Animal Health and Infectious Diseases
Volume 1, Issue 3
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Determination of antibiotic resistance patterns and frequency of tetracycline resistance genes (*tet*A, *tet*B, *tet*C) in poultry colibacillosis isolates

Nahid Yarian Feli [1], Gholam Abbas Shams al-Dini [1], Fataneh Sepahvand [1], Nemat Shams* [1], Ali Forouharmehr [3]

1. Department of Microbiology and Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Today, the spread of pathogenic *Escherichia coli* strains containing tetracycline resistance genes is considered one of the major health concerns worldwide. The main reason for their spread is the excessive and inappropriate use of antibiotics. The aim of the present study was to determine the antibiotic resistance patterns and the frequency of tetracycline resistance genes (*tet*A, *tet*B, *tet*C) in total isolates of poultry bacillus in Ilam city.

Materials and Methods: This descriptive-cross-sectional study was conducted in 2019 on one hundred and fifty APEC isolates collected from total cases of poultry bacillus in 20 broiler flocks in Ilam city. Standard bacteriological and biochemical tests were used to determine the identity of the isolates. The isolates were stored at -20°C in nutrient broth in the presence of 15% glycerol for subsequent steps. To determine the antibiotic resistance pattern of the isolated strains, disc diffusion was used according to the Kirby-Boer method based on the CLSI. In the PCR test, specific primers were used to prove the presence of *tet*A, *tet*B and *tet*C genes in the studied isolates

Results: The results of the study of the phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains producing colibacillosis showed that the highest level of antibiotic resistance was against tetracycline antibiotics. The results of the PCR test using specific primers to detect and identify the gene encoding the efflux pump *tet*A, *tet*B and *tet*C showed that 130 isolates (86.67%) had the *tet*A gene, 47 isolates (31.3%) had the *tet*B gene and only 9 isolates (6%) had the *tet*C gene.

Conclusion: The high frequency of microbial resistance genes to tetracycline in total isolates of poultry bacillus indicates the indiscriminate use of tetracycline antibiotics in poultry farms in the study area. It is necessary to perform an antibiogram before treating the disease to prevent the emergence and spread of resistance in the bacterial population at the flock level.

Keywords: *Escherichia coli*, colibacillosis, tetracycline, gene, antibiotic resistance

Received: 11.04.2025 **Accept: 15.05.2025** **Final Edit: 15.03.2025** **Online Publish:22.06.2025**

Corresponding Information: Nemat Shams, Department of Microbiology and Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Email: shams.n@lu.ac.ir

Cite this article: Yarian Feli, N; Shams al-Dini, Gh; Sepahvand, F; Shams, N; Forouharmehr, A (2025). Determination of antibiotic resistance patterns and frequency of tetracycline resistance genes (*tet*A, *tet*B, *tet*C) in poultry colibacillosis isolates. *Animal Health and Infectious Diseases*. 1(3), 5-10.

© Author (s)retain the copyright.

DOI: https://doi.org/10.22034/jahid.2025.2062411.1058

بهداشت و بیماری های عفونی دام
شماره ۱ ، دوره ۳
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

تعیین الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA*, *tetB*, *tetC*) در جدایه‌های کلی-باسیلوز طیور

ناهید یاریان فعلی [۱]، غلام عباس شمس الدینی [۱]، فاطمه سپهوند [۱]، نعمت شمس* [۲]، علی فروهر مهر [۳]

۱. گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، خرم‌آباد، ایران
۳. دانشیار گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: امروزه انتشار سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* حاوی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین به‌عنوان یکی از نگرانی‌های عمدهٔ بهداشتی در سطح دنیا مطرح است. عمده‌ترین علت گسترش آن‌ها استفادهٔ بیش‌ازحد و نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها است. هدف از مطالعهٔ حاضر تعیین الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین (*tetA*, *tetB*, *tetC*) در جدایه‌های کلی‌باسیلوز طیور شهرستان ایلام بود.

مواد و روش ها: این مطالعهٔ توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۹ برروی یک‌صدوپنجاه جدایهٔ APEC که از موارد کلی باسیلوز طیور در سطح ۲۰ گلهٔ جوجهٔ گوشتی شهرستان ایلام جمع‌آوری شده بود, انجام شد. برای تعیین هویت جدایه‌ها از آزمون‌های استاندارد باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد. جدایه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آبگوشت مغذی در حضور گلیسیرول ۱۵ درصد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی‌شده از انتشار دیسک به روش کربی-بوئر براساس مؤسسهٔ استاندارد (CLSI) استفاده شد. در آزمون PCR برای اثبات حضور ژن‌های *tetA* , *tetB* و *tetC* در جدایه‌های مورد مطالعه از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

یافته ها: نتایج بررسی میزان مقاومت فنوتیپی آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیا کلی* مولد کلی‌باسیلوز نشان داد که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین بود. نتایج آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی و شناسایی ژن کدکنندهٔ پمپ آفلوکس *tetA* , *tetB* و *tetC* نشان داد که ۱۳۰ جدایه (۸۶/۶۷ درصد) واجد ژن *tetA*, ۴۷ جدایه (۳۱/۳ درصد) واجد ژن *tetB* و تنها ۹ جدایه (۶ درصد) واجد ژن *tetC* هستند.

نتیجه گیری: فراوانی بالای ژن‌های مقاومت میکروبی به تتراسیکلین در جدایه‌های کلی باسیلوز طیور نشان‌دهندهٔ مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین در مزارع پرورش طیور در منطقهٔ مورد مطالعه است. انجام آنتی‌بیوگرام قبل از درمان بیماری برای جلوگیری از بروز و گسترش مقاومت در جمعیت باکتری در سطح گله‌ها ضرورت دارد

کلیدواژه ها: *اشریشیاکلی*، کلی‌باسیلوز، تتراسیکلین، ژن ،مقاومت آنتی‌بیوتیک.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵ ویرایش نهایی: ۱۴۰۴/۰۳/۱۵ انتشار آنلاین:۱۴۰۴/۰۴/۱

اطلاعات نویسنده مسئول: نعمت شمس، گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

Email: shams.n@lu.ac.ir

استناد: یاریان فعلی، ن؛ شمس الدینی، غ؛ سپهوند، ف؛ شمس، ن؛ فروهرمهر، علی (۱۴۰۴). تعیین الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های مقاومت به تتراسایکلین (*tetA*, *tetB*, *tetC*) در جدایه های کلی باسیلوز طیور. *بهداشت و بیماری های عفونی دام*، ۱(۳)؛ ۵-۱۰.

© نویسندگان

DOI: https://doi.org/10.22034/jahid.2025.2062411.1058

مقدمه

شیوع فراوان بیماری کلی‌باسیلوز پرندگان همه‌ساله خسارت‌های زیادی به صنعت پرورش طیور کشور وارد می‌کند. در این بین بیماری‌های باکتریایی و در رأس آن‌ها عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی* سهم عمده‌ای در بروز این مشکل دارد (۱). عوامل ضدمیکروبی مختلفی به‌منظورکاهش ضررهای ناشی از این عفونت‌ها استفاده می‌شود، اما در طی دهه‌های اخیر مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها سبب گسترش ژن‌های مقاوم و درنتیجه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها شده است، که این خود منجربه کاهش کارآیی داروها و شکست درمانی شده است (2و 1).

مصرف داروهای ضدمیکروبی در درمان عفونت‌های باکتریایی جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار و نیز افزودن آن‌ها به جیرهٔ غذایی، به‌عنوان مکمل رشد، مقاومت پیشرونده‌ای دربرابر آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد کرده است. نگرانی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه مقاومت چندداروییو و پتانسیل دریافت فاکتورهای مقاومت به‌وسیلهٔ عوامل پاتوژن انسانی از باکتری‌های حیوانات اهمیت بررسی و مطالعهٔ آن‌ها را دوچندان کرده است (3و۴).

پدیدهٔ مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌جهت گسترش باکتری‌های مقاوم به درمان و بروز بیماری اهمیت ویژه‌ای دارد. در میان *اشریشیاکلی‌های* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، شیوع سویه‌های مقاوم به تتراسیکلین از فراوانی بالایی برخوردارند (1). تتراسیکلین از سال‌ها قبل به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی مؤثر و ارزان‌قیمت سنتتیک در طب انسانی و دامی مصرف شده است. اولین‌بار از تتراسیکلین در سال ۱۹۴۸ استفاده شد، تتراسیکلین با اتصال به زیر واحد S ۳۰ ریبوزوم باکتری باعث تداخل در سنتز پروتئین در باکتری می‌شود. مقاومت به تتراسیکلین‌ها با سه مکانیسم روی می‌دهد: افلاکس تتراسیکلین، محافظت ریبوزومی و تغییر شیمیایی. مقاومت نسبت‌به تتراسیکلین اغلب به‌وسیلهٔ یک‌سری از ژن‌ها ایجاد می‌شود. این ژن‌ها مکانیسم پمپ یونی افلاکس یا پروتئین‌های حفاظت‌کنندهٔ ریبوزومی را فعال می‌کنند. تعداد زیادی از این ژن‌ها با پلاسمیدهای متحرک یا ترانسپوزون‌ها در ارتباطند. شمار محدودی از باکتری‌ها مقاومت به تتراسیکلین را ازطریق موتاسیون کسب می‌کنند؛ گاه با تغییر در قابلیت نفوذپذیری پروتئین‌های غشای خارجی، لیپوپلی‌ساکاریدهای غشای خارجی و همچنین تغییر در جزء 16S rRNA یا موتاسیون در ژن‌های مرتبط با مکانیسم پمپ یونی افلاکس می‌شود (۵) .

ژن‌های مرتبط با پمپ‌های آفلوکس, پروتئین‌های غشائی کد می‌کنند که این پروتئین‌ها تتراسیکلین را از درون سلول باکتری به خارج انتقال داده و منجربه کاهش غلظت درون‌سلولی تتراسیکلین در باکتری شده و به این طریق ریبوزوم باکتریایی در برابرتتراسیکلین حفاظت می‌شود. در باکتری‌های گرم‌منفی ژن‌های مرتبط با پمپ یونی افلاکس شامل: ,*tet*(H), ,*tet*(G), , *tet*(E),, *tet*(D),,*tet*(C), ,*tet*(B) ,*tet*(A) ,*tet*(Y), ,*tet*(V), ,*tetA*(P), ,*tet*(L), ,*tet*(K), , *tet*(J),,*tet*(I), *otr*(B) ,*tet*(35) ,*tet*(34) ,*tet*(33), ,*tet*(31), ,*tet*(30), ,*tet*(Z), هستند. فراوانی ژن‌های tetB, tetA نسبت‌به ژن‌های دیگر *tet* بیشتر دیده شده و اهمیت بیشتری دارد (۶). شیوع مقاومت با تتراسیکلین، شاخص مناسبی برای ارزیابی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک است و ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم شود.

با توجه به نبود اطلاعات کافی درخصوص حضور داشتن یا نداشتن ژن‌های مقاومت میکروبی مربوط به تتراسیکلین در جدایه‌های APEC کلی باسیلوز این بررسی با هدف تعیین الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین, *tet*A ,*tet*C,*tet*B در جدایه‌های APEC کلی باسیلوز طیور انجام گرفته است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها

این مطالعهٔ توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۹ برروی یک‌صدوپنجاه جدایهٔ APEC که از موارد کلی باسیلوز طیور در سطح ۲۰ گله جوجهٔ گوشتی شهرستان ایلام جمع‌آوری شده بود، انجام شد. برای تعیین هویت جدایه‌ها از آزمون‌های استاندارد باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد (۷) جدایه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آبگوشت مغذی در حضور گلیسیرول ۱۵ درصد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شدند.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی‌شده از انتشار دیسک به روش کربی-بوئر براساس مؤسسهٔ استاندارد (CLSI) استفاده شد (۸). به این منظور از تعداد ۹ عدد دیسک آنتی‌بیوتیک رایج ساخت شرکت روسکو (ROSCO Diagnostica,Denmark) استفاده شد که عبارت بودند از: تتراسیکلین (۳۰ µg)، استرپتومایسین (۱۰µg)، جنتامایسین (۳۰µg)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰µg)،

اریترومایسین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، انروفلوکساسین (۵µg)، تری‌متوپریم سولفومتاکسازول (۲۳/۷۵+۱/۲۵µg)، کلرآمفنیکل (۳۰µg). در این مرحله از سویهٔ استاندارد اشریشیاکلی ATCC ۲۵۰۲۲ به‌عنوان نمونهٔ کنترل در آزمایش آنتی‌بیوگرام استفاده شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از جدایه‌ها از روش جوشانیدن (Boiling method) استفاده شد (۹). بدین‌منظور یک لوپ کامل از کشت ۲۴ساعته باکتری برروی محیط ژلوز لوریا برتانی (India, HiMedia) در یک میکروتیوپ حاوی ۱۵۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل حل شد و به‌مدت ۸ دقیقه در بن‌ماری (Iran, Pars Azma) در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. میکروتیوپ‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Germany, Eppendorf R 5415) به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع بالایی به‌عنوان DNA الگو در واکنش PCRاستفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

در آزمون PCR برای اثبات حضور ژن‌های *tet*A , *tet*B و *tet*C در جدایه‌های مورد مطالعه از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (جدول۱). توالی پرایمرها و اندازهٔ محصول PCR در جدول۱ نشان داده شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (SinaCol, Iran) ، ۰/۵ میکرولیتر از غلظت ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (SinaCol, Iran)، ۵ میکرولیتر Template DNA و ۶/۵ میکرولیتر آب‌مقطر دیونیزه انجام شد. تکثیر ژن‌ها با دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) طبق برنامهٔ واسرشت اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۰ سیکل شامل: مرحلهٔ واسرشت به‌مدت۳۰ ثانیه در در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی هر پرایمر مطابق جدول۱، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (امتداد) و درنهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (امتداد نهایی) صورت گرفت. در این مطالعه برای حضور ژن‌های *tet*A , *tet*B در جدایه‌های مطالعه‌شده از سویهٔ اشریشیاکلی *E.coli* ATCC ۲۵۹۲۲ و برای اثبات ژن *tet*C از پلاسمید PBR323 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

الکتروفورز

الکتروفورز مصولات PCR با دستگاه الکتروفورز (Padideh NojePars, Iran) برروی ژل آگاروز ۱/۵درصد (Sigma,USA) و با استفاده از رنگ Safe stain (SinaCol, Iran) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, England) بررسی شدند و قطعات تکثیرشده به‌صورت باندهای فلورسنت مشاهده و با مارکرهای ۵۰ و ۱۰۰ جفت بازی (SinaCol, Iran) و کنترل مثبت و منفی مقایسه و اندازه‌گیری شدند.

ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	اندازه محصول (bp)	رفرانس
tetA	TTGGCATTCTGCATTCACTC-3′-F: 5′ R: 5′-GTATAGCTTGCCGGAAGTCG-3′	۶۰	۴۹۴	۱۰
tetB	5`- TACGTGAATTTATTGCTTCGG -3´ 5`- ATACAGCATCCAAAGCGCAC - 3´	۵۳	۲۰۶	۱۰
tetC	F: 5′-GCGGGATATCGTCCATTCCG-3′ R: 5′-GCGTAGAGGATCCACAGGACG-3′	۵۹	۲۰۷	11

جدول۱: توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه

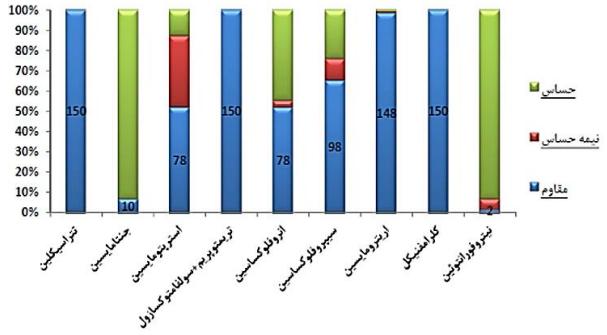
یافته‌های حاصل از بررسی‌های فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک

نتایج بررسی‌های فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک (روش کربی – بوئر) در ۱۵۰ جدایهٔ APEC گرفته‌شده از موارد کلی باسیلوز شهرستان ایلام در جدول (۱)و نمودار (۱)نشان داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین میزان مقاومت فنوتیپی نسبت‌به تتراسیکلین (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت‌به نیتروفورانتوئین (۱ درصد) و جنتامایسین (۷ درصد) وجود دارد. ازطرفی بیشترین حساسیت میکروبی در جدایه‌های مورد مطالعه نسبت‌به نیتروفورانتوئین (۹۴ درصد) و جنتامایسین (۹۳ درصد) دیده می‌شود.

آنتی‌بیوتیک	مقاوم		نیمه‌حساس		حساس		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
تتراسیکلین	۱۵۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱۵۰
جنتامایسین	۱۰	۷	۰	۰	۱۴۰	۹۳	۱۵۰

استرپتومایسین	۷۸	۵۲	۵۳	۳۵	۱۹	۱۳	۱۵۰
تریمتوپریم+ سولفامتوکسازول	۱۵۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱۵۰
انروفلوکساسین	۷۸	۵۲	۵	۳	۶۷	۴۵	۱۵۰
سیپروفلوکساسین	۹۸	۶۵	۱۶	۱۱	۳۶	۲۴	۱۵۰
اریترومایسین	۱۴۸	۹۸	۱	۱	۱	۱	۱۵۰
کلرآمفنیکل	۱۵۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱۵۰
نیتروفورانتوئین	۲	۱	۸	۵	۱۴۰	۹۴	۱۵۰

جدول ۱. فراوانی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۵۰ جدایه *E. coli* گرفته‌شده از موارد کلی‌باسیلوز شهرستان ایلام

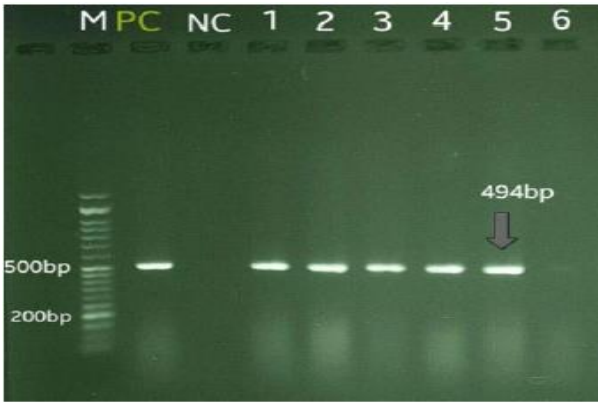


نمودار ۱. فراوانی میزان حساسیت و مقاومت فنوتیپی ۱۵۰ جدایه *E. coli* گرفته‌شده از موارد کلی‌باسیلوز شهرستان ایلام

نتایج حاصل از بررسی‌های ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

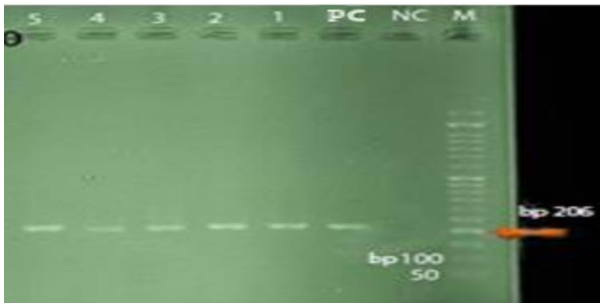
نتایج آزمایش PCR برروی ۱۵۰ جدایهٔ APEC گرفته‌شده از موارد کلی باسیلوز شهرستان ایلام با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی و شناسایی ژن کدکنندهٔ پمپ آفلوکس *tetA* , *tetB* و *tetC* نشان داد که ۱۳۰ جدایه (۸۶/۶۷ درصد) واجد ژن *tetA*, ۴۷ جدایه (۳۱/۳ درصد) واجد ژن *tetB* و تنها ۹ جدایه (۶درصد) واجد ژن *tetC* هستند.

تصاویر۲،۱ و ۳ الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های کدکنندهٔ پمپ آفلوکس *tetA* , *tetB* و *tetC* را در ژل آگاروز ۱/۵ درصد در جدایه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد.



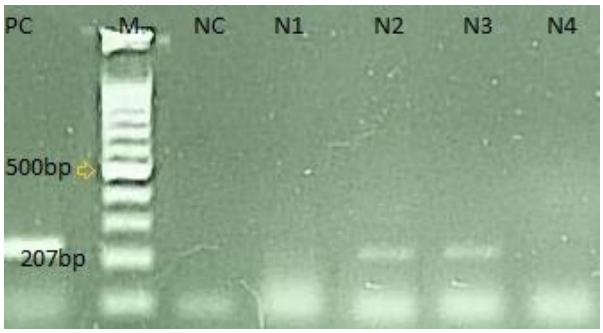
تصویر۱ .الکتروفورز محصول PCR ژن tetA در ژل آگاروز ۱/۵درصد در جدایه‌های مورد مطالعه

M لدر bp ۵۰; PC, کنترل مثبت; NC, کنترل منفی; چاهک‌های ۱ الی۵ نمونه‌های مثبت واجد باند bp ۴۹۴; چاهک ۶ نمونه منفی.



تصویر ۲. الکتروفورز محصول PCR ژنtetB در ژل آگاروز ۱/۵ درصد در جدایه‌های مورد مطالعه

M مارکر (۵۰bp) ، PC کنترل مثبت، NC کنترل منفی، چاهک ۱ الی ۵ نمونه‌های مثبت ژن tetB واجد باند bp ۲۰۶.



تصویر ۳. الکتروفورز محصول PCR ژنtetC در ژل آگاروز ۱/۵ درصد در جدایه‌های مورد مطالعه

M مارکر (۱۰۰bp) ، PC کنترل مثبت، NC کنترل منفی، چاهک N2 و N3 نمونه‌های مثبت ژن tetC واجد باند bp ۲۰۷, چاهک N1, N4 نمونه‌های منفی

بحث

امروزه از ترکیبات و عوامل ضدباکتریایی برای اهداف مختلفی نظیر افزایش رشد، پیشگیری و درمان بیماری‌ها در تولید و پرورش دام، طیور و آبزیان استفاده می‌شود. به‌دنبال مصرف بی‌رویه، نامناسب و بلندمدت آنتیبیوتیک‌ها برای اهداف بالاگفت ظهور، گسترش و بقای باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به عوامل ضدمیکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها)

به یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌روی سازمان‌های متولی سلامت انسان و دام در سطح جهان، به‌ویژه سازمان بهداشت جهانی تبدیل شده است؛ به‌طوری‌که سازمان بهداشت جهانی در سال 2015 یک سند با عنوان «طرح اقدام جهانی برای مقاومت میکروبی» منتشرکرده است. این سند شامل پنج هدف استراتژیک به‌صورت زیر است: ترویج آگاهی و درک از مقاومت ضدمیکروبی - تقویت دانش ازطریق مراقبت و تحقیق -کاهش بروز عفونت - استفادهٔ بهینه از داروهای ضدمیکروبی - تضمین سرمایه‌گذاری پایدار در زمینه‌های مبارزه با مقاومت میکروبی شامل سرمایه‌گذاری در پژوهش، تولید دارو، واکسن و ابزارهای جدید. براساس سند یادشده، سازمان جهانی بهداشت انتظار دارد همهٔ کشورهای عضو، اقدام به تهیهٔ سند ملی مهار مقاومت میکروبی خود براساس چارچوب پیشنهادی کنند. در این راستا کشور ما نیز با همکاری و هم‌فکری سودبران و سازمان‌های مرتبط به تهیهٔ سند ملی و تدوین برنامهٔ استراتژیک مهار مقاومت میکروبی جمهوری اسلامی ایران اقدام کرده است. انجام پژوهش‌های مولکولی برروی باکتری‌های اولویت‌دار مقاوم به دارو نظیر اشریشیاکلی (۱۲).

گزارش‌های متعددی در نقاط مختلف جهان، ازجمله ایران، دررابطه‌با افزایش و میزان مقاومت سویه‌های *اشریشیا کلی* پاتوژن طیور نسبت‌به ترکیبات ضدمیکروبی مورداستفاده در صنعت طیور، به‌ویژه تتراسیکلین ارائه شده است که نشان‌دهندهٔ تنوع و بالا بودن مقاومت دارویی در مناطق مختلف است.

Ibrahim و همکاران (۲۰۱۵) در مصر بالاترین مقاومت را در ۷۹ جدایه اشریشیا کلی از موارد کلی باسیلوز طیور در برابر آمپی‌سیلین (۸۱۱درصد)، اریترومایسین (۸۱۱درصد)، سولفامتوکسازول – تریمتوپریم (۸۱۱درصد) و تتراسیکلین (۸۵/۳۹درصد) گزارش دادند(۱۳).

در تحقیقی که Halfaoui و همکاران (2017) در الجزایر برروی ۸۸۵ جدایهٔ اشریشیاکلی از ۸۱۱ نمونهٔ کلی باسیلوز جوجه‌های گوشتی انجام داده است، مقاومت مربوط به تتراسایکلین (۸۵/۳۹درصد)، (فلومکوین 38/51 درصد و سولفاماید صد) گزارش شده است (۱۴).

Benameur و همکاران (2014) در غرب الجزایر بالاترین مقاومت را در ۸۸۹ جدایهٔ اشریشیاکلی از موارد کلی باسیلوز طیور در برابر تتراسایکلین (۹۱/۳۱ درصد) و سپس آموکسی‌سیلین – کلاونیک اسید (۸۱/۳۵درصد) و سولفامتوکسازول –تریمتوپریم (31/51 درصد) گزارش دادند (۱۵).

در تحقیقی که Mooljuntee و همکاران (2010) در تایلند برروی ۷۱ جدایهٔ اشریشیاکلی از موارد کلیباسیلوز طیور صورت پذیرفته است. نام‌بردگان دریافتند که مقاومت مربوط به اریترومایسین و تتراسایکلین ۸۱۱درصد است (۱۶) .

Zhang و همکاران (2012) در چین میزان مقاومت آنتیبیوتیکی را در 859 جدایهٔ اشریشیاکلی از موارد کلیباسیلوز طیور در برابر تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و مینوسیکلین به ترتیب 31/85 ,19/35 و 9/11درصد اعلام کردند (۱۷).
Fodor و همکاران (2011) در رومانی بالاترین میزان مقاومت را در برابر داکسی‌سیکلین (۵۵/۳۳ درصد) و اریترومایسین (۵۹/۳۵ درصد)، سپس تتراسیکلین (۹۱/۳۱درصد) و نئومایسین (۹۱/۳۱،درصد (مشاهده کردند (۱۸).

یافته‌های Allan و همکاران (1993) در کانادا نشان داد که بالاترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیاکلی از کلی باسیلوز طیور به ترتیب مربوط به اریترومایسین (۳۱درصد)، استرپتومایسین (۳۵درصد) و تتراسیکلین (۱۱درصد) است (۱۹).

در ایران نیز درخصوص بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از کلی‌باسیلوز طیور، به‌ویژه تتراسیکلین مطالعات بی‌شماری صورت گرفته است که نشان‌دهندهٔ روند روبه‌افزایش این میزان در مناطق مختلف کشور است.

در پژوهشی که عزیزپور و همکاران (۲۰۰۸) در منطقهٔ نمین اردبیل انجام دادند، این میزان ۹۲/۲ درصد اعلام شده است (۲۰). در مطالعهٔ سیفی و خوشبخت (۲۰۱۶) در مازاندران این میزان ۷۱/۲۵ درصد (۲۱)، محمدی و همکاران (۲۰۱۸) در آذربایجان ۷۹/۵ درصد (22)، زیبنده و همکاران (۲۰۱۶) در استان فارس ۸۳/۶ درصد (۲۳) گزارش شده است.

نتایج بررسی میزان مقاومت فنوتیپی آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد کلی‌باسیلوز جوجه‌های گوشتی شهرستان ایلام نیز نشان داد که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به میزان زیادی در بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از جوجه‌های گوشتی منطقهٔ مورد مطالعه وجود دارد؛ به‌نحوی که از میان ۱۵۰ جدایه بیشترین میزان مقاومت را به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین (۱۰۰ درصد)، سولفومتاکسازول – تریمتوپریم (۱۰۰ درصد)، کلرامفنیکل (۱۰۰ درصد)، اریترومایسین (۹۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۶۵

درصد)، انروفلوکساسین (۵۲ درصد) و استرپتومایسین (۵۲ درصد) نشان دادند.

در مطالعهٔ حاضر میزان مقاومت فنوتیپی تتراسیکلین در جدایه‌های *اشریشیا کلی* از کلی‌باسیلوز طیور شهرستان ایلام ۱۰۰درصد گزارش شد که با نتایج اعلام‌شده در برخی مناطق داخل و خارج از کشور همخوانی دارد و با بعضی از یافته‌های سایر محققان متفاوت به نظر می‌رسد. علت تفاوت را بایستی مرتبط با میزان و تداوم مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه تتراسیکلین در مناطق جغرافیایی مختلف دانست (۵و۴). نتایج حاضر به‌همراه سایر یافته‌های انجام‌گرفته نشان‌دهندهٔ افزایش میزان مقاومت *اشریشیا کلی* عامل کلی‌باسیلوز طیور در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه تتراسیکلین در ایران و دنیا به‌دلیل استفادهٔ نادرست، فراوان و بی‌رویه از این ترکیبات در قالب برنامه‌های درمانی و پروفیلاکسی سالن‌های پرورش طیور گوشتی است.

تتراسیکلین ازجمله آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک است که ازطریق اتصال به ریبوزوم باکتری و ممانعت از مرحلهٔ طویل شدن سنتز پروتئین میکروبی عمل می‌کند. مقاومت میکروبی در برابر تتراسیکلین به‌وسیلهٔ سه مکانیسم فعال کردن پمپ‌های آفلاکسی، محافظت ریبوزومی و آنزیم‌های غیرفعال‌کنندهٔ دارو با بیان‌ژن‌های مربوطه (*tet*) به‌وقوع می‌پیوندد. مهم‌ترین ژن‌های مؤثر در بروز مقاومت باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های گرم‌منفی نظیر *اشریشیاکلی* در برابر تتراسیکلین ژن‌های سنتزکنندهٔ پروتئین‌های پمپ آفلاکس (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* و *tetG*) و ژن‌های محافظت‌کنندهٔ ریبوزومی (*tetM*, *tetW* , *tetO*, *tetK* و *tetH*) هستند (۵و۱).

بررسی‌های گسترده‌ای در بیشتر نقاط جهان درخصوص توزیع ژن‌های تأثیرگذار در بروز مقاومت میکروبی جدایه‌های پاتوژن *اشریشیاکلی* در برابر تتراسیکلین انجام شده است. بررسی این مطالعات نشان داده است که فراوانی و شیوع ژن‌های بیان‌کنندهٔ پمپ‌های آفلاکسی *tetA* و *tetB* در مقایسه با دیگر ژن‌های دخیل در بروز مقاومت (نظیر ژن *tetC*) در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* بسیار بالا بوده و اهمیت زیادی دارد(۵).

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی حاضر حاکی از آن است که از میان ۱۵۰ جدایهٔ *اشریشیاکلی مقاوم به تتراسیکلین* شهرستان ایلام ۱۳۰ جدایه (۸۶/۶۶ درصد) دارای ژن *tetA*، ۴۷ جدایه (۳۲ درصد) دارای ژن *tetB* و ۳ جدایه (۵درصد) ژن *tetC* دارند. بالا بودن میزان مثبت ژن‌های مقاومت *tetA* و *tetB* در مقایسه با ژن *tetC* در این بررسی نشان داد که یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین ژن‌های مقاومت *اشریشیاکلی*‌های عامل بیماری کلی‌باسیلوز طیور در شهرستان ایلام (غرب ایران) هستند که از این حیث با سایر مطالعات همسویی دارد.

نتایج بررسی حاضر با نتایج Mohammadi و همکاران (۲۰۱۸) که فراوانی ژن‌های *tetA* و *tetB* را در ۴۴ جدایهٔ *اشریشیاکلی* از موارد کلی‌باسیلوز استان آذربایجان غربی به ترتیب ۴۷/۷ و ۹ درصد گزارش دادند (۲۲) و Kurnia و همکاران (۲۰۱۸) که دریافتند فراوانی ژن‌های *tetA* و *tetB* در ۱۹ جدایهٔ APEC مقاوم به تتراسیکلین شهر سوکابامی اندونزی به ترتیب ۶۳/۲ و ۳۱/۶ درصد بود، همخوانی دارد(۲۴).

Seifi و Khoshbakhat (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که برروی ۱۰۰ جدایهٔ *اشریشیاکلی* عامل کلی‌باسیلوز طیور شمال ایران انجام دادند، نیز به این نتیجه رسیدند که در تمامی سویه‌های *اشریشیاکلی* که به‌صورت فنوتیپی به تتراسیکلین مقاومت دارند، به ترتیب ژن‌های مقاومت *tetA* , *tetB* و *tetC* به ترتیب با میزان ۴۶ , ۴۱ و ۳۳ درصد شیوع بیشتری دارند (۲۱).

Zhang و همکاران نیز در بررسی ژنوتیپی مقاومت میکروبی ۱۶۴ جدایهٔ *اشریشیاکلی* عامل کلی‌باسیلوز طیور در شمال چین میزان فراوانی ژن‌های مقاومت *tetA*, *tetB* و *tetC* را به ترتیب ۵۷/۹۳ , ۳۸/۴۱ و صفر درصد را گزارش کردند که با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۱۷).

Tuckman و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی ژنوتیپی مقاومت میکروبی ۳۰۲ جدایهٔ *اشریشیاکلی* میزان فراوانی ژن‌های مقاومت *tetA*, *tetB* و *tetC* را به ترتیب ۲۶ , ۳۲ و یک‌درصد را گزارش کردند که با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۲۵).

در مطالعه‌ای که Gharajalar & Zare (۲۰۱۷) پایش میزان شیوع ژن‌های بیان‌کنندهٔ پمپ‌های آفلاکسی تتراسیکلین در ۵۱ جدایهٔ APEC از موارد کلی‌باسیلوز طیور در ایران، میزان فراوانی ژن‌های *tetA*, *tetB* و *tetC* را به ترتیب ۲۶, ۳۴ و ۱۵درصد گزارش داده‌اند که با مطالعهٔ حاضرهمخوانی دارد (۲۶).

یافته‌های انجام‌شده به‌دست Momtaz و همکاران (۲۰۱۲) (۲۷), Mohammadi و همکاران (۲۰۱۸) (۲۲), Kurnia و همکاران (۲۰۱۸) (۲۴) و Zibandeh و همکاران (۲۰۱۶) (۲۳) همگی نشان‌دهندهٔ میزان فراوانی و شیوع بالای ژن‌های پمپ آفلاکسی *tetA*

و *tet*B البته با میزان درصدهای متفاوت در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* فارمهای پرورش مرغان گوشتی است. علت این اختلاف را می‌توان به تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌های مقاوم مورد مطالعه و منطقهٔ جغرافیایی مرتبط دانست.

در بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۸ Asadi و همکاران برروی ۱۱۷ جدایهٔ APEC در شهر بابک، استان کرمان تنجام دادند، نام‌بردگان دریافتند که میزان شیوع ژن‌های *tet*A و *tet*B در جدایه‌های مورد مطالعه تقریباً با نسبت مساوی و برابر به ترتیب ۶۳/۸۵ و ۶۲/۶۵ درصد است(۲۸).

نکتهٔ قابل‌توجه در مطالعه و بررسی حاضر این است که در بعضی از جدایه‌ها از بین ۱۵۰ جدایهٔ مقاوم به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلن در تست فنوتیپی در آزمون PCR، فاقد ژن‌های *tet*A، *tet*B و *tet*C بودند و این خود بیانگر وجود سایر ژن‌های مؤثر در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر تتراسیکلین بوده که در این تحقیق بررسی نشدند.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که میزان بالایی از مقاومت میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* عامل بیماری کلی‌باسیلوز در منطقهٔ مطالعه‌شده وجود دارد، بنابراین لزوم اجرای طرح پایش دائمی و ملی برای بررسی مقاومت میکروبی به‌همراه نظارت بر تجویز صحیح و درست آنتی‌بیوتیک‌ها در فارم‌های پرورش طیور گوشتی و تخم‌گذار منطقه و ایران ضروری به نظر می‌رسد. همچنین تعیین الگوی ژنی سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند راهکارهای لازم برای برون‌رفت از چالش مقاومت میکروبی در این‌گونه سویه‌ها ارائه دهد.

منابع

1. Dho-Mulin, M. and Fairbrother, J.M. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). *Vet. Res.* 1999. 30:299-316.
2. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Smith, k., O-Bryan, T.T., Tatini, S.: Antimicrobial-resistant and extra intestinal pathogenic Escherichia coli in retail foods.J.*infect.Dis*.2005.191:1040-90.
3. Nolan, L. K., Barnes, H. J., Vaillancourt, J.-P., Abdul-Aziz, T., and Logue, C. M. "Colibacillosis," in Diseases of Poultry, 13th Edn, eds D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarezand, and V. Naireds (Ames, IA: John Wiley & Sons, Ltd.),2013. 751–805.
4. Singer,R.s.and Hopacre,C.L. : Potential impact of antibiotic use in poultry production. Avian Diseases,2006. (50): 161-172.
5. Michalova E, Pnovotna, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. Vet Med-Czech. 2004;49(3):79-100. doi: 10.17221/5681-VETMED.
6. Al-Bahry SN, Al-Mashani BM, Al-Ansari AS, Elshafie AE, Mahmoud IY. *Escherichia coli tetracycline efflux determinants in relation to tetracycline residues in chicken*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2013.6(9): 718-722.
7. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., & Hartigan, P. (2011).Veterinary microbiology and microbial disease (2nd ed.). John Wiley & Sons.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;twenty-four informational supplement. M100-S21. Wayne Pa: CLSI;2014.
9. Goudarztalejerdi. A, Abdolmajid Mohammadzadeh, Sajad Varmaziar Najafi, Farangis Nargesi Sara Joudari. Serogrouping, phylotyping, and virulence genotyping of commensal and avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers in Hamedan, Iran.Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2020;73 doi: 10.1016/j.cimid.2020.101558.
10. Adesoji AT, Ogunjobi AA, Olatoye IO, Call DR. Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.2015. **14**, 35. https://doi.org/10.1186/s12941-015-0093-1.
11. Aminove.R.I,CheeSanford,j.C,Garrigues., N.,Teferedegne,B.,Kerapac,I.j.,White,B.A. ,Mackie, ,R.i. Development,validation and application of PCR primers for detection(3013) Characterization of antimicrobial resistance and related resistant genes in Escherichia Coli strains isolated form chickens in china during 2007- 2012. Afr j microbial Res .2002.7; 5238-5247.Dol; 10.5897/ AjMR2013.5860.
12. *National Action Plan of Islamic Republic of Iran to Combating Antimicrobial Resistance* (IRIAMR).

Bacillosis than Ten Common Antibiotics In the
poultry industry of Iran. Comparative Pathobiology, *Scientific Research*.2017. 14(4): 2345- 2352.

21. Seifi, S. Khoshbakht, R. Atabak, A.R. Antibiotic susceptibility, serotyping and pathogenicity evaluation of avian Esherichia coli isolated from broilers in northern iran. Bulgarian. *J. Vet. Med*. 2015.18(2): 173-179.

22. Mohammadi, V. Ghaniei, A, and Sepehrnia, P: Antimicrobial resistance profile and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolates from broiler chickens. *North western Iran*,2018. 21, No 2, 169-175.

23. Zibandeh, S. Sharifiyazdi, H. Asasi, K, and Abdi-Hachesoo, B: Investigation of tetracycline resistance genes from broiler chicken during a rearing period in Iran.2016.86(4),565-572.

24. Kurnia RS. Indrawati A, Mayasari NLPI, Priadi . Molecular detection of genes encoding resistance to tetracycline and determination of plasmid-mediated resistance to quinolones in avian pathogenic Escherichia coli in Sukabumi, Indonesia, *veterinary world*, 2018.11(11): 1581- 1586.

25. Tuckman, Margaret. J. Petersen, Peter. Y.M. Howe, Anita. Orlowski, Mark. Mullen, Stanley.Chan, Karen. A. Bradford, Patricia and C. Hal Jones: *Occurrence of tetracycline resistance genes amongEscherichia coli isolates from the Phase 3 clinical trials for tigecycline*. Sept 2007, p.3205-3211.

26. Nouri Gharajelar, S., Zare, P. Monitoring the prevalence of the tetracycline efflux genes among E. coli isolated from chicken colibacillosis. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 2017; 11(3): 235-241. doi: 10.22059/ijvm.2017.215954.1004767

27. Momtaz H., Rahimi, E., Moshkelani, S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in E.coli isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. *Vet Med*.2012. 57,2 (4): 193-197.

28. Asadi A, Zahraei Salehi T, Jamshidiyan M . Molecular analysis of antibiotic resistance genes in Escherichia coli from broiler chickens in shahrebabak by Multiplex PCR Technique. Iranian Journal of Animal Science,2018. 49 (2):203-211.

13. Ibrahim Waleed A, sheriff A, Ahmad. Erfan, soacl A. *The occurrence of disinfectant and. antibiotic - resistant. Genes in Escherichia.coil isolated from chickens in Egypt*, veterinary world Eissn.2015. 2231-0916.

14. Halfaoui Z, Menoueri NM, Bendali LM. Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. Vet World. 2017 Jul;10(7):830-835.

15. Benameur, Q.D., Guemour, A., Hammoudi, H., Aoudia, H., Aggad, M-F., Humblet, C. Saegerman. *Antimicrobial Resistance of Escherichia* coli isolated from chickens in west of Algeria. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)* (2014).13(1):366-370.

16. Mooljuntee. Sarawoot Piyarat chansiripornchai Niwat chansiripornchail. *Prevalence of the Cellular and Molecular Antimicrobial Resistance against E. coli isolated from Thai Broilers*. (2010). *Thai J. Vet. Med.* 2010. 40(3): 311-315.

17. Zhang, T. Lv, C.G. Wang, R. S. and Zhong X. H.: Survery on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian Escherichia coli in north china. *Poultry Science*. 2012.(91):2774-2777.

18. FODOR, Ionica. Antimicrobial Susceptibility of E. coli Strains Isolated from a Colisepticemia Outbreak in Broilers. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Veterinary Medicine*.2011.2 (68): https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2:68:6890

19. Allan B.J., Jvan den Hurk J.V., Potter A.A. Characterization of Escherichia coli isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. Vet. Res.*1993. 57: 146–151.

20. Azizpour A, Saeedi Namin V, Antibiotic Resistance Patterns in Escherichia coli isolated from Broiler Chickens with General