

ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدایه های اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده در اصفهان

دانیال گل کاریان^۱، مجید غلامی آهنگران^{۲*}، آسیه احمدی دستگردی^۳

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

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

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

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۸

چکیده

در این مطالعه ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلی از لاشه قناری های تلف شده و ۲۲ جدایه اشریشیا کلی از سواب کلواک قناری های به ظاهر سالم مورد مطالعه قرار گرفت. پس از تایید باکتری، با تست های میکروبی و بیوشیمیایی، مقاومت جدایه ها نسبت به سفوتاکسیم مشخص شد و با دیسک های ترکیبی با کلاولانیک اسید به شناسایی موارد اشریشیا کلی تولید کننده ESBL پرداخته شد. جدایه های مولد بتالاکتاماز از نظر ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد از مجموع ۱۰۰ سویه اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده، ۲۰ جدایه از نظر فنوتیپی قادر به تولید بتالاکتاماز می باشد. از ۲۰ جدایه تولید کننده بتالاکتاماز، ۱۳ جدایه قادر به تکثیر قطعات ژنومی حاوی ژن های blaTEM، blaCTX و blaSHV می باشند. بیشترین ژن بتالاکتاماز ردیابی شده در هر دو گروه پرندگان زینتی از نوع blaCTX می باشد و ژن blaSHV در هیچ کدام از پرندگان ردیابی نشد. در سویه های اشریشیا کلی جدا شده، درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم با ردیابی ژن blaCTX ارتباط دارد به طوریکه تمامی جدایه های مقاوم واجد ژن blaCTX بودند. با توجه به شیوع سویه های مولد بتالاکتاماز در اشریشیا کلی جدا شده از قناری های تلف شده و امکان انتقال این ژن ها همراه با سایر ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی به سایر باکتری ها لازم است در درمان پرندگان زینتی از آنتی بیوتیک های مجاز و با رعایت دوز و دوره مصرف استفاده نمود. بطور کلی، به نظر می رسد استفاده نادرست از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می تواند منشأ شکل گیری و انتشار سویه های مولد بتالاکتاماز در پرندگان زینتی باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی، بتالاکتاماز، قناری، مقاومت آنتی بیوتیکی

*نویسنده مسئول: مجید غلامی آهنگران

آدرس: دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: mgholami6@gmail.com

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از باکتری های گرم منفی که عموماً در دستگاه گوارش حیوانات خونگرم و انسان یافت می شود. در هر گرم مدفوع یک تا صد میلیون اشریشیا کلی وجود دارد که حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد آنها بیمارزا هستند (Gholami-Ahangaran et al., 2022). این باکتری می تواند در پرندگان باعث عوارضی شود که اصطلاحاً به آن کلی باسیلوز می گویند. کلی باسیلوز چهره های متفاوتی دارد که از مهم ترین آن ها می توان به کلی سپتی سمی، عفونت کیسه زرده، سلولیت، سندرم تورم سر، کلی گرانولوما، تورم ناف، تورم مفصل، پن افتالمیت و مشکلات گوارشی (انتریت) اشاره کرد (Nolan et al., 2013).

عفونت کلی باسیلوز در پرندگان از نظر اقتصادی بسیار اهمیت دارد. هزینه های درمان، تلفات، و عقب افتادگی از رشد از عواقب این بیماری در پرورش پرندگان زینتی است. همچنین، ممکن است در بسیاری از بیماری های پرندگان این باکتری به عنوان یک عامل ثانویه اضافه شود و بیماری را پیچیده کند (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). عموماً در پرندگان با مشاهده هر یک از علائم کلی باسیلوز به درمان رو می آورند و آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مورد استفاده قرار می گیرد. با این حال ممکن است سویه های شایع از حدت بالایی برخوردار باشند و یا نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک های تجاری مقاوم باشند و درمان با شکست مواجه شود (Gholami-Ahangaran et al., 2021b). استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف به طور متوالی، به میزان زیاد و بدون تجویز دامپزشک متخصص می تواند منجر به پیدایش سویه های مقاوم شود که علاوه بر مشکل سازی درمان در بیماری های پرندگان زینتی، احتمال انتقال آن ها از پرندگان زینتی به صاحبان پرنده

در اثر تماس های نزدیک امکان پذیر است (Akond, 2009).

آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (Extended Spectrum Beta-Lactamase; ESBL)، یک آنزیم موتاسیون یافته بتالاکتاماز است که باعث غیرفعال شدن آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود. ژن های ESBL قدرت بالایی در هیدرولیز نسل سوم سفالوسپورین ها دارند. ژن های اصلی ESBL شامل bla_{TEM} ، bla_{CTX} و bla_{SHV} هستند که به ترتیب می توانند سفوتاکسیماز، تمونریا و سولفهیدریل را کد کنند (Paterson and Bonomo, 2005). ESBL به طور معمول توسط باکتری های انتروباکتریاسه مخصوصاً اشریشیا کلی و کلبسیلا تولید می شود. اشریشیا کلی که بسیار به مقاوم شدن حساس است می تواند ژن های کد کننده ESBL را دریافت کند و تولید آنزیم بتالاکتاماز کند. معمولاً باکتری های واجد ژن های ESBL علیه آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون ها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و سولفامتوکسازول + تری متوپریم مقاوم می شود (Singh, 1999). شواهد زیادی وجود دارد که بیان می کند ژن های مقاومت از منابع غذایی از جمله گوشت طیور و یا سایر منابع آلودگی به فلور و باکتری های دیگر انسانی منتقل می گردد (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). از آن جایی که ژن های تولید کننده بتالاکتاماز بر روی پلاسمیدها هستند امکان انتقال این ژن های مقاومت به سادگی امکان پذیر است. انتقال ژن های مقاومت می تواند در عدم پاسخ مناسب به درمان، در بیماری های عفونی انسان حایز اهمیت باشد و درمان بیماری های عفونی را در انسان با مشکل مواجه کند. اشریشیا کلی مولد ESBL در محیط و بیماری های عفونی دام و پرندگان یک خطر بالقوه برای سلامتی انسان است و احتمال انتقال مقاومت آنتی بیوتیک ها را



به انسان افزایش می دهد (Paterson and Bonomo, 2005). از آنجایی که معمولاً رابطه عاطفی و نزدیکی بین پرندگان زینتی و صاحبان آنها وجود دارد به نظر می رسد پرندگان زینتی می توانند به عنوان یک منبع آلودگی برای انسان خصوصاً کودکان مطرح باشند (Gholami-Ahangaran et al., 2021a). از طرفی مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها می تواند در میزان شیوع این گونه مقاومت ها در پرندگان زینتی نقش عمده ای داشته باشد. لذا در این بررسی به بررسی الگوی ژن های مولد بتالاکتاماز به عنوان یکی از مکانیسم های مهم مقاومت در اشریشیاکلی پرداخته می شود تا میزان فراوانی این ژن ها در قناری های آلوده به کلی باسیلوز بررسی و مقایسه قرار گیرد و احتمال آلودگی قناری با اشریشیاکلی بیماریزای حامل ژن های مولد ESBL مورد بررسی قرار گیرد

مواد و روش ها نمونه گیری

در این بررسی از ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی به دست آمده از ۱۲۰ قناری تلف شده در استان اصفهان استفاده شد. به این ترتیب که پس از کالبدگشایی پرندگان تلف شده و سوزاندن سطح قلب و کبد، از بافت قلب و کبد با سواب استریل نمونه گیری شد و سواب ها در نوترینت براث به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه ها بر روی محیط کشت مک کانکی به صورت خطی کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. علاوه بر آن، ۲۲ جدایه اشریشیاکلی از ۱۲۰ سواب کلواک پرندگان به ظاهر سالم موجود در پرند فروشی ها تهیه شد.

جداسازی و شناسایی اشریشیاکلی

در صورت رویت شدن پرگنه های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ) روی محیط کشت مک کانکی، از پرگنه های مشکوک بر روی محیط EMB به صورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی نمودند به صورت اولیه به عنوان باکتری اشریشیاکلی شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه ها تست های افتراقی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سیترات (IMVIC) انجام شد. در صورتی که از لحاظ تست های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، VP و احیای سیترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی بودند به عنوان اشریشیاکلی شناسایی شدند (Feng et al., 2002).

شناسایی فنوتیپی جدایه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

پس از شناسایی، تایید و خالص سازی پرگنه های اشریشیاکلی، حساسیت آنها نسبت به سفنازیدیم (CAZ, 30µg) و سفوتاکسیم (CTX, 30µg) بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) بررسی گردید. بر اساس توصیه این موسسه، سویه هایی که قطر هاله ممانعت کنندگی آنها برای سفنازیدیم کمتر یا مساوی ۲۲ میلیمتر و برای سفوتاکسیم کمتر یا مساوی ۲۷ میلی متر باشد از نظر این آنتی بیوتیک ها مقاوم شناخته می شود (Shaheen et al., 2011).

طبق دستورالعمل CLSI شناسایی جدایه های واجد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)، بر اساس اختلاف اندازه قطر هاله مهار کنندگی آنتی بیوتیک های ترکیبی با آنتی بیوتیک های غیر ترکیبی صورت می پذیرد. براساس دستور العمل CLSI چنانچه هاله ممانعت کنندگی رشد در اطراف دیسک سفنازیدیم /



کلاولانیک اسید (CAZ+C, 30+10 μ g) نسبت به سفنازیدیم (CAZ, 30 μ g) بیشتر یا مساوی ۵ میلیمتر و یا هاله ممانعت کنندگی رشد در اطراف دیسک سفوناکسیم / کلاولانیک اسید (CTX+C, 30+10 μ g) نسبت به سفوناکسیم (CTX, 30 μ g) بیشتر یا مساوی ۵ میلی متر باشد تایید کننده این است که سویه باکتری تلقیح شده تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) می باشد (Paterson and Bonomo, 2005).

در تست های تشخیصی سویه های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) به عنوان کنترل مثبت و /شریشیا کلی (25922ATCC) به عنوان کنترل منفی (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) بر اساس توصیه CLSI استفاده گردید.

شناسایی ژنوتیپی جدایه های /شریشیا کلی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)

در مرحله اول استخراج DNA از جدایه های مورد نظر به روش جوشاندن طبق دستورالعمل انجام شد (Ghaolami-Ahangaran and Zia-Jahromi, 2014).

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل PCR buffer (۵۰ میلی مول KCL، ۵۰ میلی مول Tris HCL و ۵۰ میلی مول کلرید منیزیم) (۲۰ میکرو لیتر)، dNTPs (۱/۵ میکرو لیتر) (۲/۰ میلی مول)، هر یک از پرایمرها (۱ میکرو لیتر)، Taq DNA polymerase (۰/۵ میکرو لیتر) (Fermentase)، DNA، استخراج شده (۲۰۰ نانومول) (۱ میکرو لیتر) بود. پرایمرهایی که ژن *bla*_{CTX}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} را مورد هدف قرار می دهند محصول ۲۱۴، ۸۴۷ و ۵۹۰ جفت بازی تکثیر می کنند (Acikgoz et al., 2007; Damborg et al., 2016; Junyoung et al., 2009). تکثیر ژن های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف

- آلمان) با برنامه ی سیکل های حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{TEM})، ۶۰ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{CTX}) و ۶۱ درجه سانتی گراد (برای همسرشت سازی ژن *bla*_{SHV}) به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله ی بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. دراین بررسی از نشان گر 100bp جهت مشخص نمودن اندازه ی محصول PCR استفاده شد.

در هر مرحله ۲۰ میکرومول از محصول PCR روی ژل یک درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل قرائت می شود.

از ۱۲۰ سواب تهیه شده از کلواک پرندگان سالم ۲۲ سویه اشیریشیا کلی (۲۲ درصد) بر مبنای خصوصیات کشت میکروبی و تست های بیوشیمیایی جدا شد. ۱۰۰ جدایه اشیریشیا کلی تهیه شده از قناری های تلف شده، همگی در محیط مک کانکی به صورت پرگنه های ارغوانی خالص سازی شدند و در محیط EMB رنگ سبز متالیک نشان دادند. در تست های افتراقی IMVIC نیز توانستند تولید ایندول کنند و متیل رد را احیا کنند اما از لحاظ تست های VP و احیای سیترات منفی بودند.

هیچکدام از جدایه های تهیه شده از کلواک پرندگان سالم در تست ترکیبی به عنوان مولد بتالاکتاماز شناخته نشدند. در مجموع ۲۰ جدایه (از ۱۰۰ جدایه اشیریشیا کلی تهیه شده از پرندگان تلف شده) در تست ترکیبی به عنوان سویه های اشیریشیا کلی مولد ESBL شناسایی شدند (۲۰ درصد). از ۲۰ جدایه مولد بتالاکتاماز ۱۰ جدایه با تولید قطر هاله کمتر از ۲۷ میلی متر نسبت به



ردیابی ژن های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف در جدایه های اشریشیاکلی... (گلکاریان و همکاران).....

سفوتاکسیم و با قطر هاله کمتر از ۲۲ میلی متر مقاوم به سفتازیدیم شناخته شدند.

از ۲۰ جدایه اشریشیا کلی مولد ESBL از لحاظ فنوتیپی، ۱۳ جدایه در تعیین ژنوتیپ سویه های مولد ESBL، توانستند ژن های blaCTX، blaTEM و blaSHV را تکثیر کنند (۶۵ درصد جدایه های اشریشیاکلی مولد بتالاكتاماز). تمامی جدایه هایی که از لحاظ ژنوتیپی واجد ژن های مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف شناخته شدند در تست ترکیبی نیز مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف شناخته شدند اما ۷ جدایه از مجموع ۲۰ جدایه اشریشیا کلی مولد

بتالاكتاماز وسیع الطیف واجد هیچ کدام از ژن های blaCTX، blaTEM و blaSHV نبودند.

در این بررسی، از مجموع ۱۳ جدایه واجد ژن های مولد ESBL، ۴ جدایه با تکثیر قطعه ۸۴۷ جفت بازی واجد ژن (blaTEM/۳۰ درصد) و ۹ جدایه با تکثیر قطعه ۲۱۴ جفت بازی حامل ژن (blaCTX/۶۹ درصد) بودند. هیچ سویه ای نتوانست قطعه ۵۹۰ جفت بازی مربوط به ژن blaSHV را تکثیر کند و در هیچ جدایه ای دو یا سه ژن مولد ESBL به طور همزمان و توأم ردیابی نشد.

جدول ۱- خصوصیات پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن های ESBL

نام ژن	توالی پرایمر (جهت ۵' به ۳')	اندازه محصول (جفت بازی)	دمای همسرشت سازی (°C)	منبع
blaCTX-M-F	5GATGAACGCTTTCCCATGATG3	۲۱۴	۶۰	(Acikgoz et al., 2007)
blaCTX-M-R	5CGCTGTTATCGCTCATGGTAA3			
blaSHV-F	5GATGAACGCTTTCCCATGATG3	۵۹۰	۶۱	(Junyoung et al., 2009)
blaSHV-R	5CGCTGTTATCGCTCATGGTAA3			
blaTEM-F	5ATGAGTATTCAACATTTCCG3	۸۴۷	۵۸	(Yazdi et al., 2010)
blaTEM-R	5GTCACAGTTACCAATGCTTA3			

جدول ۲- فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه های اشریشیا کلی مولد بتالاكتاماز وسیع الطیف

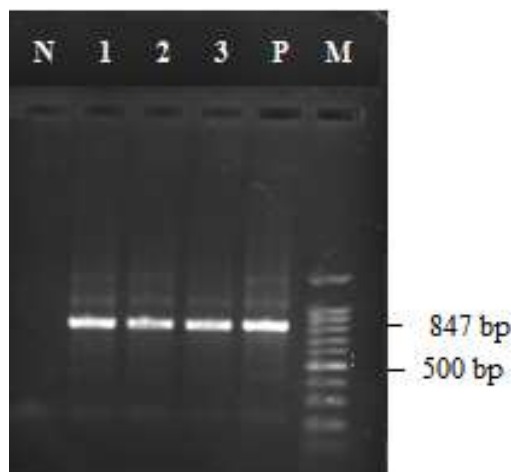
تعداد جدایه / اشریشیاکلی مورد بررسی	فراوانی فنوتیپی جدایه های ESBL	فراوانی ژنوتیپی جدایه های ESBL	فراوانی ژن های کد کننده ESBL
۱۰۰	۲۰	۱۳	۴ blaTEM
			۹ blaCTX
			۰ blaSHV

بحث

باکتری های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها از طریق غذا یا تماس مستقیم با میزبان آلوده به انسان منتقل می شوند. همچنین، باکتری های مقاوم به عنوان ناقل ژن های مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها ژن های مقاومت را به سایر عوامل بیماری زا منتقل می کنند (Akond, 2009).

در بین ژن های مولد ESBL ژن blaCTX بیشترین درصد را به خود اختصاص داده است (۶۹/۲ درصد) (نمودار ۱). ۹۰ درصد جدایه های مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم واجد ژن blaCTX بودند (۹ سویه از ۱۰ جدایه مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم).



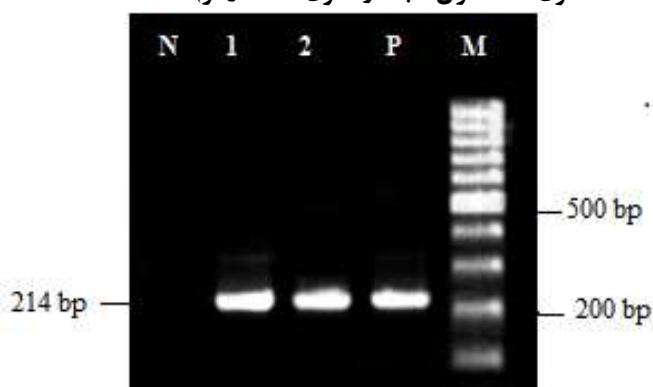


تصویر ۱- ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۸۴۷

جفت بازی ژن *blaTEM*

(ستون N: کنترل منفی، ستون ۱ تا ۳: نمونه های مثبت،

ستون P: کنترل مثبت و ستون M: مارکر)



تصویر ۲- ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۲۱۴ جفت

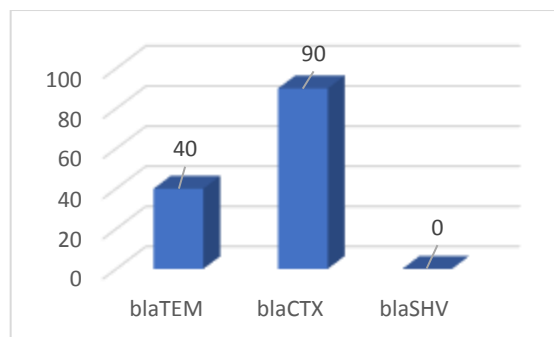
بازی ژن *blaCTX*

(ستون N: کنترل منفی، ستون ۱ و ۲: نمونه های مثبت،

ستون P: کنترل مثبت و ستون M: مارکر)

مطابق با نتایج این مطالعه، برخی مطالعات در مورد جداسازی/شریشیا کلی از نمونه های مدفوع پرندگان وجود دارد (Giacopello et al., 2015; Hidasi et al., 2013). بلزا و همکاران (۲۰۱۹) اظهار داشتند که ۴۸ مورد از ۸۸ نمونه مدفوع قناری از نظر باکتری های *انتروباکتریاسه* مثبت بودند (۵۴/۵ درصد) و/شریشیا کلی از ۴/۵ درصد (۴ نمونه از ۸۸ نمونه) باکتری های *انتروباکتریاسه* جدا شد (Beleza et al., 2019). یافته های مشابه نیز گزارش شده است که ۳/۶ درصد سواب کلوآک قناری های ظاهراً سالم در بلژیک حامل *شریشیا* کلی بودند. (Horn et al., 2015). در مقابل،

تماس نزدیک با پرندگان خانگی یا مدفوع آنها منجر به انتقال و جایگزینی باکتری های مقاوم در دستگاه گوارش می شود که به دنبال آن ژن های مقاوم به فلور میکروبی انسان انتقال می یابد (Van den Bogaard et al., 2001). فلور دستگاه گوارش در اثر انتقال پلاسمیدهای کدکننده ژن مقاومت مقاوم می شود (Nijsten et al., 1996). شواهدی مبنی بر اینکه پرندگان و حیوانات منبعی برای/شریشیا کلی در انسان هستند نشان می دهد که باکتری های مقاوم به دارو ممکن است از حیوانات به انسان و بالعکس از طریق غذای آلوده، محیط و یا از طریق تماس منتقل شوند (Akond, 2009; Damborg et al., 2016). علاوه بر این، درمان نادرست پرندگان خانگی به طور بالقوه مقاومت آنتی بیوتیکی را افزایش می دهد (Giacopello et al., 2015).



نمودار ۱- درصد ردیابی ژن های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدایه های *شریشیا* کلی

در مطالعه حاضر، به طور متوسط ۲۲ درصد (۲۲ از ۱۰۰) از نمونه های سواب کلوآکی جمع آوری شده از پرندگان سالم به عنوان/شریشیا کلی شناسایی شده است.

برخی مطالعات فراوانی بالاتر اشریشیاکلی را در پرندگان خانگی نشان داده اند. هیداسی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که اشریشیاکلی از ۳۰۰ نمونه مدفوع پرندگان طوطی سان با فراوانی ۳۳/۸۷ درصد تشخیص داده شده است (Hidasi et al., 2013). همچنین، در گنجشک سانان در ۵۰ نمونه مدفوع قناری با علائم بیماری در ایتالیا ۶۲ درصد اشریشیاکلی جدا شد (Giacopello et al., 2015). بعلاوه، در تحقیق دیگری نشان داده شد که سواب های کلوآکی از گنجشک سانان حاوی درصد بالایی از اشریشیاکلی است (۴۰ درصد) (Gaio et al., 2017). بنابراین می توان بیان کرد که شرایط محیطی و وضعیت بهداشتی که حیوانات خانگی در معرض آن قرار دارند، می تواند بر میزان جداسازی اشریشیاکلی تأثیر بگذارد. با توجه به درصد پایین آلودگی به نظر می رسد پرندگان سالم خانگی فقط تعداد کمی اشریشیاکلی در دستگاه گوارش خود نگه می دارند.

در این مطالعه فراوانی ژنهای bla_{SHV} ، bla_{TEM} ، bla_{CTX} در اشریشیاکلی جدا شده از موارد تلفات قناری ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه اگرچه سویه های اشریشیاکلی جدا شده از سواب کلوآکی فاقد توانایی تولید بتالاكتاماز بودند و ژن های کد کننده ESBL را نداشتند اما ۶۵ درصد جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از قناری های تلف شده از لحاظ فنوتیپی مولد بتالاكتاماز بودند که به شکل کلی تفاوت معنی داری بین این دو گروه از لحاظ فراوانی جدایه های مولد بتالاكتاماز وجود داشت.

در خصوص شناسایی و میزان فراوانی سویه های مولد بتالاكتاماز در پرندگان در کشورهای مختلف گزارشات زیادی وجود دارد. در پرتغال از ۱۶ درصد نمونه های مدفوعی حیوانات وحشی سویه های مولد ESBL جداسازی شد (Costa et al., 2006). در آمریکا

گزارشات متفاوتی از جداسازی سویه های مولد ESBL از حیوانات خانگی وجود دارد که از ۳ درصد تا ۴۰ و ۶۸ درصد متغیر است (Shaheen et al., 2011). در بلژیک، در ۴۵ درصد نمونه های کلوآکی اخذ شده از پنج فارم جوجه گوشتی، سویه های اشریشیاکلی مولد ESBL جدا کردند (Smet et al., 2008). در مطالعه دیگری در ۲۲ فارم از ۲۶ فارم جوجه گوشتی اشریشیاکلی مولد ESBL از سواب کلوآکی جوجه ها جدا شد (Dicrikx et al., 2013). در یک مطالعه در آلمان ۸۶/۶۰ درصد لاشه و ۷۲/۵۰ درصد سکوم واجد باکتری های مولد ESBL بودند که اکثر آن ها را اشریشیاکلی تشکیل می دادند (Reich et al., 2013). به هر حال، جدایه های مولد ESBL در تمام جهان در حال افزایش هستند که می تواند نگرانی هایی را در مورد درمان بیماری های با منشأ اشریشیاکلی در انسان و حیوانات به وجود آورد. ژن های عامل سنتز ESBL واقع شده در پلاسمید می توانند سایر ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی مانند آمینوگلیکوزیدها، تری متوپریم و سولفانامیدها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و کونولون ها را با خود حمل کنند و باعث مقاومت چند دارویی (MDR) شوند و انتخاب داروی آنتی بیوتیکی را در موارد عفونت های باکتریایی دچار مشکل کنند (Yilmaz and Dolar, 2017).

درخصوص میزان فراوانی ژن های تولید کننده ESBL همواره یک تغییر اپیدمیولوژیک در حال انجام است (Jafari et al., 2016). در دهه ۱۹۹۰، اشریشیاکلی حاوی ژن های bla_{SHV} و bla_{TEM} به عنوان اصلی ترین اشریشیاکلی واجد ESBL شناخته می شد اما اکنون bla_{CTX-M} به عنوان شایع ترین ژن ESBL مطرح است که این موضوع از سال ۱۹۸۷ مطرح شده است. در مطالعه اخیر نیز مانند سایر مطالعات قبلی، bla_{CTX} به عنوان ژن غالب ESBL (در ۴۵ درصد سویه های اشریشیاکلی جدا



شده از قناری های تلف شده) شناسایی شد و در وهله بعد، bla_{TEM} در ۲۰ درصد جدایه ها ردیابی شد حال آنکه bla_{SHV} در هیچ جدایه ای ردیابی نشد. در آلمان از پرندگان وحشی فقط سویه های واجد bla_{CTX-M} (Guenther et al., 2007) ردیابی شد. حتی در فرانسه در /شریشیا کلی جدا شده از سواب های کلوای پرندگان به ظاهر سالم نیز bla_{CTX-M1} ردیابی شد (Gilich et al., 2007). در پرتغال در اولین گزارش از سویه های مولد بتالاکتاماز در پرندگان لاشخوار، $bla_{CTX-M15}$ ردیابی شد (Radhouani et al., 2010) و در ترکیه نیز برای اولین بار سویه های مولد ESBL جدا شده از کلوک پرندگان زینتی از نوع bla_{CTX-M1} و $bla_{CTX-M15}$ بود (Yilmaz and Dolar, 2017). در یک مطالعه دیگر، در ۲۲ سویه /شریشیا کلی مقاوم به آمپی سیلین جدا شده از مدفوع جوجه های سالم ۱۷ جدایه واجد ژن bla_{TEM} بوده و در این سویه ها ژن bla_{SHV} ردیابی نشد (Dicrikx et al., 2013). در پرتغال، ۳۸/۲۰ درصد نمونه های مدفوعی جوجه های گوشتی در یک کشتارگاه از لحاظ bla_{CTX-M} و bla_{TEM} مثبت بودند (Costa et al., 2009). لذا در راستای ردیابی bla_{CTX} و عدم ردیابی bla_{SHV} در مطالعه اخیر اکثر مطالعات قبلی نیز با نتایج مطالعه اخیر همراستا است. از آنجاییکه اخیراً گزارشاتی از کشورهای مختلف و از جمله در آلمان و آمریکا از وجود bla_{CTX-M} در سویه های /شریشیا کلی جدا شده از موارد انسانی نیز گزارش شده است، ردیابی این ژن های مقاومت به طور همزمان در پرندگان زینتی می تواند باعث نگرانی انتقال این ژن ها از پرندگان دست آموز به صاحبان آن ها شود به طوریکه محققین در ترکیه نشان دادند که سویه های واجد ژن های bla_{CTX-M1} و $bla_{CTX-M15}$ جدا شده از کلوک پرندگان زینتی با سویه های انسانی که به طور معمول جدا می شود همخوانی دارد (Yilmaz and

Dolar, 2017). همچنین، در نیوزیلند به ارتباط بین جداسازی /شریشیا کلی مولد ESBL از حیوانات خانگی و جداسازی این سویه ها از کسانی که از این حیوانات نگهداری می کردند پرداختند و بیان کردند که ۸ سویه از ۱۸ سویه /شریشیا کلی جدا شده از صاحبان حیوانات و ۵ سویه /شریشیا کلی از ۳۶ سویه جدا شده از حیوانات خانگی مولد ESBL بودند. این محققین بیان کردند که سویه های /شریشیا کلی مولد ESBL در نیوزیلند در ایجاد عفونت های ادرای مقاوم به چند دارو (Multiple Drug Resistance; MDR) نقش دارند (Toombs- Ruane et al., 2020). رخداد همزمان مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز و سایر آنتی بیوتیک ها در سویه های مولد بتالاکتاماز می تواند به دلیل محل قرار گیری مشترک ژن های مقاومت به ESBL و سایر آنتی بیوتیک ها بر روی پلاسمید باشد که در انتقال این پلاسمید ها مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز بروز می کند. به هرحال تفاوت در میزان مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است به دلیل منطقه جغرافیایی و تفاوت فرهنگ استفاده از آنتی بیوتیک ها و روش های مورد مطالعه برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باشد.

به طور کلی، عدم استفاده از داروهای انسانی خصوصاً سفنازیدیم و سفوتاکسیم در درمان بیماریهای عفونی قناری و وجود مقاومت علیه این آنتی بیوتیک ها احتمال انتقال ژن های مقاومت را بیشتر می کند و لازم است مراقبت های بیشتری در خصوص پیشگیری از بیماری های عفونی اعمال شود و با جایگزینی ترکیبات بیولوژیک مطمئن بجای مصرف آنتی بیوتیک ها در پرورش قناری از رشد فزاینده مقاومت آنتی بیوتیکی علیه آنتی بیوتیک های با دامنه وسیع که علیه بیماری های عفونی انسان استفاده می شود، جلوگیری شود.

منابع



9. Feng, P., Weagant, S., and Grant, M. (2002). Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, US FDA Centre for Food Safety and Applied Nutrition Publishing, Maryland, USA.
10. Gaio, F.C. (2017). Isolamento, resistência e caracterização das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em Psitacídeos presentes no centro de triagem de animais silvestres do Ceará. Master's Thesis, Postgraduate Program in Veterinary Science, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. 57p.
11. Gholami-Ahangaran, M., and Zia-Jahromi N. (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). Toxicology and Industrial Health, **30**: 724-727.
12. Gholami-Ahangaran, M., Moravvej, A. H., Safizadeh, Z., Nogoorani, V. S., Zokaei, M., and Ghasemian, S. O. (2021). The evaluation of ESBL genes and antibiotic resistance rate in *Escherichia coli* strains isolated from meat and intestinal contents of turkey in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**: 318.
13. Gholami-Ahangaran, M., Karimi-Dehkordi, M., Miranzadeh-Mahabadi, E., and Ahmadi-Dastgerdi, A. (2021). The frequency of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic pet birds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **22**: 337.
14. Gholami Ahangaran, M., Zinsaz, P., Pourmahdi, O., Ahmadi-Dastgerdi, A., Ostadpour, M., and Soltani, M. (2022). Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Biofilm of Drinking Water System in Poultry Farms. *Acta Veterinaria Eurasia*, **48**: 64-69.
15. Giacobello, C., Foti, M., Fisichella, V. and Piccolo, F.L. (2015). Antibiotic-resistance patterns of Gram-negative bacterial isolates from breeder canaries (*Serinus canaria domestica*) with clinical disease. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **24**: 84-91.
16. Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M. F., Bertini, A., and Nordmann, P. (2007). Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from
1. Acikgoz, Z.C., Koseoglu, E.O., and Kocagoz, S. (2007). CTX-M-3 Beta lactamase producing *Shigella Sonnei* isolated from pediatric Bacillary Dysentery cases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **61** 135-137.
2. Akond, M. (2009). Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *American Journal of Environmental Sciences*, **5**: 47-52.
3. Argudín, M., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O. and Roisin, S. (2017). Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotic*, **6**: 12.
4. Beleza, AJ., Maciel, WC., Carreira, AS., Bezerra, WG., Carmo, CC., Havt, A., Gaio, FC and Teixeira, RS (2019). Detection of Enterobacteriaceae, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* in canaries (*Serinus canaria*) in northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **39**: 201-208.
5. Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., and Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**: 1311-1312.
6. Costa D., Vinue L., Poeta P., Coelho, AC., Matos, M., Sáenz, Y and Torres, C. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, **138**: 339-344.
7. Damborg, P., Broens, E.M., Chomel, B.B., Guenther, S., Pasmans, F., Wagenaar, J.A. and Guardabassi, L. (2016). Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state of the art and future perspectives for targeted research and policy actions. *Journal of Comparative Pathology*, **155**: 27-40.
8. Dierikx, C., Van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H and Mevius, D. (2013). Extended-spectrum β -lactamase and Ampc β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 60-67.



24. Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, **18**: 657-686.
25. Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Gonçalves, A., Sargo, R., Torres, C. and Poeta, P. (2010). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 171-3.
26. Reich, F., Atanassova, V and Klein, G (2013). Extended-spectrum β -lactamase and Ampc-producing *Enterobacteria* in healthy broiler chickens, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, **19**: 1253-1259.
27. Shaheen B.W., Nayak R., Foley S.L. (2011). Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 5666-5675.
28. Singh, S. (1999). Extended-Spectrum beta-lactamases: An overview. Diagnostic Laboratory Services. INC.
29. Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B. and Butaye, P (2008). Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 1238-1243.
30. Toombs-Ruane, L. J., Benschop, J., French, N. P., Biggs, P. J., Midwinter, A. C., Marshall, J. C., and Douwes, J. (2020). Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-and AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the Same Households. *Applied and Environmental Microbiology*, **86**, 100-111.
31. Van den Bogaard, A.E., London, N. and Driessen, C.A.G.G. and Stobberingh, EE (2001). Antibiotic resistance of fecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**: 763-771.
32. Yazdi, M., Nazemi, A., Mirinargasi, M., Khataminejad, M.R., Sharifi, S., and healthy poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 4681-4685.
17. Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Bethe, A., Friedrich, N. D., Goedecke, A. and Ewers, C. (2010). CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. *Environmental microbiology reports*, **2**: 641-645.
18. Hidasi, HW., Neto, JH and Moraes, DM (2013). Enterobacterial detection and *E. coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. *Journal of Avian Medicine Surgery*, **27**: 166-167.
19. Horn, RV., Cardoso, WM., Lopes, ES., Teixeira, RS., Albuquerque, ÁH., Rocha-e-Silva, RC., Machado, DN and Bezerra, WG (2015). Identification and antimicrobial resistance of members from the *Enterobacteriaceae* family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 552-556.
20. Jafari, RA., Motamedi, H., Maleki, E., Ghanbarpour, R and Mayahi, M (2016). Phylogenetic typing and detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from broiler chickens in Ahvaz., Iran. *Veterinary Research Forum*, **7**: 227-232.
21. Junyoung, K., Semi, J., Hogeun, R., Bokkwon, L., Misun, P., Hoanjong, L., Jina, L., and Seonghan, K. (2009). Rapid Detection of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) for *Enterobacteriaceae* by use of a Multiplex PCR-based Method. *Infection and Chemotherapy*, **41**, 181-184.
22. Nijsten, R., London, N., Van Den Bogaard, A. and Stobberingh, E (1996). In-vitro transfer of antibiotic resistance between faecal *Escherichia coli* strains isolated from pig farmers and pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**: 1141-1154.
23. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T., and Logue, C.M. (2013). Colibacillosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Venugopal, N., Nolan, L. (eds.), *Disease of Poultry*. 13th edition, Wiley-Blackwell, Massachusetts, pp. 751-807.



33. Yılmaz, E. Ş., and Dolar, A. (2017). Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* from cage birds. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **26**: 13-18.

Babaikochkaksaraei, M. (2010). Prevalence of SHV/CTXM/ TEM (ESBL) Beta-lactamase Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. *Medical Laboratory Journal*, **4**: 67-74.

Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing genes in *Escherichia coli* strains isolated from dead canaries in Isfahan

Danial Golkarian¹, Majid Gholami-Ahangaran^{2*}, Asiye Ahmadi-Dastgerdi³

¹ Graduated of Veterinary Department, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

² Associated Professor, Department of Veterinary, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

³ Assistance Professor, Department of Food Science and Technology, Arde.C., Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

Received: 4 June 2023

Accepted: 9 November 2023

Abstract

In this study, 100 *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from dead canaries and 22 *E. coli* strains isolated from the cloacal swabs of apparently healthy canaries were studied. After confirming *E. coli* strains with microbial and biochemical tests, the resistance of the strains to ceftazidime and cefotaxime was determined, and ESBL-producing *E. coli* strains were identified using discs combined with clavulanic acid. Beta-lactamase producing strains were investigated for *bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV genes. The results showed that out of a total of 100 *E. coli* strains isolated from dead canaries, 20 strains are phenotypically able to produce beta-lactamase. Out of 20 beta-lactamase producing *E. coli* strains, 13 strains are able to replicate genomic fragments containing *bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV genes. The most β -lactamase gene detected in both groups of canaries is *bla*CTX type, and *bla*SHV gene was not detected in any of the canaries. In the isolated *Escherichia coli* strains, the percentage of resistance to ceftazidime and cefotaxime antibiotics is related to the detection of the *bla*CTX gene, so that all the resistant strains had the *bla*CTX gene. Considering the prevalence of beta-lactamase producing strains in *Escherichia coli* isolated from dead canaries and the possibility of transferring these genes to other bacteria along with other antibiotic resistance genes, it is necessary to treat pet birds with permitted antibiotics and with compliance dose and duration of use. In general, it seems that the incorrect use of broad-spectrum antibiotics can be the origin of the formation and spread of beta-lactamase-producing strains in pet birds.

Keywords: *Escherichia coli*, beta-lactamase, canary, antibiotic resistance

*Corresponding author: Majid Gholami-Ahangaran,

Address: Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: mgholami6@gmail.com