دوفصلنامه‌ی علمی تخصصی"هیستوبیولوژی دامپزشکی"
دوره هشتم، شماره اول، بهار و تابستان ۹۹

شناسایی مولکولی ژنهای مقاومت نسبت به کینولون ها aac(6')-ib-cr و qnrS و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از طیور تخمگذار استان آذربایجان شرقی

عبدالرحمان محمدی[۱]، حسین نیک پیران*[۲]، یونس انزابی[۳]
۱گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۳ استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

چکیده

استفاده از آنتی بیوتیک ها در بحث درمان سالمونلوزیس هم در دامپزشکی و هم در پزشکی از جایگاه ویژه ای برخوردار است. به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها در بحث درمانی مقاومت به این عوامل در بین باکتری ها افزایش یافته است. هدف این مطالعه بررسی حضور ژن های مقاومت به کینولون ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا های جدا شده از طیور تخم گذار می باشد. بدین منظور در بازه زمانی حدودا سه ماهه در سال ۱۳۹۷ از ۲۰ مورد از گله مرغ های تخم گذار ارجاعی از مزارع مختلف با علائم درگیری با سالمونلا نمونه برداری گردید. جهت شناسایی جدایه ها از آزمایش های بیوشیمیایی و جهت تعیین سروتیپ از روش کافمن وایت جهت شناسایی آنتی ژن سوماتیک O و تاژک Hاستفاده شد. بعد از تعیین سروتیپ، در محیط مولر هینتون آگار تست آنتی بیوگرام با استفاده از دیسک های انروفلوکساسین و دانوفلوکساسین انجام گردید. بعد از تعیین ژن های مقاومت qnrs و aac(6’)-ib-cr پرایمر های مربوطه طراحی گردید. ژن های باکتری به روش جوشاندن استخراج و به کمک روش PCR حضور ژن ارزیابی شد. نمونه های مثبت نشانگر حضور ژن های مقاومت به کینولون ها در سالمونلا های جدا شده از طیور تخم گذار استان می باشد. یافته این پژوهش نشانگر خطر مقاومت در گله های استان بوده و اهمیت پرداختن به این مساله را توسط مسئولین بهداشت کشور نمایان می کند

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، مقاومت ژنتیکی،آنتی بیوگرام، آذربایجان شرقی

مقدمه

باکتری های جنس سالمونلا عامل بیماریهای مزمن و حاد مختلفی در طیور می باشد که به دلیل بحث بیماری های مشترک با انسان از اهمیت بالاتری برخوردار می باشند. سالانه هزینه های فراوانی در بحث کنترل و درمان بیماری های مربوط به این گونه باکتریایی صرف می گردد. استفاده از آنتی بیوتیک ها در بحث درمان سالمونلوزیس هم در دامپزشکی و هم در پزشکی از جایگاه ویژه ای برخوردار است. در دامپزشکی طیور عفونت‌های ایجاد شده توسط دو سرووار عادت‌یافته به میزبان، یعنی سالمونلا پلوروم (عامل بیماری پلوروم) و سالمونلا گالیناروم (عامل بیماری تیفوئید ماکیان) و همچنین بیماری ناشی از تحت‌گونه آریزونه ، به طور جداگانه از عفونت‌های ایجاد شده توسط سایر سروارها (بیماری سالمونلوز یا پاراتیفوئید) مورد بحث قرار می‌گیرد. جدول کافمن - وایت مخصوص طبقه‌بندی سروارهای سالمونلا است. اساس گروه‌بندی سالمونلا در این جدول ویژگی‌های پادگن سوماتیکی (O) و تاژکی(H) است. سروارهای عادت‌یافته به میزبان، یعنی سالمونلا پلوروم و سالمونلا گالیناروم، غیرمتحرک و فاقد پادگنH هستند (۱۰).

بیماری پلوروم و تیفوئید مرغان از لحاظ تاریخچه، علایم بالینی، آسیب و فرآیند کنترل و نیز ریشه کنی شباهت های فرآوانی با یکدیگر دارند. بیماری پلوروم و تیفوئید مرغان به صورت اولیه مرغ و بوقلمون را درگیر می نماید لیکن سایر پرندگان چون بلدرچین، اردک، قرقاول، طاووس و مرغ شاخدار نیز حساس می باشند. هر دو عامل هم از طریق انتقال تخمدانی و هم از طریق انتقال عمودی توانایی انتقال دارند. این سرواره اختصاصی میزبان بوده و به ندرت در میزبان غیر از پرندگان بیماری کلینیکی ایجاد می کنند. سالمونلا گالیناروم و پلوروم به ندرت از انسان نیز جداسازی گردیده است ولی از نظر بهداشت عمومی از اهمیت کمتری نسبت به پاراتیفوئیدها برخوردار است (۹).

مصرف آنتی بیوتیک ها در صنعت طیور جهت پیشگیری، درمان، افزایش رشد و به دنبال آن افزایش تولید کاربرد دارد. مصرف این آنتی بیوتیک ها سبب بروز مقاومت ژنتیکی در سویه های پاتوژن و نیز سالمونلاها گردیده است. کسب دانش و آمار کافی از مقاومت آنتی بیوتیکی در یک منطقه همواره در تعیین استراتژی های درمانی نقش بسیار مهمی داشته است (۲و۹،۱۰) . هدف مطالعه حاضر تعیین الگوی مقاومت باکتریایی نسبت به کینولون ها و تعیین حضور ژن مقاومت کینولون (aac(6')-ib-cr و qnrS) می باشد.

مواد و روش کار

جهت اجرای مطالعه در یک بازه زمانی حدود سه ماهه در سال ۱۳۹۷ از ۳۹ مورد از موارد مرغ های تخمگذار با علائم مربوط به سالمونلا ارجاعی از مزارع مختلف به کلینیک تخصصی طیور نمونه برداری شد. علائم بالینی مشاهده شده شامل کبد، طحال و کلیه های بزرگ و واجد احتقان، کبد با نقاط سفید روی آن و رنگ سبز مسی، پریکاردیت با اکسودای زرد سروزی یا فیبرینی، فولیکول کیستیک و ندولار، افزایش ضخامت کپسول تخمک ها با محتویات چربی و پنیری مانند، تخمک گذاری داخل محوطه بطنی، پریتونیت فیبرینی و پری هپاتیت و گرانولومای پنیری در ریه و کیسه های هوایی می باشد. نمونه برداری در شرایط استریل از کبد، طحال، تخمدان و مدفوع بود.

پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه در محیط کشت انتخابی سالمونلا (سالمونلا شیگلا آگار) کشت گردیده و سپس در محیط های افتراقی TSI agar و لیزین آیرون آگار LIA agar نیز کشت انجام و آزمایش ONPGجهت بررسی حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز نیز به عمل آمد. تعیین هویت سالمونلا بر اساس آزمایشات رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی و تخمیر قند، مشخص گردید. جهت انجام کشت آنتی بیوگرام از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک های شرکت پادتن طب استفاده گردید. جهت کشت از غلظت نیم مکفارلند استفاده شد. در این مطالعه انروفلوکساسین و دانوفل.کساسین به عنوان آنتی بیوتیک های کینولون انتخاب گردیدند. از سوش های ATCC13076 و ATCC14028 سالمونلا جهت کنترل کیفی مراحل آزمایش استفاده گردید.

روش استخراج DNA

بدین منظور از روش جوشاندن استفاده گردید .مقدار ۱۰۰ میکرولیتراز نمونه و یا کنترل در شرایط کاملاً استریل به لوله اپندرف وارد گردیده و سر آن بسته شد و در حرارت آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در پایان لوله در دور۱۰۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت مربوطه در شرایط استریل در دو لوله دیگر وارد و یکی جهت اندازه گیری محتوایDNA نمونه و دیگری به عنوان الگو برایPCR مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی محتوی DNA از نانودراپ استفاده گردید. نانودراپ از یک نمونه یک میکرولیتری به مدت ۱۵ ثانیه انجام گردید.

واکنش زنجیرهای پلی مراز

در این مطالعه، واکنش زنجیرهای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر PCR Buffer 10X، یک میکرولیتر MgCl2، ۱ میکرولیترdNTPs ، ۰,۸ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۰,۲۵ میکرولیتر از polymerase DNA Taq و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام گرفت. برنامه حرارتی جهت انجام واکنشهای PCRعبارت اند از: واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل هرکدام شامل واسرشت سازی ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، الحاق ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه. محصوالت PCR در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردیده و توسط ژل داک USA, BIORAD مشاهده شد.

در این مطالعه جهت طراحی پرایمر از نرم افزار ۳ پرایم استفاده گردید .پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه شامل موارد زیر می باشد:

پرایمر ژن qnrS

F: 5′-ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA-3′

R: 5′-TTA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3′

پرایمر ژن aac(6')-ib-cr

F: 5'-ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA -3’

R: 5'-TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3′

جدول۱: مراحل واکنش زنجیرهای پلی مراز در ترموسایکلر

مراحل	دما C °	زمان به دقیقه (min)	تعداد سیکل
Initial Denaturation	94	10:00	1
Denaturation	94	1:00	30
Annealing	52	1:00	30
Elongation	72	1:00	30
Final Extension	72	7:00	1

تحلیل آماری

داده های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و با استفاده از آزمونهای آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی حساسیت به انروفلوکساسین به روش دیسک گذاری، نشان داد ۶ مورد (۱۵,۳۸٪)جدایه از ۳۹ مورد به انروفلوکساسین حساس بوده اند،۲۱ مورد (۵۳,۸۴٪)مقاومت متوسط و ۱۲ مورد (۳۰,۷۶٪) مقاوم بودند. نتایج حاصل از بررسی حساسیت به دانوفلوکساسین نشانگر ۳۳ مورد (۸۴,۶۱٪) جدایه از ۳۹ مورد به دانوفلوکساسین حساس بوده اند، ۱ مورد (۲,۵۶٪) مقاومت متوسط و ۵ مورد (۱۲,۸۲٪) مقاوم بودند.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از آنتی بیوگرام جدایه های مختلف سالمونلا گالیناروم از گله های تخم گذار تجاری استان آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۷

نوع آنتی بیوتیک	حساسیت					
	حساس		مقاومت متوسط		مقاوم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
انروفلوکساسین	۶	٪۱۵,۳۸	۲۱	٪۵۳,۸۴	۱۲	٪۳۰,۷۶
دانوفلوکساسین	۳۳	٪۸۴,۶۱	۱	٪۲,۵۶	۵	٪۱۲,۸۲

نتایج حاصل از بررسی ژن qnrS نشانگر حضور ۱۰ درصدی این ژن بین کل نمونه های جدا شده سالمونلا گالیناروم و در بررسی ژن aac(6′)-ib-cr نشانگر حضور ۱۲ درصدی در جدایه های سالمونلا گالیناروم جدا شده از مرغ های تخم گذار تجاری استان آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۷ می باشد.

بحث

نتایج پژوهش امیرمظفری و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که ۱۹٪ تخم مرغ های صنعتی و ۴ ٪ تخم مرغ های محلی آلوده به سالمونلا بوده اند (۱). همچنین نتایج این پژوهشگران نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین، نالیدیکسیک اسید، سولفامتاکسازول و بیشترین حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین، سفالکسین، و جنتامایسین وجود دارد (۱).

میزان حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک aac (6')-ib-cr و qnrS در نمونه های مورد آزمایش در کشور مصر به ترتیب ۱۰ و ۱۵ درصد بود. همچنین نتایج نشان داد که ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک بطور گسترده ای در جدایه های سالمونلا طیور وجود دارد (۷). نتایج پژوهشگران نشان داد که سالمونلا در طیور تخمگذار در ۳۷/۵ درصد نمونه ها از کبد، ۳۳/۳ درصد از سکوم، ۲۰/۸ درصد از تخمدان، و ۸/۳ درصد از قلب جدا شده است (۷).

نتایج پژوهشگران نشان داد که ۱۰۰ درصد از جدایه های سالمونلا ها به فلورفنیکل و استرپتومایسیت حساس بودند و ۵۸ درصد به نالیدیکسیک اسید حساس بودند (۳). در یک مطالعه دیگر فلورفنیکل بهترین آنتی بیوتیک برای درمان سالمونلا معرفی شد (۸).

نتایج یک تحقیق نشان داد که ۳/۲ درصد جدایه های سالمونلا دارای ژن qnrS بودند اما هیچ یک از جدایه ها ژن aac(6')-ib-cr را نداشتند (۶) نتایج یک تحقیق مشخص نمود که ژن مقاومت aac(6')-ib-cr و qnrS در جدایه های سالمونلا به ترتیب ۲۰/۲ و ۱/۶ درصد بود (۴).

در مطالعه امیدوارپناه و همکاران در سال ۱۳۹۷ نتایج نشان داد که مهمترین عوامل موثر در بروز مقاومت علیه فلوروکینولون ها پروتئینaac(6')-ib-cr ،پمپ پروتئینی qepA و پروتئینهای qnr می باشد(۹). نتایج مطالعه امیدوار پناه با مطالعه ای که توسط ما انجام گردید مطابقت دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کلیه اشخاصی که مارا در اجرای این پایان نامه و مطالعه یاری نموده اند قدردانی می کنیم.

منابع:

1. Amirmozaffari, N., Rahmani, Z. and Iesazadeh, K. 2013. Evaluation of the Level of Contamination with Salmonella Spp. In Red Meat, Chicken, and Domestic and Industrial Eggs Produced in Talesh City and Assessment of Their Antibiotic Resistance Pattern, Iran. Qom Univ Med Sci J 7(5): 60-65.
2. Angulo, F. J., Collignon, P., Powers, J. H., Chiller, T. M., Aidara-Kane, A. and Aarestrup, F. M. 2009. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. Clinical infectious diseases 49(1): 132-141.
3. Habrun, B., Simpraga, B., Kompes, G. and Krstulovic, F. 2012. Antimicrobial Resistance and Serotyping of Salmonella Enteric Subsp. Enterica Isolated from Poultry in Croatia. Veterinarski Arhiv 4(82): 371-381.
4. Hao, H., Yang, B., Shi, J., Xi, M., Wang, X., Cui, Y., et al. (2011): Drug Resistance and Related Genes of Chickenborne Salmonella to Quinolone and Fluoroquinolones. Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica 51(10): 1413-1420.
5. Jafari, R., Ghorbanpour, M. and Jaideri, A. 2007. An Investigation into Salmonella Infection Status in Backyard Chickens in Iran. Int J Poult Sci 6(3): 227-229.
6. Kim, J. H., Cho, J. K. and Kim, K. S. 2013. Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Salmonella Isolated from Poultry in Korea. Avian Pathology 42(3): 221-229.
7. Lebdah, M. A., Mohammed, W. M., Eid, S. and Hamed, R. I. 2017. Molecular Detection of Some Antimicrobial Resistance Genes in Salmonella Species Isolated from Commercial Layers in Egypt. Zagazig Veterinary Journal (Zag. Vet. J.) 45(1).
8. Okamoto, A., Andreatti Filho, R., Rocha, T., Menconi, A. and Marietto-Gonçalves, G. 2009. Detection and Transfer of Antimicrobial Resistance Gene Integron in Salmonella Enteritidis Derived from Avian Material. Revista Brasileira de Ciência Avícola 11(3): 195-201.
9. Omidvar Panah, M. Najafi, A. Peymani. 2018. Plasmid-mediated quinolones resistance in clinically important bacteria. Medical Microbiology.
10. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V.L., 2013. Diseases of poultry. 13th ed. Wiley-Blackwell. USA.

Molecular Identification of Quinolone Resistance Genes (aac (6 ') - ib-cr and qnrS) and Determination of Antibiotic Resistance Pattern of Salmonella Isolated from Laying Poultry of East Azarbaijan Province

Abstract:

The use of antibiotics in the treatment of salmonellosis is of particular interest both in veterinary medicine and in medicine. Due to the widespread use of antibiotics in the therapeutic debate, resistance to these agents has increased among bacteria. The aim of this study was to evaluate the presence of quinolone resistance genes and to determine the antibiotic resistance pattern of Salmonella isolates from laying poultry. For this purpose, in a period of approximately three months in 1977, 20 cases of reference laying hens were sampled from different farms with symptoms of Salmonella. Biochemical tests were used to identify the isolates and to determine the serotype by the Kauffman White method for the identification of somatic O antigen and flagella H. After serotyping in the Muller Hinton Agar environment, antibiogram tests were performed using the disks of Enrofloxacin and Danofloxacin. After determination of qnrs and aac (6 ') - ib-cr resistance genes, the respective primers were designed. Bacterial genes were extracted by boiling and the presence of the genes was evaluated by PCR. Positive samples indicate the presence of quinolone resistance genes in Salmonella isolates from laying poultry. The findings of this study indicate the risk of resistance in herds in the province and highlight the importance of addressing this issue by national health authorities.

Keywords: Salmonella, Genetic resistance, Antibiogram, East Azarbaijan