

بررسی اثر حرارت بر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی های جدا شده از طیور

جاوید اقبال^{۱*}، بهزاد سمساری آذر^۲، ملاح احمدی^۳، کمال جعفری^۴

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۲

چکیده

اشریشیاکلی یکی از باکتریهای پاتوژنیک مهم در انسان و حیوانات است. یکی از راههای ایجاد مقاومت منشاء پلاسمیدی دارد و از آنجائیکه بعضی از پلاسمیدها به حرارت حساس بوده و در حرارت غیر مطلوب از بین می روند، در این تحقیق سعی شده است که امکان تغییر مقاومت در باکتری E-coli جدا شده از طیور نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج درمانی با استفاده از حرارت، مورد بررسی قرار گیرد. در ابتدا بمنظور تأیید هویت ۲۵ جدایه اشریشیاکلی جدا شده از طیور، آنها را به محیط اختصاصی مکانیکی آگار و سپس محیطهای افتراقی خانواده آنترو باکتریاسه انتقال داده و از هویت آنها اطمینان حاصل گردید. در مرحله دوم هر یک از جدایه ها به ۲ محیط BHI منتقل شده و همزمان در دو دمای ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. در قدم بعدی حساسیت جدایه های E-coli به آنتی بیوتیکهای مورد نظر به روش دیسک-دیفیوژن (کربی بائر) براساس معیارهای CLSI انجام گرفت و بعد از انکوباسیون در دو دمای مختلف ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد بررسی شده و برای ثبت و بیان نتایج از سه طبقه بندی حساس، نیمه حساس و مقاوم استفاده گردید. در بررسی حاضر بیشترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی در E-coli در دو دمای ۳۷ و ۴۳/۵ درجه به ترتیب مربوط به کلرامفنیکل (۵۲٪ و ۵۶٪) بوده و بالاترین مقاومت نسبت به اریترومايسين (۹۲٪) مشاهده شد، و تغییر محسوسی در کاهش مقاومت باکتری علیه آنتی بیوتیکها در دو دمای مورد آزمایش مشاهده نگردید.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، مقاومت آنتی بیوتیکی، حرارت

مقدمه

اشریشیاکلی جزء فلور طبیعی روده انسان،

۱- مربی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانش آموزخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی

واحد ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: J.eghbal@iaurma.ac.ir

پستانداران و پرندگان می‌اشد و در اکثر موارد به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب مطرح می شود که در اثر وقوع بیماری اولیه باکتریایی و ویروسی به طور ثانویه بروز می کند (۲، ۷، ۱۴).

غالباً *E-coli* در انسان و پستانداران باعث بروز عفونت‌های گوارشی شده و در پرندگان اهلی موجب عفونتهای غیر گوارشی عمومی و یا موضعی مانند

و در مورد هر یک از جدایه ها روش زیر مورد اجرا قرار گرفت.

تعداد ۱۰-۵ پرگنه از هر جدایه میکروبی را در نیم میلی لیتر محیط نوترینت برات به حالت تعلیق در آورده و لوله فوق ۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس به کمک یک سواپ استریل از لوله برداشت شده و هر جدایه در سطح ۲۰ پلیت حاوی محیط کشت جامد (مولر هیتون آگار) به طور یکنواخت کشت گردید. پلیت ها در حالتی که درب آنها بسته بود به مدت ده دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرارداد شد، تا سطح آنها خشک شود. در مرحله بعد دیسک های آنتی بیوتیکی به کمک پنیسی که روی شعله سترون شده بود بطور استاندارد بر روی سطح محیط کشت قرار گرفت. برای اطمینان از تماس کامل دیسک با محیط کشت با نوک پنیس به دیسک اندکی فشار وارد شد (۸،۱۱).

پلیت های فوق به مدت ۱۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. لازم به ذکر است که در مورد هر جدایه حساسیت نسبت به ده آنتی بیوتیک آمپی سیلین، سفالوتین، آمیکاسین، جتتامایسین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، کوتریموکسازول، استرپتومایسین و تتراسایکلین در دو مرحله تعیین گردید.

پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد قطر منطقه عدم رشد میکروبی برای هر دیسک زیر چراغ مطالعه و با خط کش دقیق اندازه گیری و یادداشت گردید. این عمل در مورد هر یک از ۲۵ جدایه مورد مطالعه انجام گرفت.

در مرحله بعد هر یک از این ۲۵ جدایه به محیط مایع BHI منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۴۳/۵ درجه سانتیگراد مجدداً این جدایه ها را به روش مذکور در مرحله قبل به محیط مولر هیتون آگار منتقل و مجدداً از همان آنتی بیوتیک ها استفاده گردید و نتایج مربوط به آنتی بیوتیک های مورد استفاده برای

عفونت کیسه هوایی، سپتی سمی و آنتریت کلی باسیلوزی می گردد (۹،۱۴).

کلی باسیلوز در تمام پرندگان اهلی و در سنین مختلف بخصوص پرندگان جوان رخ می دهد و از علائم بارز بالینی این بیماری ناراحتی تنفسی می باشد (۲، ۷، ۱۴).

صدمات اقتصادی عفونت های حاصل از *E-coli* خصوصاً در صنعت طیور بسیار بالا بوده و سالانه هزینه زیادی صرف درمان بیماری های ناشی از آن با آنتی بیوتیک ها می شود با این وجود امروزه افزایش مقاومت نسبت به ترکیبات آنتی باکتریال، درمان این بیماری را با مشکل مواجه نموده است (۱۱،۱۲). لذا در این امر آزمایش آنتی بیوگرام بسیار با ارزش بوده و ضمن جلوگیری از مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها، باعث کاهش هزینه های درمان عفونت های ناشی از *E-coli* می شود.

به طور کلی مقاومت باکتری ها در مقابل داروها را به دو دسته با منشاء غیر ژنتیکی و ژنتیکی تقسیم می کنند، که در منشاء ژنتیکی مقاومت از طریق انتقال پلاسمیدهای R حائز اهمیت است (۸،۱۰) و از آنجائیکه بعضی از پلاسمیدها به حرارت حساس بوده و در حرارت نامطلوب از بین می روند (۱۰،۱۳)، در این تحقیق سعی شده است که امکان تغییر مقاومت در باکتری *E-coli* جدا شده از طیور نسبت به آنتی بیوتیک های رایج درمانی با استفاده از حرارت، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

در ابتدا بمنظور تأیید هویت ۲۵ جدایه اشریشیاکلی جدا شده از طیور، آنها را به محیط اختصاصی مکانکی آگار و سپس محیط های افتراقی خانواده آنرو باکتریاسه (MR-VP-SIM-TSI و سیترات هویت) انتقال داده و از هویت آنها اطمینان حاصل گردید.

سپس هر یک از این جدایه ها شماره گذاری شده

استرپتومايسين، تتراسيكلين بصورت جداول ۱ و ۲ می‌باشد. لازم به ذکر است که تعداد نمونه‌های آزمایش شده در هر دما ۲۵۰ عدد می‌باشد.

این جدول نتایج فراوانی مطلق و نسبی حساسیت اشریشیاکلی به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان می‌دهد. همانطوری که در جدول مشاهده می‌شود از ۲۵۰ نمونه مورد آزمایش ۵۳ عدد (۲۱/۲٪) نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده حساس بودند و تعداد ۸۶ عدد (۳۴/۴٪) از موارد آزمایش شده نیمه حساس و تعداد ۱۱۱ عدد (۴۴/۴٪) آنها به آنتی بیوتیک‌های فوق مقاوم بودند.

هر جدایه بدقت یادداشت گردید. با استفاده از جدول استاندارد، میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها به صورت حساس - نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش آنتی بیوگرام روی ۲۵ جدایه اشریشیاکلی در دو دمای ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد توسط آنتی بیوتیک‌های: آمپی سیلین، سفالوتین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، کوتریموکسازول،

جدول ۱ - تأثیر آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اشریشیاکلی بعد از انکوباسیون ۳۷ درجه

آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
آمپی سیلین	۴	۱۶	۱۲	۴۸	۹	۳۶
سفالوتین	۱	۴	۴	۱۶	۲۰	۸۰
آمیکاسین	۵	۲۰	۶	۲۴	۱۴	۵۶
جنتامایسین	۱۰	۴۰	۷	۲۸	۸	۳۲
سیپروفلوکساسین	۱۰	۴۰	۹	۳۶	۶	۲۴
کلرامفنیکل	۱۳	۵۲	۱۱	۴۴	۱	۴
اریترومایسین	۰	۰	۲	۸	۲۳	۹۲
کوتریموکسازول	۸	۳۲	۱۳	۵۲	۴	۱۶
استرپتومايسين	۰	۰	۱۲	۴۸	۱۳	۵۲
تتراسيكلين	۲	۸	۱۰	۴۰	۱۳	۵۲

جدول ۲ - تأثیر آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اشریشیاکلی بعد از انکوباسیون ۴۳/۵ درجه

آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
آمپی سیلین	۲	۸	۱۳	۵۲	۱۰	۴۰
سفالوتین	۱	۴	۳	۱۲	۲۱	۸۴
آمیکاسین	۴	۱۶	۷	۲۸	۱۴	۵۶
جنتامایسین	۹	۳۶	۸	۳۲	۸	۳۲
سیپروفلوکساسین	۹	۳۶	۱۰	۴۰	۶	۲۴
کلرامفنیکل	۱۴	۵۶	۱۰	۴۰	۱	۴
اریترومایسین	۱	۴	۱	۴	۲۳	۹۲
کوتریموکسازول	۷	۲۸	۱۳	۵۲	۵	۲۰
استرپتومايسين	۰	۰	۱۲	۴۸	۱۳	۵۲
تتراسيكلين	۱	۴	۱۱	۴۴	۱۳	۵۲

مؤثری در جهت تعیین داروی مناسب‌تر و جلوگیری گسترش مقاومت باکتریایی باشد (۲،۷).

این موضوع بخصوص در مورد باکتریهای مولد بیماری مشترک اهمیت فراوانی دارد. چرا که باکتری اشیریشیاکلی می‌تواند مقاومت را از طریق پلاسمید به باکتریهای دیگر نظیر سالمونلا انتقال دهد (۱۱، ۱۲).

از آنجایی که در اشیریشیاکلی به علت وجود پلاسمید-R مقاومت خارج کروموزومی و مقاومت چند تایی در برابر آنتی بیوتیکها دیده می‌شود (۹). بعنوان یک اصل کلی می‌بایست مبادرت به انجام آنتی بیوگرام نمود تا از طرفی مانع از مصرف بیهوده دارو شده و از طرف دیگر از بروز یا افزایش مقاومت باکتریایی جلوگیری به عمل آورد.

تاکنون پژوهشهای متعددی در رابطه با تعیین حساسیت اشیریشیاکلی ایزوله شده از طیور نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف در ایران انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به پژوهشهای انجام گرفته توسط پوربخش در ۱۳۶۹ و احمدی در ۱۳۸۴ در سطح مرغداریهای اطراف ارومیه اشاره نمود. نامبردگان میزان حساسیت اشیریشیاکلی را نسبت به جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل، کانامایسین، نئومایسین، تتراسیکلین و آمپی سیلین مورد بررسی قرار دادند و در نتیجه گیری کلی اشیریشیاکلی‌ها مورد آزمایش نسبت به داروهای جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل حساسیت بالایی داشته و نسبت به سایر آنتی بیوتیکها مقاومت کلی یا نسبی داشته‌اند (۳،۱).

در تحقیق پیغمبری و همکاران در ۱۳۸۴ در خصوص الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی جدایه‌های *Escherichia coli* از موارد کلی باسیلوز طیور، همه جدایه‌ها حساس به سفتیوفور و جنتامایسین بودند و درصد وقوع مقاومت به دیگر ۱۸ ترکیب آنتی باکتریال در بین جدایه‌ها به ترتیب عبارت بود از: نالیدیکسیک اسید ۹۸/۷ - اریترومایسین ۹۷/۳ - آمپی سیلین ۹۶/۷ - کلیستین ۹۶/۷ - تتراسیکلین ۹۴ -

این جدول نتایج عنوان شده در جدول شماره ۱ را این بار در دمای ۴۳/۵ درجه سانتیگراد نشان می‌دهد و داده‌های حاصل از آن بدین ترتیب بودند که از ۲۵۰ نمونه مورد آزمایش، ۴۸ عدد (۱۹/۲٪) حساس، ۸۸ عدد (۳۵/۲٪) نیمه حساس و ۱۱۴ عدد (۴۵/۶٪) به آنتی بیوتیک‌های فوق مقاوم بودند.

بطوریکه در جداول ۱ و ۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی در *E-coli* در دو دمای ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد مربوط به کلرامفنیکل (۵۲٪ و ۵۶٪) بوده و بالاترین مقاومت نسبت به اریترومایسین (۹۲٪) مشاهده شده است. همچنین در دو دمای انکوباسیون ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد، اختلاف بین موارد حساس ۲٪، بین موارد نیمه حساس ۱/۲٪ و بین موارد مقاوم نیز ۱/۲٪ می‌باشد و این امر حاکی از این مسئله است که تغییر محسوسی در نتایج حاصل از دو دمای انکوباسیون ایجاد نشده است.

بحث

امروزه تخمین زده می‌شود که در آمریکا تقریباً ۵۰٪ آنتی بیوتیکهای داده شده به حیوانات بدون حضور بیماری در آنهاست و خسارات ناشی از کاربرد بی رویه و نامناسب آنتی بیوتیک‌ها، گاهاً بیش از خسارات ناشی از خود بیماری است (۱۳).

مصرف بیش از حد و مداوم آنتی بیوتیکها در حیوانات مختلف سبب توسعه و گسترش تعداد و نوع مقاومتهای میکروبی در سویه‌های مقاوم شده است و این امر درمان بیماری در انسان و بهداشت عمومی را به خطر انداخته است. سویه‌هایی از اشیریشیاکلی که در آنها مقاومت ایجاد شده است، می‌توانند از حیوانات به انسان انتقال یابند. انتخاب نادرست آنتی بیوتیک مورد استفاده در درمان عفونتهای باکتریایی در دامها و طیور باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی و انتقال آنها به انسان می‌گردد. از این جهت آنتی بیوگرام می‌تواند کمک

آشکاری در حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد (۵). و این امر اینطور توجیه می‌شود که رپلیکون همانند سازی یا ناحیه Ori-R در پلاسمید نسبت به حرارت حساس است و در حرارت‌های بالا از همانند سازی پلاسمیدها جلوگیری می‌کند. در توجیه مغایرت نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه یاد شده نظریه‌های مختلفی می‌توان ارائه کرد که یکی از محتمل‌ترین این نظریات این می‌تواند باشد که به علت بالا بودن دمای فیزیولوژیک بدن طیور (۴۱ تا ۴۲ درجه سانتیگراد) پلاسمیدهای مربوط به طیور با این درجه حرارت تطابق حاصل کرده‌اند و این بدین منظور است که ناحیه Ori-R پلاسمید، مقاومت بیشتری به دمای مذکور (۴۳/۵ درجه سانتیگراد) پیدا کرده و همانند سازی پلاسمیدها در این دما متوقف نمی‌شود و بنابراین نظریه همانطوریکه انتظار می‌رفت، تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در معرض حرارت ۴۳/۵ درجه سانتیگراد مشاهده نشد.

منابع

- ۱- احمدی، م. (۱۳۸۴): مطالعه مقاومتهای دارویی قابل انتقال در اشریشیا کلی جدا شده از مرغداریهای منطقه ارومیه، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۶۰، شماره ۱، صفحه: ۷۱-۷۷
- ۲- اکبری، ع. (۱۳۶۸): راهنمای تشخیص بیماریهای باکتریایی طیور، انتشارات سپهر-صفحه: ۲۳
- ۳- پوربخش، ع. (۱۳۶۹): بررسی و تعیین سویه‌های بیماریزای اشریشیا کلی در مرغداریهای شهرستان ارومیه و تعیین میزان حساسیت آنها نسبت به آنتی بیوتیکها، پایان نامه جهت دریافت دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه شماره پایان نامه ۱۲۳، صفحه: ۵۷-۵۱

فلومکوئین ۹۲ - اکسی تتراسیکلین ۹۰/۷ - دیفلوکساسین ۸۴ - نیتروفورانئوئین ۸۱/۳ - فورازولیدن ۷۹/۳ - سولفامتوکسازول + تری متوپریم ۷۲/۶ - انروفلوکساسین ۶۶ - لینکوسپکتین ۶۴/۷ - نورفلوکساسین ۵۲/۷ - نئوماکسیم ۵۲ - کلرامفنیکل، ۴۶/۷ - سیپروفلوکساسین ۴۴ و استرپتوماکسیم ۲۶/۷ درصد(۴).

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر از ۲۵ مورد اشریشیاکلی جدا شده از لاشه طیور که آزمایش حساسیت نسبت به ده نوع آنتی بیوتیک مختلف در دو دمای ۳۷ و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد بر روی آنها انجام شده است می‌توان گفت:

در ۳۷ درجه سانتیگراد ۲۱/۲ درصد آنها نسبت به آنتی بیوتیکها حساس، ۳۴/۴ درصد نیمه حساس و ۴۴/۴ درصد موارد مقاوم بودند و در ۴۳/۵ درجه سانتیگراد ۱۹/۲ درصد حساس، ۳۵/۲ درصد نیمه حساس و ۴۵/۶ درصد آنها به آنتی بیوتیکها مقاوم بودند. با مقایسه نتایج فوق تغییر محسوسی در افزایش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیکها دیده نمی‌شود. در مطالعه مولانا و همکاران در ۱۳۸۵ در خصوص اثر حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد بر مقاومت باکتریهای استافیلوکوکوس و اشریشیا کلی جدا شده از موارد بیمارستانی، تغییرات مقاومت در اثر حرارت در *E-coli* نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، سفالوتین، آمیکاسین و جنتامایسین و کوتریماکسازول مشاهده شده است که تغییر حالت از مقاوم به حساس نسبت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، آمیکاسین و جنتامایسین قابل توجه بوده و علت را قرار داشتن عامل مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها بر روی پلاسمید حساس به حرارت اعلام داشته‌اند (۶).

در مطالعه مشابه که توسط کاکای افشار در ۱۳۸۴ بر روی جدایه‌های ایزوله شده از نشخوار کننده کوچک صورت گرفت ملاحظه گردیده است که تغییر دما از ۳۷ درجه سانتیگراد و ۴۳/۵ درجه سانتیگراد باعث افزایش

- 7- Calnek, B.W., (2000): Disease of poultry, 10th edition (Ames. Iowa State University Press USA) pp: 131-139.
- 8- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehman, S., Helmuth, R., (2003): phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry. J. Antimicrob. Chemother.52: 489-92
- 9- Jawetz, E., Melnick, J.K., Adelberg, E.A., (2004): Review of medical Microbiology. 19th ed. Lange Medical. plosaltos, California PP: 117-121.
- 10- Macuie, M.C., Cartney, M.C., (1999): Practical Medical Microbiology. PP:432-453.
- 11- Shane, S.M. (2001): Coliform infections are responsible for heavy losses, part one. World Poult. 17: 58-59.
- 12- Van-den-bogaard, A., London, N., Driessen, C., Stobbering, E., (2001): Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughters. J. Antimicrob. Chemother.47: 763-71
- 13- Wayner, D.D., (2001): Implications Of Multiple Antimicrobial Resistance Enterococci Associated With The Poultry, Food Additives and Contaminates. 18: 2-11
- 14- Wray, C., Davies R.H., (2002): Colibacillosis. In Poultry Diseases. Edited by F.T.W. Jordan, M. Pattison, D. Alexander, and T. Faragher. 5th ed. W.B. Saunders company, USA. pp: 123-130
- ۴- پیغمبری، س. حقیقی خوشخو، پ. (۱۳۸۴): الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی جدایه های Escherichia coli از موارد کلی باسیلوز طیور مجله تحقیقات دامپزشکی، سال شصتم، شماره ۲ (پیاپی ۲۳۸) صفحه: ۹۷-۱۰۵
- ۵- کاکای افشار، ا. (۱۳۸۴): بررسی اثر حرارت در مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها در اشرشیا کلی، پایان نامه جهت دریافت دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه شماره پایان نامه ۳۳۶، صفحه: ۶۶-۶۴
- ۶- مولانا، ز. شاهنده، ز. حاجی احمدی، م. (۱۳۸۵): بررسی اثر حرارت بر مقامت باکتریهای استافیلوکوکوس و اشرشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیکها، مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۴ صفحه: ۳۱-۲۶