مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۳۷۰-۳۶۳
Journal of Veterinary Research. 70,4: 363-370, 2015
Original Article

مطالعه جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی تولید کننده بتالاکتامازهای ESBLs و AmpC در طیور و کارگران مرغداری‌های اطراف تهران

فاطمه دره گیرایی[۱] بهار نیری فسایی[۱*] مسعود آل بویه[۲]
۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۲) گروه بیماریهای گوارش و کبد بیمارستان شهید طالقانی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ مرداد ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۹ مهر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: AmpC و ESBL به عنوان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف وابسته به پلاسمید عامل اصلی مقاومت برخی باکتری‌ها مخصوصاً انتروباکتریاسه‌ها به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بوده و نهایتاً شکست درمانی، افزایش هزینه‌های درمان در انسان و ضررهای اقتصادی در صنعت طیور را در پی خواهد داشت. **هدف:** هدف این مطالعه بررسی و غربالگری جدایه‌های اشریشیا کلی تولیدکننده آنزیم‌های ESBL و AmpC در مدفوع طیور و کارگران طیور مربوطه می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه ۵۰۰ نمونه سواپ کلوآک از جوجه‌های گوشتی مربوط به پنج مرغداری اطراف تهران و ۲۵ نمونه سواپ رکتال از کارگران همان مرغداری‌ها جمع‌آوری و با کشت در محیط مک کانکی و تست‌های بیوشیمیایی مربوطه، تایید جدایه‌های اشریشیا کلی انجام گردید. حساسیت جدایه‌ها توسط روش انتشار دیسک به ۱۲ آنتی بیوتیک (طبق پیشنهادهای CLSI) تعیین گردید و برای تأیید جدایه‌های ESBL از دو دیسک سفتازیدیم و سفتازیدیم- کلاولانیک اسید و از دیسک‌های سفوکسیتین و سفوکسیتین- EDTA نیز جهت تعیین جدایه‌های AmpC استفاده گردید. داده‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شدند. جدایه‌های تولیدکننده ESBL توسط PCR جهت حضور ژن‌های کد کننده بتالاکتامازهای TEM، CTX-M و SHV مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** در مجموع ۴۶۷ جدایه اشریشیا کلی از ۸۸/۹٪ نمونه‌ها جدا گردید به طوریکه ۹۲٪ جدایه‌های طیور و ۷۲/۷٪ جدایه‌های کارگران الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) نشان دادند. فنوتیپ مقاومت ESBL در ۵/۵٪ (۲۶) جدایه‌های طیور تعیین گردید در حالیکه در بین هیچکدام از جدایه‌های کارگران مشاهده نگردید. شش جدایه حامل هر دو ژن TEM و CTX-M بودند در حالیکه ۵ جدایه فقط برای ژن TEM و یک جدایه برای CTX-M تایید شدند. ۸۸/۶٪ از جدایه‌های ESBL مثبت برای تولید AmpC تایید فنوتیپی شدند. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به اینکه سفالوسپورین‌ها در جوجه‌های گوشتی در ایران استفاده نمی‌گردند بنابراین جداسازی جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌تواند نشان دهنده انتقال ژن‌های مقاومت مربوطه از طریق پلاسمیدهای حامل و یا دیگر عوامل متحرک ژنتیکی در بین انتروباکتریاسه‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: AmpC، جوجه‌های گوشتی، EDTA، اشریشیا کلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، کارگران مرغداری

مقدمه

با توجه به این که سفالوسپورین‌ها نقش بسیار مهمی را در سلامت انسان به عهده دارند روند افزایشی مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در انتروباکتریاسه‌ها باعث نگرانی‌های بسیاری در جوامع انسانی و دامی شده است. وقوع این نوع مقاومت‌ها عمدتا با گسترش ژن‌های کد کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) و یا بتالاکتامازهای قابل انتقال AmpC مرتبط است. این بتالاکتامازها باعث مقاومت به اکسی ایمینوسفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها، آمینو پنی‌سیلین‌ها می‌شوند با این تفاوت که ESBLs توسط اسید کلاولانیک، تازوباکتام و یا سالباکتام مهار می‌شوند و بر سفامایسین‌ها (سفوکسیتین) و کارباپنم‌ها بی‌تأثیراند در حالیکه AmpC، توسط سفوکسیتین مهار می‌گردد (۱۹). طیور مخصوصاً جوجه‌های گوشتی به عنوان یک منبع برای این نوع ژن‌ها و یا باکتری‌های مقاوم پیشنهاد شده‌اند که یکی از مهمترین این باکتری‌ها جنس اشریشیا کلی است (۵). اشریشیا کلی بخشی از میکروبیوتای روده انسان و حیوانات است و می‌تواند عامل اصلی عفونت‌های مهمی چون عفونت‌های گوارشی، خونی و دستگاه ادراری در انسان و همین طور عامل کلی باسیلوز در طیور باشد که باعث کاهش بازده گله‌ها و یا حتی تلفات سنگین در آنها می‌شود (۱۳،۱۶،۲۷). به علاوه این باکتری یکی از پاتوژن‌های مهم عامل بیماریهای ناشی از غذا (foodborne disease) محسوب میگردد. زنجیره غذایی از طریق محصولات گوشتی طیور و همین‌طور تماس مستقیم با حیوان و کود آنها از مهمترین راه‌های انتقال سویه‌های اشریشیا کلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL و AmpC از طیور به انسان در نظر گرفته می‌شوند. تماس مستقیم با طیور بیشتر در ارتباط با کارگران مرغداری‌ها مطرح است و به دنبال آن می‌تواند خطر انتقال به جامعه را نیز در بر داشته باشد (۷). براساس مطالعاتی که در ایران در ارتباط با حضور و فراوانی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از طیور گوشتی انجام شده است، اثبات حضور و فراوانی تقریباً بالایی در جوجه‌های گوشتی مخصوصاً طیور بیمار نشان داده شده، در حالی‌که

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: nayerib@ut.ac.ir

این مطالعات در ارتباط با طیور سالم در سطح محدودی انجام شده است. بنابراین مرغداری‌ها می‌توانند از نظر انتقال مقاومت‌های دارویی به کارگران و از آنها به جوامع انسانی حائز اهمیت باشند. از این رو در این تحقیق چندین مرغداری پرورش مرغ گوشتی به همراه کارگران مربوطه از نظر وضعیت مقاومت دارویی مخصوصاً بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL و AmpC هدف مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه، کشت و جداسازی باکتری: تعداد ۵۰۰ نمونه سواپ کلوآک از جوجه‌های گوشتی و ۲۵ نمونه سواپ رکتال از کارگران مربوط به پنج مرغداری اطراف تهران طی یک دوره شش ماهه در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در اسرع وقت و در محیط انتقالی کری- بلر (cary-blair) به آزمایشگاه منتقل و بر روی محیط مک کانکی کشت داده شدند. جداسازی و شناسایی جدایه‌های اشریشیا کلی براساس مرفولوژی کلنی و تست‌های بیوشیمیایی تخمیر گلوکز، لاکتوز، تولید گاز، تولید اندول از تریپتوفان، واکنش ووگس- پروسکوئر (تولید استیل متیل کاربینول از دکستروز) بر روی محیط‌های SIM ، TSI و MR-VP انجام گردید (۱۷).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی: بررسی الگوی مقاومت دارویی باکتری‌های جدا شده به روش انتشار دیسک (روش کیربی – بوئر) توسط دیسک‌های آنتی بیوتیکی تتراسیکلین (۳۰µg)، آمپی سیلین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، سفالوتین (۳۰ µg)، سفالکسین (۳۰ µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتری آکسون (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰µg) و مروپنم (۱۰µg) (شرکت پادتن طب، ایران) در محیط مولر هینتون آگار با استفاده از راهنمای استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI) انجام شد (۱۰). دراین مطالعه از سویه اشریشیا کلی ATCC ۱۰۵۵۹ به عنوان کنترل آزمون‌های تشخیصی استفاده گردید. جدایه‌های دارای الگوی مقاومتی سه و بیش از سه خانواده دارویی مختلف به عنوان جدایه‌های دارای مقاومت چندداروییMDR) درنظر گرفته شدند.

تشخیص جدایه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL بصورت فنوتیپی: جدایه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل ۳ مانند سفتازیدیم و یا سفتری آکسون جهت غربالگری سویه‌های تولیدکننده ESBL انتخاب و توسط combined Disk Test به صورت فنوتیپی تایید شدند. برای این منظور از دو دیسک سفتازیدیم (۳۰ µg) و سفتازیدیم- کلاولانیک اسید (۳۰ µg – ۱۰) (شرکت روسکو، دانمارک) استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها در صورتیکه تفاوت قطرهاله‌ی عدم رشد در دو دیسک، معادل یا بزرگتر از ۵mm باشد به عنوان نتیجه‌ی تاییدی فنوتیپ ESBL در نظر گرفته می‌شود (تصویر ۱) (۲۳).

بررسی ژن‌های کد کننده ESBL با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) : جدایه‌های تأیید شده فنوتیپی ESBL از لحاظ حضور ژن‌هایblaCTX-M ، blaTEM و blaSHV بررسی شدند. برای انجام واکنش PCR از ۳ جفت پرایمر اختصاصی برای ژن‌های مذکور استفاده گردید که به همراه شرایط PCR در جدول ۱ ملاحظه می‌گردند. با استفاده از روش استخراج جوشاندن DNA (boiling extraction) مورد نیاز جهت انجام واکنش تهیه و تمامی محصولات PCR بر روی ژل ۱/۲٪ رنگ‌آمیزی شده توسط اتیدیم برماید (۰/۵ µg/mL) مورد بررسی قرار گرفتند.

تشخیص جدایه‌های تولید کننده AmpC: سویه‌های دارای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل ۳ و سایر بتالاکتام‌های عمومی که توسط کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند و مقاوم به سفوکسیتین بودند جهت غربالگری سویه‌های فنوتیپیک AmpC در نظر گرفته شدند. برای این منظور از دیسک‌های سفوکسیتین آغشته شده به EDTA استفاده شد. برای تهیه این دیسک‌ها ۲۰µL از مخلوط ۱:۱ سالین و ۱۰۰X Tric-EDTA به هر دیسک سفوکسیتین اضافه شد. در ادامه سوپانسیون باکتری با رقت نیم مک فارلند بر روی محیط مولر-هینتون آگار کشت و بر روی هر محیط دو دیسک، یک سفوکسیتین و یک سفوکسیتین EDTA قرار داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شدند. سفوکسیتین یک سفامایسین است که همانطور که در مقدمه بیان گردید جدایه‌های ESBL مثبت بر این آنتی‌بیوتیک بی‌تأثیراند و در صورتیکه جدایه تنها تولیدکننده ESBL باشد قادر به رشد در حضور این آنتی بیوتیک نمی‌باشد اما جدایه‌های AmpC مثبت باعث مهار این آنتی‌بیوتیک شده و رشد می‌کنند. از آنجاییکه EDTA مهار کننده سفالوسپورینازهای AmpC بوده بنابراین استفاده از دیسک‌های سفوکسیتین + EDTAبه ترتیب با مهار ESBL و AmpC مانع از رشد جدایه‌های تولیدکننده ESBL و همچنین AmpCمی‌گردد. به عبارت دیگر تشکیل‌هاله عدم رشد باکتری‌های ESBL در اطراف دیسک‌های سفوکسیتین حاوی EDTA، به عنوان معیار ترشح AmpC در نظر گرفته می‌شود (تصویر ۲) (۲۰).

نتایج

از مجموع ۵۲۵ نمونه طیور و کارگر، ۸۸/۹٪ (۴۶۷جدایه) اشریشیا کلی جدا گردید که ۴۴۵ جدایه مربوط به طیور و ۲۲ جدایه مربوط به کارگران و ۹۸/۷٪ آنها لاکتوز مثبت بودند. نتایج آنتی بیوگرام جدایه‌های طیور و کارگران توسط نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای آنالیز گردیدند (نمودار ۱). بر اساس آنالیز نتایج، ۹۲٪ جدایه‌های طیور و ۷۲/۷٪ جدایه‌های کارگران الگوی مقاومت دارویی چندگانه(MDR) داشتند. در جدایه‌های اشریشیا کلی مقاومت آمینوگلیکوزیدی و کینولونی به ترتیب در نمونه‌های طیور (۸۲/۶٪، ۳۰/۴٪) و کارگران (۲۲/۷٪، ۱۳/۶٪) بود و در هر دو گروه مقاومت بالایی به سفالوسپورین‌های نسل۱, ۲, ۳و۴ مشاهده نگردید. فنوتیپ مقاومت ESBL در ۵/۵٪ (۲۶) جدایه‌های طیور تعیین گردید در حالیکه در بین هیچکدام

جدول ۱. پرایمرها و شرایط PCRجهت غربالگری ژن‌های ESBL.

پرایمر	سکانس	اندازه آمپلیکون (bp)	منبع	شرایط PCR
TEM	F: ۵' –TCAACATTTCCGTGTCG۳-' R: ۵'- CTG ACAGTTACCAATGCTTA۳-'	۸۶۰	Iroha et al. (۱۱)	یک سیکل ۵ دقیقه در۹۴°c– ۳۰سیکل ۱ دقیقه در ۹۴°c، ۳۰ثانیه در ۵۷،۳۰°cثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۵دقیقه در ۷۲ °c
CTX-M	F: ۵' –GAGTTTCCCCATTCCGTTTC۳-' R: ۵'-CAGAATAAGGAATCCCATGGTT۳-'	۸۸۰	Hamidian et al. (۸)	یک سیکل ۴ دقیقه در۹۴°c– ۴۰ سیکل ۱ دقیقه در ۹۴°c، ۳۰ثانیه در ۶۱°c، ۴۰ثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۱۰دقیقه در ۷۲ °c
SHV	F: ۵'-GAGTTTCCCCATTCCGTTTC۳-' R: ۵'-CAGAATAAGGAATCCCATGGTT۳-'	۸۵۴	Kiiru et al. (۱۴)	یک سیکل ۵ دقیقه در۹۴°c– ۳۵ سیکل ۱ دقیقه در ۹۴°c، ۳۰ثانیه در ۵۷،۵۰°cثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۷دقیقه در ۷۲ °c

از جدایه‌های مربوط به کارگران مشـاهده نشد. در بین جدایه‌های فنوتیپ مثبت طیور در مجموع ۱۲ جدایه از ۲۶ جدایه برای ژن‌های مورد آزمایش تایید ژنتیکی شدند به طوریکه ۶ جدایه حامل هر دو ژن بودند، ۵ جدایه تنها برای ژن blaTEM تأیید شدند و یک جدایه تنها واجد blaCTX-M بود. در بیـن جدایه‌های ESBL مثبـت ۸۸/۶٪ آنها برای تولید AmpC تأیید فنوتیپی شدند.

بحث

در این مطالعه فراوانی مقاومت نسـبتاً بالایی علیه آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین، تتراسیکلین، آمپی‌سـیلین و کلرامفنیکل برای جدایه‌های طیور تعیین شـد که براساس بسیاری از مطالعات می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در طیور باشد (۱۵).

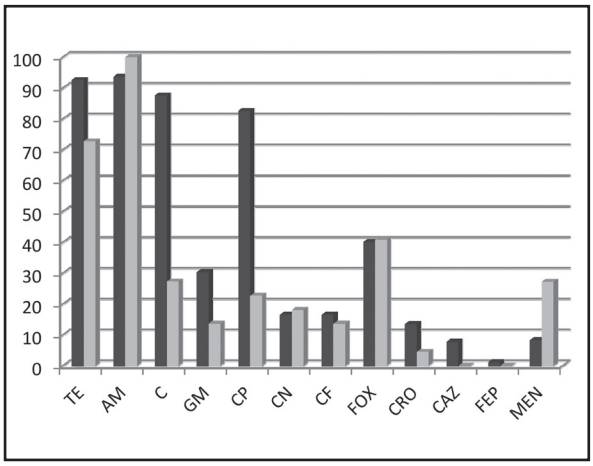
مطالعات در زمینه بررسـی مقاومت آنتی بیوتیکی در گله‌های سـالم طیور در ایران بسیار محدود است اما در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Tabatabaei و همـکاران در آذربایجان غربی انجام گردید (۲۶) مقاومت به آمپی سیلین در جدایه‌های \شریشیا کلی مدفوعی طیور بیش از مطالعه حاضر گزارش گردید. Zahraei Salehi در سـال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای بر روی طیور مبتلا به کلی‌سپتی‌سـمی مقاومت بالایی را علیه تتراسـیکلین (۹۴٪)، سیپروفلوکساسـین (۶۷٪) کلرامفنیکل (۶۷٪) آمپی‌سیلین (۴۷٪) نشان داد در حالیکه هیچ مقاومتی نسبت به جنتامایسین دیده نشد و مقاومت به سفالوسـپورین‌ها بسیار نادر بود (۳۰). نگاهی بر مطالعه زهرایی صالحی که بر روی طیور بیمار انجام گردیده بود و مقایسه نتایج آن با نتایج گزارش شده توسط مطالعه حاضر (نمودار ۱) حاکی از افزایش معنی‌دار مقاومت در طول زمان علیه آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها، پنی‌سیلین‌ها، فنیکل‌ها وکوئینولون‌ها است.

در مطالعـه‌ای کـه Rahimi در سـال ۲۰۱۳ در گله‌هـای درگیـر با کلی‌باسیلوز کرمانشـاه انجام داد جدایه‌های MDR، ۶۳/۳٪ و مقاومت به کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین بالا و تقریباً مشابه مطالعه حاضر گزارش گردید (۲۱). در مقایسه مطالعه Rahimi و مطالعه حاضر می‌توان به افزایش معنی‌دار جدایه‌های با مقاومت چندگانه اشـاره نمود. در واقع مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های \شریشیا کلی روده‌ای در گله‌های طیور گوشتی ایران با یک روند صعودی در حال افزایش اسـت که حاکی از مصرف بی رویه و خارج از کنترل آنتی بیوتیک در خوراک و آب طیور می‌باشد.

در ارتباط با کارگران مرغداری این اولین مطالعه در ایران است که بر روی جدایه‌های \شریشـیا کلی فلور روده آنها انجام می‌گیرد. در مطالعه‌ای که توسـط Cho و همکاران در سـال ۲۰۱۲ در کـره انجام گردید میزان مقاومـت آنتی بیوتیکـی در جدایه‌های \شریشـیا کلی مدفوعی مربوط به کارگران گله‌های طیور بیش از کارگران رسـتوران‌ها گزارش گردید علاوه بـر آن فراوانی جدایه‌های MDR نیز در کارگران طیور بیشـتر بود. غالب ترین الگوی مقاومت تعیین شده در جدایه‌های \شریشیا کلی روده‌ای مربوط به کارگران مطالعه مذکور تتراسـیکلین/ آمپی‌سیلین بود (۶) در حالیکه در مطالعه حاضر تتراسیکلین/ آمپی‌سیلین/ سفوکسیتین/ مروپنم گزارش گر دید.

ایجاد و حضور این مقاومت‌ها در کارگران گله‌های حیوانات تولید کننده غذا مخصوصاً طیور می‌تواند به چندین دلیل رخ دهد: ۱) استفاده پیشگیرانه و زیـر دوز درمانی آنتی‌بیوتیک در آب و خـوراک طیور باعث از بین رفتن باکتری‌های حساس و تسلط باکتری‌های مقاوم در فلور میکروبی روده طیور می‌شود به طوریکه این باکتری‌های مقاوم از طریق مدفوع طیور در سطح بسـتر پراکنده شده و به صورت آئرسـول‌های تنفسی وارد دستگاه تنفس فوقانی کارگران شده و به همراه خلط تنفسی بلعیده و وارد دستگاه گوارش می‌گردند. باکتری مقاوم می‌تواند با انتقال افقی عوامل ژنتیکی مقاومت به همان گونه باکتریایی و یا حتی گونه‌های دیگر نقش مهم خود را در انتقال و انتشار مقاومت به کارگران ایفا کند. ۲) تراکم زیاد در سالن‌های پروش طیور با تأثیر منفی بر روی تهویه امکان نگهداری جدایه‌های مقاوم در مرغداری را بـه صورت فزاینده‌ای افزایش می‌دهد که این مسـئله می‌تواند انتقال و انتشار آنها را در بین گله و به کارگران تسهیل کند (۶).

در ایـن مطالعه جدایه‌های \شریشـیا کلی نمونه‌هـای طیور مقاومت آمینوگلیکوزیدی و کینولونی بیشـتری نسـبت به کارگران نشان دادند در حالیکه در هر دو گروه مقاومت بسیار بالا به سفالوسپورین‌های نسل۱، ۲، ۳و۴ مشـاهده نگردید. مقاومت دارویی مشـکل عظیمی در سراسر جهان



نمودار ۱. درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی روده‌ای مربوط به جوجه‌های گوشتی و کارگران مرغداری‌های اطراف تهران. TE: تتراسیکلین، AM: آمپی‌سیلین، C: کلرامفنیکل، GM: جنتامایسین، CP: سیپروفلوکساسین، CN: سفالکسین، CF: سفالوتین، FOX: سفوکسیتین، CRO: سفتری‌آکسون، CAZ: سفتازیدیم، FEP: سفپیم، MEN: مروپنم.
طیور ■ کارگر ■

تصویر ۱. تست تایید فنوتیپی ESBL جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی طیور با استفاده از دیسک‌های سفتازیدیم (CAZ۳۰) و سفتازیدیم- کلاولانیک (CAZ+C).

تصویر ۲. تست تشخیص فنوتیپی جدایه‌های تولید کننده بتالاکتاماز AmpC با استفاده از دیسک‌های سفوکسیتین (دیسک بالا) و سفوکسیتین- EDTA (دیسک پایین).

است که می‌تواند یک عامل مهم در گسترش عفونت باشد. ممکن است مصرف بی رویه آنتی بیوتیک بروز سویه‌های MDR را افزایش دهند که این می‌تواند یک تهدید جدی باشد (۱). در مطالعه حاضر فراوانی فنوتیپ MDR در جدایه‌های اشریشیا کلی طیور بالاتر از میزان گزارش شده توسط Yang و همکاران در سال ۲۰۰۴ بود (۲۸). Islam و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بنگلادش تمامی جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی طیور مورد مطالعه را واجد مقاومت چندگانه MDR گزارش کرد در حالیکه مقاومت به تتراسیکلین، آمپی سیلین، جنتامایسین و کلرامفنیکل جدایه‌ها بیش از مطالعه ما بود و مقاومت به اریترومایسین کمتر گزارش گردید (۱۲). در این تحقیق ابتدا فراوانی جدایه‌های ESBL مثبت در تمامی جدایه‌ها تعیین و سپس در بین آنها به بررسی حضور فنوتیپی بتالاکتاماز AmpC پرداخته شد. در انتروباکتریاسه‌ها از مهمترین دلایل مقاومت به بتالاکتام‌ها به ویژه بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف حضور ژن‌های کد کننده آنزیم‌های ESBL و AmpCاست. در سال ۲۰۰۸ Smet و همکاران حضور جدایه‌های اشریشیا کلی ESBL و AmpC مثبت را در ۵ گله گوشتی بلژیک گزارش کردند که فراوانی بیشتری نسبت به مطالعه ما داشت، در این مطالعه فراوانی جدایه‌های تولید کننده AmpC، ESBL و ESBL+ AmpC به ترتیب ۴۵٪، ۴۳٪ و ۱۲٪ و فراوانی ژن‌های TEM و CTX-M به ترتیب ۱۵٪ و ۳۰٪ گزارش گردید (۲۵). در مطالعه دیگری توسط Blance در سال۲۰۰۶ حضور جدایه‌های مثبت برای ESBL و AmpC در طیور نشان داده شد که البته فراوانی جدایه‌های تولید کننده ESBL تقریباً چهار برابر بیشتر ازجدایه‌های AmpC مثبت بود (۴). Randall در سال ۲۰۱۰ در بریتانیا CTX-M را از ۵۴/۵٪ سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از کشتارگاه‌های طیور گوشتی و ۳/۶٪ نمونه‌های سکوم جوجه‌های گوشتی گزارش کرد (۲۲). Yuan در مطالعه‌ای در چین در سال ۲۰۰۹ فراوانی ESBL را در اشریشیا کلی طیور ۶۱٪ نشان داد به‌طوریکه ۴۳٪ واجد ژن TEM و ۲۹/۴٪ واجد ژن CTX-M بودند (۲۹). در سال ۲۰۱۱ فراوانی مقاومت مذکور در طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز توسط Asai و همکارانش در ژاپن ۱۰/۱٪ گزارش گردید به‌طوریکه ۶/۷٪ واجد ژن CTX-M بودند و هیچ ژن TEM تعیین نگردید (۲).

در سال ۲۰۱۴ Saeed در مطالعه‌ای در گله‌های گوشتی عراق حضور جدایه‌های ESBL را در هر دو گروه طیور سالم و کارگران به ترتیب ۴۳/۷٪ و ۱۵/۳٪ گزارش کرد به طوریکه اکثریت ژن‌های ESBL را در طیور به ترتیب ژن‌های TEM (۶۹/۷٪) و CTX-M (۱۰/۹٪) شناسایی کرد و در مورد کارگران نیز ژن‌های TEMو CTX-M به ترتیب با فراوانی ۶۰٪ و ۲۰٪ تعیین گردیدند (۲۴). حضور ۵/۴٪ جدایه‌های اشریشیا کلی تولید کننده ESBL در مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتیجه ۵۷٪ در بلژیک و ۴۳/۷٪ در عراق نشان از پایین بودن فراوانی این بتالاکتامازها در گله‌های ایران دارد اما با توجه به اینکه بتالاکتام‌های وسیع الطیف مخصوصاً سفالوسپورین‌ها

در ایران مجوز استفاده در گله‌های طیور گوشتی را ندارند حضور این میزان جدایه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای مذکور جای بحث دارد که نشـان از انتقال و انتشار ژن‌های کد کننده آنها در بین انتروباکتریاسه‌ها بوده و زنگ خطری برای بهداشت عمومی جامعه و گله‌های طیور می‌باشد.

در واقع حضور جدایه‌های اشریشیا کلی مقاوم واجد ژن‌های بتالاکتاماز وسـیع‌الطیف ESBL و AmpC بـه همـراه ژن‌هـای مقاومـت به دیگر خانواده‌هـای آنتی بیوتیکی مخصوصاً آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها در دسـتگاه گوارش طیور فلور روده را به مخزنـی از ژن‌های مقاومت دارویی تبدیل می‌کند که می‌تواند علاوه بر انتقال این عوامل مقاومتی به دیگر فلور روده، با انتقال به سویه‌های پاتوژن در بروز سویه‌های پر خطر برای جوامع انسانی و دامی نقش جدی و مهمی در شیوع اپیدمی‌ها داشته باشد.

کارباپنم‌ها بتالاکتام‌های منحصر به فردی هستند که در برابر هیدرولیز شـدن توسط بیشـتر بتالاکتامازها مقاوم‌اند و در بسیاری از موارد به عنوان مهار کننده‌های بتالاکتامازها به کار گرفته می‌شوند بنابراین در عفونت‌های جدی در انسان استفاده می‌گردند به طوری که از آنها به عنوان آخرین درمان یا last – resort therapy علیه بسـیاری از باکتری‌های گرم منفی نام برده می‌شود (۳،۱۸،۳۱). Hasan در سال ۲۰۱۲ هیچ‌گونه مقاومتی را علیه کارباپنم‌ها در جدایه‌های اشریشـیا کلی طیور بنـگلادش گزارش نکرد (۹) در حالیکـه در مطالعه حاضر فراوانی مقاومت ۸/۳٪ علیه مروپنم به عنوان یک کارباپنم مشاهده گردید. براسـاس گزارش سال ۲۰۱۳ انجمن ایمنی اروپا (EFSA) در آلمان و چین جدایه‌هایی از اشریشیا کلی طیور جدا گردید که واجد مقاومت علیه کارباپنم‌ها بودند که درخواست این انجمن را جهت انجام اقدامات پیشگیرانه فعال در سطوح ملی و بین‌المللی برای جلوگیری از انتشـار سـویه‌های مقاوم به کارباپنم در حیوانات اهلی در پی داشت (۳). بنابراین تعیین حضور سویه‌های مقاوم به کارباپنم در برخی مرغداری‌های ایران توسط مطالعه حاضر، انجام مطالعات دقیق تر را جهت شناسایی دلایل گسترش آن در میان طیور خاطر نشان می‌نماید.

نتیجه‌گیـری: این نتایج موید حضور سـویه‌های کد کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در میان سویه‌های رودهای اشریشیا کلی گله‌های گوشتی طیور در ایران اسـت. با وجود اینکه فنوتیپ ESBL و AmpC فراوانی پایینی را در بین جدایه‌های طیور نشـان داد اما می‌تواند به عنوان زنگ خطر جدی برای ایجاد مقاومت‌های وسـیع و چندگانه و انتشار آنها بین انسان وطیور مطرح باشـد. زیـرا ژن‌های کد کننده این مقاومت‌ها قابل انتقال به سـایر سویه‌ها و گونه‌های باکتریایی در جامعه می‌باشند لذا کنترل انتشار آنها به سایر گله‌ها و افراد مصرف کننده آنها ضروری است. مسئله دیگری که به عنوان خطری جدی در ارتباط با بهداشت عمومی قابل تامل به نظر می‌رسد حضور جدایه‌های اشریشیا کلی واجد کارباپنماز در سطح گله‌های گوشتی و انتقال مقاومت از طریق زنجیره غذایی (آلودگی مدفوعی گوشـت طیور در کشتارگاه) به سطح جامعه انسانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه مسئولین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیماریهای ناشـی از غذا و اسهال‌های مزمن دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مخصوصاً سرکارخانم الهه تاج‌الدین و همچنین آقای دکتر داریوش کاظمی معاون شـبکه دامپزشکی دماوند که در نمونه‌گیری شهر دماوند نهایت محبت را نموده‌اند تقدیر و تشکر ویژه به عمل می‌آید.

References

1. Aly, M.A., Essam, T.M., Amin, M.A. (2012) Antibiotic resistance profile of *E. coli* strains isolated from clinical specimens and food samples in egypt. Int J Microbiol Res. 3: 176-182.
2. Asai, T., Masani, K., Sato, C., Hiki, M., Usuiz, M., Baba, K., Ozawa, M., Harada, K., Aoki, H., Sawada, T. (2011) Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. Acta Vet Scand. 53: 52.
3. Andreoletti, O., Baggesen, D.L., Bolton, D., Butaye, P., Cook, P., Davies, R., Fernández Escámez, P.S., Griffin, J., Hald, T., Havelaar, A., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., McLauchlin, J., Nesbakken, T., Prieto, M., Ricci, A., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Sofos, J., Threlfall, J. (2013) Scientific opinion on carbapenem resistance in food animal ecosystems. EFSA J. 11: 1-70.
4. Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M. (2006) ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. Vet Microbiol. 118: 299-304.
5. Borjesson, S., Egervarn, M., Lindblad, M., Englund, S. (2013) Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable ampc beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. Appl environ Microbiol. 79: 2463-2466.
6. Cho, S.H., Lim, Y.S., Kang, Y.H. (2012) Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from healthy poultry and

swine farm workers using antibiotics in Korea. Osong Public Health Res Perspect. 3: 151-155.
7. Collignon, P., Daniels, R., Grove-White, D. (2012) *E. coli* superbugs on farms and foods. Soil Association. 6: 1-82.
8. Hamidian, M., Tajbakhsh, M., Walther-Rasmussen, J., Zali, M.R. (2009) Emergence of extended-spectrum β-Lactamases in clinical isolates of *Salmonella enterica* in Tehran, Iran. Jpn J Infect Dis. 62: 368-371.
9. Hasan, B., Sandegren, L., Melhus, A., Drobni, M., Hernandez, J., Waldenstrom, J., Alam, M., Olsen, B. (2012) Antimicrobial drug-resistant Escherichia coli in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 18: 2055-2058.
10. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standarts Institute (2012) USA: Wayne, PA.
11. Iroha, I.R., Esimone, C.O., Neumann, S., Marlinghaus, L., Korte, M., Szabados, F., Gatermann, S., Kaase, M. (2012) First description of *Escherichia coli* producing CTX-M-15- extended spectrum beta lactamase (ESBL) in out-patients from south eastern Nigeria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 11: 7-11.
12. Islam, M.J., Sultana, S., Das, K.K., Sharmin, N., Hasan, M.N. (2008) Isolation of plasmid - mediated multidrug resistant *Escherichia coli* from poultry. Int J Sustain Crop Prod. 3: 46-50.
13. Khodadadi, A., Nikpiran, H., Bijanzad, P., Moomivand, H. (2013) Comparing the difference of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* between broiler breeder and broiler farms with Colibacillosis in East Azerbaijan province. Eur J Zool Res. 2: 50-54.
14. Kiiru, J., Kariuki, S., Goddeeris, B.M., Butaye, P. (2012) Analysis of β-lactamase phenotypes and carriage of selected β-lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. BMC Microbiol. 1: 10-12.
15. Miles, T., McLaughlin, W., Brown, P. (2006) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. BMC Vet Res. 2: 1-9.
16. Mu¨ller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tscha¨pe, H., Schmidt, M.A. (2007) Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 73: 3380-3390.
17. Odonkor, S.T., Ampofo, J.K. (2013) Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. Microbiol Res. 4: 20-35.
18. Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011) Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother. 55: 4943-4960.
19. Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Bo¨ttger, E.C., Zbinden, R., Bloemberg, G.V. (2011) Detection of ampC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 49: 2924-2932.
20. Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E.C., Zbinden, R., Bloemberg, G.V. (2011) Detection of ampC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 49: 2924.
21. Rahimi, M. (2013) Antibioresistance profile of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from broiler chicken farms with colibacillosis in Kermanshah province, Iran. Global Vet. 10: 447-452.
22. Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Teale, C.J. (2011) Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum b-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. J Antimicrob Chemother. 66: 86-95.
23. Rawat, D., Nair, D. (2010) Extended-spectrum β-lactamases in gram negative bacteria. J Glob Infect Dis. 2: 263-274.
24. Saeed, N.M. (2014) Detection of extended spectrum beta-lactamase gene production by *E. coli*

isolated from human and broiler in Sulemania province/ Iraq. J Zankoy Sulaimani. 16: 95-105.
25. Smet, A., Marte, A., Persoons, D., Jeroen Dewulf, M.H., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P. (2008) Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in belgian broiler farms. Antimicrob Agents Chemother. 52: 1238-1243.
26. Tabatabaei, M., Marashi, N., Mokarizade, A. (2010) Transferable plasmid mediating multi-antibiotic resistance in non-pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken flocks. Global Vet. 5: 371-375.
27. Tian, G.B., Wang, H.N., Zhang, A.Y., Zhang, Y., Fan, W.Q., Xu, C.W., Zeng, B., Guan, Z.B., Zou, A.K. (2012) Detection of clinically important b-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China. J Med Microbiol. 61: 233-238.
28. Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J. (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol. 42: 3483-3489.
29. Yuan, L., Liu, J.H., Hu, G.Z., Pan, Y.S., Liu, Z.M., Mo, J., Wei, Y.J. (2009) Molecular characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan province, China. J Med Microbiol. 58: 1449-1453.
30. Zahraei Salehi, T., Farashi Bonab, S. (2006) Antibiotics susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. Int J Poult Sci. 5: 677-684.
31. Zavascki, A.P., Bulitta, J.B., Landersdorfer, C.B. (2013) Combination therapy for carbapenem-resistant gram-negative bacteria. Expert Rev Anti Infect Ther. 11: 1333-1353.

Surveillance study of faecal *E. coli* isolates producing AmpC and extended spectrum β-lactamases (ESBLs) enzymes in poultry and workers from aviculture around Tehran

Doregiraee, F.[1], Nayeri Fasaei, B.[1*], Alebouyeh, M.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*
[2]*Gastroenterology and liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran- Iran*

(Received 18 August 2015, Accepted 21 October 2015)

Abstract:

BACKGROUND: AmpC and ESBLs as mediated-plasmid extended spectrum β-lactabases are the main factors of resistance to extended-spectrum cephalosporins in enterobacteriacea especially *E. coli* and will follow treatment failure, high costs of treatment in human and economic losses in the poultry industry. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to screen and study the faecal *E. coli* isolates producing extended spectrum β-lactamases (ESBLs) and AmpC enzymes and related workers. **METHODS:** A total of 500 cloacal swab samples from broiler chickens and 25 rectal swab samples from workers were collected from five poultry houses around Tehran. All samples were seeded on MacConkey agar and identification of *E. coli* isolates were performed via biochemical tests. Antibiotic susceptibility was determined against 12 antibiotics using the disk diffusion method as recommended by the clinical and laboratory standard institute (CLSI2012). Ceftazidim / ceftazidim-clavolanic acid and cefoxitin / cefoxitin-EDTA disks were used for the detection of ESBL and AmpC phenotypes, respectively. phonetic analysis of the drug resistances was performed via SPSS software and Chi-square test. ESBL- producing *E. coli* screened by PCR for the presence of genes encoding beta-lactamases of TEM, CTX-M and SHV. **RESULTS:** A total 467 *E. coli* isolates were isolated from 88.9% of the samples as 92% and 72.7% of isolates presenting MDR phenotype among chickens and workers respectively. ESBL phenotype detected in 5.5% (26) of poultry isolates while, none of the workers isolates have this phenotype. Six isolates carried both of TEM and CTX-M whereas, five and one isolates were detected only for TEM and CTX-M, respectively. Eighty-eight and nine-tenths percent of ESBL *E. coli* displayed AmpC phenotype. **CONCLUSIONS:** Since cephalosporins are not used in broilers in Iran, isolation of faecal *E. coli* isolates producing extended spectrum β-lactamases in broilerchickens can indicate transfer of the resistance genes via plasmids and other mobile genetic elements among Enterobacteriaceae.

Keyword: AmpC, broiler chickens, EDTA, *Escherichia coli*, extended- spectrum β-lactamases, workers

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primer sequences and PCR conditions for screening of ESBL genes.

Graph 1. Frequency of antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* of poultry and workers from five poultry houses around Tehran. TE: tetracycline; CP: ciprofloxacin; C: chloramphenicol; AM: ampicillin; GM: gentamicine; E: erythromycin; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidime; CF: cephalotin; CN: cephalexin; FOX: cefoxitin; CRO: ceftriaxon; MEN: meropenem.

Figure 1. The confirmation test of ESBL phenotype in faecal *E. coli* from poultry using ceftazidim (CAZ30) and ceftazidim-clavolanic acid (CAZ+C) disks.

Figure 2. Detection test of faecal *E.coli* isolates producing AmpC using cefoxitin disk (the upper disk) and cefoxitin+EDTA (the lower disk).

***Corresponding author's email: nayerib@ut.ac.ir, Tel: 021-61117050, Fax: 021-66933222**