نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۹۰-۸۰

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

جداسازی، شناسایی و الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی های جدا شده از جوجه های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز نسبت به پانزده آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران

سیده ام البنین قاسمیان[۱]، حمید محمودی پور*[۲]

۱ – استادیار گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

۲– استادیار گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی و جداسازی سویه های اشریشیا کلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۳۰ جدایه اشریشیا کلی جدا شده از جوجه های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان بهبهان می باشد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی جدایه‌ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران با استفاده از روش انتشار از دیسک تعیین گردید. درصد مقاومت نسبت به دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتتراسایکلین، اریترومایسین، تیلوسین، تیامولین، داکسی سایکلین، فلورفنیکل، لینکومایسین، دانوفلوکساسین، نئومایسین، کلیستین، آمیکاسین و جنتامایسین به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۶/۶، ۹۶/۶، ۹۶/۶، ۹۰، ۷۶/۶۶، ۶۶/۶، ۶۳/۳۳، ۶۰، ۵۳/۳۳، ۲۶/۶۶، ۱۰ و ۰ گزارش شد. ۱۷ الگوی مقاومت دارویی در بین ۳۰ جدایه اشریشیاکلی نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک پر مصرف در صنعت طیور شناسایی گردید که ۲۶ جدایه (۸۶/۶۷٪) به بیش از یک الگو تعلق داشتند، در حالیکه ۴ جدایه دیگر (۱۳/۳۳٪) هر کدام فقط به یک الگو تعلق داشتند. از این مقاله نتیجه گیری شد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای رایج در صنعت طیور ایران بالاست که بر لزوم اجرای طرح پایش ملی برای مقاومت ضد میکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک ها تاکید می کند.

واژه های کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اشریشیا کلی، جوجه های گوشتی، کلی‌باسیلوز

*نویسنده مسئول : حمیده محمودی پور

آدرس: گروه پرستاری ومامایی، واحد بهبهان ، دانشگاه ازاد اسلامی ،بهبهان ،ایران

پست الکترونیکی : hamidmahmoudipoor@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی یکی از شایع ترین پاتوژن های مسئول کلی‌باسیلوز موضعی یا سیستمیک در طیور است (Jassim and M Shareef, 2023). این پاتوژن در طیور باعث بیماری مزمن تنفسی، امفالیت، سینوویت، کولی گرانولوماتوز و سالپنژیت می شود که همگی به عنوان بیماری های ناشی از اشریشیاکلی بیماری زای پرندگان طبقه بندی می گردد (Nolan et al., 2013, Panth, 2019).

بسیاری از داروهای ضد میکروبی در صنعت تولید طیور به منظور کاهش عوارض و مرگ و میر ناشی از کلی باسیلوز استفاده می شود، با این حال، استفاده بیش از حد از این آنتی بیوتیک ها به عنوان عوامل پیشگیری کننده و درمانی عفونت و همچنین تقویت کننده رشد در طیور، منجر به ظهور و انتقال ژن های مقاومت شده است (Sciberras et al., 2019).

فاکتورهای چسبندگی، سموم، فاکتورهای اکتساب آهن، لیپوپلی ساکاریدها، کپسول پلی ساکاریدی و عوامل دخیل در تهاجم، تنها تعدادی از عوامل بیماری زای موجود در اشریشیاکلی هستند (Sarowska et al., 2019). وجود برخی از عوامل ویرولانس اشریشیاکلی برای بیماری زایی آنها ضروری است. این عوامل ویرولانس به آنها قدرت ایجاد بیماری در پرندگان را می دهد (Oliveira et al., 2019) ثابت شده است که بسیاری از عوامل ویرولانس تأثیر مهمی در بیماری زایی اشریشیاکلی دارند (Rueter and Bielaszewska, 2020). تشخیص بیماری را می توان با ترکیبی از علائم بالینی، ویژگی های پاتولوژیک و همچنین جداسازی و شناسایی عامل ایجاد کننده انجام داد (Abalaka et al., 2017).

کلی باسیلوز به عنوان یکی از شایع ترین بیماری های تشخیص داده شده در صنعت تولید طیور، یکی از مشکلات کلیدی برای بهره وری صنعت تولید طیور می باشد. صنعت تولید طیور شهرستان بهبهان اخیرا تمهیداتی را در جهت توسعه سریع تجارت مرغ محلی، با توجه به نگرانی در خصوص بیماری های عفونی طیور مانند کلی‌باسیلوز، اندیشیده است. در همین راستا مطالعه حاضر تعیین شیوع، مقاومت باکتریولوژیکی و ضد میکروبی کلی‌باسیلوز در جوجه های گوشتی شهرستان بهبهان می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از مهرماه ۱۴۰۱ الی اسفندماه ۱۴۰۱ در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان انجام شد. در این تحقیق، ۳۰ جدایه اشریشیاکلی از ۳۵ گله جوجه گوشتی با سنین ۶-۲ هفتگی از نقاط مختلف شهرستان بهبهان جداسازی شدند. نمونه گیری براساس جدول گرجسی مورگان صورت گرفت. از هر گله با علایم بالینی و جراحات کالبدگشایی مشکوک به بیماری به طور تصادفی تعداد ۵ جوجه انتخاب و بعد از کالبدگشایی و تشخیص اولیه بیماری، از کبد و قلب نمونه برداری به عمل آمد.

جداسازی و تشخیص باکتری اشریشیاکلی

برای جداسازی و تشخیص باکتری اشرشیا کلی از روش کشت خطی از روش چهار مرحله‌ای (Quadrant Streak Pattern) استفاده شد. از هر پلیت مک‌کانکی، بیش از سه کلنی صاف لاکتوز مثبت اشریشیا کلی برداشته شد، سپس این تک کلنی به منظور ایجاد کشت خالص دوباره بر روی محیط مک کانکی کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷

درجه سانتیگراد قرار گرفت. برای جداسازی باکتری اشریشیاکلی، جدایه‌ها از نظر مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی (تولید اندول، تخمیر گلوگز، تولید سولفید هیدروژن، مصرف سیترات، دکربوکسیلاسیون اورنیتین، دکربوکسیلاسیون لیزین، تولید اوره و واکنش ووگس-پروسکوئر) بررسی شدند.

مخلوط واکنش و سیکل های PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس شامل بافر PCR(X۱)، MgCl۲ ۱/۲ میلی مول)، (dNTPs ۰/۰۸ میلی مول)، Taq DNA Polymerase (U۱)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت (۲۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۲۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. چرخه های حرارتی در PCR در سه مرحله واسرشت، طویل شدن و طویل شدن نهایی صورت گرفت

تشخیص مولکولی اشریشیاکلی توسط PCR

در این مرحله، یک کلنی خالص باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله برای شوک سرمایی بر روی یخ قرار گرفت. سپس، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی جمع آوری و به عنوان الگوی DNA برای PCR استفاده گردید (شکل ۱) یک PCR اختصاصی ژن برای تکثیر۱۶SrRNA با استفاده از پرایمرهای منتشر شده قبلی انجام شد (Farhoumand et al., 2020). لیست پرایمر در جدول ۱ ارائه شده است. جدول ۲ شرایط دمایی PCR برای آمپلیفیکیشن ژن SrRNA ۱۶را نشان می دهد (Moawad et al., 2022). همچنین، تایید شناسایی اشرشیا کلی¬های جدا شده از جوجه¬های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز بر اساس توالی یابی ژن SrRNA ۱۶در جدول ۳ نمایش داده شده است.

آزمون آنتی بیوگرام

برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه نسبت به ۱۵ داروی پر مصرف در صنعت طیور ایران از روش کیفی انتشار از دیسک (Disk diffusion test) و به روش کربی بائر(Kirby-Bauer)، بر طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) سال ۲۰۰۶ استفاده گردید (MA, 2006). جهت انجام این تحقیق دیسکهای آنتی‌بیوتیک (غلظت بر حسب میکروگرم) کلیستین (۱۰)، دیفلوکساسین (۱۰)، دانوفلوکساسین (۱۰)، جنتامایسین (۱۰) و تیلوسین (۱۰)، انروفلوکساسین (۵)، متوپریم (۵)، لینکومایسین (۲۰۰/۱۵)، تری کلرتتراسیکلین (۳۰)، اریترومایسین (۱۵)، فلورفنیکل (۳۰)، داکسی‌سیکلین (۳۰)، آمیکاسین (۳۰)، تیامولین (۳۰) و نئومایسین (۳۰) از شرکت پادتن طب ایران تهیه شد. برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد خارج و بر روی محیط کشت مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط کشت مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی تریپتیک سوی براث (TSB) با کدورت ۰/۵ مک فارلند انکوبه شدند. پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک‌فارلند روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت سفره ای داده شد. پس از گذشت تقریبا ۱۰ دقیقه، دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولرهینتون تلقیح شده قرار داده شدند و

پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند (Nolan et al., 2013, Seifi et al., 2015). سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک به وسیله کولیس اندازه گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی CLSI قرائت شد (شکل ۱).

تحلیل آماری

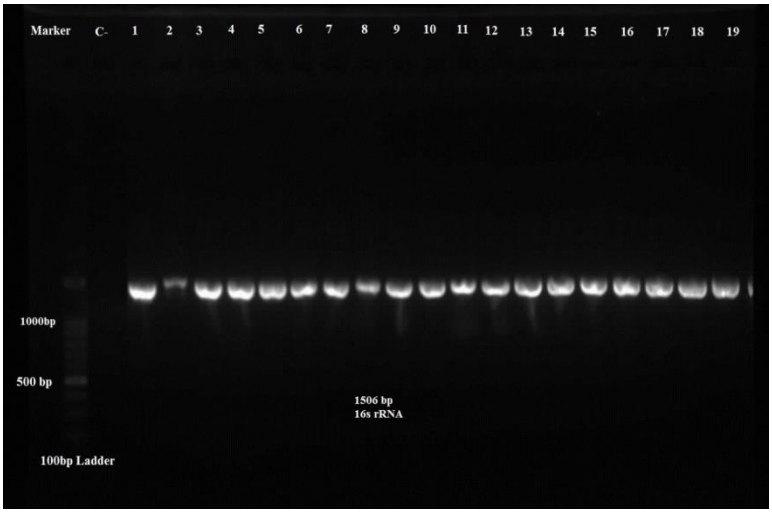
داده های بدست آمده وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ گردید و با استفاده از آزمون مربع کای ۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده ها در سطح ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. F=Forward, R=Reverse, bp=Base pair, PCR=Polymerase chain reaction

پرایمر	توالی	اندازه – (bp)
E. coli 16S (F)	5’- AATTGAAGAGTTTGATCATG-3’	۱۵۰۶
E. coli 16S (R)	5’- CTCTACGCATTTCACCGCTAC-3’	

جدول ۲. شرایط دمایی PCR برای آمپلیفیکیشن ژن 16S rRNA

	دما(درجه سانتی گراد)	زمان(ثانیه)
واسرشت اولیه	۹۶	۶۰
واسرشت	۹۶	۱۵
هم سرشت	۵۸	۶۰
طویل شدن	۷۲	۴۵
طویل سازی نهایی	۷۲	۶۰



شکل ۱. ژل الکتروفورز جهت مشاهده ژن 16S rRNA اشرشیا کلی های جداشده از نمونه‌ها: ستون اول سمت چپ مارکر ۱۰۰ جفت بازی یکتا تجهیز ژن. ستون C- نمونه کنترل منفی، ستون ۱ نمونه استاندارد (*اشریشیا کلی*) همراه با کد ATCC 25922 به اندازه ی ۱۵۰۶ جفت باز و ستون های با شماره ۲ تا ۱۹ نمونه های جداشده می باشد.

جدول ۳. تایید شناسایی *اشریشیا کلی* های جدا شده از ازجوجه های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز بر اساس توالی یابی ژن *16S rRNA*

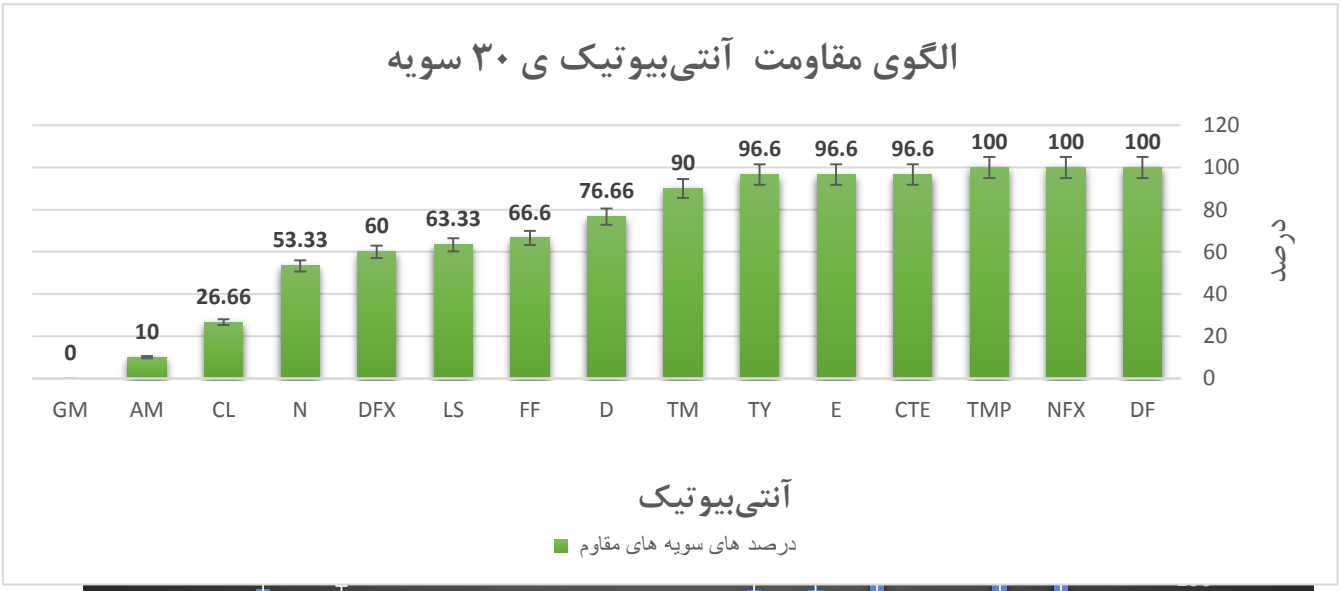
نتیجه توالی	کد دسترسی	نتیجه توالی	کد دسترسی
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli strain EGE 104574-76...*	MF067514.1
E.coli strain EC1515	CP021844.1	*E.coli* strain Z247	CP021207.1
E.coli strain HB-COLI0	CP020933.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli* strain BDUMS-3 16S	KY617770.1
E.coli strain EC1515	CP021844.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain EC1515	CP021844.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain EC1515	CP021844.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E. coli strain EGE 104574-76...	CP021844.1	*E.coli* strain EC1515	MF067514.1
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E.coli strain BDUMS-3 16S	KY617770.1	*E.coli* strain EC1515	CP021844.1
E. coli strain EGE 104574-76...	MF067514.1	*E. coli strain EGE 104574-76...*	MF067514.1
E. coli strain EGE 104574-76...	MF067514.1	*E.coli* strain Z247	CP021207.1
E.coli strain Z247	CP021207.1	*E. coli strain EGE 104574-76...*	MF067514.1

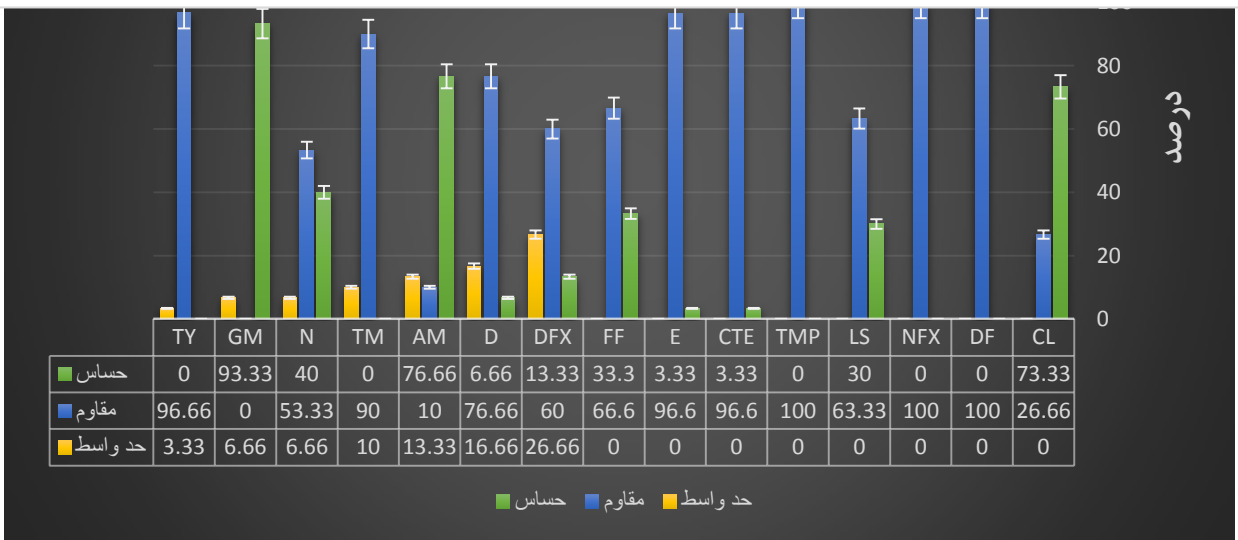
جدول ٤. تعداد و درصد جدایه های اشریشیا کلی حساس، حدواسط و مقاوم جدا شده ازجوجه های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز، نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران

آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	حد واسط تعداد(درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
کلیستین	۲۲(۷۳/۳۳)	۰(۰)	۸(۲۶/۶۶)
دیفلوکساسین	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۱۰۰)
انروفلوکساسین	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۱۰۰)
لینکومایسین	۱۱(۳۶/۶۷)	۰(۰)	۱۹(۶۳/۳۳)
تریمتوپریم	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۱۰۰)
کلرتتراسیکلین	۱(۳/۳۳)	۰(۰)	۲۹(۹۶/۶۷)
اریترومایسین	۱(۳/۳۳)	۰(۰)	۲۹(۹۶/۶۷)
فلورفنیکل	۱۰(۳۳/۳۳)	۰(۰)	۲۰(۶۶/۶۷)
دانوفلوکساسین	٤(۱۳/۳۳)	۸(۲۶/۶۷)	۱۸(۶۰)
داکسی سیکلین	۲(۶/۶۷)	٥(۱۶/۶۶)	۲۳(۷۶/۶۷)
آمیکاسین	۲۳(۷۶/۶۷)	٤(۱۳/۳۳)	۳(۱۰)
تیامولین	۰(۰)	۳(۱۰)	۲۷(۹۰)
نئومایسین	۱۲(٤۰)	۲(۶/۶۷)	۱۶(۵۳/۳۳)
جنتامایسین	۲۸(۹۳/۳۳)	۲(۶/۶۷)	۰(۰)
تیلوسین	۰(۰)	۱(۳/۳۳)	۲۹(۹۶/۶۷)

نتایج آزمایش انتشار از دیسک جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوزیس در نمودار شماره ۱ و ۲ آورده شده است. آزمون مربع کای نشان داد که تفاوت در میزان مقاومت و حساسیت جدایه‌ها نسبت به داروهای مورد بررسی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در برابر دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتتراسایکلین، اریترومایسین، تیلوسین و تیومالین بود. کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر جنتامایسین، آمیکاسین و کلیستین گزارش شد. در این نمودارها مشخص می شود که جدایه‌های اشریشیاکلی مورد بررسی، نسبت به سه آنتی بیوتیک دیفلوکساسین، انروفلوکساسین و تری متوپریم مقاومت دارویی بسیار بالایی (۱۰۰٪) را نشان دادند، در حالی که مقاومت این جدایه‌ها نسبت به ۱۲ ترکیب آنتی بیوتیک دیگر بین صفر تا ۹۶/۶ درصد متغیر بود (نمودار ۱ و ۲).

نمودار ۱. نمای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله های اشریشیاکلی جداشده از نمونه های جوجه های گوشتی (n۳۰=). کلیستین (Cl)، دیفلوکساسین (DF)، انروفلوکساسین (NFX)، لینکومایسین (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتتراسیکلین (CTE)، اریترومایسین E))، فلورفنیکل (FF)، دانوفلوکساسین (DFX)، داکسی سیکلین (D) ،آمیکاسین (AM)، تیامولین





	TY	GM	N	TM	AM	D	DFX	FF	E	CTE	TMP	LS	NFX	DF	CL
حساس	0	93.33	40	0	76.66	6.66	13.33	33.3	3.33	3.33	0	30	0	0	73.33
مقاوم	96.66	0	53.33	90	10	76.66	60	66.6	96.6	96.6	100	63.33	100	100	26.66
حد واسط	3.33	6.66	6.66	10	13.33	16.66	26.66	0	0	0	0	0	0	0	0

(TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY).

نمودار ۲. نمای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله های اشریشیاکلی جداشده از نمونه های جوجه های گوشتی (n۳۰=). کلیستین (Cl)، دیفلوکساسین (DF)، انروفلوکساسین (NFX)، لینکومایسین (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتتراسیکلین (CTE)، اریترومایسین E))، فلورفنیکل (FF)، دانوفلوکساسین (DFX)، داکسی سیکلین (D) ،آمیکاسین (AM)، تیامولین (TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY).

بررسی فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین ۳۰ جدایه اشریشیاکلی از موارد کلی‌باسیلوز جوجه-های گوشتی، نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک با مصرف رایج در صنعت طیور ایران نشان دهنده ی ۱۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بود. بطوری که ۲۶ جدایه (۸۶/۶۷درصد) به ۱۳ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (بیش از یک اشریشیاکلی در هر الگو) و ۴ جدایه دیگر(۱۳/۳۳ درصد) به ۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (یک اشریشیاکلی در هر الگو) تعلق داشتند. تفاوت از نظر فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بین دو گروه (جدایه های بیش از یک اشریشیاکلی در هر الگو و جدایه های یک اشریشیاکلی در هر الگو) با یکدیگر معنی دار بود (P<۰/۰۵). در بین ۱۳ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، ۱۳/۳ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره یک، ۱۰ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره دو، ۱۰ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره هفت، ۶/۷ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره سه، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره چهار، ۶/۷ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره شش، ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره نه، ۶/۷ درصد جدایه‌ها در الگوی مشترک شماره دوازده و ۶/۷ درصد جدایه ها در الگوی مشترک شماره سیزده بودند. مابقی جدایه‌ها در الگوهای مشترک شماره پنج، هشت، ده و یازده قرار گرفتند. بیشترین و کمترین فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به ترتیب ۱۳/۳درصد و ۳/۳ درصد دیده شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی¬دار بود (P<۰/۰۵). (جدول شماره ۵).

جدول۵. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه اشریشیاکلی جدا شده از جوجه های گوشتی نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور ایران

شماره الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	تعداد ترکیبات ضد میکروبی در هرالگو	مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی	تعداد جدایه‌های *اشریشیاکلی* متعلق به هر الگو(درصد)	شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی چند گانه (MAR Index)	درصد
۱	۱۰	AM, CTE, CL, D, DFX, DF, E, FF, NFX, TMP	(۱۳/۳)٤	۰/٦۷	/٦۷ ۸٦
۲	۱۰	AM, CTE, CL, D, DFX, DF, E, FF, NFX, TY	(۱۰)۳	۰/٦۷	
۳	۹	CL, D, DFX, DF, E, FF, LS, NFX, TY	(٦/۷)۲	۰/٦	
٤	۸	AM, CTE, CL, D, DFX, DF,LS, TM	(٦/۷)۲	۰/۵۳	
۵	۷	CL, D, DFX, DF,LS, TM, TMP	(۳/۳)۱	۰/۵	
٦	۷	AM, CTE, CL, D, DF, TM, TMP	(٦/۷)۲	۰/۵	
۷	٦	AM, CTE, CL, D, DFX, DF	(۱۰)۳	۰/٤۳	
۸	٦	AM, CTE, DFX, DF,LS, TMP	(۳/۳)۱	۰/٤۳	
۹	۵	AM, CTE, D, DFX, DF	(٦/۷)۲	۰/۳٦	
۱۰	۵	CL, E, FF, NFX, TY	(۳/۳)۱	۰/۳٦	
۱۱	٤	AM, DF, NFX, TMP	(۳/۳)۱	۰/۲۹	
۱۲	٤	LS, N, TM, TMP	(٦/۷)۲	۰/۲۹	
۱۳	۳	DFX, NFX, TMP	(٦/۷)۲	۰/۲۱	
۱٤-۱۷	متغییر	الگوهای انفرادی متنوع	(۱۳/۳)٤	-	/۳۳ ۱۳

کلیستین (Cl)، دیفلوکساسین (DF)، انروفلوکساسین (NFX)، لینکومایسین (LS)، تریمتوپریم (TMP)، کلرتتراسیکلین (CTE)، اریترومایسین (E))، فلورفنیکل (FF)، دانوفلوکساسین (DFX)، داکسی سیکلین (D) ،آمیکاسین (AM)، تیامولین (TM)، نئومایسین (N)، جنتامایسین (GM) و تیلوسین (TY)

بحث

این مطالعه به منظور ارزیابی برخی از خصوصیات مهم سویه های پاتوژن اشریشیاکلی در یکی از مناطق مهم پرورش صنعتی طیور گوشتی در ایران یعنی بهبهان انجام شد. روش کار به گونه ای برنامه ریزی شد تا بتوان از نتایج بدست آمده برای مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی های تکمیلی سرولوژیکی و ژنوتیپی در آینده استفاده گردد تا بتوان سیاست پیشگیری و درمانی مناسبی در منطقه اتخاذ نمود.

گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت سویه های پاتوژن اشریشیاکلی نسبت به ترکیبات آنتی باکتریال در حال افزایش است و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می باشد (Lambie et al., 2000, Salmon and

Watts, 2000). مقایسه بین تفاوت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شهر های مختلف شاید مقایسه‌ی مناسبی برای مصرف آنتی بیوتیک برای درمان این بیماری در یک منطقه نباشد. با استفاده از نتایج این تحقیق در کنار تحقیقات گذشته در یک منطقه، می توان روش درمانی مناسب برای درمان بیماری کلی باسیلوز با این آنتی بیوتیک ها جایگزین گردد. گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت سویه های پاتوژن اشریشیاکلی نسبت به ترکیبات آنتی باکتریال در حال افزایش است و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می باشد (Lambie et al., 2000). در ایران در مطالعاتی که بر روی جدایه‌های اشریشیاکلی از نمونه های جوجه های گوشتی بیمار، در شیراز و تهران و دیگر شهرها به عمل آمده مشخص شده که میزان مقاومت جدایه‌ها به ترکیبات آنتی باکتریال، گسترده و بالا می باشد (Jahantigh et al., 2020b, Farhoumand et al., 2020, Rajaeian et al., 2003). در این مطالعه فراوانی مقاومت نسبتا بالایی علیه آنتی‌بیوتیک های دیفلوکساسین، انروفلوکساسین، تریمتوپریم، کلرتتراسایکلین، اریترومایسین، تیلوسین و تیومالین برای جدایه های طیور تعیین شد که می-تواند ناشی از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در طیور باشد (Sanchez et al., 2020). زهرایی صالحی و همکاران، در سال ۲۰۰۶ در بررسی بر روی طیور مبتلا به کلی سپتیسمی، به این نتیجه رسیدند که جدایه ها مقاومت بیش از ۹۴ درصد را علیه تتراسیکلین نشان دادند. در حالیکه هیچ مقاومتی نسبت به جنتامایسین دیده نشد و مقاومت به سفالوسپورین ها بسیار نادر بود، اما در این تحقیق حد واسطی از مقاومت نسبت به جنتامایسین (۶/۶۳ درصد) مشاهده گردید. بنابراین، ممکن است در آینده ی نه چندان دور مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک ایجاد گردد (Salehi and Bonab, 2006). همچنین، ذاکری و کاشفی در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که ایزوله های APEC اشریشیاکلی جدا شده از طیور آلوده در تبریز میزان حساسیت بالایی نسبت به انروفلوکساسین (۷۷ درصد) داشتند (Zakeri and Kashefi, 2012).

در گزارشات مختلف، تفاوت هایی در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی های پاتوژن طیور در برابر ترکیبات ضد میکروبی دیده شده است (Mohammadi et al., 2018, Rafiei and Nasirian, 2003). در مطالعه حاضر نیز، بررسی فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۳۰ جدایه مورد بررسی، نسبت به ۱۵ ترکیب آنتی بیوتیک پر مصرف در صنعت طیور ایران، نشان دهنده ۱۷ الگو بود که ۱۳/۳۳ درصد جدایه ها از اشریشیاکلی های جدا شده، هر کدام تنها به یک الگو و ۸۶/۶۷ درصد جدایه‌ها از اشریشیاکلی های جدا شده، به بیش از یک الگو تعلق داشتند. یافته های بدست آمده از مطالعه حاضر در خصوص وجود ۱۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بین جدایه های مورد بررسی، از برخی گزارش‌های پیشین کمتر است (Rafiei and Nasirian, 2003, Seifi et al., 2015). این موضوع بیانگر آن است که فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نواحی مختلف جغرافیایی و مقاطع زمانی متفاوت حتی در یک منطقه ممکن است متفاوت باشد. لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با توجه به الگوی مقاومت دارویی سایر مناطق و یا کشورها بدلیل قابل تغییر بودن مکان و زمان این الگوها امکان پذیر نیست. بنابراین آزمون حساسیت ضد میکروبی (آنتی بیوگرام) بایستی مستقلا برای هر منطقه و یا حتی هر مرغداری قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک ها انجام گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای رایج در صنعت طیور ایران بالاست که بر لزوم اجرای طرح پایش ملی برای مقاومت ضد میکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها تاکید می کند.

منابع

1. ABALAKA, S., SANI, N., IDOKO, I., TENUCHE, O., OYELOWO, F., EJEH, S. & ENEM, S. 2017. Pathological changes associated with an outbreak of colibacillosis in a commercial broiler flock. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 15**,** 95-102.
2. FARHOUMAND,P., HASSANZADAZARH., SOLTANPOUR, M. S., AMINZARE, M. & ABBASI, Z. 2020. Prevalence, genotyping and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes and Escherichia coli in fresh beef and chicken meats marketed in Zanjan, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 12**,** 537.
3. JAHANTIGH, M., SAMADI, K., DIZAJI, R. E. & SALARI, S. 2020a. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC veterinary research*, 16**,** 1-6.
4. JAHANTIGH, M., SAMADI, K., DIZAJI, R. E. & SALARI, S. 2020b. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16**,** 1-6.
5. JASSIM, W. G. & M SHAREEF, A. 2023. Antibiotic Resistance Patterns of Escherichia coli Isolated From Broiler Chickens with Colibacillosis in Duhok Province. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 54**,** 137-148.
6. LAMBIE, N., NGELEKA, M., BROWN, G. & RYAN, J. 2000. Retrospective study on Escherichia coli infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. *Avian diseases***,** 155-160.
7. MA, W. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *Clsi (Nccls)*, 26**,** M7-A7.
8. MOAWAD, A. A., HOTZEL, H., HAFEZ, H. M., RAMADAN, H., TOMASO, H., BRAUN, S. D., EHRICHT, R., DIEZEL, C., GARY, D. & ENGELMANN, I. 2022. Occurrence, phenotypic and molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in healthy turkeys in Northern Egypt. *Antibiotics*, 11**,** 1075.
9. MOHAMMADI, V., GHANIEI, A. & SEPEHRNIA, P. 2018. Antimicrobial resistance profile and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolates from broiler chickens, Northwestern Iran. *Bulgarian J. Vet. Med*, 21**,** 169-175.
10. NOLAN, L. K., BARNES, H. J., VAILLANCOURT, J.-P., ABDUL-AZIZ, T. & LOGUE, C. M. 2013. Colibacillosis. *Diseases of poultry***,** 751-805.
11. OLIVEIRA, E., CARDOZO, M., BORZI, M. M., BORGES, C., GUASTALLI, E. & ÁVILA, F. 2019. Highly pathogenic and multidrug resistant avian pathogenic Escherichia

coli in free-range chickens from Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21.
12. PANTH, Y. 2019. Colibacillosis in poultry: A review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 2**,** 301-311.
13. RAFIEI, T. R. & NASIRIAN, A. 2003. Isolation, Identificationand Antimicrobial Resistance Patternsof E. Coli Lsolated From Chicken Flocks.
14. RAJAEIAN, H., FIROUZI, R., JALAEI, J. & HEYDARI, D. F. 2003. Antibiotic resistance of several common bacterial species isolated from chickens in Shiraz area.
15. RUETER, C. & BIELASZEWSKA, M. 2020. Secretion and delivery of intestinal pathogenic Escherichia coli virulence factors via outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10**,** 91.
16. SALEHI, T. Z. & BONAB, S. F. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of Escherichia coli strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *International Journal of Poultry Science*, 5**,** 677-684.
17. SALMON, S. A. & WATTS, J. L. 2000. Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults. *Avian diseases***,** 85-98.
18. SANCHEZ, H. M., WHITENER, V. A., THULSIRAJ, V., AMUNDSON, A., COLLINS, C., DURAN-GONZALEZ, M., GIRAGOSSIAN, E., HORNSTRA, A., KAMEL, S. & MABEN, A. 2020. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from conventional, no antibiotics, and humane family owned retail broiler chicken meat. *Animals*, 10**,** 2217.
19. SAROWSKA, J., FUTOMA-KOLOCH, B., JAMA-KMIECIK, A., FREJ-MADRZAK, M., KSIAZCZYK, M., BUGLA-PLOSKONSKA, G. & CHOROSZY-KROL, I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11**,** 1-16.
20. SCIBERRAS, M., PIPOVÁ, M., REGECOVÁ, I., JEVINOVÁ, P. & DEMJANOVÁ, S. 2019. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from broiler chickens. *FOLIA*, 63**,** 1-8.
21. SEIFI, S., KHOSHBAKHT, R. & ATABAK, A. 2015. Antibiotic susceptibility, serotyping and pathogenicity evaluation of avian Escherichia coli isolated from broilers in northern Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18.
22. ZAKERI, A. & KASHEFI, P. 2012. Antimicrobial susceptibilities of avian Escherichia coli isolates in Tabriz, Iran. *African Journal of Biotechnology*, 11**,** 4467-4470.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

Isolation, identification, and antibiotic resistance patterns of Escherichia coli isolated from broiler chickens with colibacillosis against 15 common antibiotics in the Iranian poultry industry

Seyedeh Ommolbanin Ghasemian1, Hamid Mahmoodipour2*

1. Assistant Professor, Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

2. Assistant Professor, Department of Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

Received: 28 May2023 *Accepted: 8 October 2023*

Abstract

The purpose of this research is to identify and isolate antibiotic-resistant Escherichia coli strains and determine the antibiotic resistance pattern in 30 Escherichia coli isolates isolated from broiler chickens with colibacillosis in Behbahan city. The antibiotic resistance pattern of all isolates was determined against 15 important and common antibiotics in Iran's poultry industry using the disk diffusion method. The percentage of resistance to difloxacin, enrofloxacin, trimethoprim, chlortetracycline, erythromycin, tylosin, tiamulin, doxycycline, florfenicol, lincomycin, danofloxacin, neomycin, colistin, amikacin and gentamicin is 100, 100, 100, 96/6, 96/6, respectively. 96/6, 90, 76/66, 66/6, 63/33, 60, 53/33, 26/66, 10 and 0 were observed. 17 drug resistance patterns were identified among 30 Escherichia coli isolates to 15 commonly used antibiotics in the poultry industry, of which 26 isolates (86.67%) belonged to more than one pattern, while the other 4 isolates (13.33%) each They belonged to only one pattern. The results of this study showed that the resistance of the isolates to the majority of commonly used drugs in Iran's poultry industry is high, which makes it necessary to implement a strong national monitoring plan for antimicrobial resistance and the principled use of antibiotics.

Keywords: antibiotic resistance, Escherichia coli, broilers, colibacillosis

**Corresponding author: hamidmahmoudipoor*
Address: Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan
Email: hamidmahmoudipoor@yahoo.com