



بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلای جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان با استفاده از شاخص مقاومت چنددارویی و تحلیل خوشه‌بندی

علیرضا میرزایی^۱، احمد راشکی^{۲*}، محسن نجمی^۳، سعید سالاری^۴

۱- دانش آموخته‌ی ارشد میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل

۲- دانشیار میکروب‌شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل

۳- دانشیار میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل

۴- دانشیار میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل

*نویسنده مسئول: دکتر احمد راشکی، تخصص و مدرک تحصیلی: دکترای تخصصی میکروبیولوژی و ژنتیک مولکولی، ایمیل: ah_rashki@usal.es،

تلفن: ۰۹۱۵۵۴۶۲۰۶۳

دریافت مقاله: ۲۱ خرداد ۱۴۰۵، بازنگری: ۲۴ خرداد ۱۴۰۵، پذیرش نهایی: ۲۴ تیر ۱۴۰۵



10.22034/nfvm.2026.586183.1317

چکیده

کبوتران شهری و نیمه‌اهلی به دلیل تماس مداوم با محیط‌های انسانی، منابع آلوده، پسماندها و سایر حیوانات می‌توانند در چرخه‌ی انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نقش داشته باشند. *Escherichia coli (E. coli)* به عنوان یکی از باکتری‌های شاخص روده‌ای در پرندگان، می‌تواند برای پایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در چارچوب رویکرد «یک‌سلامت» مورد استفاده قرار گیرد. هدف این مطالعه، جداسازی *E. coli* از کبوتران منطقه‌ی سیستان و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شاخص مقاومت چنددارویی و ساختار شباهت پروفایل‌های مقاومت با استفاده از تحلیل‌های خوشه‌بندی بود.

در این مطالعه‌ی مقطعی، از ۱۳۶ کبوتر در منطقه‌ی سیستان نمونه برداری کلواکی انجام شد. نمونه‌ها روی محیط‌های مک‌کانکی، اتوزین‌متیلن‌بلو و آگار خون‌دار کشت داده شدند و ایزوله‌های مشکوک با استفاده از آزمون‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی استاندارد شناسایی گردیدند. آزمون همولیز روی آگار خون‌دار انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer روی محیط مولر هینتون بررسی و نتایج بر اساس دستورالعمل CLSI تفسیر شد. داده‌های مقاومت به صورت باینری کدگذاری شدند و فراوانی مقاومت، فراوانی و الگوی مقاومت چنددارویی، خوشه بندی K-means، خوشه بندی سلسله‌مراتب بر اساس فاصله‌ی Jaccard و تحلیل مؤلفه‌های اصلی بررسی گردید.

در مجموع، ۱۰۰ ایزوله‌ی *E. coli* از کبوتران منطقه‌ی سیستان با روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. هیچ‌یک از ایزوله‌ها فنوتیپ همولیتیک نشان ندادند. بیش‌ترین میزان مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین و سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید بود که برای هر دو حدود ۹۹٪ گزارش شد. مقاومت بالا نسبت به تتراسایکلین نیز مشاهده گردید، در حالی که کم‌ترین مقاومت مربوط به آمیکاسین و انروفلوکساسین بود. تحلیل مقاومت چنددارویی نشان داد که بخشی از ایزوله‌ها به چندین کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم

بودند. نتایج خوشه بندی نشان داد که ایزوله‌ها در گروه‌های متمایزی شامل ایزوله‌های پرمقاومت، ایزوله‌های دارای مقاومت انتخابی و ایزوله‌های حساس‌تر قرار می‌گیرند. تحلیل PCA نیز تا حدی این ساختار را تأیید کرد، هرچند دو مؤلفه‌ی اصلی فقط حدود ۴۶/۵٪ از واریانس کل داده‌ها را توضیح دادند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کبوتران منطقه‌ی سیستان می‌توانند حامل ایزوله‌های E. coli با الگوهای متنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند. اگرچه ایزوله‌ی همولیتیک شناسایی نشد، وجود ایزوله‌های مقاوم و چنددارویی از دیدگاه بهداشت عمومی و رویکرد یک سلامت قابل توجه است. پایش منظم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پرندگان شهری می‌تواند به شناسایی مخازن محیطی مقاومت و طراحی راهکارهای کنترلی کمک کند.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلای، کبوتر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت چنددارویی، خوشه بندی، سیستان

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مهم‌ترین چالش‌های بهداشت عمومی در جهان است و امروزه به‌عنوان مسئله‌ای فراتر از پزشکی انسانی شناخته می‌شود. مصرف گسترده و گاه غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی، دامپزشکی، پرورش دام و طیور و حتی آلودگی‌های زیست‌محیطی موجب شده است که سویه‌های مقاوم در انسان، حیوان و محیط به‌طور همزمان گسترش یابند (۱). به همین دلیل، رویکرد «یک سلامت» بر ارتباط میان سلامت انسان، حیوان و محیط زیست تأکید دارد و مطالعه‌ی مخازن حیوانی و محیطی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را ضروری می‌داند. پرندگان شهری از جمله کبوتران به‌دلیل تماس نزدیک با محیط‌های انسانی، پسماندهای شهری، فاضلاب‌ها، دام‌ها و سایر پرندگان می‌توانند نقش مهمی در انتقال باکتری‌های مقاوم ایفا کنند. کبوتران در بسیاری از شهرها به‌صورت آزادانه در پارک‌ها، ساختمان‌ها، بازارها، محوطه‌های عمومی و مراکز دامداری حضور دارند. این شرایط موجب می‌شود که مدفوع آن‌ها به‌عنوان منبع بالقوه‌ی انتشار باکتری‌های روده‌ای در محیط مطرح باشد. از طرف دیگر، امکان تماس غیرمستقیم انسان با ترشحات یا مدفوع این پرندگان، اهمیت پایش میکروبی آن‌ها را افزایش می‌دهد (۲). اشریشیا کلی یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه است و به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش انسان، دام‌ها و پرندگان حضور دارد. بسیاری از سویه‌های این باکتری غیر بیماری‌زا هستند،

اما برخی سویه‌ها می‌توانند دارای عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند (۳). در پرندگان، سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی ممکن است با عفونت‌هایی مانند کولی‌باسیلوز، سپتیسمی، التهاب کیسه‌های هوایی و سایر اختلالات سیستمیک همراه باشند. برخی سویه‌ها نیز قادر به ایجاد همولیز هستند که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی ظرفیت بیماری‌زایی بالاتر باشد. با این حال، حتی سویه‌های غیرهمولیز آن نیز از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال ژن‌های مقاومت اهمیت دارند (۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پرندگان شهری می‌توانند حامل سویه‌های اشریشیا کلی مقاوم به چند دارو باشند. این ایزوله‌ها ممکن است از طریق مدفوع وارد محیط شوند و ژن‌های مقاومت را به سایر باکتری‌های محیطی یا فرصت‌طلب منتقل کنند. مقاومت به بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها، سولفونامیدها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های جداشده از پرندگان گزارش شده است. چنین مقاومت‌هایی می‌توانند پیامدهای مهمی برای درمان عفونت‌های حیوانی و انسانی داشته باشند (۵). در ایران، مطالعات مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیش‌تر بر روی دام‌های تولیدی، طیور صنعتی و نمونه‌های انسانی متمرکز بوده‌اند و پرندگان آزادی یا شهری کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. منطقه‌ی سیستان، به‌ویژه شهر زابل و نواحی پیرامون آن، به‌دلیل شرایط جغرافیایی، حضور گسترده‌ی پرندگان، تماس نزدیک انسان و دام و احتمال مصرف غیرکنترل‌شده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها،

منطقه‌ای مناسب برای پایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در چارچوب یک سلامت محسوب می‌شود (۶). از سوی دیگر، در کنار گزارش ساده‌ی فراوانی مقاومت، استفاده از روش‌های تحلیلی مانند خوشه بندی، تحلیل شباهت، PCA و بررسی مقاومت چنددارویی می‌تواند درک بهتری از الگوهای مقاومت ایجاد کند. این روش‌ها امکان شناسایی گروه‌هایی از ایزوله‌ها با الگوهای مشابه مقاومت را فراهم می‌کنند و می‌توانند برای پایش اپیدمیولوژیک مفید باشند. با این حال، تفسیر این تحلیل‌ها باید با دقت انجام شود و بر پایه داده‌های کافی، تعریف روشن متغیرها و روش آماری مناسب باشد (۷). بر همین اساس، مطالعه‌ی حاضر با هدف جداسازی اشریشیا کلی از کبوتران منطقه‌ی سیستان، بررسی وجود سویه‌های همولیزان، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ارزیابی مقاومت چنددارویی و تحلیل شباهت پروفایل‌های مقاومت با استفاده از روش‌های خوشه بندی انجام شد.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و منطقه‌ی مورد بررسی: این مطالعه به صورت مقطعی در منطقه‌ی سیستان، واقع در جنوب شرقی ایران، شامل نواحی شهری و نیمه‌روستایی شهرستان زابل و مناطق اطراف انجام شد. نمونه برداری از کبوترهای آزادی در مکان‌های مختلف از جمله میادین شهری، بازارها، پشت‌بام‌ها و نواحی نزدیک واحدهای دامپروری صورت گرفت.

روش نمونه‌گیری به صورت تصادفی از میان کبوترهای آزادی قابل دسترس در هر محل نمونه برداری انجام شد. به این ترتیب، در هر محل، از میان پرندگان قابل دسترس و واجد معیارهای ورود، تعدادی کبوتر به صورت تصادفی انتخاب و وارد مطالعه شدند. در مجموع، ۱۳۶ پرنده نمونه برداری شدند. معیار ورود شامل کبوترهای آزادی ظاهراً سالم، بدون علائم بالینی واضح بیماری‌های سیستمیک یا آسیب شدید بود. پرندگان دارای علائم بیماری شدید، ناتوانی حرکتی یا وضعیت جسمانی نامناسب

از مطالعه حذف شدند. در مطالعه‌ی حاضر، تفکیک دقیق بر اساس سن و جنس انجام نشد و هر دو گروه پرندگان جوان و بالغ در مطالعه در نظر گرفته شدند. نمونه برداری با سوآپ کلواکی استریل و با رعایت اصول ایمنی زیستی دامپزشکی انجام شد. نمونه برداری به صورت غیرتهاجمی انجام گرفت و در طول فرآیند، تلاش شد مدت زمان نگهداری پرندگان در دست به حداقل برسد و از ایجاد آسیب یا استرس غیرضروری جلوگیری شود. در این مطالعه هیچ گونه روش تهاجمی، جراحی، عفونت‌زایی آزمایشی یا کشتار انجام نشد و پرندگان پس از نمونه برداری در محل نمونه‌گیری آزاد شدند.

این مطالعه با کد اخلاقی IR.UOZ.REC.۱۴۰۳،۰۱۹ به تصویب کمیته‌ی اخلاق زیستی در پژوهش دانشگاه زابل رسیده است. تمامی مراحل نمونه برداری و کار با حیوانات مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات، دستورالعمل‌های ایمنی زیستی دامپزشکی و مقررات مرتبط با پژوهش‌های حیوانی انجام شد.

جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها: نمونه‌ها در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شدند و روی محیط‌های کشت انتخابی و افتراقی شامل MacConkey agar، Eosin Blood agar و Methylene Blue agar (EMB) کشت داده شدند. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انجام شد (۸، ۹، ۱۰). کلنی‌های مشکوک بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، ظاهر کلنی در EMB (درخشش فلزی سبز)، و ویژگی‌های لاکتوز مثبت انتخاب شدند. سپس رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. شناسایی بیوشیمیایی با آزمون‌های استاندارد شامل indole، methyl red، Voges-Proskauer، citrate utilization، urease، H₂S production و تخمیر قندها انجام گرفت (۹، ۱۰). در نهایت، ایزوله‌های تأییدشده‌ی E. coli برای بررسی‌های بعدی وارد مطالعه شدند.

بررسی همولیز: توانایی همولیز روی Blood agar

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بررسی شد. ایزوله‌هایی که هاله‌ی شفاف β -hemolysis ایجاد کردند به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند. در این مطالعه هیچ ایزوله‌ی همولیتیکی شناسایی نشد (۱۱).

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Kirby-Bauer disk diffusion روی Mueller-Hinton agar مطابق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام شد (۱۲، ۱۳). سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ McFarland تهیه و به‌طور یکنواخت روی سطح محیط تلقیح شد (۱۲، ۱۳). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فاصله‌ی استاندارد قرار داده شدند و پلیت‌ها در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری و نتایج بر اساس استاندارد CLSI تفسیر گردید (۱۳).

تفسیر نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی عمدتاً بر اساس دستورالعمل CLSI M۱۰۰، ویرایش ۲۰۲۴ انجام شد (۱۴). برای آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین/کلاوولانیک اسید، جنتامایسین، آمیکاسین،

تتراسایکلین، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول، تری‌متوپریم، سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید، سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید و اریترومایسین، معیارهای تفسیری CLSI مربوط به *E. coli* یا Enterobacterales مورد استفاده قرار گرفت. برای تایلوزین و انروفلوکساسین، با توجه به نبود breakpoint اختصاصی مناسب برای *E. coli* با منشأ پرندگان در CLSI، از معیارهای تفسیری EUCAST، ویرایش ۲۰۲۴، استفاده شد (۱۵). در مواردی که breakpoint اختصاصی برای *E. coli* با منشأ پرندگان در دسترس نبود، نتایج با احتیاط و بر اساس معیارهای مربوط به Enterobacterales تفسیر شدند. همچنین با توجه به این‌که تفسیر برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه ماکرولیدها، برای *E. coli* از نظر بالینی محدودیت دارد، نتایج مربوط به این داروها عمدتاً در چارچوب پایش اپیدمیولوژیک الگوی مقاومت و نه به‌عنوان راهنمای مستقیم درمانی تفسیر شدند.

آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی: آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

گروه دارویی	غلظت دیسک (µg)	مخفف	آنتی‌بیوتیک
بتالاکتام	۱۰	AMP	آمپی‌سیلین
بتالاکتام / مهارکننده بتالاکتاماز	۲۰/۱۰	AMC	آموکسی‌سیلین/کلاوولانیک اسید
آمینوگلیکوزید	۱۰	GEN	جنتامایسین
آمینوگلیکوزید	۳۰	AMK	آمیکاسین
تتراسایکلین	۳۰	TET	تتراسایکلین
آنتی‌فولات ترکیبی	۱/۲۵ / ۲۳/۷۵	SXT	تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول
آنتی‌فولات	۵	TMP	تری‌متوپریم
ماکروئید	۳۰	TYL	تایلوزین
سفالوسپورین / مهارکننده	۳۰/۱۰	CAZ/CLV	سفازیدیم/کلاوولانیک اسید
سفالوسپورین / مهارکننده	۳۰/۱۰	CTX/CLV	سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید

اریترومایسین	ERY	۱۵	ماکرولید
انروفلوکساسین	ENR	۵	فلوروکینولون

تعریف مقاومت چندارویی: در این مطالعه، مقاومت چندارویی بر اساس تعریف پیشنهادی Magiorakos و همکاران به صورت مقاومت نسبت به حداقل یک عامل ضد میکروبی در سه یا بیش از سه کلاس آنتی بیوتیکی تعریف شد. بنابراین، معیار MDR بر پایه‌ی تعداد کلاس‌های دارویی درگیر است، نه صرفاً تعداد آنتی بیوتیک‌های مقاوم. برای هر ایزوله، کلاس‌های دارویی مقاوم محاسبه شد و ایزوله‌هایی که واجد معیار فوق بودند، به عنوان MDR طبقه‌بندی گردیدند (۱۶).

آماده‌سازی داده‌ها برای تحلیل خوشه بندی: برای تحلیل الگوهای مقاومت، نتایج آنتی بیوگرام به صورت داده‌های دودویی (Binary) کدگذاری شدند؛ به طوری که مقاومت با مقدار ۱ و حساسیت با مقدار صفر مشخص گردید. تفسیر نتایج بر اساس breakpoint های ارائه شده در دستورالعمل CLSI ۱۰۰ و ویرایش ۲۰۲۴ انجام شد (۱۴). در مواردی که دسته‌ی حد واسطه (Intermediate) وجود داشت، این ایزوله‌ها مطابق معیارهای از پیش تعیین شده و بر اساس توصیه‌های CLSI و EUCAST به طور جداگانه ثبت و گزارش شدند (۱۴، ۱۵). مقادیر گمشده (Missing values) پیش از تحلیل بررسی شدند و تنها در مواردی که مستندات آزمایشگاهی حساسیت را تأیید می‌کرد، به عنوان حساس طبقه‌بندی شدند؛ در غیر این صورت از تحلیل حذف یا به عنوان داده‌ی گمشده نگهداری شدند تا از ایجاد سوگیری در برآورد الگوهای مقاومت جلوگیری شود (۱۴، ۱۵، ۱۶).

تحلیل آماری: ابتدا فراوانی و درصد مقاومت ایزوله‌ها نسبت به هر آنتی بیوتیک به صورت توصیفی محاسبه شد. برای بررسی الگوهای چندبعدی مقاومت، ماتریس باینری مقاومت/حساسیت وارد تحلیل‌های خوشه بندی شد. در این ماتریس، مقدار ۱ نشان‌دهنده‌ی مقاومت و مقدار صفر نشان‌دهنده‌ی حساسیت بود. برای شناسایی گروه‌های مشابه از نظر پروفایل مقاومت، از خوشه بندی K-means استفاده شد (۱۷) و تعداد بهینه‌ی خوشه‌ها با شاخص سیلوئت ارزیابی گردید. همچنین برای بررسی ساختار شباهت در داده‌های باینری، خوشه بندی سلسله‌مراتبی با

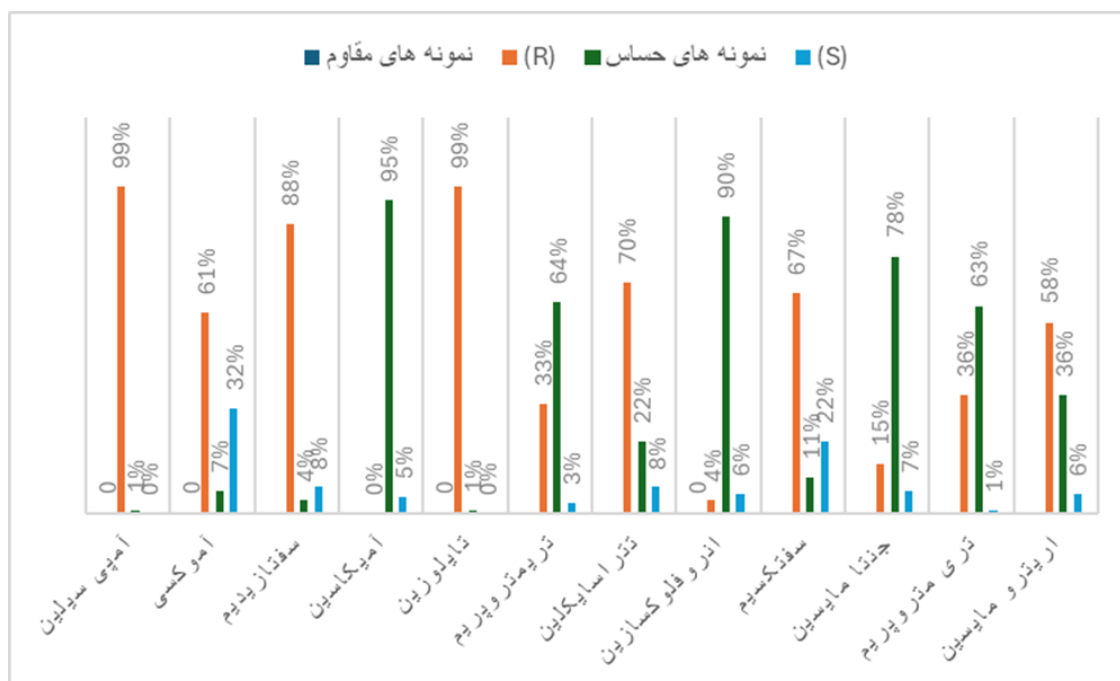
فاصله‌ی Jaccard انجام شد و نتایج به صورت دندروگرام نمایش داده شد (۱۸، ۱۹، ۲۰). برای نمایش دوبعدی الگوهای مقاومت، تحلیل مؤلفه‌های اصلی به کار رفت. با توجه به ماهیت باینری داده‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، برای مقایسه‌ی فراوانی مقاومت بین خوشه‌ها از آزمون کای دو استفاده شد و در مواردی که فراوانی مورد انتظار کم‌تر از حد قابل قبول بود، آزمون دقیق فیشر به کار رفت. سطح معنی‌داری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Python انجام شدند (۲۴-۲۱).

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها و الگوی مقاومت

آنتی بیوتیکی: از مجموع ۱۳۶ نمونه کلوآکی اخذ شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان، ۱۰۰ ایزوله *E. coli* با روش های بیوشیمیایی شناسایی گردید. بررسی الگوی همولیز روی آگار خون‌دار نشان داد که هیچ‌یک از ایزوله‌ها فنوتیپ همولیتیک نداشتند؛ بنابراین، ادامه تحلیل‌ها بر روی ایزوله‌های غیرهمولیتیک *E. coli* انجام شد.

نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که الگوی مقاومت در میان ایزوله‌ها متنوع بود. بیش‌ترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و سفنازیدیم/کلاولانیک اسید مشاهده شد که برای هر دو حدود ۹۹٪ بود. همچنین مقاومت بالا نسبت به تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید گزارش گردید. در مقابل، آمیکاسین و انروفلوکساسین کم‌ترین میزان مقاومت را نشان دادند. این یافته نشان می‌دهد که مقاومت نسبت به برخی بتالاکتام‌ها و تتراسایکلین در ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان شایع است، در حالی که آمیکاسین و انروفلوکساسین در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدباکتریایی بیش‌تری نشان داده‌اند. نتایج کامل مقاومت برای هر آنتی بیوتیک در گراف



گراف ۱ - درصد مقاومت و حساسیت ایزوله‌های اشریشیا کلای جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان

کلاس دارویی، ۹۳ مورد از ۱۰۰ ایزوله‌ی *E. coli*، معادل ۹۳٪، واجد معیار مقاومت چنددارویی بودند. تنها ۷ ایزوله‌ی معیار MDR را نداشتند. از نظر تعداد کلاس‌های دارویی درگیر، ۳۴٪ ایزوله‌ها نسبت به سه کلاس، ۳۴٪ نسبت به چهار کلاس، ۱۴٪ نسبت به پنج کلاس و ۱۱٪ نسبت به شش کلاس دارویی مقاومت نشان دادند (جدول ۲). شایع‌ترین الگوهای مقاومت چنددارویی شامل مقاومت همزمان به پنی‌سیلین‌ها، ترکیبات بتالاکتام/مهارکننده‌ی بتالاکتاماز، ترکیبات سفالوسپورین/کلاولانیک اسید و تتراسایکلین بود. این یافته نشان می‌دهد که ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان دارای بار قابل توجهی از مقاومت چنددارویی هستند و می‌توانند از دیدگاه پایش محیطی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در چارچوب رویکرد یک سلامت اهمیت داشته باشند.

تحلیل مقاومت چنددارویی (MDR): کلاس‌های

آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی در این مطالعه شامل پنی‌سیلین‌ها (AMP)، بتالاکتام/مهارکننده‌ی بتالاکتاماز (AMC)، سفالوسپورین/کلاولانیک اسید (CAZ/CLV) و CTX/CLV، آمینوگلیکوزیدها (AMK و GEN)، مهارکننده‌های سنتز فولات (TMP و SXT)، تتراسایکلین‌ها (TET)، فلوروکینولون‌ها (ENR) و ماکرولیدها (TYL و ERY) بود. با این حال، با توجه به محدودیت تفسیر بالینی ماکرولیدها در *E. coli*، داده‌های مربوط به TYL و ERY عمده‌تاً برای توصیف اپیدمیولوژیک الگوی مقاومت گزارش شدند و در محاسبه‌ی اصلی MDR به صورت محافظه‌کارانه وارد نشدند. بنابراین، تحلیل MDR بر اساس کلاس‌هایی انجام شد که تفسیر آن‌ها برای *E. coli* یا Enterobacterales معتبرتر است.

بر اساس تعریف استاندارد MDR، یعنی مقاومت نسبت به حداقل یک عامل ضد میکروبی در سه یا بیش از سه

جدول ۲. الگوهای غالب مقاومت چنددارویی در ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان

الگوی مقاومت بر اساس کلاس دارویی **	تعداد ایزوله‌ها	درصد
پنی‌سیلین + بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + تتراسایکلین	۱۶	۱۶٪
پنی‌سیلین + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + تتراسایکلین	۱۶	۱۶٪
پنی‌سیلین + بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید	۱۵	۱۵٪
پنی‌سیلین + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + تتراسایکلین + آنتی‌فولات	۱۱	۱۱٪
پنی‌سیلین + بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + آمینوگلیکوزید + تتراسایکلین + آنتی‌فولات	۱۱	۱۱٪
پنی‌سیلین + بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + تتراسایکلین + آنتی‌فولات	۹	۹٪
پنی‌سیلین + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید	۶	۶٪؛ غیر MDR
پنی‌سیلین + بتالاکتام/مهارکننده بتالاکتاماز + سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید + آنتی‌فولات	۴	۴٪
سایر الگوها	۱۲	۱۱٪ + ۱٪ غیر MDR
مجموع	۱۰۰	۱۰۰٪

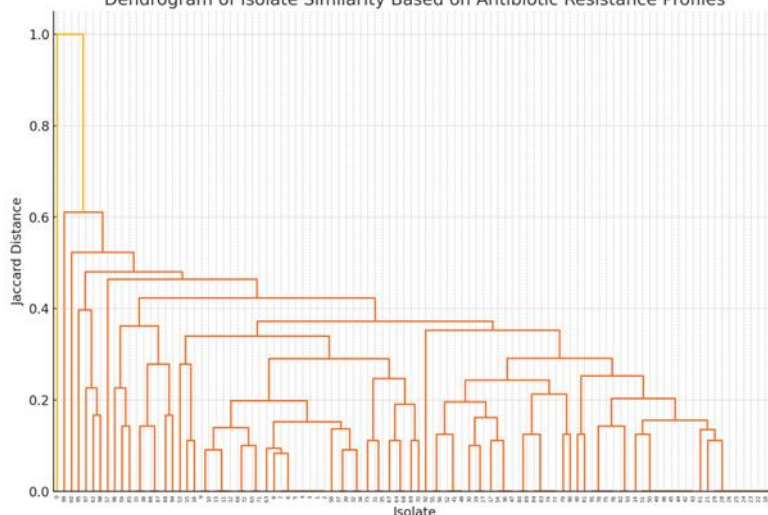
MDR به صورت مقاومت نسبت به حداقل یک عامل ضد میکروبی در سه یا بیش از سه کلاس دارویی تعریف شد. در محاسبه‌ی MDR، فقط ایزوله‌های دارای فنوتیپ مقاوم (R) به عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند و ایزوله‌های حدواسط (I) در گروه مقاوم محاسبه نشدند. با توجه به محدودیت تفسیر بالینی ماکرولیدها در *E. coli*، کلاس ماکرولید در محاسبه‌ی اصلی MDR وارد نشد و نتایج مربوط به TYL و ERY به صورت توصیفی و اپیدمیولوژیک تفسیر شدند.

خوشه بندی سلسله مراتبی: برای بررسی ساختار

شباهت میان ایزوله‌های *E. coli* بر اساس پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی، خوشه بندی سلسله مراتبی با استفاده از فاصله‌ی Jaccard بر روی داده‌های دودویی مقاومت/حساسیت انجام شد. استفاده از فاصله‌ی Jaccard برای این نوع داده‌ها مناسب است، زیرا شباهت ایزوله‌ها را بر اساس حضور یا عدم حضور مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ارزیابی می‌کند. دندروگرام حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است. در این دندروگرام، ارتفاع اتصال شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی میزان تفاوت بین پروفایل‌های مقاومت است؛ به طوری که فاصله‌های کوتاه‌تر بیانگر شباهت

بیش تر و فاصله‌های طولانی تر نشان‌دهنده‌ی تفاوت بیش تر میان ایزوله‌ها هستند. بر اساس نقطه‌ی برش تقریبی در فاصله‌ی ۰/۴ تا ۰/۵، سه خوشه‌ی اصلی قابل تشخیص بود. خوشه‌ی اول عمدتاً شامل ایزوله‌هایی با مقاومت پایین تر و پروفایل‌های نسبتاً مشابه بود. خوشه‌ی دوم شامل ایزوله‌هایی با مقاومت انتخابی نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها بود و خوشه‌ی سوم بیش تر ایزوله‌های دارای الگوی مقاومت چنددارویی بالا را در بر می‌گرفت. این گروه بندی نشان می‌دهد که ایزوله‌های مورد مطالعه از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جمعیتی یکنواخت نیستند و دارای تنوع قابل توجهی در پروفایل مقاومت هستند.

Dendrogram of Isolate Similarity Based on Antibiotic Resistance Profiles



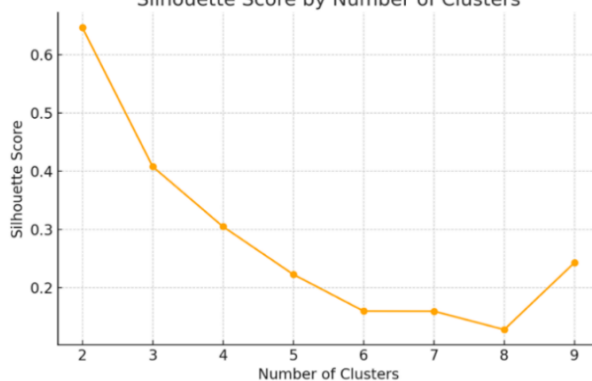
شکل ۱. دندروگرام خوشه بندی سلسله‌مراتبی ایزوله‌های *E. coli* بر اساس پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی. ارتفاع شاخه‌ها نشان‌دهنده فاصله‌ی Jaccard است؛ فاصله‌های کوتاه‌تر بیانگر شباهت بیش‌تر پروفایل مقاومت هستند. خوشه‌ها گروه‌هایی از ایزوله‌ها با الگوهای مقاومت مشابه را نشان می‌دهند.

خوشه بندی *K-means* و تحلیل سیلوئت: برای

ارزیابی تکمیلی الگوهای مقاومت و بررسی قابلیت طبقه‌بندی ایزوله‌ها، خوشه بندی *K-means* بر اساس ماتریس دودویی مقاومت/حساسیت انجام شد. به‌منظور تعیین تعداد مناسب خوشه‌ها، تحلیل سیلوئت برای تعداد خوشه‌های مختلف انجام گرفت. نتایج نشان داد که مدل دوخوشه‌ای با بالاترین مقدار سیلوئت، حدود ۰/۶۵، بهترین تفکیک کلی داده‌ها را ایجاد می‌کند. با این‌حال، مدل سه‌خوشه‌ای نیز با مقدار سیلوئت حدود ۰/۴ برای تحلیل تفسیری تکمیلی انتخاب شد، زیرا امکان طبقه‌بندی ایزوله‌ها به سه گروه قابل تفسیر شامل ایزوله‌های حساس‌تر، ایزوله‌های دارای مقاومت انتخابی و ایزوله‌های پرمقاومت یا چنددارویی را فراهم می‌کرد (شکل ۲).

کاهش امتیاز سیلوئت از مدل دوخوشه‌ای به سه‌خوشه‌ای نشان می‌دهد که اگرچه تقسیم داده‌ها به دو خوشه از نظر آماری تفکیک بهتری ایجاد می‌کند، مدل سه‌خوشه‌ای از نظر تفسیر زیستی و اپیدمیولوژیک می‌تواند اطلاعات جزئی‌تری از طیف مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارائه دهد. بنابراین، نتایج مدل سه‌خوشه‌ای باید به‌عنوان یک تحلیل اکتشافی و تکمیلی تفسیر شود. به‌طور کلی، نتایج *K-means* با الگوی مشاهده‌شده در خوشه بندی سلسله‌مراتبی همخوانی داشت و نشان داد که ایزوله‌ها از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارای الگوهای متنوع اما قابل طبقه‌بندی هستند.

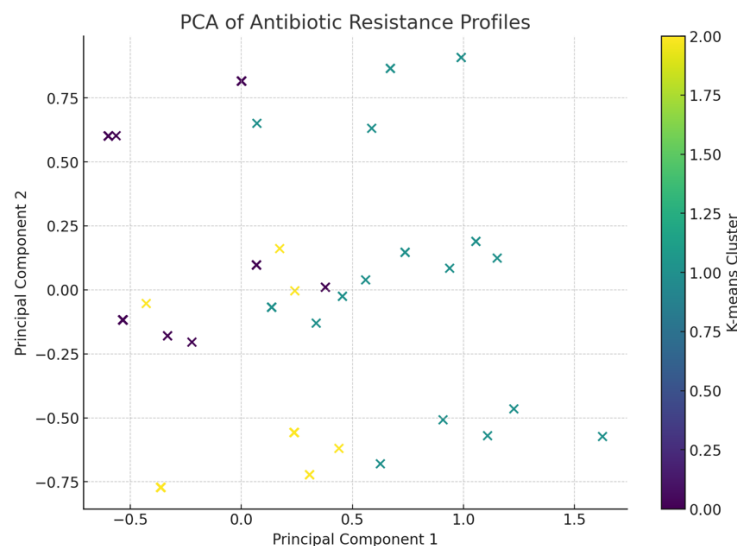
Silhouette Score by Number of Clusters



شکل ۲. تحلیل امتیاز سیلوئت برای تعیین تعداد بهینه خوشه‌ها در پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *E. coli*، بیش‌ترین مقدار سیلوئت در مدل دوخوشه‌ای مشاهده شد؛ با این حال، مدل سه‌خوشه‌ای برای تفسیر تفصیلی‌تر الگوهای مقاومت به‌عنوان تحلیل اکتشافی تکمیلی مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA): برای کاهش ابعاد داده‌ها و نمایش بهتر توزیع ایزوله‌ها بر اساس پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تحلیل مؤلفه‌های اصلی انجام شد. دو مؤلفه‌ی اصلی اول در مجموع ۴۶/۵٪ از واریانس کل داده‌ها را توضیح دادند؛ به‌طوری‌که مؤلفه‌ی اول (PC1) سهم ۲۵/۱٪ و مؤلفه‌ی دوم (PC2) سهم ۲۱/۴٪ از واریانس را به خود اختصاص داد. نمودار دوبعدی PCA نشان داد که ایزوله‌ها تا حدی مطابق با خوشه‌های حاصل از K-means در فضای دوبعدی توزیع شده‌اند. خوشه‌ی صفر شامل ایزوله‌های با مقاومت چنددارویی بالاتر، خوشه‌ی یک شامل

ایزوله‌هایی با مقاومت انتخابی نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و خوشه‌ی دو عمدتاً شامل ایزوله‌های حساس‌تر بود. با این حال، از آنجا که دو مؤلفه‌ی اول کم‌تر از نیمی از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌دهند، جداسازی خوشه‌ها در نمودار PCA باید با احتیاط تفسیر شود. بنابراین، PCA در این مطالعه بیش‌تر به‌عنوان ابزار نمایشی و تکمیلی در کنار خوشه‌بندی سلسله‌مراتب و K-means در نظر گرفته شد.



گراف ۲. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *E. coli*، ایزوله‌ها در فضای دوبعدی PCA نمایش داده شده‌اند. رنگ‌ها نشان‌دهنده‌ی خوشه‌های K-means هستند: خوشه‌ی صفر، ایزوله‌های با مقاومت چنددارویی بالاتر؛ خوشه‌ی ۱، ایزوله‌های دارای مقاومت انتخابی؛ و خوشه‌ی ۲، ایزوله‌های حساس‌تر. محور X، مؤلفه‌ی اول (PC1) با ۲۵/۱٪ و محور Y، مؤلفه‌ی دوم (PC2) با ۲۱/۴٪ از واریانس داده‌ها را نشان می‌دهد.

مقایسه‌ی آماری فراوانی مقاومت بین خوشه‌ها:

برای ارزیابی تفاوت فراوانی مقاومت بین خوشه‌های حاصل از تحلیل پروفایل مقاومت، از آزمون کای‌دو و در موارد لازم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. نتایج نشان داد که فراوانی مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها بین خوشه‌ها اختلاف معنی‌دار دارد (جدول ۳). این اختلاف

به‌ویژه برای آموکسی‌سیلین/کلاوولانیک اسید، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول، تتراسایکلین، تری‌متوپریم، اریترومایسین و ترکیبات سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که خوشه‌های شناسایی شده صرفاً حاصل تفکیک الگوریتمی نیستند، بلکه از نظر آماری نیز در برخی الگوهای مقاومت با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

جدول ۳. فراوانی مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها

مقدار p	آنتی‌بیوتیک
۰/۰۴۷	AMC
<۰/۰۰۱	SXT
<۰/۰۰۱	TET
<۰/۰۰۱	CAZ/CLV
<۰/۰۰۱	CTX/CLV
<۰/۰۰۱	GEN
<۰/۰۰۱	TMP
<۰/۰۰۱	ERY

** آنتی‌بیوتیک‌هایی که فراوانی مقاومت نسبت به آن‌ها بین خوشه‌های حاصل از تحلیل پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی اختلاف معنی‌دار نشان داد. مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در فراوانی مقاومت بین خوشه‌ها در نظر گرفته شد. مقایسه‌ها با آزمون کای‌دو و در موارد دارای فراوانی مورد انتظار پایین، با آزمون دقیق فیشر انجام شدند.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از کبوتران منطقه‌ی سیستان بررسی شد. اگرچه هیچ ایزوله‌ای همولیتیک شناسایی نشد، وجود ایزوله‌های غیرهمولیتیک دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی متنوع از دیدگاه بهداشت عمومی و رویکرد یک سلامت اهمیت دارد. مقاومت بسیار بالا نسبت به آمپی‌سیلین از یافته‌های مهم مطالعه بود. مقاومت بالا به آمپی‌سیلین در ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از حیوانات و پرندگان در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۲۶، ۲۷). این موضوع می‌تواند با مصرف گسترده‌ی بتالاکتام‌ها در انسان و دام، انتقال ژن‌های بتالاکتاماز و پایداری ژن‌های مقاومت در محیط مرتبط باشد (۲۷، ۲۸). کبوتران به‌دلیل تماس با پسماندها و محیط‌های آلوده‌ی شهری ممکن است چنین باکتری‌هایی را از محیط کسب کرده و از طریق مدفوع منتشر کنند و به‌عنوان مخزن محیطی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش داشته باشند (۲۹، ۳۰).

مقاومت بالا نسبت به دیسک‌های ترکیبی سفنازیدیم/کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم/کلاوولانیک اسید نیز از یافته‌های قابل توجه مطالعه‌ی حاضر بود. با این‌حال، تفسیر این یافته باید با احتیاط انجام شود؛ زیرا این دیسک‌های ترکیبی معمولاً به‌عنوان شاخص‌های فنوتیپی برای غربالگری یا تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) در اعضای خانواده‌ی Enterobacterales به‌کار می‌روند و نباید مانند آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مستقل تفسیر شوند (۱۴، ۱۵). در روش‌های فنوتیپی شناسایی ESBL، مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد سفالوسپورین‌ها به‌تنهایی و در ترکیب با کلاوولانیک اسید اهمیت دارد؛ افزایش معنی‌دار قطر هاله در حضور کلاوولانیک اسید می‌تواند نشان‌دهنده‌ی مهار آنزیم‌های ESBL و در نتیجه احتمال تولید این آنزیم‌ها باشد (۱۴، ۱۵). بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر نتایج مربوط به این دیسک‌ها باید در چارچوب احتمال وجود فنوتیپ ESBL تفسیر شود و تأیید قطعی آن نیازمند آزمون‌های

فوتوتیپی تکمیلی و بررسی مولکولی ژن‌های blaCTX-M، blaTEM و blaSHV است (۳۱، ۱۵).

مقاومت بالا نسبت به تتراسایکلین نیز قابل توجه است. تتراسایکلین‌ها از داروهای پرمصرف در دامپزشکی بوده‌اند و مقاومت به این گروه در باکتری‌های روده‌ای حیوانات شایع است. مشاهده‌ی مقاومت بالا نسبت به تتراسایکلین در ایزوله‌های کبوتران می‌تواند بازتاب آلودگی محیطی، تماس با منابع دامی یا فشار انتخابی ناشی از مصرف گسترده‌ی این دارو باشد (۳۲). در مقابل، مقاومت پایین نسبت به آمیکاسین و انروفلوکساسین نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی فعالیت بیشتری علیه ایزوله‌های مورد بررسی داشته‌اند. آمیکاسین معمولاً کم‌تر در محیط‌های عمومی و دام‌های غیرصنعتی استفاده می‌شود و همین موضوع می‌تواند یکی از دلایل مقاومت پایین‌تر نسبت به آن باشد (۳۵، ۳۶). انروفلوکساسین نیز در این مطالعه مقاومت کمی نشان داد، اما با توجه به اهمیت فلوروکینولون‌ها، حتی مقادیر پایین مقاومت نیز باید مورد توجه قرار گیرد، زیرا مقاومت به این گروه می‌تواند از طریق جهش‌های کروموزومی در ژن‌های هدف یا انتقال پلاسمیدی گسترش یابد (۳۶، ۳۷).

تحلیل مقاومت چنددارویی نشان داد که بخش قابل توجهی از ایزوله‌ها واجد الگوهای MDR هستند. این یافته اهمیت اپیدمیولوژیک دارد، زیرا ایزوله‌های MDR می‌توانند به‌عنوان مخزن ژن‌های مقاومت عمل کرده و در محیط شهری منتشر شوند (۳۸). در مطالعه‌ی حاضر، الگوهای غالب MDR در قالب جدول ارائه شد و نشان داد که مقاومت همزمان به پنی‌سیلین‌ها، ترکیبات بتالاکتام/مهارکننده‌ی بتالاکتاماز، ترکیبات سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید و تتراسایکلین از الگوهای برجسته‌ی مقاومت چنددارویی در ایزوله‌های مورد بررسی است. این یافته با تعریف استاندارد مقاومت چنددارویی بر اساس مقاومت به حداقل یک عامل ضد میکروبی در سه یا بیش از سه کلاس دارویی تفسیر شد (۱۶).

تحلیل خوشه بندی نشان داد که ایزوله‌های *E. coli*

جدا شده از کبوتران از نظر الگوی مقاومت، جمعیتی یکنواخت نیستند و در گروه‌هایی با درجات مختلف مقاومت قرار می‌گیرند. استفاده از فاصله‌ی Jaccard در خوشه بندی سلسله‌مراتب، با توجه به ماهیت دودویی داده‌های مقاومت/حساسیت، امکان ارزیابی شباهت ایزوله‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را فراهم کرد (۱۹، ۲۰). شناسایی خوشه‌هایی شامل ایزوله‌های حساس‌تر، ایزوله‌های دارای مقاومت انتخابی و ایزوله‌های با مقاومت چنددارویی بالا، بیانگر تنوع قابل توجه در ساختار مقاومت آنتی‌بیوتیکی جمعیت مورد مطالعه است. نتایج خوشه بندی K-means نیز این الگو را تأیید کرد؛ هرچند تحلیل سیلوئت نشان داد که مدل دوخوشه‌ای بهترین تفکیک کلی را ایجاد می‌کند، انتخاب سه خوشه امکان تفسیر دقیق‌تر طیف مقاومت از ایزوله‌های حساس‌تر تا ایزوله‌های پرمقاومت را فراهم ساخت. همچنین تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) نشان داد که دو مؤلفه‌ی اول در مجموع ۴۶/۵ درصد از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌دهند و تا حدی جدایی خوشه‌های حاصل از K-means را نشان می‌دهند؛ با این حال، به دلیل باقی ماندن بخش قابل توجهی از واریانس در مؤلفه‌های بعدی، تفسیر PCA باید با احتیاط انجام شود (۲۰، ۱۶). از سوی دیگر، مشاهده‌ی تفاوت معنی‌دار میان خوشه‌ها در مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه تتراسایکلین، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول، تری‌متوپریم، اریترومیسین و ترکیبات سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید، نشان می‌دهد که گروه‌بندی ایزوله‌ها صرفاً یک تفکیک الگوریتمی نیست، بلکه بازتابی از تفاوت واقعی در پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۱۶، ۳۴).

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که کبوتران منطقه‌ی سیستان می‌توانند حامل ایزوله‌های *E. coli* با الگوهای متنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند. این موضوع اهمیت پایش پرندگان شهری را در چارچوب رویکرد یک‌سلامت برجسته می‌کند. با این حال، این مطالعه محدودیت‌هایی دارد؛ از جمله عدم بررسی مولکولی ژن‌های

هیچ‌یک از ایزوله‌ها فنوتیپ همولیتیک نداشتند. با وجود این، ایزوله‌های غیرهمولیتیک دارای الگوهای متنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند. مقاومت بالا نسبت به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین، همراه با الگوی مشکوک به تولید ESBL بر اساس دیسک‌های ترکیبی سفالوسپورین/کلاوولانیک اسید، از یافته‌های اصلی مطالعه بود. تحلیل خوشه بندی نشان داد که ایزوله‌ها بر اساس پروفایل مقاومت در گروه‌های متمایز قرار می‌گیرند و بخش قابل توجهی از آن‌ها واجد الگوی مقاومت چنددارویی هستند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که کبوتران می‌توانند در پایش محیطی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد توجه قرار گیرند. با این حال، برای تأیید نقش آن‌ها در انتقال مقاومت به انسان یا دام، مطالعات تکمیلی شامل شناسایی مولکولی، بررسی ژن‌های مقاومت، ارزیابی ESBL/AmpC و تحلیل اپیدمیولوژیک گسترده‌تر ضروری است.

سپاسگزاری

از کلیه افراد یا سازمان‌هایی که در فراهم کردن تسهیلات، کمک‌های مالی و یا تکنیکی همکاری نموده‌اند و نام آن‌ها جزء نویسندگان مقاله نیست، تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

مقاومت، عدم تأیید مولکولی *E. coli*، نبود داده‌های مربوط به منشأ تماس آنتی‌بیوتیکی و محدود بودن تحلیل‌ها به فنوتیپ مقاومت. بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی با بررسی ژن‌های مقاومت، ESBL/AmpC، تایپینگ مولکولی و تحلیل اپیدمیولوژیک گسترده‌تر توصیه می‌شود. مطالعات پیشین نیز نقش کبوتران را در حمل ایزوله‌های مقاوم گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای در اردبیل، Azizpour از ۱۳۰ نمونه سوآپ کلوآکی کبوتران خانگی، ۲۳ ایزوله‌ی *E. coli* و ۷ ایزوله‌ی *Salmonella* spp جدا کرد و نشان داد که ایزوله‌های *E. coli* بیش‌ترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین و سولفادیازین/تری‌متوپریم داشتند، در حالی که نسبت به سیپروفلوکساسین حساس بودند (۳۹). همچنین مطالعه‌ای در مجارستان کبوتران خانگی را به‌عنوان منبع بالقوه‌ی ایزوله‌های *E. coli* تولیدکننده‌ی ESBL و AmpC مطرح کرده است (۴۰). یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نیز با این گزارش‌ها همسو است و نشان می‌دهد که پایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کبوتران می‌تواند بخشی از برنامه‌های مراقبت در چارچوب رویکرد یک‌سلامت باشد (۳۴).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از میان ۱۳۶ نمونه‌ی کلوآکی کبوتران منطقه‌ی سیستان، ۱۰۰ ایزوله‌ی *E. coli* شناسایی شد و

References

- 1- **Davies J, Davies D.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417–433.
- 2- **Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, et al.** Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the continental European pigeon (*Columba livia*). *PLoS One.* 2010;5(10):e11012.
- 3- **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):207–217.
- 4- **Dziva F, Stevens MP.** Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of *Escherichia coli* pathogenicity, in the context of vaccination. *Avian Pathol.* 2008;37(4):355–366. doi:10.1080/03079450802216652
- 5- **Guenther S, Ewers C, Wieler LH.** Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife and the environment: a review. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(17):5599–5607.
- 6- **Jahantigh M, Samadi K, Esmaealzadeh Dizaji R, Salari S.** Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Vet Res.* 2020;16:267. doi:10.1186/s12917-020-02488-z
- 7- **Huang SS, Zhang Z, Lee KY, et al.** Clustering analysis and machine learning approaches for antimicrobial resistance surveillance: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2020;71(11):2822–2832.
- 8- **Amsterdam D, Wolfe MW.** Comparison of reagent-impregnated paper strips and conventional tests for distinguishing *Escherichia* from *Aerobacter*: correlation with colonial morphology. *Appl Microbiol.* 1968;16(10):1460–1464.
- 9- **Powers EM, Latt TG.** Simplified 48-hour IMVic test: an agar plate method. *Appl Environ Microbiol.* 1977;34(3):274–279.
- 10- **Antony AC, Paul MK, Silvester R, et al.** Comparative evaluation of EMB agar and Hicrome *E. coli* agar for differentiation of green metallic sheen producing colonies. *J Pure Appl Microbiol.* 2016;10(4):2863–2870. doi:10.22207/JPAM.10.4.48.
- 11- **Tille PM.** Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 15th ed. Elsevier; 2022.
- 12- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne (PA): CLSI; 2023.
- 13- **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493–496.
- 14- **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.
- 15- **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. Växjö, Sweden: EUCAST; 2024.
- 16- **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–281.
- 17- **MacQueen J.** Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability.* Berkeley (CA): University of California Press; 1967. p. 281–297.
- 18- **Rousseeuw PJ.** Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987;20:53–65.
- 19- **Jaccard P.** Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc Vaud Sci Nat.* 1901;37:547–579.
- 20- **Ward JH Jr.** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc.* 1963;58(301):236–244.
- 21- **Pearson K.** On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag.* 1901;2:559–572.
- 22- **Jolliffe IT, Cadima J.** Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos*

Trans A Math Phys Eng Sci.
2016;374(2065):20150202.

23- Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos Mag.* 1900;50:157–175.

24- Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J R Stat Soc.* 1922;85(1):87–94.

25- Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. *Applied Logistic Regression.* 3rd ed. Hoboken (NJ): Wiley; 2013.

26- Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–584.

27- Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(3):159–166.

28- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):718–733.

29- Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, et al. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One.* 2009;4(6):e5958.

30- Silva N, Igrejas G, Figueiredo N, et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from wild birds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:137–145.

31- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657–86.

32- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232–260.

33- Roberts MC. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253(2):201–210.

34- Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* 2015;8:49–61.

35- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(3):175–186.

36- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1354:12–31.

37- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(5):1109–1117.

38- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification.* San Francisco: W.H. Freeman; 1973.

39- Azizpour A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from domestic pigeons in Ardabil, Iran. *Vet Res Biol Prod.* 2023;36(4):20–27. [In Persian]

40- Kerek Á, Szabó Á, Jerzsele Á. Antimicrobial susceptibility profiles of *Escherichia coli* isolates from domestic pigeons in Hungary. *Front Vet Sci.* 2025 Sep 12;12:1642902



Volume 9, Issue 1, Spring 2026, pages: 74-88



Antibiotic Resistance Profiling and Clustering Analysis of *Escherichia coli* Isolated from Urban and Semi-Domestic Pigeons in the Sistan Region, Iran

Alireza Mirzaei¹, Ahmad Rashki^{2*}, Mohsen Najimi³, Saeid Salari⁴

1- MSc Graduate in Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor of Microbiology and Molecular Genetics, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

3- Associate Professor of Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

4- Associate Professor of Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding Author: Ahmad Rashki, Ph.D. (Email: ah_rashki@usal.es; Tel: +98 915 546 2063).

Receive: June 11, 2026; Revise: June 14, 2026; Accept: July 15, 2026

10.22034/nfvm.2026.586183.1317

Abstract

Urban and semi-domestic pigeons, due to their continuous interaction with human-dominated environments, contaminated sources, waste materials, and other animals, may contribute to the dissemination cycle of antibiotic-resistant bacteria. *Escherichia coli*, as an indicator enteric bacterium in birds, serves as a suitable sentinel for monitoring antimicrobial resistance within the One Health framework. This study aimed to isolate *E. coli* from pigeons in the Sistan region and evaluate their antibiotic resistance patterns, multidrug resistance prevalence, and resistance profile similarity structure using cluster analyses.

In this cross-sectional study, cloacal swabs were collected from 136 pigeons in the Sistan region. Samples were cultured on MacConkey agar, eosin methylene blue agar, and blood agar. Presumptive *E. coli* isolates were identified using standard morphological and biochemical tests. Hemolysis testing was performed on blood agar. Antimicrobial susceptibility testing was conducted using the Kirby–Bauer disk diffusion method on Mueller–Hinton agar, and results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Resistance data were binary-coded, and analyses included resistance frequency, multidrug resistance index, K-means clustering, hierarchical clustering based on Jaccard distance, and principal component analysis (PCA).

A total of 100 *E. coli* isolates were confirmed from pigeons in the Sistan region. None of the isolates exhibited a hemolytic phenotype. The highest resistance rates were recorded against ampicillin and ceftazidime/clavulanic acid, each at approximately 99%. High resistance to tetracycline was also observed, whereas the lowest resistance rates were noted for amikacin and enrofloxacin. Multidrug resistance analysis revealed that a subset of isolates were resistant to multiple antibiotic classes. Clustering analyses demonstrated that isolates formed distinct categories, including highly resistant isolates, those with selective resistance, and more susceptible isolates. PCA partially confirmed this clustering structure; however, the first two principal components accounted for only about 46.5% of the total variance.

The findings indicate that pigeons in the Sistan region may harbor *E. coli* isolates with diverse antibiotic resistance profiles. Although no hemolytic isolates were identified, the presence of resistant and multidrug-resistant isolates is of public health concern from a One Health perspective. Regular monitoring of antimicrobial resistance in urban birds can help identify environmental resistance reservoirs and inform the development of targeted control strategies

Keywords: *Escherichia coli*; Pigeon; Antibiotic resistance; Multidrug resistance (MDR); Cluster analysis; Sistan region