بررسی مقاومت به کولیستین و آمینوگلیکوزیدها در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور گوشتی استان گیلان

زهره پورحسین، لیلا اسدپور*، هادی حبیب‌الهی، سیده‌طوبی شفیقی

گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

دریافت مقاله: ۲۳ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۰۹ اردیبهشت ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۳ خرداد ۱۴۰۲

چکیده

گوشت مرغ، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی در جهان، میزان بالایی از آلودگی به اشریشیاکلی را نشان می‌دهد، که می‌تواند به‌طور گسترده‌ای مقاومت آنتی‌بیوتیکی را انتشار دهد. هدف از این مطالعه، بررسی مقاومت به کولیستین و آمینوگلیکوزیدها در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور گوشتی است. در این بررسی، ۱۲۲ جدایه اشریشیاکلی از قلب و کبد مرغ‌های ۲۰ تا ۴۵ روزه با علائم بالینی کلی‌باسیلوس در سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید. سویه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید وکولیستین به‌ترتیب توسط روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC شناسایی شدند. سپس حضور ژن‌های *mcr*-۱، *mcr*-۲، *mcr*-۳، *aph(3')- IIa*، *aac(3)-IIa* و *ant(3")-Ia* در جدایه‌ها به روش PCR بررسی گردید. از ۱۲۲جدایه مورد بررسی، ۳۵ جدایه (۲۸/۶۸ درصد) به نئومایسین سولفات، و ۱ جدایه (۰/۸۲ درصد) به جنتامایسین مقاوم بود. همه جدایه‌ها به آمیکاسین، توبرامایسین و استرپتومایسین حساسیت نشان دادند و ۵ جدایه (۴/۱۰ درصد) مقاوم به کولیستین بودند. در ردیابی ژن‌های *mcr* توسط روش PCR، هیچ‌یک از ژن‌های مورد بررسی شناسایی نشد اما ژن‌های *aph(3')- IIa*، *aac(3)-IIa* و *ant(3")-Ia* به‌ترتیب در ۲۵/۴۱، ۲۳/۷۷ و ۳۶/۸۸ درصد جدایه‌ها شناسایی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر کاهش حساسیت اشریشیاکلی‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی به آمینوگلیکوزید وکولیستین می‌باشد. گسترش این مقاومت‌ها هشدار جدی در زمینه کاهش گزینه‌های درمان کلی‌باسیلوس و خطر انتقال ژن‌های مقاومت به فلور میکروبی انسان می‌باشد.

واژگان کلیدی: *مقاومت آنتی‌بیوتیک، گوشت مرغ، اشریشیاکلی، طیورگوشتی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: l.asadpour@yahoo.com

مقدمه

کولیستین، یک آنتی‌بیوتیک پلی‌پپتیدی از خانواده پلی‌میکسین، با وزن مولکولی ۱۷۵۰ دالتون، متشکل از یک هپتاپپتید حلقوی با زنجیره جانبی تری‌پپتیدی است که در انتهای N دارای دم اسید چرب است. آبگریز بودن بخش N ترمینال قطعه اسید چرب مسئول ماهیت سمی آن است و تأثیر زیادی بر فعالیت ضد میکروبی کولیستین دارد (۱). این آنتی‌بیوتیک کاتیونی، به لیپید A لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی متصل می‌گردد و با جابجایی کاتیون‌هایی مانند Mg^{2+} و Ca^{2+} در غشای خارجی، یکپارچگی غشاء را مختل می‌کند و منجر به لیز سلولی می‌شود (۲). اگرچه چندین مکانیسم مولکولی در مقاومت به کولیستین مؤثر است، تغییراتی در پورین‌های غشای خارجی و کاهش بار منفی LPS، بیان بیش از حد سیستم‌های پمپ افلاکس، تولید بیش از حد پلی‌ساکارید کپسولی از جمله‌ی آنهاست. مقاومت کولیستین با واسطه پلاسمید نیز شناخته شده است که توسط ترانسفرازهای فسفو اتانول آمین به نام‌های *mcr* -۱، *mcr* -۲، *mcr*-۳ و *mcr*-۴ ایجاد می‌شود (۳، ۴).

در اواخر سال ۲۰۱۵، ژن *mcr* -۱ پلاسمیدی که یک فسفو اتانول آمین ترانسفراز را تحریک می‌کند و باعث ایجاد مقاومت در برابر پلی‌میکسین می‌شود، برای اولین بار در سویه‌های باکتریایی با منشأ حیوانی، شناسایی شد (۵). در بسیاری از کشورها کولیستین در دامپروری برای کنترل عفونت استفاده می‌شود، اما در انسان به دلیل سمیت کلیوی قابل توجهی که دارد به‌طور محدود مورد مصرف قرار می‌گیرد (۶).از آنجا که این آنتی‌بیوتیک به‌عنوان آخرین گزینه درمانی عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم‌منفی مقاوم به چند دارو استفاده می‌شود، ظهور جدایه‌های مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک مهم‌ترین نگرانی بهداشت عمومی در سال‌های اخیر است (۷). ارتباط بین اشریشیاکلی پاتوژن طیور(APEC) با اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژن انسان سبب بروز نگرانی در خصوص انتقال ژن‌های *mcr* جدایه‌های APEC مقاوم در برابر کولیستین به سویه‌های بالینی انسان گردید. بنابراین ارزیابی مقاومت مرتبط با حضور ژن *mcr* در APEC برای تعیین منابع بالقوه مهم در زنجیره غذایی انسان ضروری است (۸، ۹). آمینوگلیکوزیدها از نظر ساختاری، قند آمینی پلی‌کاتیونیک هستند که گروه‌های آمین در محیط‌های بیولوژیکی پروتون‌دار می‌شوند. مکانیسم فعالیت آمینوگلیکوزیدها شامل باند شدن به جایگاه A در 16SrRNAو مهار سنتز پروتئین‌هاست (۱۰). مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها از طریق مکانیسم‌های مختلفی چون اصلاح آنزیمی، نفوذناپذیری، فعالیت پمپ‌های افلاکس، تشکیل بیوفیلم و فعالیت متیلازهای 16SrRNA رخ می‌دهد. در میان این مکانیسم‌ها ،غیر فعال کردن داروها توسط آنزیم‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید (AMEs) رایج‌ترین است. AME ها مجموعه متنوعی از سه خانواده: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (aac) ، آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز (ant) و آمینوگلیکوزید فسفوریل ترانسفراز (aph) است (۱۱، ۱۲). ژن *aph(3') – IIa* مقاومت در برابر کانامایسین و نئومایسین، *aac(3) -IIa* مقاومت به جنتامایسین، توبرامایسین و نتلمایسین را ایجاد می‌کند، (*ant(3''* مقاومت در برابرکانامایسین، استرپتومایسین و -*aac(6')Ib*مقاومت در برابر کانامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین و نتیلمیسین را رمزدهی می‌کند (۱۳).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: این مطالعه در سال ۱۴۰۰، بر روی جوجه‌های گوشتی۲۰ تا ۴۵ روزه با علائم بالینی کلی‌باسیلوز در استان گیلان انجام پذیرفت. نمونه‌ها از قلب و کبد جوجه‌های گوشتی بیمار جمع‌آوری شد.

جداسازی و شناسایی باکتری اشریشیاکلی: نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های کشت آگار مکانکی و آگار EMB کشت داده شدند. سپس کلونی‌های لاکتوز مثبت رشد کرده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شامل بررسی تولید اندول، واکنش متیل رد، واکنش وژ پروسکوئر، تولید اوره‌آز، مصرف سیترات، تخمیر

گلوکز و دکربوکسیلایون ارنیتین و لیزین تعیین هویت گردیدند (۱۴).

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: الگوی حساسیت و مقاومت اشریشیاکلی‌های جداسازی شده، به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی آمیکاسین، جنتامایسین، نئومایسین سولفات، توبرامایسین و استرپتومایسین با روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تعیین و قطر هاله عدم رشد با توجه به پروتکل CLSI VET01-A4(2018) مشخص گردید. مقاومت به کولیستین نیز با تعیین MIC این آنتی‌بیوتیک به روش براث میکرودایلوشن تعیین شد.

بررسی حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌ها: برای بررسی حضور ژن‌های پلاسمیدی کدکننده مقاومت به کولیستین و ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی، DNA جدایه‌های اشریشیاکلی توسط کیت استخراج DNA از باکتری (شرکت پیشگامان انتقال ژن)، استخراج شد. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ۱- *mcr*-۲،*mcr*-۳، *mcr*، *aph(3')- IIa*، *aac(3)-IIa* و *ant(3'')-Ia* توسط شرکت متابیون آلمان طبق توالی ذکر شده در جدول ۱ سنتز گردید (۱۶-۱۴). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل dNTPs (۱۰ میلی‌مول) ۰/۵ میکرولیتر، بافر آنزیم (10X) ۵ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ پیکومول) ۳ میکرولیتر، DNA الگو (۲ میکروگرم) ۲ میکرولیتر، آنزیم (۲/۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر و آب مقطر به میزان ۱۴ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. پس از آن، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشته شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر طبق دماهای ذکر شده در جدول ۱، به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن رشته هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طویل شدن نهایی اضافه گردید و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکترو فورز و با تعیین توالی صحت آن تایید گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول (bp)	دمای اتصال(C)	منبع
mcr-1-F	5′-GCTCGGTCAGTCCGTTTGTTCTTG-3'	۱۴۹۷	۵۵	۱۵
mcr-1-R	5′-GGATGAATGCGGTGCGGTCTT-3'			
mcr-2-F	5′-AGCCGAGTCTAAGGACTTGATGAATTTG-3′	۵۷۶	۵۵	۱۵
mcr-2-R	5′-GCGGTATCGACATCATAGTCATCTTG-3'			
mcr-3-F	5′-CGCTTATGTTCTTTTTGGCACTGTATT-3'	۱۰۶۳	۵۵	۱۵
mcr-3-R	5′-TGAGCAATTTCACTATCGAGGTCTTG-3'			
aph(3′)- IIa-F	5′-ATGAGCCATATTCAACGGGAA-3'	۸۱۶	۵۳	۱٤
aph(3′)- IIa-R	5′-TCAGAAAAACTCATCGAGCAT-3'			
aac(3)-IIa-F	5′-ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG-3''	۳۸۴	۵۴	۱۶
aac(3)-IIa-R	5′-CCAAGCATCGGCATCTCATA-3'			
ant(3'')-Ia-F	5′-ATCTGGCTATCTTGCTGACA-3'	۳۸۸	۵۷	۱۴
ant(3'')-Ia-R	5′-TTGGTGATCTCGCCTTTC-3'			

نتایج

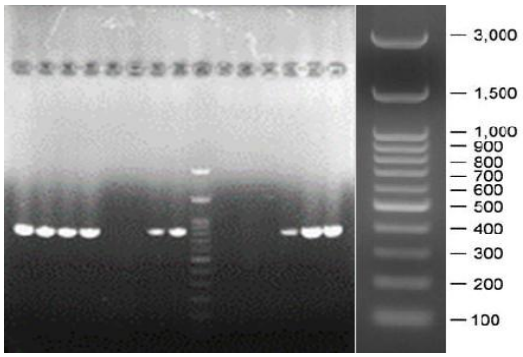
در این مطالعه ۱۲۲ جدایه اشرشیاکلی از طیور گوشتی با علایم بالینی کلی‌باسیلوز جداسازی شد. بیشترین مقاومت جدایه‌ها مربوط به آنتی‌بیوتیک

نئومایسین سولفات، ۳۵ جدایه (۲۸/۶۸ درصد) و پس از آن به کولیستین، ۵ جدایه (۴/۱۰ درصد) بود. نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مطابق با جدول ۲ می‌باشد.

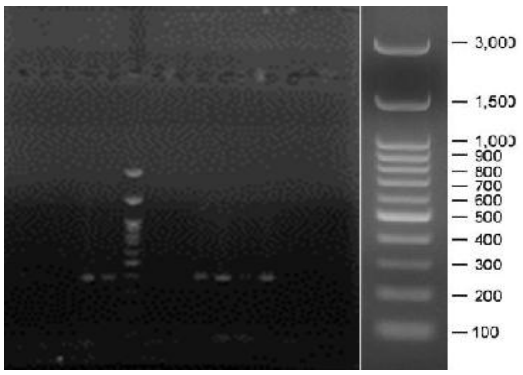
جدول ۲- تعداد و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	حد واسط تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
آمیکاسین	0(0%)	22 (18.03%)	100 (82%)
جنتامایسین	1(0.82%)	3 (2.46%)	118 (96.72%)
نئومایسین سولفات	35 (28.68%)	50 (40.98%)	37 (30.33%)
توبرامایسین	0(0%)	2(1.64%)	120 (98.36)
استرپتومایسین	0(0%)	4(3.28)	118 (96.72%)
کولیستین	5(4.10)	1(0.82%)	116 (95.1)

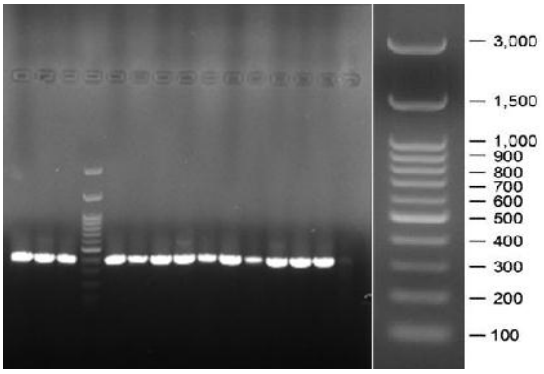
در ردیابی ژن‌های *mcr*-۱، *mcr* -۲، و *mcr*-۳ توسط روش PCR هیچ‌یک از ژن‌های مورد بررسی شناسایی نشد. میزان فراوانی ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aph(3')- IIa* ۳۱ (۲۵/۴۱ درصد)، *aac(3)-IIa* ۲۹ (۲۳/۷۷ درصد) و *ant(3")-Ia* ۴۵ (۳۶/۸۸ درصد) بود (شکل‌های ۳-۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *aph (3′)-IIa* (طول محصول ۸۱۶bp)



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *aac (3)-IIa* (طول محصول ۳۸۴bp)



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن *ant (3″)-a*(طول محصول ۳۸۸bp)

بحث

مقاومت باواسطه پلاسمید به کولیستین، به دلیل توانایی انتقال ژن‌های مقاومت به سویه‌های دیگر و احتمال گسترش آنها از حیوانات به جمعیت‌های انسانی نگران‌کننده است. این امر اهمیت پایش این مقاومت‌ها در باکتری‌های جداشده از منابع غذایی انسان را مشخص می‌سازد. تاکنون گزارشی از مقاومت باواسطه پلاسمید به کولیستین در ایران گزارش نشده است. علیرغم استفاده از کولیستین در حیطه دامپزشکی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به کولیستین در بررسی فنوتیپی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد ژن *mcr* در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه در گیلان وجود ندارد. در ایران، در مطالعات مختلفی مقاومت به کولیستین در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که در شمال غرب ایران توسط آقاپور و همکاران (۲۰۱۹) بر روی جدایه‌های اشریشیاکلی در بیمارستان‌های تبریز انجام شد، از ۹۰۰ جدایه بالینی ، ۳۳۳ جدایه، به‌عنوان جدایه‌های با مقاومت حد وسط به کولیستین و ۲۶/۶ درصد از آنها بسیار مقاوم بودند. ژن‌های *mcr-۱*، *mcr* -۲ و *mcr-۳* در هیچ‌کدام از جدایه‌های مقاوم شناسایی نشد (۷). در مطالعه دیگری در شمال غربی ایران سطح بالایی (۱۴ درصد) از مقاومت در برابر کولیستین گزارش شده است (۱۵). همچنین میزان مقاومت به کولیستین در مطالعه‌ای از مرکز ایران حدود ۱۱/۶ درصد گزارش شده است (۱۷). در سایر کشورها، در مطالعات مختلف حضور ژن پلاسمیدی کدکننده مقاومت به کولیستین در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور گزارش شده است. به‌ویژه در مناطقی که کولیستین به‌طور معمول در دامپزشکی استفاده می‌شود، طیور ممکن است مخزنی از اشریشیاکلی‌هایی باشند که *mcr-۱* را حمل می‌کند (۱۸). در مطالعه‌ای در برزیل، فراوانی ژن *mcr-۱* در اشریشیاکلی‌های مدفوعی و بیماری‌زای طیور ۵۷/۹ درصد گزارش شد و بین مصرف گوشت مرغ خریداری شده از بازار حیوانات زنده و جداسازی اشریشیاکلی حامل *mcr-۱* ارتباط وجود داشت (۱۹). در مطالعه‌ای در آمریکا، *mcr-۱* در ۱۲ جدایه از مجموعه ۹۸۰ جدایه اشریشیاکلی بیماری‌زای مرغی شناسایی شد (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای در آلمان (۲۰۱۶)، حضور ژن *mcr-۱* در اشریشیاکلی بیماری‌زای طیور گزارش گردید (۲۱). در پایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در اشریشیاکلی‌های جداشده از دام و طیور در کشور چین نیز افزایش چشمگیر در مقاومت به کولیستین باواسطه پلاسمید، در سال‌های اخیر گزارش گردید (۲۲). همچنین در مطالعه حاضر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلکوزیدی در اشریشیاکلی‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های مورد مطالعه، بیشترین میزان مقاومت را به آنتی‌بیوتیک نئومایسین سولفات (۲۸/۶۸ درصد) نشان دادند. در بررسی فنوتیپی میزان مقاومت به آمیکاسین و جنتامایسین در باکتری‌های مورد آزمایش از درصد بالایی

برخوردار نبود، اما به نظر می‌رسد حساسیت به آمیکاسین در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه رو به کاهش است. در میان آمینوگلیکوزیدها، نئومایسین معمولاً در درمان بیماری‌های جوجه‌های گوشتی در شمال ایران استفاده می‌شود. این امر شیوع بالاتر مقاومت به نئومایسین را در جدایه‌های مورد آزمایش توضیح می‌دهد. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها، غیر فعال‌سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک است که عمدتاً از طریق آنزیم‌های اصلاح‌کننده ساختار آنتی‌بیوتیک (AMEs)که منشأ پلاسمیدی یا کروموزومی دارند، رخ می‌دهد (۲۳). در مطالعه حاضر، آنزیم اصلاح کننده آمینوگلیکوزید *ant (3'')- Ia* فراوان‌ترین(۳۶/۸۸) ژن AMEs شناسایی شده بود و پس از آن *aph(3')- IIa* و *aac(3)-Iia* به‌ترتیب در ۲۵/۴۱ و ۲۳/۷۷ درصد جدایه‌ها شناسایی شدند. در نتایج مشابهی ژانگ و همکاران (۲۰۱۴)، *ant(3')-Ia* را به‌عنوان متداول‌ترین ژن‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید در اشریشیاکلی جداشده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به سپتی‌سمی در چین گزارش کردند (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط لی و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، *ant(3)- Ia* یکی از شایع‌ترین ژن‌های مقاومت مشاهده شده در جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم به آمینوگلیکوزیدها بود (۲۴).از آنجایی که گوشت طیور یکی از مهم‌ترین و ارزان‌ترین منابع پروتئینی در جهان است، ظهور و گسترش ژن‌های مقاومت پلاسمیدی در اشریشیاکلی‌های جداشده از طیور می‌تواند کنترل بیماری‌های ناشی از این باکتری در انسان را دشوار نماید (۲۰). در این راستا چوی و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی در کره دریافتند که در نتیجه مصرف آپرامایسین در حیوانات، انسان در معرض خطر عفونت ناشی از سویه‌های مقاوم به جنتامایسین قرار می‌گیرد. این محققین با بررسی ۱۹۲۱ اشریشیاکلی جداشده از دام و طیور، ژن مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aac (3) -IV* را در تمام جدایه‌های مقاوم به آپرامایسین شناسایی کردند (۲۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر ظهور سویه‌های مقاوم به کولیستین در اشریشیاکلی‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی در گیلان می‌باشد. مصرف بی‌رویه و نادرست کولیستین خطری جدی برای صنعت طیور کشور و بهداشت عمومی محسوب می‌شود.کاهش حساسیت جدایه‌های مطالعه حاضر به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و حضور ژن‌های کدکننده این مقاومت‌ها نیز هشدار جدی در زمینه کاهش گزینه‌های درمانی، در درمان کلی‌باسیلوس در صنعت پرورش طیور و خطر انتقال ژن‌های مقاومت به فلور میکروبی انسان می‌باشد.

References

1- Brink AJ, Richards GA, Colombo G, Bortolotti F, Colombo P, Jehl F. Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. *International journal of antimicrobial agents*. 2014; 43(1): 1-6.

2- Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, *et al.* Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015; 59(1): 536-43.

3- Kim Y, Bae IK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. In vivo emergence of colistin resistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014; 79(3): 362-6.

4- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Paratyphi B. *Jour-*

nal of Antimicrobial Chemotherapy. 2017; 72(12): 3317-24.

5- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016; 16(2): 161-8.

6- Caniaux I, Van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017; 36(3): 415-20.

7- Aghapour Z, Hasani A, Aghazadeh M, Rezaei MA, Ganbarov K, Pourlak T, *et al.* Genes involved in colistin resistance of gram-negative isolates in the northwest of Iran. *Gene Reports*. 2019; 14: 81-6. [In persian]

8- Singer RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Frontiers in microbiology*. 2015; 6: 28-36.

9- Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, *et al.* Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature microbiology*. 2017; 2(4): 1-7.

10- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. Clinical microbiology reviews. 2014; 27(1): 21-47.

11- Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2")-I, aph (3')-VI*) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics*. 2011; 66(9): 1519-22. [In persian]

12- Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(8): 4443-51.

13- Zhou WR, Wang HN, Zhang AY, Wu Q, Huang Y, Liu P, *et al.* Detection of sulfonamides-resistant genes in Salmonella and *Escherichia coli* isolated from pigs and wild animals. *Vet. Sci. China*. 2007; 37: 287-90.

14- Xie R, Huo S, Li Y, Chen L, Zhang F, Wu X. Molecular epidemiological survey on quinolone 424 resistance genotype and phenotype of *Escherichia coli* in septicemic broilers in Hebei. *China. 425 Poultry science.* 2014; 93(2): 335-9.

15- Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Aghazadeh M, Iversen A, Edquist P, *et al.* A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *Apmis*. 2013; 121(2): 146-52. [In persian]

16- Zhang FY, Huo SY, Li YR, Xie R, Wu XJ, Chen LG, *et al.* A survey of the frequency of aminoglycoside antibiotic-resistant genotypes and phenotypes in *Escherichia coli* in broilers with septicaemia in Hebei, China. *British poultry science*. 2014; 55(3): 305-10.

17- Vakili B, Fazeli H, Shoaei P, Yaran M, Ataei B, Khorvash F, *et al.* Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(1): S67. [In persian]

18- Monte DF, Fernandes MR, Cerdeira L, de Souza TA, Franco BD, Landgraf M, *et al.* Draft genome sequences of colistin-resistant MCR-1-producing *Escherichia coli* ST1850 and ST74 strains isolated from commercial chicken meat. *Genome Announcements*. 2017; 5(20): e00329-17.

19- Vasquez AM. Investigation of *Escherichia coli* harboring the mcr-1 resistance gene—Connecticut, 2016. MMWR. *Morbidity and mortality weekly report*. 2016; 65.

20. Lima Barbieri N, Nielsen DW, Wannemuehler Y, Cavender T, Hussein A, Yan SG, *et al.* *mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One*. 2017; 12(3): e0172997.

21- Ewers C, Göttig S, Bülte M, Fiedler S, Tietgen M, Leidner U, *et al.* Genome sequence of avian Escherichia coli strain IHIT25637, an extraintestinal pathogenic *E. coli* strain of ST131 encoding colistin resistance determinant MCR-1. *Genome Announc*. 2016; 4(5): e00863-16.

22- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016; 16(2): 161-8.

23. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resistance Update. 2010; 13 (6), 151–171.

24. Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science*. 2015; 94(4), 601–611.

25-Choi MJ, Lim SK, Nam HM, Kim AR,

Jung SC, Kim MN. Apramycin and gentamicin resistances in indicator and clinical *Escherichia coli* isolates from farm animals in Korea. *Food borne pathogens and disease*. 2011; 8(1): 119-23.

Evaluation of resistance to colistin and aminoglycosides in *Escherichia coli* isolated from broilers in Guilan province

Zohreh Pourhossein, Leila Asadpour*, Hadi Habibollahi, Seyedeh Tooba Shafighi

Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Receive: January 13, 2023; Revise: April 29, 2023; Accept: June 3, 2023

Summary

Chicken meat, as one of the most important sources of protein in the world, shows a high rate of contamination with *Escherichia coli*, which can widely spread antibiotic resistance. The aim of this study was to investigate the resistance to colistin and aminoglycosides in *E. coli* isolated from broilers. In this study, during 2021, a total of 122 *E. coli* isolates were collected from the heart and liver of 20- to 45-day-old chickens with clinical signs of colibacillosis. Aminoglycosides and colistin resistant strains were identified by disk diffusion and MIC determination, respectively. Subsequently, the presence of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *aph (3')-IIa*, *aac (3) -IIa* and *ant (3")-Ia* genes in the isolates was analyzed by PCR. Out of 122 isolates, 35 isolates (28.68%) were resistant to neomycin sulfate and 1 isolate (0.82%) was resistant to gentamicin. All isolates were sensitive to amikacin, tobramycin and streptomycin and 5 isolates (4.10%) were resistant to the colistin. In the detection of *mcr* genes by PCR method, none of the studied genes were identified, but *aph (3') -IIa*, *aac (3) -IIa* and *ant (3")-Ia* genes were detected in 25.41%, 23.77% and 36.88% of isolates respectively. The results of this study indicate a decrease in the sensitivity of poultry isolated *E. coli* to aminoglycosides and colistin. The spread of such resistant isolates is a serious warning about the reduction in treatment choices of colibacillosis and indicates the risk of transmission of resistance genes to the human microbial flora.

Key words: *Antibiotic resistance, Chicken meat, Escherichia coli, aminoglycoside, colistin*