

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

فاطمه دره گیرایی<sup>۱</sup>، بهار نیری فسایی<sup>۱\*</sup>، مسعود آل بویه<sup>۲</sup>

(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 وسیع الطیف وابسته به پلاسمید عامل اصلی مقاومت برخی باکتری‌ها مخصوصاً انتروباکتریاسه‌ها به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف 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 AmpC و ESBL در مدفوع طیور و کارگران طیور مربوطه می‌باشد. روش کار: در این مطالعه ۵۰۰ نمونه سواب کلوآک از جوجه‌های گوشتی مربوط به پنج مرغداری اطراف تهران و ۲۵ نمونه سواب 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 آنتی‌بیوتیک (طبق پیشنهادهای CLSI) تعیین گردید و برای تایید جدایه‌های ESBL از دو دیسک سفنازیدیم و سفنازیدیم-کالولانیک 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 CTX-M، TEM، SHV مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج: در مجموع ۴۶۷ جدایه اشریشیا کلی از ۸۷/۹٪ نمونه‌ها جدا گردید به طوری که 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. ۸۷/۶٪ 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 وسیع الطیف 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

حیوانات است و می‌تواند عامل اصلی عفونت‌های مهمی چون عفونت‌های گوارشی، خونی و دستگاه ادراری در انسان و همین‌طور عامل کلی باسیلوز در طیور باشد که باعث کاهش بازده گله‌ها و یا حتی تلفات سنگین در آنها می‌شود (۲۷، ۱۶، ۱۳). 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 آنتی‌بیوتیکی 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 حالی که

با توجه به این که سفالوسپورین‌ها نقش بسیار مهمی را در سلامت انسان به عهده دارند روند افزایشی مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف در انتروباکتریاسه‌ها باعث نگرانی‌های بسیاری در جوامع انسانی و دامی شده است. وقوع این نوع مقاومت‌ها عمدتاً با گسترش ژن‌های کد کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) و یا بتالاکتامازهای قابل انتقال AmpC مرتبط است. این بتالاکتامازها باعث مقاومت به اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها، آمینو پنی‌سلین‌ها می‌شوند با این تفاوت که ESBLs توسط اسید کالولانیک، 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



پلی‌مرز (PCR): جدایه‌های تأیید شده فنوتیپی ESBL از لحاظ حضور ژن‌های bla<sub>TEM</sub>، bla<sub>SHV</sub> و bla<sub>CTX-M</sub> 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 تولیدکننده AmpC:** سویه‌های دارای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل ۳ و سایر بتالاکتام‌های عمومی که توسط کلانولانیک 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 ۲۰ μL از مخلوط ۱:۱ سالین و Tric-EDTA ۱۰× 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 آنتی‌بیوتیک نمی‌باشد اما جدایه‌های AmpC مثبت باعث مهار این آنتی‌بیوتیک شده و رشد می‌کنند. از آنجاییکه EDTA مهارکننده سفالوسپورین‌های AmpC بوده بنابراین استفاده از دیسک‌های سفوکسیتین + EDTA به ترتیب با مهار ESBL و AmpC مانع از رشد جدایه‌های تولیدکننده ESBL و همچنین AmpC می‌گردد. به عبارت دیگر تشکیل هاله 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، ۸۷/۹٪ (۴۶۷ جدایه) شریشیا کلی جدا گردید که ۴۴۵ جدایه مربوط به طیور و ۲۲ جدایه مربوط به کارگران و ۹۸/۷٪ آنها لاکتوز مثبت بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام 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 شریشیا 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 نسل ۱، ۲، ۳ و ۴ مشاهده نگردید. فنوتیپ مقاومت ESBL در ۵/۵٪ (۲۶) جدایه‌های طیور تعیین گردید در حالیکه در بین هیچکدام

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 بتالاکتام‌های وسیع الطیف ESBL و AmpC هدف مطالعه قرار گرفتند.

## مواد و روش کار

**جمع‌آوری نمونه، کشت و جداسازی باکتری:** تعداد ۵۰۰ نمونه سوپا کلوآک از جوجه‌های گوشتی و ۲۵ نمونه سوپا 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 شریشیا کلی بر اساس مرفولوژی کلنی و تست‌های بیوشیمیایی تخمیر گلوکز، لاکتوز، تولید گاز، تولید اندول از تریپتوفان، واکنش ووگس-پروسکوئر (تولید استیل متیل کاربنول از دکستروز) بر روی محیط‌های SIM، TSI و MR-VP انجام گردید (۱۷).  
**تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** بررسی الگوی مقاومت دارویی باکتری‌های جدا شده به روش انتشار دیسک (روش کیربی-بوئر) توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسیکلین (۳۰ μg)، آمپی سیلین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، سفالوتین (۳۰ μg)، سفالکسین (۳۰ μg)، سفوکسیتین (۳۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg)، سفتری آکسون (۳۰ μg)، سفپییم (۳۰ μg) و مروینم (۱۰ μg) (شرکت پادتن طب، ایران) در محیط مولر هینتون آگار با استفاده از راهنمای استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI) انجام شد (۱۰). در این مطالعه از سویه شریشیا 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 چنددارویی (MDR) در نظر گرفته شدند.

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

**بررسی ژن‌های کدکننده ESBL با استفاده از واکنش زنجیره‌ای**



جدول ۱. پرایمرها و شرایط PCR جهت غربالگری ژنهای ESBL.

پرایمر	سکانس	اندازه آمپلیکون (bp)	منبع	شرایط PCR
TEM	F: 5'-TCAACATTTCGGTGTGCG3' R: 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA3'	۸۶۰	Iroha et al. (۱۱)	یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۴-°C - ۳۰ سیکل ۱ دقیقه در ۹۴-°C، ۳۰ ثانیه در ۶۱-°C، ۴۰ ثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۵ دقیقه در ۷۲ °C
CTX-M	F: 5'-GAGTTTCCCCATTCCGTTTC3' R: 5'-CAGAATAAGGAATCCCATGGTT3'	۸۸۰	Hamidian et al. (۸)	یک سیکل ۴ دقیقه در ۹۴-°C - ۴۰ سیکل ۱ دقیقه در ۹۴-°C، ۳۰ ثانیه در ۶۱-°C، ۴۰ ثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C
SHV	F: 5'-GAGTTTCCCCATTCCGTTTC3' R: 5'-CAGAATAAGGAATCCCATGGTT3'	۸۵۴	Kiiru et al. (۱۴)	یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۴-°C - ۳۵ سیکل ۱ دقیقه در ۹۴-°C، ۳۰ ثانیه در ۶۱-°C، ۵۰ ثانیه در ۷۲ و یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ °C

بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیا کلی روده‌ای در گله‌های طیور گوشتی ایران با یک روند صعودی در حال افزایش است 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 اشریشیا کلی فلور روده آنها انجام می‌گیرد. در مطالعه‌ای که توسط Cho و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کره انجام گردید میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی مربوط به کارگران گله‌های طیور بیش از کارگران رستوران‌ها گزارش گردید علاوه بر آن فراوانی جدایه‌های MDR نیز در کارگران طیور بیشتر بود. غالب ترین الگوی مقاومت تعیین شده در جدایه‌های اشریشیا کلی روده‌ای مربوط به کارگران مطالعه مذکور تتراسیکلین / آمپی سیلین بود (۶) در حالیکه در مطالعه حاضر تتراسیکلین / آمپی سیلین / 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 زیر دوز درمانی آنتی بیوتیک در آب و خوراک طیور باعث از بین رفتن باکتری‌های حساس و تسلط باکتری‌های مقاوم در فلور میکروبی روده طیور می‌شود به طوری که این باکتری‌های مقاوم از طریق مدفوع طیور در سطح بستر پراکنده شده و به صورت آئروسول‌های 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 پرورش طیور با تأثیر منفی بر روی تهویه امکان نگهداری جدایه‌های مقاوم در مرغداری را به صورت فزاینده‌ای افزایش می‌دهد که این مسئله می‌تواند انتقال و انتشار آنها را در بین گله و به کارگران تسهیل کند (۶).

در این مطالعه جدایه‌های اشریشیا کلی نمونه‌های طیور مقاومت آمینوگلیکوزیدی و کینولونی بیشتری نسبت به کارگران نشان دادند در حالیکه در هر دو گروه مقاومت بسیار بالا به سفالوسپورین‌های نسل ۱، ۲، ۳ و ۴ مشاهده نگردید. مقاومت دارویی مشکل عظیمی در سراسر جهان

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

## بحث

در این مطالعه فراوانی مقاومت نسبتاً بالایی علیه آنتی بیوتیک‌های اریترومايسين، تتراسیکلین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل برای جدایه‌های طیور تعیین شد که بر اساس بسیاری از مطالعات می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در طیور باشد (۱۵).

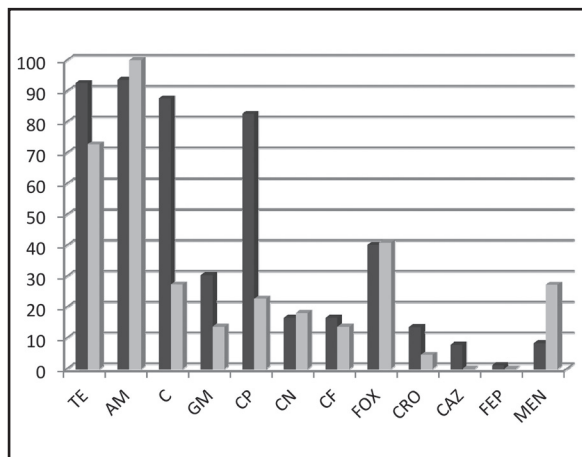
مطالعات در زمینه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در گله‌های سالم طیور در ایران بسیار محدود است اما در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Tabatabaei و همکاران در آذربایجان غربی انجام گردید (۲۶) مقاومت به آمپی سیلین در جدایه‌های اشریشیا کلی مدفوعی طیور بیش از مطالعه حاضر گزارش گردید. Zahraei Salehi در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای بر روی طیور مبتلا به کلی سیتی سمی مقاومت بالایی را علیه تتراسیکلین (۹۴٪)، سیپروفلوکساسین (۶۷٪) کلرامفنیکل (۶۷٪) / آمپی سیلین (۴۷٪) نشان داد در حالیکه هیچ مقاومتی نسبت به جنتامایسین دیده نشد و مقاومت به سفالوسپورین‌ها 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 معنی دار مقاومت در طول زمان علیه آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها، پنی سیلین‌ها، فنیکل‌ها و کوئینولون‌ها است.

در مطالعه‌ای که Rahimi در سال ۲۰۱۳ در گله‌های درگیر با کلی باسیلوز کرمانشاه 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 معنی دار جدایه‌های با مقاومت چندگانه اشاره نمود. در واقع مقاومت آنتی



است که می‌تواند یک عامل مهم در گسترش عفونت باشد. ممکن است مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک بروز سویه‌های MDR را افزایش دهند که این می‌تواند یک تهدید جدی باشد (۱). در مطالعه حاضر فراوانی فنوتیپ MDR در جدایه‌های اشریشیاکلی 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 اشریشیاکلی مدفوعی طیور مورد مطالعه را واجد مقاومت چندگانه MDR گزارش کرد در حالیکه مقاومت به تتراسیکلین، آمپی‌سیلین، 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 کدکننده آنزیم‌های ESBL و AmpC است. در سال ۲۰۰۸ Smet و همکاران حضور جدایه‌های اشریشیاکلی 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 تولیدکننده 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 سال ۲۰۰۶ حضور جدایه‌های مثبت برای ESBL و AmpC در طیور نشان داده شد که البته فراوانی جدایه‌های تولیدکننده ESBL تقریباً چهار برابر بیشتر از جدایه‌های AmpC مثبت بود (۴). Randall در سال ۲۰۱۰ در بریتانیا از جدایه‌های اشریشیاکلی 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 اشریشیاکلی طیور ۶۱٪ نشان داد به طوری که 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 به طوری که 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 طوری که 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 TEM و CTX-M به ترتیب با فراوانی ۶۰٪ و ۲۰٪ تعیین گردیدند (۲۴). حضور ۵/۴٪ جدایه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده ESBL در مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتیجه ۵/۷٪ در بلژیک و ۴۳/۷٪ در عراق نشان از پایین بودن فراوانی این بتالاکتامها در گله‌های ایران دارد اما با توجه به اینکه بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف مخصوصاً سفالوسپورین‌ها



نمودار ۱. درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی 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: سفنازیدیم، FEP: سفیپم، MEN: مروپم. ■ کارگر ■ طیور



تصویر ۱. تست تایید فنوتیپی ESBL جدایه‌های اشریشیاکلی مدفوعی طیور با استفاده از دیسک‌های سفنازیدیم (CAZ۲۰) و سفنازیدیم-کلاولانیک (CAZ+C).



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



### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه مسئولین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مخصوصاً سرکار خانم الهه تاج‌الدین و همچنین آقای دکتر داریوش کاظمی معاون شبکه 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., Usui, 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

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

در واقع حضور جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم واجد ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ESBL و AmpC به همراه ژن‌های مقاومت به دیگر خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی مخصوصاً آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها در دستگاه گوارش طیور فلور روده را به مخزنی 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 پرخطر برای جوامع انسانی و دامی نقش جدی و مهمی در شیوع اپیدمی‌ها داشته باشد.

کارباپنم‌ها بتالاکتام‌های منحصر به فردی هستند که در برابر هیدرولیز شدن توسط بیشتر بتالاکتامازها مقاوم‌اند و در بسیاری از موارد به عنوان مهارکننده‌های 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 - last resort therapy علیه بسیاری از باکتری‌های گرم منفی نام برده می‌شود (۳۱، ۱۸، ۳). Hasan. در سال ۲۰۱۲ هیچ‌گونه مقاومتی را علیه کارباپنم‌ها در جدایه‌های اشریشیاکلی طیور بنگلادش گزارش نکرد (۹) در حالیکه در مطالعه حاضر فراوانی مقاومت ۸/۳٪ علیه مروپنم به عنوان یک کارباپنم مشاهده گردید. براساس گزارش سال ۲۰۱۳ انجمن ایمنی اروپا (EFSA) در آلمان و چین جدایه‌هایی از اشریشیاکلی 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 انتشار سویه‌های مقاوم به کارباپنم در حیوانات اهلی در پی داشت (۳). بنابراین تعیین حضور سویه‌های مقاوم به کارباپنم در برخی مرغدارهای ایران توسط مطالعه حاضر، انجام مطالعات دقیق‌تر را جهت شناسایی دلایل گسترش آن در میان طیور خاطر نشان می‌نماید.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج موید حضور سویه‌های کدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در میان سویه‌های رودهای اشریشیاکلی گله‌های گوشتی طیور در ایران است. با وجود اینکه فنوتیپ ESBL و AmpC فراوانی پایینی را در بین جدایه‌های طیور نشان داد اما می‌تواند به عنوان زنگ خطر جدی برای ایجاد مقاومت‌های وسیع و چندگانه و انتشار آنها بین انسان و طیور مطرح باشد. زیرا ژن‌های کدکننده این مقاومت‌ها قابل انتقال به سایر سویه‌ها و گونه‌های باکتریایی در جامعه می‌باشند لذا کنترل انتشار آنها به سایر گله‌ها و افراد مصرف‌کننده آنها ضروری است. مسئله دیگری که به عنوان خطری جدی در ارتباط با بهداشت عمومی قابل تامل به نظر می‌رسد حضور جدایه‌های اشریشیاکلی واجد کارباپنماز در سطح گله‌های گوشتی و انتقال مقاومت از طریق زنجیره غذایی (آلودگی مدفوعی گوشت طیور در کشتارگاه) به سطح جامعه انسانی می‌باشد.



- 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  $\beta$ -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 Standards 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  $\beta$ -lactamase phenotypes and carriage of selected  $\beta$ -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. Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, 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., 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: 2924-2932.
  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  $\beta$ -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.
- Smet, A., Marte, A., Persoons, D., Jeroen Dewulf, 25. 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., Mekarizade, 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 beta-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 beta-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 $\beta$ -lactamases (ESBLs) enzymes in poultry and workers from aviculture around Tehran

Doregiraee, F.<sup>1</sup>, Nayeri Fasaei, B.<sup>1\*</sup>, Alebouyeh, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>2</sup>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  $\beta$ -lactabases are the main factors of resistance to extended-spectrum cephalosporins in enterobacteriaceae 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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: cephalixin; 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

