comparing of antibiotic resistance pattern in *Escherichia coli* isolates from chicken meat that reared under conventional and without antibiotic condition. *Iranian Journal of Food Microbiology*, 5(2):11-18.
23. Soufi L., Sáenz Y., Vinué L., Abbasi MS., Ruiz E., Zaragaza M. 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, 144:497-502.
24. Yang H., Chen S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R. 2004. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:3483-3489.
25. Zahraei Salehi T., Farashi Bonab S. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *International Journal of Poultry Sciences*, 5:677-684.
17. Prescott L.M., Harley J.P., Klein K.A. 2002. *Microbiology*, 5th Ed., McGraw-Hill company, UK, pp: 53-66.
18. Privalsky M., Alexander M. Soohoo J., Wang T., Gerard D., Wright M., Gordon S., Gray Chaitan K. 2021. Prospects for antibacterial discovery and development. *Journal of American Chemical Society*, 143(50):21127-21142.
19. Ponce-Rivas E., Muñoz-Márquez M. E., Khan A. A. 2012. Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. *Applied Environmental Microbiology*, 78(15):5444-5447.
20. Rafiei Tabatabaei R., Nasirian A. 2003. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from chicken flocks. *Iranian Journal of Pharmacological Therapeutics*, 2:39-42.
21. Rajaeian H., Firouzi R., Jalaei J., Heydari D.F. 2003. Antibiotic resistance of several common bacterial species isolated from chickens in Shiraz area. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 58(3):223-226.

The Determination and Comparing of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Chicken Meat with Colibacillosis and Apparently Healthy Flocks

Hanieh Shafei¹, Majid Gholami-Ahangaran^{1*}, Asiye Ahmadi Dastgerdi²

1. Department of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran

*Correspondence Author Email: mgholami6@gmail.com

Abstract

Colibacillosis is one of the most important diseases caused by *Escherichia coli* (*E. coli*), which causes a lot of economic damage to the poultry industry. Considering the increasing spread of antibiotic resistance in this bacterium and the emergence of resistant strains of *E. coli*, this study was conducted with the aim of determining the pattern of antibiotic resistance in *E. coli* strains isolated from chicken carcasses referred to veterinary diagnostic laboratories in Isfahan province. In this study, for detecting of resistance genes to fluoroquinolones and sulfonamides, 50 bacterial strains were isolated from broiler chickens with pericarditis and perihepatitis and *E. coli* colonies were confirmed by microbial and biochemical tests. Then, the resistance of the strains to the commercial antibiotics (enrofloxacin and sulfonamide + trimethoprim) was evaluated by the conventional antibiogram method. In addition, the bacterial genome was extracted by boiling method and the *qnrA* and *sulI* genes were amplified with specific primers to evaluate antibiotic resistance against fluoroquinolones and sulfonamides. After confirming the bacteria and performing an antibiogram, the strains isolated from chickens with a history of colibacillosis showed the lowest antibiotic resistance to gentamicin (7%) and the highest resistance to tetracycline (71%). In this study, 59.5% of these strains showed resistance to at least two antibiotics, and about 9.5% of the strains showed resistance to all 13 antibiotics used in the antibiogram test. Also, the electrophoresis of the PCR product of the strains isolated from chickens with a history of colibacillosis showed that 10 and 15 and one strain out of the 42 investigated strains were able to amplify fragments of 822, 670 and 286 base pairs, respectively, carrying the gene *SulI*, *qnrA* and *Act* (3)-IV. In other words, 23.8% of strains contained *SulI* gene, 35.7% of strains contained *qnrA* gene and 2.4% of strains carried *Act* (3)-IV gene.

Keywords: *Escherichia coli*, Chicken meat, Resistance genes, Antibiogram.