نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۱۱- ۲۱

لاشه‌های بزهای کشتار شده در کرمان؛ مخزن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و چالشی برای سلامت عمومی

شیرین محمدی‌پور[۱]، رضا قنبرپور[۲]، مازیار جاجرمی[۳]*، محبوبه باقری[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- استاد، گروه تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۶ شهریور ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۷ شهریور ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.457540.1237

چکیده

اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یکی از پاتوژن‌های مهم و قابل انتقال از طریق محصولات غذایی با منشأ دامی به انسان می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از لاشه‌های بز در کشتارگاه کرمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد. در این مطالعه، ۱۵۰ لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان در یک دوره‌ی زمانی یک‌ساله در سال ۱۴۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. از هر لاشه‌ی بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه اخذ گردید. بنابراین مجموعاً ۳۰۰ نمونه سواب (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) اخذ شد. پس از کشت سواب‌ها و جداسازی باکتری *اشریشیاکلی*، مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم با کمک آزمون دیسک دیفیوژن تعیین گردید و به‌وسیله‌ی PCR ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA} در جدایه‌ها ردیابی شد. مجموعاً، ۱۹۰ از ۳۰۰ سواب (۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها) از نظر باکتری *اشریشیاکلی* مثبت بودند؛ بنابراین ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمد که ۴۵/۲۷ درصد (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۲۶/۳۲ درصد آنها (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند. فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد (۱۷ از ۱۹۰ جدایه)، ۷/۸۹ درصد (۱۵ از ۱۹۰ جدایه)، ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) و ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) ارزیابی شد. درنتیجه‌ی این مطالعه، می‌توان لاشه‌ی بز را به‌عنوان یکی از مخازن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی* مقاوم به بتالاکتام‌ها و چالشی مهم برای سلامت عمومی در منطقه‌ی کرمان، معرفی کرد.

واژگان کلیدی: *بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اشریشیاکلی، لاشه بز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: maziar.jajarmi@uk.ac.ir

مقدمه

مقاومت ضد میکروبی یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یکی از تهدیدات مهم و جدی در حوزه سلامت عمومی است و زندگی انسان و حیوانات را به شدت به مخاطره انداخته است (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به حالتی گفته می‌شود که در آن، باکتری‌ها نسبت به اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند، به‌طوری که این داروها دیگر قادر به کشتن یا مهار رشد آنها نیستند (۱). این پدیده معمولاً به‌دلیل تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها رخ می‌دهد که ممکن است از طریق جهش‌های طبیعی یا انتقال ژن‌های مقاومت از سایر باکتری‌ها ایجاد شود (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک چالش بزرگ در درمان بیماری‌های عفونی است، زیرا منجر به کاهش اثربخشی داروها، طولانی‌تر شدن مدت بیماری، افزایش هزینه‌های درمان و افزایش مرگ و میر می‌شود (۲). استفاده بیش از حد و نادرست از عوامل ضد میکروبی در پزشکی و دامپزشکی منجر به ایجاد یک فشار انتخابی به نفع باکتری‌های مقاوم موجود در فلور طبیعی بدن انسان و حیوان و نهایتاً گسترش این میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۲).

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در انسان و حیوانات هستند و این امر به‌دلیل طیف وسیع اثربخشی، دسترسی به فرم‌های خوراکی و قیمت پایین‌تر نسبت به سایر دسته‌های ضد میکروبی است (۳). مقاومت نسبت به این دسته‌ی آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی صورت می‌پذیرد. یکی از این مکانیسم‌ها تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) مانند TEM، CTX-M، OXA و SHV است که به‌وسیله ژن‌هایی مانند bla_{TEM}، $bla_{CTX\text{-}M}$، bla_{OXA} و bla_{SHV} بیان می‌شوند (۴). این آنزیم‌ها باعث تخریب حلقه‌ی بتالاکتام در آنتی‌بیوتیک‌های مذکور می‌شود و ژن‌های کدکننده‌ی آنها معمولاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک (مانند پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها) قرار دارند که این امکان را فراهم می‌کنند که به راحتی توسط انتقال افقی ژن از یک باکتری به باکتری دیگر، حتی بین گونه‌های مختلف باکتریایی، منتقل شوند (۴). این امر منجر به شکست‌های درمانی مکرر یا کاهش اثربخشی بتا-لاکتام‌های وسیع‌الطیف به‌عنوان یکی از خطوط اول درمان در پزشکی و دامپزشکی می‌شود.

اشریشیاکلی، یک باکتری گرم منفی، عضو میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم و از مهم‌ترین پاتوژن‌های منتقله از طریق غذا است (۵). مواد غذایی مخصوصاً مواد غذایی با منشأ دامی طی فرآیندهای مختلف تولید و فرآوری ممکن است به این باکتری آلوده شوند (۶). از جمله مواد غذایی که مستعد آلودگی به این باکتری هستند، گوشت انواعی از حیوانات است که در کشتارگاه ذبح می‌شوند. منشأ اصلی این باکتری در گوشت، مدفوع حیوانی است که در حال کشتار می‌باشد ولی ممکن است به‌واسطه‌ی آلودگی‌های محیطی مانند خاک و آب نیز این باکتری در گوشت قرار بگیرد (۶). چنانچه این باکتری از طرق مختلفی مانند مصرف آب و غذای آلوده به مدفوع وارد دستگاه گوارش شود، بسته به عوامل حدتی که دارد می‌تواند باعث بیماری‌های جدی از جمله اسهال، کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمی همولیتیک (HUS) در انسان و بعضاً حیوان گردد (۷) و چنانچه این باکتری دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد، طبیعتاً باعث بروز مشکلات فراوانی در زمینه‌ی درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ایجاد شده می‌شود (۵).

گوشت بز، گوشتی با ارزش بالا و از مهم‌ترین تامین‌کنندگان پروتئین در سبد غذایی انسان بوده و همچون سایر محصولات غذایی با منشأ دامی، ممکن است ناقل پاتوژن‌های مختلفی باشد (۸). از این رو هدف از انجام این مطالعه ردیابی باکتری *اشریشیاکلی* در سطوح مختلف لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان و پس از آن بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی علیه بتالاکتام‌ها و در ادامه بررسی حضور ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، $bla_{CTX\text{-}M}$ و bla_{OXA} در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از سطوح

مختلف لاشه‌ی بز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری اشریشیاکلی: در این مطالعه، ۱۵۰ لاشه‌ی بز در کشتارگاه کرمان در یک دوره‌ی زمانی یک ساله در سال ۱۴۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. از هر لاشه بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه در کشتارگاه اخذ گردید. بنابراین تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز به‌دست آمد (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب). سواب‌ها در داخل محیط انتقالی کری بلیر (میکرومدیا، اتحادیه اروپا) در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شدند.

سواب‌ها ابتدا در محیط مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) به‌صورت خطی کشت داده شدند و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از انکوباسیون، کلنی‌های لاکتوز مثبت، صاف، گرد و محدب به‌عنوان کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی*، در نظر گرفته شدند. جهت تأیید بیوشیمیایی کلنی‌های مشکوک، از تست IMViC [شامل بررسی تولید ایندول (I)، بررسی انجام تخمیر از نوع اسیدهای مخلوط (M)، بررسی انجام تخمیر بوتاندیولی (V) و بررسی قابلیت استفاده از سیترات (C)]، استفاده گردید (۹).

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی علیه بتالاکتام‌ها: ابتدا هر جدایه‌ی خالص *اشریشیاکلی* در محیط نوترینت براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. پس از ایجاد کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند، از سوسپانسیون باکتریایی به‌دست آمده، با کمک سواب استریل، باکتری‌ها به محیط مولرهینتون آگار انتقال داده شد و به‌صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید (شرکت پادتن طب، ایران)، به‌وسیله یک پنس استریل و در مجاورت شعله، به فاصله‌ی تقریبی ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر و دیواره‌ی پلیت، روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در نهایت قطر ناحیه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مذکور با کمک کولیس اندازه‌گیری شد و نتایج با استانداردهای ارائه شده در CLSI سال ۲۰۲۳ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند (۱۰).

جهت تعیین قابلیت تولید ESBLs از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Method) استفاده گردید. در این روش پس از اندازه‌گیری قطر ناحیه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مذکور، چنانچه قطر این هاله در اطراف سفوتاکسیم کلاولانیک اسید نسبت به سفوتاکسیم / یا قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف سفتازیدیم کلاولانیک اسید نسبت به سفتازیدیم، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر باشد، باکتری مورد بررسی، تولیدکننده‌ی ESBL ارزیابی خواهد شد (۱۰).

ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها: برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد که در این روش ابتدا باکتری‌های خالص روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار کشت داده شدند و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، یک کلنی خالص از باکتری مورد نظر در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (موجود در میکروتیوب‌های استریل) سوسپانسه گردید. میکروتیوب‌ها در دستگاه بلاک حرارتی (اپندورف، آلمان) در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) سرد شده و پس از آن به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به داخل میکروتیوب‌های استریل جدید منتقل شد و به‌عنوان نمونه DNA استخراج شده در

دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی نگهداری شدند (۱۱).

جهت شناسایی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA} در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌ی بز، از PCR سیمپلکس با کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد. از سویه رفرانس *اشریشیاکلی* ATCC 35218 برای ژن bla_{TEM}، از سویه رفرانس *کلبسیلا* ATCC 700603 برای ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{OXA} و bla_{SHV} به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از آب مقطر استریل نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برنامه دمایی عبارت بود از یک سیکل یک مرحله‌ای شامل ۱۰ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ ۳۵ سیکل ۳ مرحله‌ای، هر مرحله شامل ۳۰ ثانیه واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{OXA} و ۱ دقیقه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ در نهایت یک سیکل یک مرحله‌ای شامل ۱۰ دقیقه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۱– ۱۴).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA}

هدف	توالی (′۳-′۵)	اندازه‌ی محصول (bp)	منبع
bla_{TEM}	5′-GCGGAACCCCTATTTG-3′ 5′-ACCAATGCTTAATCAGTGAG-3′	۹۶۴	(۱۱)
bla_{SHV}	5′-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3′ 5′-GATTTGCTGATTTCGCTCGG-3′	۷۹۵	(۱۲)
bla_{CTX-M}	5′ -CGATGTGCAGTACCAGTAA-3′ 5′-TTAGTGACCAGAATCAGCGG-3′	۵۸۵	(۱۳)
bla_{OXA}	5′-TCAACTTTCAAGATCGCA-3′ 5′-GTGTGTTTAGAATGGTGA-3′	۶۰۹	(۱۴)

نتایج

همان‌طور که ذکر شد در این مطالعه از هر لاشه بز ۲ نمونه سواب شامل یک سواب از سطح داخلی لاشه و یک سواب از سطح خارجی لاشه اخذ گردید. بنابراین تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) در کشتارگاه کرمان جمع‌آوری شد. از میان ۳۰۰ نمونه سواب مذکور، باکتری *اشریشیاکلی* از ۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها (۱۹۰ از ۳۰۰ سواب) از طریق روش‌های کشت، جداسازی شد و با کمک تست‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت، ولی از ۳۶/۶۷ درصد سواب‌ها (۱۱۰ از ۳۰۰ سواب) باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی نگردید. با این حال نمی‌توان نتیجه گرفت که سواب‌های فاقد *اشریشیاکلی*، به مفهوم لاشه‌های عاری از این باکتری هستند، زیرا ممکن است تنها در محل سواب‌گیری این باکتری وجود نداشته، ولی در قسمت‌های دیگر لاشه موجود باشد.

با توجه به جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* از ۱۹۰ سواب، ازین پس تمامی فراوانی‌ها برمبنای ۱۹۰ جدایه محاسبه و بیان می‌گردد؛ از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، ۴۶/۸۴ درصد آنها (۸۹ از ۱۹۰ جدایه) متعلق به سواب‌های خارجی، و ۵۳/۱۶ درصد آنها نیز (۱۰۱ از ۱۹۰ جدایه) متعلق به سواب‌های داخلی لاشه بودند. همچنین از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، مجموعاً ۴۵/۲۷ درصد آنها (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم مقاوم بودند و ۲۶/۳۲ درصد آنها نیز (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند (جدول ۲). در این مطالعه جدایه‌هایی شناسایی شدند که به‌طور همزمان به هر دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند که فراوانی آنها ۱۸/۹۴ درصد (۳۶ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید. همچنین بر اساس روش انتشار دیسک ترکیبی، فراوانی سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBL، ۱۳/۶۸ درصد (۲۶ از

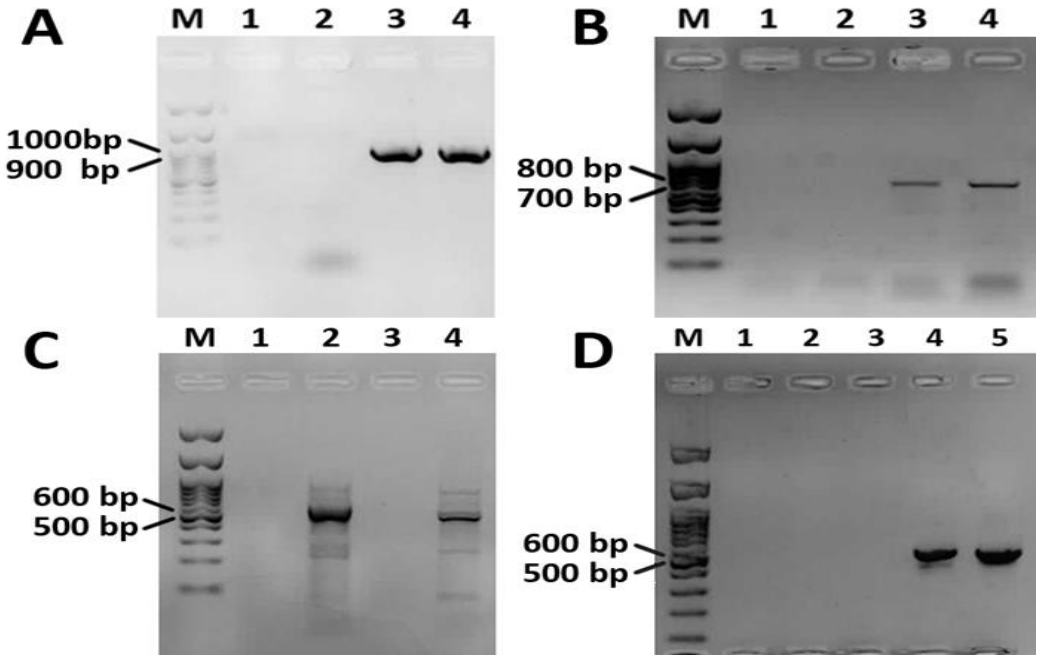
۱۹۰ جدایه) به‌دست آمد.

جدول ۲- تعداد و درصد جدایه‌های *اشریشیاکلی* حساس، نیمه‌حساس و مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در میان ۱۹۰ جدایه‌ی *اشریشیاکلی*

نوع آنتی‌بیوتیک	حساس؛ (درصد) تعداد	نیمه حساس؛ (درصد) تعداد	مقاوم؛ (درصد) تعداد	جمع
سفوتاکسیم	۳۷ (۱۹/۴۷)	۶۷ (۳۵/۲۶)	۸۶ (۴۵/۲۷)	۱۹۰ (۱۰۰)
سفتازیدیم	۴۸ (۲۵/۲۶)	۹۲ (۴۸/۴۲)	۵۰ (۲۶/۳۲)	۱۹۰ (۱۰۰)

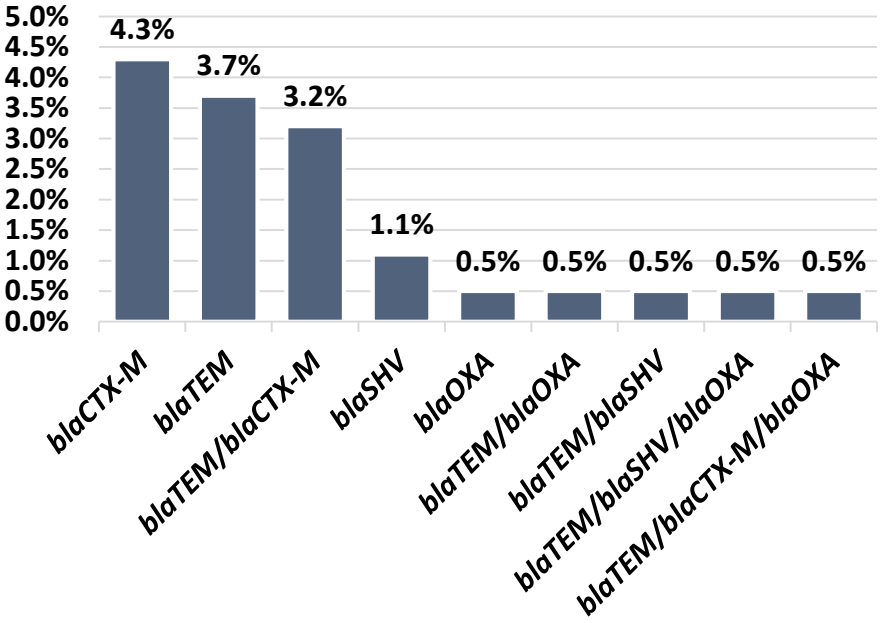
در این مطالعه، ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} و bla_{OXA}، در تمام ۱۹۰ جدایه‌ی *اشریشیاکلی* با کمک PCR مورد ردیابی قرار گرفت و به‌ترتیب در موقعیت‌های ۹۶۴، ۷۹۵، ۵۸۵ و ۶۰۹ جفت باز بر روی ژل آگارز پس از الکتروفورز شناسایی شدند (شکل ۱). فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} به‌صورت جداگانه، به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد (۱۷ از ۱۹۰ جدایه)، ۷/۸۹ درصد (۱۵ از ۱۹۰ جدایه)، ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) و ۲/۱ درصد (۴ از ۱۹۰ جدایه) ارزیابی شدند. در این مطالعه ۱۰ درصد جدایه‌ها (۱۹ از ۱۹۰ جدایه) دارای فقط یک ژن مقاومت بودند. همچنین ۵/۲۶ درصد جدایه‌ها (۱۰ از ۱۹۰ جدایه) حاوی بیش از یک ژن به‌طور همزمان بودند.

مجموعاً ۹ پروفایل مختلف از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌دست آمد که فراوانی هر یک در میان ۱۹۰ جدایه در شکل ۲ نشان داده شده است: bla_{CTX-M} (۸ از ۱۹۰ جدایه؛ ۴/۳ درصد)، bla_{TEM} (۷ از ۱۹۰ جدایه؛ ۳/۷ درصد)، bla_{TEM}/bla_{CTX-M} (۶ از ۱۹۰ جدایه؛ ۳/۲ درصد)، bla_{SHV} (۲ از ۱۹۰ جدایه؛ ۱/۱ درصد)، bla_{OXA} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، bla_{TEM}/bla_{OXA} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، bla_{TEM}/bla_{SHV} (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد)، $bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{OXA}$ (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد) و $bla_{TEM}/bla_{CTX-M}/bla_{OXA}$ (۱ از ۱۹۰ جدایه؛ ۰/۵ درصد) (شکل ۲).



شکل ۱- آزمون PCR برای شناسایی ژن‌های مقاومت علیه بتالاکتام‌ها. A. ژن bla_{TEM} [۹۶۴ جفت باز (bp)] M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: نمونه منفی. ۳: نمونه مثبت. ۴: کنترل مثبت. B. ژن bla_{SHV} (۷۹۵ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: نمونه منفی. ۳: نمونه مثبت. ۴: کنترل مثبت. C. ژن

***bla*$_{CTX-M}$**(۵۸۵ جفت باز) M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲: کنترل مثبت. ۳: نمونه منفی. ۴: نمونه مثبت. D. ژن ***bla*$_{OXA}$** (۶۰۹ جفت باز) M: لدر (۱۰۰ جفت باز). ۱: کنترل منفی. ۲ و ۳: نمونه منفی. ۴: نمونه مثبت. ۵: کنترل مثبت.



شکل ۲- فراوانی پروفایل‌های مختلف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها در میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که ذکر شد در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه سواب از ۱۵۰ لاشه‌ی بز (۱۵۰ لاشه × ۲ سواب = ۳۰۰ سواب) در کشتارگاه کرمان مورد بررسی قرار گرفت که از میان ۳۰۰ نمونه سواب اخذ شده، باکتری *اشریشیاکلی* از ۶۳/۳۳ درصد سواب‌ها (۱۹۰ از ۳۰۰ سواب) جداسازی گردید. نمونه سواب را نمی‌توان نماینده‌ی کل لاشه برای جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* دانست چرا که ممکن است این باکتری در محلی غیر از محل سواب‌گیری در لاشه وجود داشته باشد. مطالعات زیادی در دنیا به بررسی کیفیت میکروبی گوشت بز در کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه پرداخته است اما روش کار اکثر آنها از نظر نمونه‌گیری و جداسازی عامل میکروبی، با یکدیگر و با مطالعه‌ی حاضر متفاوت می‌باشد. در ادامه به برخی تحقیقاتی که بر روی جداسازی باکتری *اشریشیاکلی* از گوشت بز متمرکز بوده‌اند به‌ترتیب سال انتشار اشاره می‌گردد. در مطالعه‌ی ریفیاندی و همکاران (۲۰۲۲) در اندونزی از گوشت بز در حال عرضه در ۵ مرکز فروش، نمونه‌گیری انجام شد (از هر مرکز یک نمونه‌ی ۲۵۰ گرمی) و با کمک روش شمارش کلنی نشان داده شد که تمام نمونه‌های گوشت بز (۱۰۰ درصد) آلوده به *اشریشیاکلی* بوده است (۱۵). همچنین، در مطالعه‌ی نگاش و همکاران (۲۰۲۱) در اتیوپی از سطح داخلی و خارجی ۱۲ لاشه‌ی بز در کشتارگاه با کمک سواب، نمونه‌گیری انجام شد و با انجام آزمایش شمارش کلنی نشان داده شد که سطوح مختلف همه‌ی لاشه‌های بز تحت بررسی (۱۰۰ درصد) به باکتری *اشریشیاکلی* آلوده می‌باشد (۱۶). سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان باکتری *اشریشیاکلی* را در ۲۹ مورد از ۶۱ نمونه گوشت بز (۴۷/۵ درصد) در حال عرضه در مراکز خرده‌فروشی گوشت با کمک روش کشت مورد شناسایی قرار دادند (۱۷). تانگانیکا و همکاران (۲۰۱۷) در کشور مالاوی در قاره آفریقا با کمک سوآب از ۳۴ لاشه بز در کشتارگاه نمونه‌گیری انجام دادند و پس از کشت، باکتری *اشریشیاکلی* را از ۲۹/۴ درصد لاشه‌های بز (۱۰ لاشه) جداسازی نمودند (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر مانایکا و

همکاران در سال ۲۰۱۶ در تانزانیا، ۱۲۴ نمونه‌ی ۲۵۰ گرمی گوشت بز را از کشتارگاه اخذ نموده و با کمک روش شمارش کلنی، حضور باکتری *اشریشیاکلی* را در ۹۶/۸ درصد نمونه‌های گوشت شناسایی نمودند (۱۹). از نظر حجم نمونه، تمامی مطالعاتی که ذکر شد تعداد نمونه‌ی کمتری را نسبت به مطالعه‌ی حاضر بررسی کرده‌اند. هر چند فراوانی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در مطالعه‌ی حاضر از تمامی مطالعات مذکور پایین‌تر بود، با این حال مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که میزان آلودگی لاشه‌ی بز به *اشریشیاکلی* بسته به حجم نمونه، نوع نمونه‌گیری و روش ردیابی عامل متفاوت می‌باشد. از طرفی، بدون شک تأثیر عواملی چون شرایط بهداشتی کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه و همچنین شیوه‌های فرآوری گوشت در کشورهای مختلف، مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر آلودگی میکروبی گوشت می‌باشند (۲۰). با توجه به فراوانی نسبتاً بالای باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه‌های تحت بررسی در این مطالعه (۶۳/۳۳ درصد)، اهمیت نظارت مستمر و بهبود فرآیندهای بهداشتی کشتارگاه‌ها در کرمان بیش از پیش برجسته می‌گردد. در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، روش‌های رعایت بهداشت گوشت، بازرسی‌های بهداشتی و قوانین مربوطه در کشتارگاه‌ها هنوز به‌خوبی استقرار نیافته یا بروزرسانی نشده است (۲۰).

همان‌طور که در بخش نتایج نیز ذکر شد، با توجه به شناسایی ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی* در این مطالعه، فراوانی‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی برمبنای ۱۹۰ جدایه محاسبه گردیده است. ازین رو در مطالعه‌ی حاضر از میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*، مجموعا ۴۵/۲۷ درصد آنها (۸۶ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۲۶/۳۲ درصد آنها (۵۰ از ۱۹۰ جدایه) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند. سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان با بررسی ۲۹ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* از گوشت بز، فراوانی مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم را ۱۰۰ درصد گزارش نمودند (۱۷) که به‌طور قابل توجهی بالاتر از نتایج به‌دست آمده در مطالعه‌ی حاضر بود. همچنین سینگ و همکاران گزارش دادند که تمامی ۲۹ جدایه *اشریشیاکلی* تحت بررسی (۱۰۰ درصد) به‌طور همزمان نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم دارای مقاومت می‌باشند (۱۷)، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر فراوانی جدایه‌هایی که به‌طور همزمان به هر دو آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند، ۱۸/۹۴ درصد (۳۶ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید که پایین‌تر از مطالعه‌ی سینگ و همکاران بود. آبرهام و همکاران در کشور اتیوپی در سال ۲۰۱۹ فراوانی مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۲۱)، و در مطالعه‌ای دیگر دیولو و همکاران در اتیوپی در سال ۲۰۱۵ فراوانی مقاومت نسبت به سفوتاکسیم را در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌ی بز، صفر درصد اعلام کردند (۲۲)، که لازم به ذکر است تعداد لاشه‌های بز تحت بررسی در دو مطالعه‌ی اخیر به‌ترتیب ۳ و ۲ لاشه بوده است که بسیار حجم نمونه‌ی کوچکی نسبت به مطالعه‌ی حاضر است. در مطالعه‌ای که مانایکا و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تانزانیا، بر روی ۱۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از ۱۲۴ نمونه‌ی گوشت بز انجام داده بودند، هیچ‌یک از جدایه‌های تحت بررسی نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم نبودند (۱۹) که در مقایسه با نتایج مطالعه‌ی حاضر بسیار متفاوت است. تعداد جدایه‌های تحت بررسی در تمامی مطالعاتی که ذکر شد نسبت به تعداد جدایه‌های تحت بررسی در مطالعه‌ی حاضر، کمتر است. بنابراین علاوه بر عواملی چون تفاوت‌ها در نوع آنتی‌بیوتیک مصرفی در مناطق تحت بررسی (که باعث شکل‌گیری جمعیت‌های میکروبی مقاوم در میزبانان مختلف می‌شود)، عواملی چون حجم نمونه و روش بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند از عوامل تأثیرگذار بر شباهت‌ها و تفاوت‌ها میان نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر باشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیاز به بهبود روش‌های کنترل و مدیریت تجویز آنتی‌بیوتیک در دامداری‌ها و کشتارگاه‌های منطقه کرمان را برجسته می‌کند.

در این مطالعه، در میان ۱۹۰ جدایه *اشریشیاکلی*

تحت بررسی، فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M}، bla_{SHV} و bla_{OXA} ، به‌ترتیب ۸/۹۴ درصد، ۷/۸۹ درصد، ۲/۱ درصد و ۲/۱ درصد ارزیابی شدند. در مطالعه‌ی سینگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور هندوستان فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} را در میان ۲۹ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از گوشت بز، به‌ترتیب ۴۴/۸ درصد (۱۳ جدایه) و ۳/۴ درصد (۱ جدایه) اعلام کردند (۱۷). همچنین سینگ و همکاران گزارش دادند که تنها یک جدایه *اشریشیاکلی* تحت بررسی (۳/۴ درصد) به‌طور همزمان ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} را دارا بودند (۱۷)، در حالی که در مطالعه حاضر فراوانی جدایه‌هایی که به‌طور همزمان هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} را داشتند، ۱/۱ درصد (۲ از ۱۹۰ جدایه) محاسبه گردید که با مطالعه‌ی سینگ و همکاران تا حدودی همسو می‌باشد. از آنجایی که در پایگاه‌های جستجوی مقالات، مطالعه‌ی دیگری در مورد شناسایی ژن‌های مذکور در *اشریشیاکلی* با منشأ گوشت و لاشه‌ی بز پیدا نشد، لذا در ادامه به چند مورد از مطالعات بر روی نمونه‌های دیگری چون شیر در حیوان بز پرداخته خواهد شد. در مطالعه‌ای که توسط ساتپاتی و همکاران در سال ۲۰۲۳ در منطقه‌ی پنجاب انجام شد، فراوانی ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{OXA} در ۲۲ جدایه *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از ۱۲۵ نمونه شیر متعلق به بزهای نژاد بیتال، به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۶۲/۵ درصد، ۲۵ درصد و ۳۷/۵ درصد گزارش گردید (۲۳) که نسبت به مطالعه‌ی حاضر، تعداد جدایه‌های *اشریشیاکلی* تحت بررسی بسیار پایین‌تر ولی فراوانی ژن‌ها بسیار بالاتر بود. در مطالعه‌ی عبیدات و همکاران که بر روی ۲۶۱ جدایه *اشریشیاکلی* (به‌دست آمده از ۴۴۵ نمونه شیر بز) در اردن انجام شد، فراوانی bla_{CTX-M} ۴۱/۷ درصد (۱۰۹ از ۲۶۱ جدایه)، bla_{TEM} ۳۹/۸ درصد (۱۰۴ از ۲۶۱ جدایه) و bla_{SHV} ۱/۵ درصد (۴ از ۲۶۱ جدایه) گزارش گردید (۲۴) که این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر به‌غیر از bla_{SHV} تفاوت چشمگیری دارد. در برخی از جدایه‌های *اشریشیاکلی* در مطالعه‌ی حاضر و دیگر مطالعات که به‌صورت فنوتیپی نسبت به بتالاکتام‌ها دارای مقاومت بودند، از نظر ژن‌های مورد بررسی منفی بودند؛ از سویی دیگر، جدایه‌هایی که حداقل دارای یکی از ژن‌های مورد بررسی بودند نیز بعضاً از نظر مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه منفی بودند. در توجیه این موضوع باید ابراز داشت که ژن‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها دارای تنوع بسیاری بوده و این احتمال وجود دارد که ژن‌هایی به‌غیر از ژن‌های مورد بررسی، مسئول بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه بتالاکتام‌ها باشند. همچنین این ژن‌ها (در صورت وجود) ممکن است به‌دلایل مختلف به حالت خاموش باشند و اصلاً بیان نشوند (۲۵).

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی فنوتیپی و ژنوتیپی نسبت به بتالاکتام‌ها در میان جدایه‌های *اشریشیاکلی* به‌دست آمده از لاشه‌های بز در کشتارگاه کرمان می‌باشد. از آنجایی که بز در دسته‌ی حیوانات تولیدکننده‌ی غذا برای انسان طبقه‌بندی می‌شود، بنابراین می‌توان لاشه‌های بزهای کشتار شده در کرمان را مخزن بالقوه‌ی *اشریشیاکلی*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و چالشی برای سلامت عمومی معرفی نمود. با توجه به اهمیت مبحث مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باید سویه‌های مقاوم را مشابه به باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام در نظر گرفت. بنابراین، ضروری است که اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از گسترش این سویه‌های باکتریایی، به‌ویژه در مراکز تهیه و توزیع محصولات دامی، از جمله کشتارگاه‌ها، بیش از پیش اتخاذ گردد.

سپاسگزاری

از همکاری پرسنل آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, *et al.* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare*. 2023; 11(13): 1946.

2- Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, *et al.* Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. J Med Surgery, *Public Heal*. 2024; 2: 100081.

3- Zango UU, Ibrahim M, Shawai SAA, Shamsuddin IM. A review on β-lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Des Dev Ther*. 2019; 3(2): 52–8.

4- Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J intensive care*. 2020; 8(1): 13.

5- Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, *et al.* Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018; 6(4): 10-128.

6- Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr*. 2018; 4(3): 250–5.

7- Bintsis T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*. 2017; 3(3): 529.

8- Da Silva-Guedes J, Martinez-Laorden A, Gonzalez-Fandos E. Effect of the presence of antibiotic residues on the microbiological quality and antimicrobial resistance in fresh goat meat. *Foods*. 2022; 11(19): 3030.

9- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. *Elsevier Health Sciences*. 2013.

10- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI supplement M100). 33rd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2023.

11- Saadat L, Jajarmi M, Eskandarzade N, Ghanbarpour R. Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* bacterial isolated from Kerman zoo animals using ERIC-PCR. *New Find Vet Microbiol*. 2023; 6(1): 29–39.

12- Arlet G, Rouveau M, Philippon A. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β-lactamase. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 152(1): 163–7.

13- Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, *et al.* blaCTX-M genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(4): 1319–22.

14- Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine MH. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(4): 879–84.

15- Riffiandi N, Maradon GG, Pertiwi VR. The Detection of Microbial Contamination on Goat Meat from Traditional Market in Bandar Lampung City. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. *IOP Publishing*. 2022.

16- Negash A, Olga K. Goat carcass microbial investigation in Modjo Export Abattoirs, Ethiopia. *J Microbiol Antimicrob.* 2021; 13(2): 37–49.

17- Singh F, Hirpurkar SD, Rawat N, Shakya S, Kumar R, Rajput PK, *et al.* Occurrence of the genes encoding carbapenemases, ESBLs and class 1 integron integrase among fermenting and non fermenting bacteria from retail goat meat. *Lett Appl Microbiol.* 2020; 71(6): 611–9.

18- Tanganyika J, Mfitilodze WM, Mtimuni JP, Phoya RRKD. Microbial quality of goat carcasses in Lilongwe, Malawi. *Chem Biol Technol Agric.* 2017; 4:1–7.

19- Mwanyika G, Call DR, Rugumisa B, Luanda C, Murutu R, Subbiah M, *et al.* Load and prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh goat meat in Arusha, Tanzania. *J Food Prot*. 2016; 79(9): 1635–41.

20- Rani ZT, Mhlongo LC, Hugo A. Microbial profiles of meat at different stages of the distribution chain from the abattoir to retail outlets. *Int J Environ Res Public Health.* 2023; 20(3): 1986.

21- Abreham S, Teklu A, Cox E, Sisay Tessema T. *Escherichia coli* O157: H7: distribution, molecular characterization, antimicrobial resistance patterns and source of contamination of sheep and goat carcasses at an export abattoir, Mojdo, Ethiopia. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 1–14.

22- Dulo F, Feleke A, Szonyi B, Fries R, Baumann MPO, Grace D. Isolation of multidrug-resistant *Escherichia coli* O157 from goats in the Somali region of Ethiopia: a cross-sectional, abattoir-based study. *PLoS One.* 2015; 10(11):

e0142905.

23- Satpathy MM, Sharma NS, Kaur P, Arora AK. Detection of antimicrobial resistance genes in extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from milk of indigenous Beetal goats of Punjab. *Iran J Vet Res.* 2023; 24(1): 37–41.

24- Obaidat MM, Gharaibeh WA. Sheep and goat milk in Jordan is a reservoir of multidrug resistant extended spectrum and AmpC beta-lactamases *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 2022; 377: 109834.

25- Abdelwahab GE, Ishag HZA, Al Hammadi ZM, Al Yammahi SMS, Mohd Yusof MF Bin, Al Yassi MSY, *et al.* Antibiotics Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Livestock in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2014-2019. *Int J Microbiol.* 2022.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 11-21

Carcasses of slaughtered goats in Kerman: A potential reservoir of β-lactam-resistant *Escherichia coli* and a public health challenge

Shirin Mohammadipour[1], Reza Ghanbarpour[2], Maziar Jajarmi[3*], Mahboube Bagheri[4]

1- Ph.D. Student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Bardsir Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Receive: May 14, 2024; Revise: September 6, 2024; Accept: September 7, 2024

10.22034/nfvm.2024.457540.1237

Summary

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* is one of the significant food-borne pathogens transmissible from food products of animal origin to humans. The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic resistance of *E. coli* isolates obtained from goat carcasses in Kerman abattoir against β-lactam antibiotics. In this study, 150 goat carcasses were examined at the Kerman slaughterhouse over a one-year period in 2023. From each carcass, two swab samples were collected, one from the internal surface and one from the external surface, resulting in a total of 300 swabs (150 carcasses × 2 swabs = 300 swabs). After culturing the swabs and isolating *E. coli*, the resistance of the isolates to cefotaxime and ceftazidime was determined using the disk diffusion method, and the genes bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, and bla_{OXA} were detected using PCR. Overall, 190 of 300 the swabs (63.33%) were positive for *E. coli*, resulting in 190 isolates. Among these, 45.27% (86 of 190 isolates) were resistant to cefotaxime, and 26.32% (50 of 190 isolates) were resistant to ceftazidime. The frequencies of the bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, and bla_{OXA} genes were 8.94% (17 of 190 isolates), 7.89% (15 of 190 isolates), 2.1% (4 of 190 isolates), and 2.1% (4 of 190 isolates), respectively. As a result, this study identifies goat carcasses as a potential reservoir of β-lactam-resistant *E. coli*, posing a significant public health challenge in the studied region.

Keywords: *β-lactam, antibiotic resistance, Escherichia coli, goat carcasses*