بررسی تجربی اثر تسهیل کننده کولیستین سولفات در کلونیزاسیون باکتری سالمونلا تیفی موریم مقاوم به این دارو در جوجه های گوشتی

محمدرضا باسامی[۱]، عبدالله جمشیدی[۲]، اوستا صدر زاده[۲]، علیرضا برادران[۳]، امیر ماهوتی[۱]
۱- بخش بیماریهای طیور، گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- بخش بیوتکنولوژی دامپزشکی، پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی
۴- دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد گرمسار

خلاصه:

سالمونلا تیفی موریوم یک پاتوژن مهم در طیور می باشد. در این بررسی اثر مصرف مشوق کولیستین سولفات در کلونیزاسیون باکتری سالمونلا تیفی موریوم مقاوم به این دارو در جوجه گوشتی یک روزه مورد بررسی تجربی قرار گرفت. برای این بررسی در سری اول تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی در ۶ گروه تقسیم گردیدند. به تمام گروهها به جز گروه ششم ۲۰۰ µl از سوسپانسیون باکتری سالمونلا تیفی موریوم (غلظت 2×10^{7} CFU /ml) مقاوم به کولیستین سولفات و حساس به سولفادیازین- تریمتوپریم باکتری خورانده شد. به گروه های ۱ و ۲ دو فرمولاسیون کولیستین سولفات و به گروه ۳ و ۴ دو فرمولاسیون سولفادیازین- تریمتوپریم با دوز توصیه شده استاندارد خورانده شد. گروه پنجم نیز به عنوان گروه کنترل مثبت کلونیزاسیون و گروه ششم نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. نتایج حاصله موید کلونیزاسیون باکتری صرفا در دو گروه تحت درمان با کولیستین سولفات بود. در سری دوم آزمایشات ۳۲ قطعه جوجه یک روزه مورد آزمایش قرار گرفت. در این آزمایشات که با خوراندن ۲۰۰ مایکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (غلظت CFU 6×10^{8} /ml) در روز اول و دو دوز معادل آزمایشات سری اول در روزهای دوم و سوم صورت پذیرفت کلونیزاسیون در گروه کنترل مثبت نیز حاصل گردید. یافته های این بررسی ها نشانگر آن بود که کولیستین سولفات می تواند احتمالا با مکانیسم تضعیف فلور طبیعی روده و حذف اثر رقابتی آن زمینه را برای رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم مقاوم به این آنتی بیوتیک فراهم نماید. تایید اثرات مفید فلور طبیعی روده در حفظ سلامت جوجه گوشتی و به طور غیر مستقیم تاثیر پروبیوتیک ها در جلوگیری از کلونیزاسیون باکتری پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم و پرهیز از درمان آنتی بیوتیکی نابجا را می توان از دستاورد های این پژوهش به شمار آورد.

کلمات کلیدی: کولیستین سولفات، سالمونلا تیفی موریم، جوجه های گوشتی

مقدمه :

مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در جوجه های یک روزه پدیده ای است که به فراوانی مشاهده می گردد. در صورتی که باکتری های پاتوژن مقاوم به یک آنتی بیوتیک خاص در محیط حضور داشته باشند، از نظرگاه تئوریک تجویز این آنتی بیوتیک ممکن است با از بین بردن فلور طبیعی روده موجب تکثیر و کلونیزه شدن این باکتری های پاتوژن را موجب گردد. فرضیه مورد آزمون در این بررسی این بود که با فرض شرایط کاملا یکسان در جوجه های گوشتی، آیا مصرف آنتی بیوتیک کولیستین سولفات، در قیاس با عدم مصرف این آنتی بیوتیک، می تواند با مکانیسم تضعیف و تخریب فلور طبیعی روده موجبات تسهیل در کلونیزه شدن باکتری سالمونلا تیفی موریوم مقاوم به این آنتی بیوتیک را فراهم نماید. در صورت صحت این فرضیه می توان انتظار داشت که استفاده بی رویه و چشم بسته آنتی بیوتیک ها می تواند با تغییر فلور طبیعی روده موجب فراهم شدن زمینه برای رشد باکتری های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک ها مصرفی را فراهم آورد. در مرور منابع موارد محدودی را می توان یافت که صحت احتمالی این پدیده را حمایت نمایند.

مواد و روش کار:

باکتری مورد استفاده در این پژوهش یک ایزوله سالمونلا تیفی موریوم تعیین هویت شده به روش های کشت مرسوم، آزمایشات بیوشیمیایی، مولتی پلکس PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی با پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی به کولیستین سولفات و حساسیت به سولفادیازین-تری متوپریم بود. قبل از شروع آزمایش جهت اطمینان از عاری بودن اجزاء جیره از سالمونلا، دان آماده شده ابتدا به روش PCR با پرایمرهای اختصاصی جنس سالمونلا که ژن invA را شناسایی می کردند مورد بررسی قرار گرفت.

برای این بررسی تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی نژاد راس ۳۰۸ در نظر گرفته شد که بلافاصله پس از هچ به سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل شدند. جوجه ها در بدو ورود به ۴ گروه ۳۳ قطعه ای تحت درمان (گروه های ۱ تا ۴)، یک گروه ۵۰ قطعه ای، به عنوان گروه کنترل مثبت کلونیزاسیون (گروه ۵) و یک گروه ۱۸ قطعه ای، به عنوان گروه کنترل منفی (گروه ۶) تقسیم گردیدند. به تمام گروهها به جز گروه ششم، ۲۰۰µl از سوسپانسیون باکتری سالمونلا تیفی موریوم (غلظت 2×10^{7} CFU /ml) مقاوم به کلستین سولفات و حساس به سولفاتامید و تری متوپریم از طریق scalp vein (به عنوان لوله مری) خورانده شد. گروه ششم به همین حجم سرم فیزیولوژی خورانده شد. درگروه های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب کلستین سولفات تولید داخل، سوژی کولای (کلستین سولفات وارداتی)، سولفاد یازین- تری متوپریم تولید داخل، سولفاد یازین-تری متوپریم تولید تحت لیسانس با دوز استاندارد توصیه شده خورانده شد. درگروه پنجم، به عنوان گروه کنترل مثبت کلونیزاسیون، و در گروه ششم، به عنوان کنترل منفی یا گروه غیر آلوده هیچ آنتی بیوتیکی مصرف نگردید. اولین نمونه گیری ۳۶ ساعت پس از ورود جوجه ها و آخرین نمونه گیری در سه هفتگی انجام گردید. در هر آزمایش از هر یک از گروه های تحت درمان و گروه کنترل منفی ۲ نمونه و از گروه کنترل مثبت (بدون آنتی بیوتیک) ۴ نمونه به صورت تصادفی انتخاب و مورد کالبدگشایی و کشت قرار گرفت. پس از باز کردن سکوم و توزین محتویات، با آب پپتونه ۰.۱ درصد رقت سازی سریال تا رقت 10^{-2} انجام شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ µl بر روی محیط XLD کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در $37^{0}C$ پرگنه های صورتی با نوک سیاه رنگ شمارش گردیدند. سپس کلنی های مشکوک به سالمونلا را انتخاب نموده و با استفاده از محیط های کشت تفریقی مانند TSI ، سیمون سیترات و اوره جنس سالمونلا مورد تشخیص اولیه قرار گرفت. جهت تأیید تشخیص جنس سالمونلا وگونه تیفی موریوم در باکتری های ایزوله شده تعداد ۱۰ پرگنه یا ۱۰ درصد پرگنه ها (هر کدام کمتر بود) انتخاب و به روش multiplex clony PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که بخشی از ژن های invA و filiC را تکثیر می نمودند، هویت باکتری های ایزوله شده تایید نهایی گردید.

با توجه به اینکه در جوجه های کنترل مثبت، در قیاس با جوجه های تحت درمان با کولیستین، علی رغم خوراندن حجم یکسان باکتری کلونیزاسیون باکتری در آزمایشات سری اول صورت نپذیرفت، تصمیم گرفته شد که دوز مصرفی و تعداد دفعات خوراندن باکتری افزایش داده شود. با این هدف که اثرات مهارکنندگی فلور طبیعی روده در کلونیزه شدن باکتری سالمونلا خنثی گردد. در آزمایشات سری دوم تعداد ۲۴ قطعه جوجه یک روزه تهیه و به ۳ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب به عنوان گروه تحت درمان با کولیستین تولید داخل، سوژی کولای (کولیستین)، کنترل مثبت (بدون درمان) و کنترل منفی (بدون عفونت و بدون درمان) انتخاب گردیدند. در سه گروه اول ۱ µl ۲۰۰ از سوسپانسیون باکتری سالمونلا تیفی موریوم (غلظت 6×10^{8} CFU /ml) در روز اول و ۲۰۰µl از سوسپانسیون باکتری (غلظت 2×10^{7} CFU /ml) در روزهای دوم و سوم خورانده شد. گروه ۴ به همین میزان سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. کالبد گشایی، نمونه برداری و شمارش پرگنه از گروه ها هر ۴ روز یکبار جمعا ۴ بار، هر بار ۲ نمونه صورت پذیرفت. امور مربوط به کارهای مولکولی این بررسی بر اساس روش های استاندارد صورت پذیرفت.

نتایج:

در خلال آزمایشات علایم بالینی پاراتیفوئید در هیچیک از جوجه ها مشاهده نشد. از نظر تلفات بین دو گروه تحت درمان و

کنترل تفاوت مشخصی مشاهده نشد. نمونه برداری از گروه تحت درمان و کنترل به طور همزمان صورت گرفت. علی رغم عدم ایزولاسیون کامل جوجه ها ی گروه های تحت درمان و کنترل، جوجه های کنترل منفی در طول دوره درمان عاری از آلودگی باقی ماندند. دان مورد مصرف بر اساس نتایج PCR عاری از سالمونلا تشخیص داده شد. حد شمارش (detection limit) پرگنه ها در این بررسی معادل $1x10^1$ cfu/gm بود. لذا نمونه هایی که تحت عنوان صفر ثبت شدند، می توانسته اند حاوی حداقل ۱۰ باکتری در هر گرم مدفوع بوده باشند. در جوجه های گروه کنترل مثبت سری اول آزمایشات که با ۱ µl ۲۰۰ از سوسپانسیون باکتری (غلظت ۲×۱۰^{۷} CFU /ml) آلوده شدند جمعیت باکتری مورد شمارش در سکوم در دفعات متوالی نشانگر عدم کلونیزاسیون باکتری بود. در سری دوم آزمایشات با افزودن تعداد باکتری و تعدد دفعات خوراندن باکتری، جوجه های گروه کنترل مثبت دارای آلودگی پایدارتری بودند که به خوبی معرف کلونیزاسیون کامل در سکوم بود. عفونت سکال تا پایان آزمایش استمرار یافت. در سری اول آزمایشات طبق نتایج بدست آمده از شمارش پرگنه ها درگروهای ۱ و ۲ که از کلیستین سولفات مقاوم به سالمونلا تیفی موریوم استفاده کرده بودند کلونیزاسیون به طور کامل انجام گرفت. در سری دوم آزمایشات این نتایج در مورد گروه های دریافت کننده کولیستین تکرار گردید. در سری اول آزمایشات در گروه سوم که از سولفادیازین و تری متوپریم داخلی و در گروه چهارم که از سولفادیازین و تری متوپریم تحت لیسانس یک شرکت خارجی استفاده شد کلونیزاسیون صورت نگرفته و هر دو دارو دارای اثر تقریبا یکسانی بر علیه کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم بودند. در گروه ششم نیز که به عنوان کنترل منفی کلونیزاسیون در نظر گرفته شده بود همانگونه که انتظار می رفت کلونیزاسیون مشاهده نگردید. این موضوع در سری دوم آزمایشات تکرار گردید. تست های بیوشیمیایی و مولکولی انجام گرفته بر روی باکتری های جدا شده تماما جنس سالمونلا و گونه تیفی موریوم را تایید نمودند. معنی دار بودن نتایج حاصله توسط آزمون های آماری استاندارد تایید گردید. (جداول و تصاویر مربوطه بواسطه محدودیت صفحات منظور نگردیده است).

بحث:

بر اساس طراحی انجام شده در سری اول آزمایشات گروههای اول و دوم برای بررسی هیپوتز اثر احتمالی تسهیل کننده کلستین سولفات در کلونیزه شدن باکتری سالمونلا تیفی موریوم مقاوم به این دارو و گروه سوم و چهارم جهت بررسی اثر مهار کنندگی سولفاتامید-تری متوپریم در کلونیزاسیون باکتری سالمونلا تیفی موریوم حساس به این دارو در نظر گرفته شدند. گروه های کنترل مثبت و منفی نیز در این بررسی نیز همانند تمامی آزمایشات تجربی منظور گردیدند. بر اساس نتایج حاصله در گروهای اول و دوم که کلیستین سولفات مصرف کرده بودند کلونیزاسیون به سهولت صورت گرفت. این نتیجه به همراه عدم کلونیزاسیون در گروه کنترل مثبت که تعداد و حجم یکسانی از باکتری را دریافت کرده بودند، می تواند این گونه تفسیر شود که کلیستین سولفات احتمالا با تضعیف یا تخریب میکرو فلور طبیعی روده و حذف باکتری های مفید زمینه را برای تکثیر و کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم فراهم نموده است. در حالیکه در نمونه های کنترل مثبت که با تعداد و حجم یکسانی از باکتری آلوده شده بودند، با توجه به فقدان عامل مختل کننده میکروفلور، کلونیزاسیون صورت نگرفت. در سری دوم آزمایشات با افزایش تعداد باکتری و دفعات خوراندن باکتری کلونیزاسیون در نمونه های کنترل مثبت انجام گردید. در این جوجه ها احتمالا فلور طبیعی روده تاب مقاومت در برابر تکثیر و کلونیزاسیون باکتری پاتوژن سالونلا تیفی موریوم را نداشته است. این نتیجه به طور مستقیم تاثیر سوء استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک و به طور غیر مستقیم اثرات مفید کاربرد پروبیوتیک ها در طیور بالاخص در ابتدای پرورش جوجه را به خوبی نشان می دهد. نکته دیگر در این بررسی عدم تفاوت کارایی دو آنتی بیوتیک کولیستین سولفات ژنریک تولید داخل و ترکیب تجاری سوژی کولای و همچنین عدم تفاوت قابل توجه دو فرمولاسیون ژنریک و فرمول تجاری تحت لیسانس سولفاتامید- تریمتوپریم در مهار کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم حساس به این آنتی بیوتیک بود.

منابع:

1-Jamshidi, A. & Hampson, D. J. (2002). Zinc bacitracin enhances colonization by the intestinal spirochaete Brachyspira pilosicoli in experimentally infected layer hens. Avian Pathol 31, 293–298.
2-Baba, E., S. Nagaishi, T. Fukata, and A. Arakawa (1991). The role of intestinal microflora on the prevention of Salmonella colonization in gnotobiotic chickens. Poult. Sci. 70:1902–1907
3-Bjerrum, L., Engberg, R. M and Pedersen K. (2003). Infection Models for Salmonella typhimurium DT110 in Day-Old and 14-Day-Old Broiler Chickens Kept in Isolators. Avian Diseases 47:1474–1480
4-Colistin: The Final Report of Committee for Veterinary Medicinal Products (1995). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/)16/95-Final
5-ault, S., H. Bewa, C. Bridonneau, and P. Raibaud (1985). Efficiency of various bacterial suspensions derived from cecal floras of conventional chickens in reducing the population level of Salmonella typhimurium in gnotobiotic mice and chicken intestines. Can. J. Microbiol. 31:832–838
6-Muir W.I, Bryden W.L, and Husband A.J (1998). Comparison of Salmonella typhimurium challenge models in chickens. Avian Diseases 42(2):257-64
7-Oliveira et al., 2002: Oliveira SD, Santos LR, Schuch DM, Silva AB, Salle CT, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Veterinary Microbiology. 2002; 87(1): 25 - 35.

An Experimental investigation into the Effect of Clolistin Sulphate in Enhancment of Cecal Clonization of Colistin-resistant Salmonella Typhymorium in Broiler

Bassami, M. R. Jamshidi, A. Sadr Zadeh, A. Baradaran, A. R. Mahooti, A

Abstract:

In this introductory research, the effect of clolistin sulphate in enhancement of cecal clonization of colistin-resistent salmonella typhimurium in broiler chicken, in were compared with the chickens without the use of any antibiotics and chickens with the use of sulphadiazin-trimethoprim. Two-hundred day-old chicken were grouped into 6 groups. Groups 1, 2, 3 and 4 were treated with two formulation of colistin suphate and two formulation of sulphadiazin-trimethoprim respectively. Group 5 and 6 were chosen as positive control and neagative control, respectively. In all groups, except the negative control, a 200 µl volume of salmonella typhimurium (2x 10^7 CFU/ml) resistant to colistin sulphate and sensitive to sulphadiazin-trimethoprim were orally administrated, immediately upon the arrival of the day-old chickens. While the colonization was failed in positive group receiving no antibiotic, the colonization occurred in both colistin sulphate receiving chickens. Colonization in the groups receiving sulphanamide, as expected, did not happen. In another experiment, conducted on 24 day-old chickens, categorized in 4 groups, 200µl of bacteria (6x 10^8 CFU/ml) in the first day and 200µl bacteria (2x 10^7 CFU/ml) in second and third days were administrated orally, including 2 groups for two formulation of colistin and 2 positive control group. In this experiment, other than two colistin-medicated groups, colonization were also occurred in positive control group. Based on the results, it seems colistin sulphate may have suppressed the normal intestinal flora and disabled the competitive exclusion phenomenon. As a result, salmonella typhimurium resistant to colistin have had enough room to be colonized. However, the inhibitory effect of normal flora on perception and colonization of the pathogen and in this experiment was limited by the load of pathogenic bacteria. This research clearly shows the final application of antibiotics in chicken industry without considering the antibiotic resistant related to pathogens is unjustifiable and risky.

Keywords: colistin, salmonella typhimurium, broiler chicken