JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره دوم، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۷: ۱۲۸-۱۱۷

الگوی پلاسمیدی و مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی در *سالمونلا*های جدا شده از طیور

ملاحت احمدی[1*]، علیرضا طالبی[2]، صدف منصوری[3]، بنت الهدی رحمان[4]

۱. دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانش‌آموخته‌ی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. دستیار دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۲٤ فروردین ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۲ تیر ۱۳۹۲

چکیده

مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در صنعت طیور منجر به حذف سالمونلاهای حساس و ابقای انواع مقاوم این باکتری (حاوی پلاسمید R) در دستگاه گوارش طیور می‌شود. با مصرف گوشت و تخم طیور احتمال انتقال عوامل مقاومت به باکتری‌های مقیم روده انسان وجود دارد. هدف از پژوهش حاضر تعیین ارتباط بین الگوی مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی و پروفایل پلاسمیدی در سالمونلاهای جداشده از طیور صنعتی در استان آذربایجان غربی می‌باشد. در تحقیق حاضر ۲۵ جدایه‌ی سالمونلا از محتویات روده‌ی لاشه‌های طیور مشکوک به سالمونلوز از سطح مرغداری‌های استان آذربایجان‌غربی جداسازی گردید. همه‌ی جدایه‌های سالمونلا با تکثیر ژن invA مورد تائید قرار گرفتند. جدایه‌های سالمونلا از نظر حساسیت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک رایج در صنعت طیور به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفتند. پلاسمید جدایه‌ها با روش لیز قلیایی استخراج شد و ارتباط بین الگوی مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی و الگوی پلاسمیدی بررسی گردید. بیشترین و کمترین مقاومت در میان ۲۵ جدایه به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تیامولین (۲۱ مورد) و نالیدیکسیک اسید (۳ مورد) بود. همچنین ۱۹ جدایه دارای یک پلاسمید با اندازه تقریبی ۲۲-۲۰ کیلوباز بودند. درحالیکه ۴ جدایه علاوه بر پلاسمید ذکر شده، پلاسمیدهای دیگری در اندازه‌های۳/۵ کیلو باز و ۲ کیلو باز داشتند. ۲ جدایه از مجموع جدایه‌ها نیز فاقد پلاسمید بودند. جدایه‌های حاوی دو قطعه پلاسمیدی در مقایسه با جدایه‌هایی که تنها یک پلاسمید داشتند در برابر تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. جدایه‌های فاقد پلاسمید نیز نسبت به جدایه‌های حاوی پلاسمید حساسیت بالایی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند. بیشتر سالمونلاهای حاوی پلاسمید جدا شده از طیور دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پلاسمیدهای مقاومت در سالمونلاهای جداشده از طیور وجود داشته و بعلت مصرف بالای فراورده‌های غذایی با منشا طیور، احتمال انتقال مقاومت دارویی به انسان مورد انتظار است.

کلمات کلیدی: *سالمونلا، الگوی پلاسمیدی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، طیور*

* نویسنده مسئول: ملاحت احمدی

آدرس: گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸

پست الکترونیک: m.ahmadi@urmia.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یکی از شناخته-شده‌ترین گروه در باکتری‌های بیماریزا می‌باشند. *سالمونلا*ها که از اعضای مهم این گروه هستند، برخلاف اکثر باکتری‌های روده‌ای، انگل‌های داخل سلولی اختیاری بوده و همه آن‌ها بالقوه بیماری‌زا هستند (۸). این باکتری به سادگی به وسیله روش‌های مستقیم یا غیرمستقیم از حیوان به حیوان، حیوان به انسان و انسان به انسان انتقال می‌یابد (۲). بنابراین پیشگیری و کنترل سالمونلوز در انسان تا حد زیادی بر اساس کنترل و پیشگیری عفونت در حیوانات می‌باشد. در انسان، غالباً گوشت به ویژه گوشت طیور، به عنوان منشا عفونت شناخته می‌شود (۳).

جهت درمان عفونت‌های *سالمونلا*یی از آنتی-بیوتیک‌های متفاوتی استفاده می‌گردد و مصرف روزافزون و بی‌رویه‌ی این داروها در انسان و حیوانات، سبب حذف سویه‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌گردد (۷ و ۱۸). با توجه به مصرف بالای آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره طیور و جایگزینی باکتری‌های مقاوم در روده این حیوانات، مدفوع آن‌ها حاوی مقادیر نسبتاً زیادی از باکتری‌های مقاوم می‌باشد. سویه‌های مقاوم هنگام ذبح، لاشه طیور را آلوده نموده و از طریق غذا می‌توانند در دستگاه گوارش انسان کلونیزه شوند (۷).

یکی از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها ناشی از موتاسیون کروموزومی است که در غیاب آنتی‌بیوتیک نیز رخ می‌دهد. همچنین انواعی از پلاسمیدها (پلاسمیدهای R) وجود دارند که ژن‌های مربوط به مقاومت در برابر فلزات یا آنتی‌بیوتیک‌ها برروی آن‌ها قرار می‌گیرند. معمول‌ترین حالت مشاهده شده عبارت از حمل مقاومت در برابر چهار ماده ضدمیکروبی (کلرآمفنیکل، استرپتومایسین، سولفونامیدها و تتراسایکلین) بر روی یک پلاسمید می-باشد (۸). باکتری‌های حاوی پلاسمید می‌توانند آنرا به باکتری‌های فاقد فاکتور مقاومت منتقل نموده و سبب گسترش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بین جمعیت‌های باکتریایی شوند.

انتقال ژن‌های پلاسمیدی مربوط به مقاومت‌های دارویی و همچنین ژن‌های پلاسمیدی مربوط به حدت در بین باکتری‌های گرم منفی بخصوص در خانواده انتروباکتریاسه همواره مورد توجه محققین بسیاری در سطح جهان بوده (۹، ۱۰ و ۲۴) و لازم است در ایران نیز تحقیقات مربوط به زمینه فوق مورد توجه و عنایت بیشتری قرار گیرد. باتوجه به اینکه بررسی‌های اپیدمیولوژیک محدودی بر روی الگوی پلاسمیدی و ارتباط آن‌ها با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در مورد *سالمونلا* در ایران انجام گرفته است، هدف از انجام این تحقیق، تعیین الگوی پلاسمیدی *سالمونلا*های جدا شده از طیور و بررسی مقاومت یا حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در صنعت طیور و همچنین تعیین ارتباط بین مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی و الگوی پلاسمیدی می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه‌ها: نمونه‌گیری از تیرماه ۱۳۸۸ تا تیرماه ۱۳۸۹ در سطح مرغداری‌های استان آذربایجان غربی ، از محتویات روده پرندگان، تا جداسازی و تائید تشخیص ۲۵ جدایه خالص *سالمونلا* به عمل آمد. نمونه‌های مرغ گوشتی از آزمایشگاه‌های تشخیص دامپزشکی جمع‌آوری گردیدند که شامل ۳۱ مرغداری بود. نمونه‌های مرغ تخمگذار نیز شامل ۲۸ مرغداری بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی *سالمونلا*: از هر نمونه به میزان ۲-۱ گرم در محیط سلنیت F براث (Merck, Germany) کشت گردید و پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به محیط کشت کروم آگار سالمونلا (CHROM agar, France) منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از پرگنه‌های مشکوک (به رنگ ارغوانی روشن) کشت مجدد در محیط سالمونلا-شیگلا آگار (Laboratories CONDA, Spain) به عمل آمد تا کشت خالص از هر جدایه بدست آید. از هر کشت خالص رنگ آمیزی گرم به عمل آمد و متعاقباً برای تایید تشخیص آزمایشات بیوشیمیایی اندول، اوره، لاکتوز، متیل رد، وگس-پروسکائر، و سیترات بر روی جدایه‌ها انجام گرفت(۲۰). تشخیص جدایه‌های *سالمونلا* با تکثیر ژن *invA* به روش PCR مورد تائید قرار گرفت (شکل۱). در نهایت ۲۵ جدایه خالص جهت انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

روش PCR: نمونه‌ها در محیط سلنیت F غنی شدند و سپس برای جداسازی DNA *سالمونلا* از روش فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل استفاده شد (۲۲و۲۳). جهت تشخیص ژن *invA* در *سالمونلا*ها از پرایمرهای S_{139} و S_{141} (سیناژن- ایران) استفاده گردید. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

برای انجام PCR از کیت شرکت سیناژن استفاده گردید. برای هر یک از نمونه‌ها ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی (*Taq* DNA polymerase، $MgCl_2$، PCR buffer و dNTPs)، ۲ میکرولیتر از پرایمر R، ۲ میکرولیتر از پرایمر F با غلظت ۰/۱۵ میکرومول برای هر یک، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. برای هر مرحله یک کنترل منفی (آب مقطر) و یک کنترل مثبت نیز در نظر گرفته شد. ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی، ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۲ میکرولیتر از *Salmonella Typhimurium* (ATCC 1730) DNA نیز با هم ترکیب شده و به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. میکروتیوب‌های مخصوص PCR پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ ثانیه به دستگاه PCR منتقل شدند. مراحل چرخه دمایی واکنش PCR بدین ترتیب بود که ابتدا برای ۵ دقیقه DNA موجود در ۹۴ درجه سانتیگراد دناتوره شد و سپس ۳۰ سیکل شامل ۳ مرحله دناتوره شدن، اتصال پرایمرها و توسعه به‌صورت ۴۵ ثانیه دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه مرحله اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتیگراد و ۷۰ ثانیه مرحله توسعه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت پس از اتمام سیکل آخر، به مدت ۷ دقیقه عمل توسعه در ۷۲ درجه سانتیگراد ادامه یافت تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل گردد. سپس محصولات PCR سانتریفیوژ شد تا مواد چسبیده به دیواره لوله در ته آن جمع و آماده‌ی الکتروفورز شود (۲۲). جهت انجام الکتروفورز محصولات PCR از آگاروز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید و جریان ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه در بافر TBE استفاده شد.

آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسک به روش Kirby-Bauer استفاده شد(۶). به این منظور ۲۵ جدایه *سالمونلا* به طور خالص در محیط BHI (Merck, Germany) کشت گردیدند و با توجه به کدورت محیط کشت شده و مقایسه آن با لوله شماره ۰/۵ مک فارلند، تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر محیط به میزان 10^6 CFU تنظیم گردید. در

Archive of SID

www.SID.ir

مرحله بعد، از محیط BHI مورد نظر برداشت شده و در سطح محیط مولرهینتون (Merck, Germany) به‌طور یکنواخت کشت گردید. سپس دیسک‌های آنتی-بیوتیکی تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، نئومایسین، کلرامفنیکل، تیامولین، انروفلوکساسین، فلومکوئین، لینکواسپکتین، نالیدیکسیک اسید و کانامایسین (پادتن طب، ایران)، با رعایت شرایط استاندارد بر روی محیط کشت داده شده قرار داده شدند. محیط‌های مذکور به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و در نهایت نتایج حاصل بر اساس استانداردهای CLSI قرائت شدند.

آزمایش استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی طبق دستورالعمل موجود در کیت Takara ساخت ژاپن انجام گرفت وDNA پلاسمیدی استخراج شده در میکروتیوب قرار داده شد و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۳). حدود ۸ میکرولیتر از هر نمونه پلاسمید با ۲ میکرولیتر بافر بارگذار (Fermentas, Germany) به خوبی مخلوط شده و به دستگاه الکتروفورز حاوی ژل آگاروز ۱٪، با ولتاژ ۱۰۰V برای مدت ۱ ساعت منتقل شد. جهت تخمین وزن مولکولی پلاسمیدهای بدست آمده از دو نوع مارکر GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Cinnagene, Iran) و Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (Cinnagene, Iran) استفاده گردید. برای بررسی باندهای مجزا و رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید، از دستگاه ترانس ایلومیناتور استفاده گردید. در نهایت ارتباط بین مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی و الگوی پلاسمیدی جدایه‌ها نیز بررسی گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

نتایج نشان داد که ۲۱ جدایه از مجموع ۲۵ جدایه مورد آزمایش نسبت به تیامولین مقاوم بودند. بیشترین مقاومت دارویی در بین جدایه‌ها، مربوط به تیامولین (۸۴٪) و پس از آن مربوط به آمپی-سیلین (۶۴٪) بود. همچنین بیشترین حساسیت مربوط به نالیدیکسیک اسید (۸۸٪) و بعد از آن مربوط به انروفلوکساسین (۵۶٪) بود. نتایج حاصل از آزمایش آنتی‌بیوگرام، در جدول شماره ۲ آمده است.

از مجموع کل ۲۵ *سالمونلای* مقاوم جدا شده، ۳ مورد (۱۲ درصد) مقاومت یگانه، ۲ مورد (۸ درصد) مقاومت دوگانه، ۸ مورد (۳۲ درصد) مقاومت سه‌گانه و ۱۲ مورد (۴۸ درصد) مقاومت بیشتر از سه‌گانه داشتند. جدول شماره ۳ نوع، تعداد و درصد الگوی مقاومت *سالمونلا*های جداشده از طیور را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از بررسی الگوی پلاسمیدی:

الگوی پلاسمیدی ۲۵ جدایه مورد آزمایش بررسی شد و نتایج بدست آمده نشان داد که ۲۳ جدایه از مجموع جدایه‌ها دارای یک پلاسمید با اندازه تقریبی kb ۲۲-۲۰ بودند که از بین آن‌ها ۴ جدایه علاوه بر پلاسمید ذکر شده پلاسمید دیگری در اندازه‌های bp ۳۵۰۰ و bp ۲۰۰۰ نیز داشتند. همچنین تعداد ۲ جدایه از مجموع جدایه‌ها فاقد پلاسمید بودند. الگوی پلاسمیدی ۲۵ جدایه مورد آزمایش در شکل ۲ نشان داده شده است.

Archive of SID

جدول شماره ۱: ردیف پرایمر و محصول تکثیر یافته مورد نظر (۲۳)

Gene	Oligonucleotide sequence of primers (5′- 3′)	product (bp)
invA	S 139: GTGAAATTATCGCCGCCACGTTCGAA S 141: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284

جدول شماره ۲: تعداد و درصد جدایه‌های مقاوم *سالمونلا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

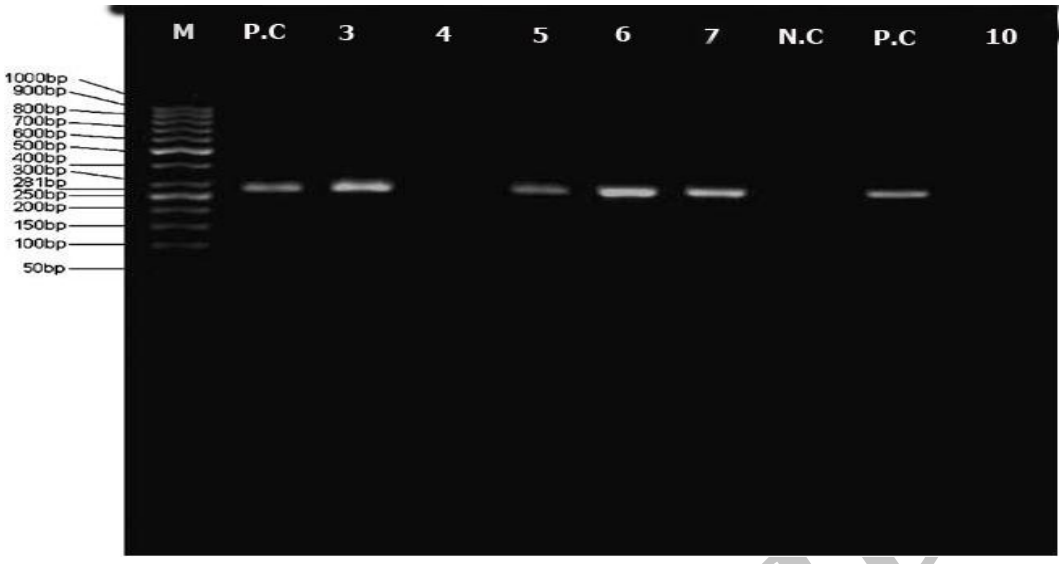
نام دارو	تعداد	درصد
تیامولین (TM)	۲۱	۸۴
آمپی‌سیلین(Am)	۱۶	۶۴
فلومکوئین (FM)	۱۱	۴۴
تتراسایکلین (Te)	۱۱	۴۴
لینکواسپکتین (LS)	۱۰	۴۰
کانامایسین (K)	۸	۳۲
نئومایسین (N)	۷	۲۸
انروفلوکساسین (NFX)	۴	۱۶
کلرامفنیکل (C)	۴	۱۶
نالیدیکسیک اسید (Na)	۳	۱۲

جدول شماره ۳: نوع، تعداد و درصد الگوی مقاومت *سالمونلا*های جداشده از طیور

نوع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	الگوی مقاومت	تعداد جدایه متعلق به هر الگو	درصد شیوع الگوهای مقاومت
یگانه	TM	۲	۸
	Am	۱	۴
دوگانه	TM-Am	۱	۴
	TM-FM	۱	۴
سه‌گانه	Te-N-TM	۱	۴
	K-C-TM	۱	۴
	LS-N-NFX	۱	۴
	TM-Am-FM	۲	۸
	TM-K-Am	۱	۴
	FM-LS-K	۲	۸
بیش از سه‌گانه	LS-Te-Am-N-NFX-TM	۲	۸
	FM-C-TM-Am	۱	۴
	FM-Na-Te-Am-TM	۱	۴
	Am-TM-N-C-FM- Te	۲	۸
	TM-FM-Te-Na-Am-LS	۲	۸
	LS-K-N-NFX-TM-Am	۱	۴
	TM-K-Am-Te	۱	۴
	TM-K-Am-LS-Te	۱	۴
	Te-Tm-K-LS	۱	۴

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۱: نتایج PCR ژن *invA*

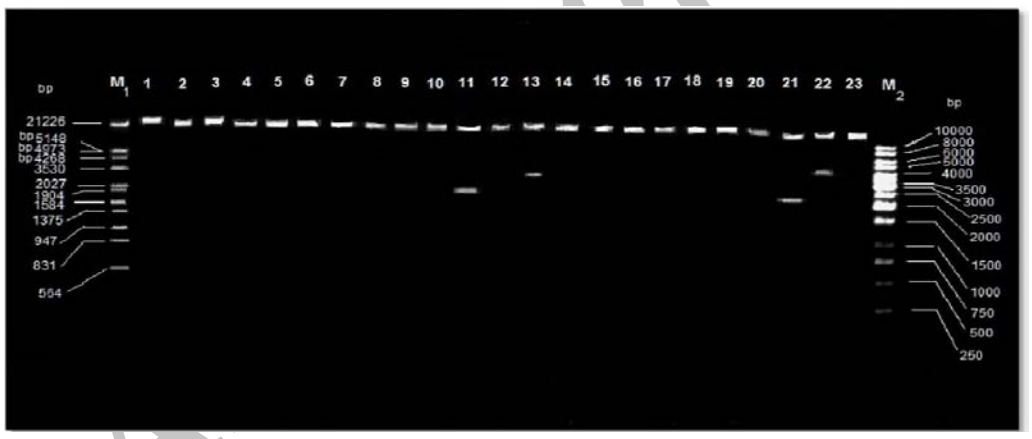
M: مارکر 1000 *bp*

PC: کنترل مثبت، *Salmonella Typhimurium* (*ATCC 1730*)

N.C: کنترل منفی (آب مقطر)

شماره‌های ۳،۵،۶،۷: نمونه‌های مثبت

شماره‌های ۴،۱۰: نمونه‌های منفی



شکل شماره ۲: الگوی پلاسمیدی ۲۵ جدایه *سالمونلا*

چاهک‌های ۱ تا ۲۵: الگوی پلاسمیدی جدایه‌ها

چاهک‌های M1 و M2: مارکر (Cinnagene, Iran)

بحث

سالمونلوز یک بیماری زئونوز با اهمیت اقتصادی جهانی در انسان و حیوانات می‌باشد. در اغلب موارد گوشت به ویژه گوشت طیور، به عنوان منشا عفونت *سالمونلایی* در انسان شناخته شده است (۳). جهت درمان این بیماری از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از مشکلات مهم در رابطه با مصرف داروها، بروز مقاومت نسبت به آن‌ها می‌باشد (۵، ۱۴، ۱۵ و ۱۹). در این رابطه، مطالعات Graziani و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که *سالمونلا*های جدا شده از طیور دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشند. این مسئله می‌تواند پیامد استفاده از جیره غذایی حاوی آنتی‌بیوتیک در صنعت پرورش طیور باشد (۱۱).

Archive of SID

منشاء ژنتیکی مقاومت دارویی به پلاسمید یا کروموزوم مربوط می‌باشد (۱۲). انتقال مقاومت آنتی-بیوتیکی نسبت به چند دارو بصورت همزمان، از یک باکتری به باکتری دیگر اغلب به پلاسمیدها نسبت داده می‌شود. پلاسمیدها ممکن است حاوی ژن‌های مقاومت به عوامل آنتی‌بیوتیکی، ضدعفونی‌کننده‌ها، فلزات سنگین، کاتیون‌ها، آنیون‌ها و باکتریوسین‌ها و نیز دارای ژن‌هایی مربوط به فعالیت متابولیک یا حدت باشند (۲۵). پلاسمیدهایی که ژن‌های مقاومت نسبت به داروها را حمل می‌کنند براحتی می‌توانند از طریق فرایندهای تبادل ژنی بین گونه‌ها و حتی جنس‌های مختلف باکتریایی (۱۲) انتقال یافته و در انتشار مقاومت چندگانه در بین گونه‌های باکتریایی نقش مهمی ایفا نمایند (۱۵).

از روش‌های مختلفی همچون تعیین الگوی پلاسمیدی می‌توان بعنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک برای مطالعه انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها بخصوص در رابطه با انتروباکتریاسه‌ها استفاده نمود. در این رابطه، در مطالعه‌ای که با هدف آنالیز پروفایل پلاسمیدی جدایه‌های *اشرشیا کلی* در هند انجام گرفت، از میان ۷۶ جدایه *اشرشیا کلی* مربوط به بیماران هندی، بیش از ۵۰٪ آن‌ها دارای مقاومت چندگانه و ۵۲/۶٪ نیز حاوی پلاسمید بودند. دراین بررسی جدایه‌های حاوی پلاسمیدهای با وزن مولکولی بالا (kb ۲۳)، مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیادی از خود نشان دادند. محققین در این بررسی عنوان کردند که تعداد پلاسمیدها و اندازه آن‌ها در ایجاد ویژگی مقاومت نسبت به داروهای آنتی-بیوتیکی مهم می‌باشند (۱۳). در بررسی دیگری روی همین باکتری در سال ۲۰۱۱ در تایلند، از ۲۵۸ جدایه *اشرشیاکلی* بدست آمده از منابع مختلف، ۳۲/۲٪ آن‌ها حاوی پلاسمید بودند که بیشترین درصد آن‌ها مربوط به جدایه‌های بدست آمده از جوجه مرغ بودند. همچنین وجود بیش از دو پلاسمید در نمونه‌های بدست آمده از سکوم جوجه مرغ نسبت به منابع دیگر بیشتر بوده و حدود ۹۷٪ جدایه‌های مربوط به این منبع به تتراسایکلین مقاوم بودند (۲۵). بررسی احمدی و همکاران (۲۰۰۸) بر روی ۲۰ جدایه *اشرشیا کلی* بدست آمده از مدفوع گاومیش از نظر حساسیت آنتی‌بیوتیکی و الگوی پلاسمیدی نیز نشان داد که تمام جدایه‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌های نئومایسین، استرپتومایسین و اریترومایسین مقاوم بودند. همچنین تمام جدایه‌های بررسی شده در این مطالعه دارای یک پلاسمید با اندازه مولکولی ۱۳۰۰۰kb- ۹/۱۶۲ بودند(۴). در مطالعه حسینی جزنی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز الگوی پلاسمیدی گونه‌های *کلبسیلا* و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شد و ۳۹ جدایه *کلبسیلا* جدا شده از ادرار بیماران مورد مطالعه قرار گرفتند. در این بررسی بیشترین مقاومت دارویی مربوط به آمپی‌سیلین و کمترین مقاومت مربوط به داروهای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین گزارش گردید. در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین حضور پلاسمید و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مشاهده گردید (۱۲).

در مطالعه Olusesan و همکاران در سال ۲۰۱۰ که بر روی نمونه خون افراد مشکوک به تب تیفوئید انجام گرفت، ۷۱ جدایه *سالمونلا تایفی* و ۳۱ جدایه *سالمونلا پاراتایفی* از نظر الگوی پلاسمیدی و مقاومت آنتی-بیوتیکی بررسی شدند و بیشترین و کمترین میزان مقاومت دارویی برای *سالمونلا تایفی* به ترتیب مربوط به آموکسی‌سیلین و افلوکساسین و برای *سالمونلا پاراتایفی* مربوط به آوگومنتین و افلوکساسین گزارش گردید. همچنین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سالمونلا پاراتایفی* بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از *سالمونلا تایفی* گزارش شد. آنالیز پلاسمیدی در این

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیق نشان داد که جدایه‌های *سالمونلا تایفی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک ممکن است پلاسمید مقاومت را از هر باکتری روده‌ای مقاوم دیگری همچون *اشرشیا کلی* دریافت نموده باشند (۱۹). نتایج بررسی احمدی (۱۳۸۴) در رابطه با مطالعه مقاومت‌های دارویی قابل انتقال در *اشرشیا کلی*‌های جدا شده از مرغداری‌های منطقه ارومیه نیز احتمال انتقال فاکتورهای مقاومت‌های دارویی از جنس *اشرشیا* به جنس *سالمونلا* را تائید می‌نماید (۱). در مطالعه‌ی دیگری که با هدف تعیین نقش پلاسمید در ایجاد مقاومت چند گانه دارویی انجام گرفت، تعداد ۲۰ جدایه *سالمونلا تایفی* از بیماران تیفوئیدی جداسازی گردید. ۸۴٪ این جدایه‌ها نسبت به داروهای کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و استرپتومایسین مقاوم و نسبت به نالیدیکسیک‌اسید و سیپروفلوکساسین حساس بودند. پلاسمیدهای kb ۱۲۰ و kb ۱۴ در جدایه‌های *سالمونلایی* که مقاومت چنددارویی داشتند مشاهده شد در حالی که در جدایه‌های حساس هیچ پلاسمیدی دیده نشد (۱۴).

مطالعاتی در این زمینه در داخل کشور نیز انجام گرفته است. در مطالعه مرشد و پیغمبری در سال ۲۰۱۰ بر روی ۴۹ جدایه *سالمونلا انتریتیدیس* از منابع مختلف، بیشترین مقاومت دارویی (۳۸/۸٪) در مورد فلومکوئین گزارش گردید. در این مطالعه ۹۸٪ جدایه‌ها یک پلاسمید kb ۶۸ داشته و ۶۱/۲٪ جدایه‌ها نیز دارای مقاومت چندگانه بودند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که نمونه‌های جدا شده از منابع وابسته به طیور (طیور و محیط مرغداری) تا حد زیادی با جدایه‌های بدست آمده با منشا انسانی قرابت داشتند (۱۷). همچنین در بررسی طباطبائی و همکاران در سال ۱۳۸۸ شمسی، ۵۰ سویه *سالمونلا* جدا شده از مواد غذایی از نظر سروتایپینگ، مقاومت دارویی و تعیین طرح پلاسمیدی مورد مطالعه قرار گرفتند. در ۵۸٪ از جدایه‌ها مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک یا بیشتر مشاهده شد. از طرفی همه جدایه‌ها دارای یک تا چهار پلاسمید بودند و ۴ الگوی پلاسمیدی متفاوت را نشان دادند. همچنین همه جدایه‌ها دارای یک پلاسمید ۳/۰۳۶ مگا دالتونی بوده و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۲۱).

در تحقیق حاضر، مقاومت دارویی و الگوی پلاسمیدی گونه‌های *سالمونلای* جدا شده از مدفوع طیور در استان آذربایجان غربی، و نیز ارتباط بین این دو ویژگی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، همه‌ی جدایه‌های *سالمونلا* نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند که میزان آن بسیار بالا می‌باشد. مصرف مداوم و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره طیور موجب افزایش تعداد و نوع مقاومت‌های میکروبی در *سالمونلا*ها شده است. احتمال انتقال این مقاومت‌ها به انسان از طریق مصرف مواد غذایی با منشا طیور اهمیت این مسئله را بیشتر می‌نماید. همانگونه که در جدول ۲ آمده است از ۲۵ جدایه مورد آزمایش ۲۱ جدایه (۸۴٪) نسبت به تیامولین مقاوم بودند. بیشترین مقاومت دارویی پس از تیامولین مربوط به آمپی‌سیلین (۶۴٪) بود. همچنین ۲۲ جدایه (۸۸٪) به نالیدیکسیک اسید حساس بودند و پس از آن، میزان حساسیت به انروفلوکساسین ۵۶٪ بود. در تفسیر این نتایج می‌توان گفت مصرف آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین به عنوان مکمل غذایی در تغذیه طیور جهت تسریع رشد موجب شده تا باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مخصوصاً آن‌هایی که واجد پلاسمید مقاومت هستند، افزایش‌فوق‌العاده‌ای پیدا کنند. این امر به ویژه در بین باکتری‌های گرم منفی فلور روده‌ای این حیوانات واجد اهمیت است.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین میزان مقاومت باکتری‌های روده‌ای نسبت به نالیدیکسیک اسید پایین گزارش شد که استفاده محدود این دارو در دامپزشکی می‌تواند علت این امر باشد. بنابراین هر چه تماس باکتری‌ها با ترکیبات ضد باکتریایی کمتر باشد، احتمال ایجاد و انتشار مقاومت-های آنتی‌بیوتیکی بین آن‌ها کمتر خواهد بود.

در تعیین الگوی پلاسمیدی ۲۵ جدایه *سالمونلای* مورد مطالعه، ۱۹ جدایه حاوی یک پلاسمید با اندازه تقریبی kb ۲۲-۲۰ بودند. ۴ جدایه علاوه بر پلاسمید ذکر شده پلاسمید دیگری نیز داشتند. اندازه این پلاسمیدها ۳۵۰۰bp و ۲۰۰۰bp گزارش گردید. همچنین از ۲ جدایه از مجموع جدایه‌ها پلاسمیدی استخراج نگردید. در این مطالعه ۴ نوع الگوی مختلف مقاومت مشاهده شد که مقدار آن برای الگوی مقاومت بیش از سه‌گانه ۴۸ درصد، سه‌گانه ۳۲ درصد، دوگانه ۸ درصد و الگوی مقاومت یگانه ۱۲ درصد بود. در مورد بررسی ارتباط بین مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی و الگوی پلاسمیدی مشاهده شد که نمونه‌های حاوی دو قطعه پلاسمیدی (با وزن‌های مختلف) نسبت به نمونه‌های حاوی یک پلاسمید، در برابر تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. بطوری که تمام نمونه‌های حاوی دو قطعه پلاسمیدی دارای الگوی مقاومت چندگانه بودند در حالیکه تمام نمونه‌های فاقد پلاسمید دارای الگوی مقاومت یگانه و یا دوگانه بوده و در مقایسه با نمونه‌های حاوی پلاسمید حساسیت بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان دادند. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که پلاسمیدها می‌توانند حامل ژن‌های مربوط به مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها باشند و با تبادلات ژنی در بین گونه‌ها یا حتی جنس‌های مختلف باکتریایی این عوامل را انتقال داده و به این ترتیب موجب گسترش مقاومت دارویی در بین جمعیت‌های میکروبی شوند. انتشار جمعیت‌های میکروبی مقاوم می‌تواند برای بهداشت عمومی نیز مخاطره‌آمیز باشد.

منابع

۱. احمدی، م. (۱۳۸۴). مطالعه مقاومت‌های دارویی قابل انتقال در *اشرشیا کلی*‌های جدا شده از مرغداری‌های منطقه ارومیه. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران*، دوره ۶۰، شماره ۱، صفحات ۷۷-۷۱.

۲. جاکلیک، و.ک.، ویلت، اچ.پی.، آموس، د.ب.، ویلفرت، س.م. (۲۰۰۳). *میکروب‌شناسی زینسر*. انتشارات آییژ. جلد دوم، صفحات ۲۷۷- ۲۶۹ .

۳. گیلز، کارلتون. ال.، توئن، چارلز. او. (۲۰۰۲). *پاتوژنز عفونت‌های باکتریایی در حیوانات*. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج. صفحات ۲۳۰-۲۲۹.

4. Ahmadi, M., Tokmechi, A., Kazemnia, A. (2008). Study of antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Escherichia coli* in Iran, Urmia. *Journal of Veterinary Research* **63**: 19-23.
5. Ahmed, B., Shakoori, F.R., Ali, S.S., Shakoori, A.R. (2009). Antimicrobial resistance pattern and plasmid analysis of *Escherichia coli* from patients suffering from acute diarrhoea in Azad Kashmir, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* **41**: 371-80.
6. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherries, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* **45**: 493-6.
7. Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E.E. (2001). Antibiotic resistance of fecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 763-71.
8. Carter, G.R., Wise, D.J. (2004). *Essentials of Veterinary Bacteriology*. 6th edition, Jahad Publications, West Azerbaijan: 316-23.

Archive of SID

www.SID.ir

documented outbreaks in school children. *Journal of Medical Microbiology* **49**: 355-60.
17. Morshed, R., Peighambari, S.M., (2010). Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of *Salmonella* Enteritidis. *New Microbiologica* **33**: 47-56.
18. Nadine, B., Lieve, H., Rijpens, N. (2004). Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5305-14.
19. Olusesan, A.G., Nonyelum, O., Ebere, O.C.L., Olorunmola, E.J. (2010). Plasmid DNA analysis and conjugative study of antibiotic resistant *Salmonella typhi* and *paratyph*i to ten selected antibiotics in Zaria, Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **4**: 151-7.
20. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. First edition, Mosby, London: 44-53.
21. Rafiei Tabatabaie, R., Pourbakhsh, S.A., Nazem Shirazi, M.H. (1388). Plasmid pattern analysis of the *Salmonella* isolated from food samples. *Journal of Biological Sciences* **3**: 37-45.
22. Rahn, K., Grandis, S.A., Clarke R.C., Mcewen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method for detection of Salmonella. *Molecular Cell Probes* **6**: 271-9.
23. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
24. Ucan, U.S., Acik, L., Celebi, A., Erganis, O., Arslan, E. (2005). Plasmids and protein patterns of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Konya,
9. El-Baghdady, Kh.Z., Abooulwafa, M.M., Ghobashy, M.O., Gebreel, H.M. (2009). Plasmid mediated virulence factors of some *Proteus* isolates. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* **1**: 7-22.
10. Gomashe, A.V., Dharmik, P.G., Suriya, S.S. (2011). Antibiotic sensitivity pattern and plasmid profile analysis of *Escherichia coli O157:H7* isolates from different meat samples of Nagpur. *Bioscience Biotechnology Research Communications* **4**: 139-44.
11. Graziani, C., Busani, L., Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Ricci, A. (2008). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* from human and animal sources in Italy. *Veterinary Microbiology* **128**: 414-8.
12. Hosseini Jazani, N., Omrani, M.D., Sabahi, Z., Mosavi, M., Zartoshti, M. (2008). Plasmid profiling of *Klebsiella* sp. and its relation with antibiotic resistance at two hospitals of Urmia (Iran). *Journal of Applied Sciences* **8**: 2781-4.
13. Jan, N., Meshram, S.U., Kulkarni, A. (2009). Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India. *Romanian Biotechnological Letters* **14**: 4635-40.
14. Karmaker, S., Biswas, D., Shaikh, N.M., Chatterjee, S.K., Kataria, V.K., Kumar, R. (1991). Role of a large plasmid of *Salmonella* typhi encoding multiple drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* **34**: 149-51.
15. Lay, K.K., Chansong, N., Chuanchuen, R. (2012). Plasmid profiles of multidrug-resistant *Escherichia coli* from clinically healthy swine. *Thai Journal of Veterinary Medicine* **42**: 229-33.
16. Lee, T.M., Chang, L.L., Chang, Ch.Y., Wang, J.Ch., Pan, T.M., Wang, T.K. (2000). Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-

Archive of SID

www.SID.ir

Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **29**: 475-80.

25. Wonglumsom, W., Sianglum, W., Tiyasuttipan, W., Sirisali, S. (2011). Plasmid profiles and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli*. *Royal Thai Army Medical Journal* **64**: 175-80.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 2, 2013

Antimicrobial Resistance Pattern and Plasmid Profile of *Salmonella* Isolates from Poultry

Ahmadi, M.[1*], Talebi, A.[2], Mansouri, S.[3], Rahman, B.[4]

1- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
3- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
4- PhD Student of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

Received Date: 13 April 2013 *Accepted Date: 3 July 2013*

Abstract:

The imprudent use of different antibiotics in poultry industry leads to the elimination of sensitive Salmonella and retention of resistant forms of Salmonella (containing R-plasmid) in the digestive tract of poultry. Consumption of poultry meat and eggs may transfer resistance elements to intestinal bacteria in human. The aim of present study was to determine the correlation of antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of Salmonella spp. isolates from commercial poultry production in west-Azerbaijan province. Twenty-five Salmonella isolates were recovered from the feces of the suspicious poultry carcasses in west Azerbaijan poultry farms. All Salmonella isolates were confirmed using invA gene amplification. The Salmonella isolates were tested for susceptibility to 10 common antimicrobial agents used in poultry industry by disk diffusion method. Plasmids were extracted using alkaline lysis method. The correlation between antimicrobial resistance pattern and plasmid profile was investigated. Out of 25 Salmonella isolates, maximum and minimum resistance was observed to Tiamoline (21 isolates) and Nalidixic acid (3 isolates), respectively. Also, 19 isolates carried a plasmid with approximate size of 20-22 kb. Whereas, in addition to mentioned plasmid, 4 isolates harbored other plasmids with 3.5 kb and 2 kb. Overall, 2 isolates were plasmid free. The isolates with two plasmids in comparison with the isolates carrying only one plasmid were resistant against a higher number of antibacterial agents. The isolates with no plasmid when compared with the isolates carrying plasmids displayed high susceptibility against antibacterial agents. Most Salmonella isolates of poultry origin which contained plasmids were multidrug resistant. It can be concluded that resistance plasmids are present in Salmonella isolates from poultry and due to the high consumption of food products of poultry origin, the possibility of transmission of drug resistance to human is expected.

Key words: *Salmonella, Plasmid profile, Antimicrobial resistance, Poultry.*

**Corresponding author: Ahmadi, M.*
Address: Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran. Tel: 0441-2770508
Email: m.ahmadi@urmia.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir