جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی استرپتوکوکوس‌های گروه C و D (غیرانتروکوکی) در برخی پرندگان با روش‌های کشت و PCR

محمد معینی[۱]، غلامعلی کلیدری[۲]، غلامرضا هاشمی‌تبار[۳] و جمشید رزم‌یار[۴*]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

چکیده

هدف این تحقیق مطالعه‌ی جداسازی استرپتوکوکوس‌های گروه C و D (غیرانتروکوکی) محوطه‌ی دهانی و کلوآک پرندگان (ماکیان، طوطی سبز، دلیجه، سار، عقاب طلایی، کلاغ، مینا، کبوتر، قناری، فنچ آفریقایی، طوطی برزیلی، طوطی استرالیایی، اردک، طوطی کاسکو، کاکاتیل، بلبل هزار دستان، یاکریم، بالابان، قرقاول، کبک) و تعیین هویت تا حد گونه با استفاده از روش بیوشیمیایی و همچنین تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن در گونه‌های جدا شده بود. از ۱۵۰ پرنده ارجاعی به بیمارستان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد از مناطق و گونه‌های مختلف در این مطالعه نمونه‌گیری شد. جهت جداسازی استرپتوکوکوس کشت بر روی پلیت آگار خون‌دار انجام شد. روی کلونی‌های مشکوک تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفت و در نهایت با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدایه‌های استرپتوکوکوس تأیید شد. در این مطالعه ۴۲ جدایه استرپتوکوکوس جداسازی و تعیین هویت گردید که بیش‌ترین گونه به ترتیب *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه* ۲۱/۳۳ درصد، سپس *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* ۲/۶۶ درصد، *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ۲ درصد، *استرپتوکوکوس موتانس* ۱/۳۳ درصد و *استرپتوکوکوس سوئیس* ۰/۶۶ درصد مشخص گردید. همچنین در تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن، استرپتوکوکوس‌ها به ترتیب بیش-ترین مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های سفازولین، سفترياکسون، سفالکسین، فلومکوئین، اکسی‌تتراسایکلین، استرپتومایسین، تیامولین، تایلوزین، داکسی‌سیکلین، نئومایسین را نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر غالبیت سویه *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* را در پرندگان قفسی نشان می‌دهد. علاوه بر این، سویه‌های جداسازی شده دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها بودند که از دیدگاه بهداشت عمومی اهمیت دارد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوس C و D، پرنده‌ی قفسی، PCR، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

استرپتوکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت در خانواده‌ی استرپتوکوکاسه می‌باشند . بسیاری از اعضای جنس استرپتوکوکوس برای انسان و حیوانات بیماری‌زا می‌باشند. برخی از گونه‌های استرپتوکوکوس بین انسان و حیوان مشترک می‌باشند. شناسایی بالینی استرپتوکوکوس‌ها تا حدی بر پایه‌ی الگوی همولیز آن‌ها در ژلوز خون‌دار و گروه‌بندی لانسفیلد می‌باشد. گروه‌بندی لانسفیلد بر اساس شناسایی سرولوژیک آنتی‌ژن‌های دیواره‌ی سلولی می‌باشد. طبقه‌بندی لانسفیلد بیست گروه سروتیپی را که با حروف A تا H و K تا V نمایش داده می‌شوند، شناسایی کرده است. گروه‌های لانسفیلد الزاماً با گونه‌ی استرپتوکوکوس‌ها تطابق ندارد.

تشخیص گونه‌های زئونوز استرپتوکوکوس و اهمیت آن‌ها در انسان مشکل می‌باشد . برخی از گونه‌های

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۴*] دانشیار گروه بیماری‌های پرندگان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران E-mail: jrazmyar@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

استرپتوکوکوس بخشی از فلور نرمال در انسان و حیوانات می‌باشد . *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت گونه‌ی زواپیدمیکوس[1] (بتاهمولیتیک- گروه C لانسفیلد) پاتوژنی فرصت طلب است که در بسیاری از گونه‌ها بیماری‌های مختلفی را ایجاد می‌کند. گروه *استرپتوکوکوس بویس* (غیربتا همولیتیک، گروه D لانسفیلد) شامل *استرپتوکوکوس بویس*[2]، *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس*[3] و چند گونه‌ی دیگر می‌باشند. باکتری‌های این گروه غالباً در کشت خون انسان‌های بیمار مبتلا به اندوکاردیت، عفونت مجاری ادراری، استئومیلیت، سپسیز و عفونت‌های دیگر یافت می‌شوند. آن‌ها همچنین در فلور نرمال انسان و حیوانات یافت می‌شوند (Hardie and Wheily 1977).

گونه‌های استرپتوکوکوسِ بیماری‌زا که از پرندگان جدا شده است شامل *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس*[4] از زیر گروه C آنتی‌ژنیک لانسفیلد و *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه*[5] می‌باشد. گونه‌ی جدیدی نیز تحت عنوان *استرپتوکوکوس پلومورفوس*[6] که یک بی هوازیِ اجباری می‌باشد در محتوای سکوم طبیعی جوجه‌ها، بوقلمون و اردک تشریح شده است (Saif et al. 2008). *استرپتوکوکوس موتانس*[7] که یک ارگانیسم رایج در محوطه‌ی دهانی انسان می‌باشد، با رخداد سپتی سمی و مرگ و میر در غازها در ارتباط می‌باشد. آب آشامیدنی آلوده و کیفیت پایین بستر از جمله عوامل مستعد کننده هستند (Smyth and McNamee 2008). مهم‌ترین گونه‌ی شناخته شده در مبحث بیماری‌های طیور «*استرپتوکوکوس گالیناسئوس*[8]» است که با سپتی‌سمی و اندوکاردیت در گله‌های مولد همراه است . گونه‌های استرپتوکوکوس از زخم‌های استئومیلیت در بوقلمون، همراه با *اشریشیاکلی* و گونه‌های استافیلوکوکوس جدا شده است (Benina et al. 2005). *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه* عامل فارنژیت (گلودرد) و سایر عفونت‌های تب‌زا مشابه استرپتوکوکوس‌های گروه A است. این باکتری در دسته‌ی استرپتوکوکوس‌های گروه C طبقه‌بندی می‌شود و بتا همولیتیک است. این باکتری از جوجه‌های مبتلا به سلولیت جدا شده است (Chadfield et al. 2004).

پرندگان به ویژه نوع زینتی آن‌ها یکی از حیطه‌های مهم تحقیقاتی از جهت انتقال عوامل بیماری‌زای مشترک و همراه مقاوم به آنتی میکروب‌ها به انسان و انتشار آن‌ها در محیط می‌باشند (Guardabassi et al. 2004). بسته به مکان جغرافیایی، سیاست‌های ملی و محلی استفاده از آنتی-میکروب‌ها و گستردگی استفاده از آن‌ها الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها متفاوت است. یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که از توسعه و پخش میکروارگانیسم‌های مقاوم حمایت می‌کند، استفاده‌ی برنامه‌ریزی نشده از عوامل آنتی-میکروب می‌باشد (Burch 2005).

مطالعات اندکی به بررسی استرپتوکوکوس در پرندگان پرداختند (Santos et al. 2013) و هیچ مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است. مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی نقش احتمالی پرندگان در حمل و انتشار بالقوه استرپتوکوکوس‌ها به بررسی شیوع و توزیع گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس در پرندگان قفسی پرداخته است. علاوه بر این، پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از پرندگان نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

از ۱۵۰ پرنده‌ی ارجاعی به بیمارستان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد از مناطق و گونه‌های مختلف در این مطالعه نمونه‌گیری شد (جدول ۱). از هر مورد پرنده اقدام به اخذ دو نمونه‌ی دهانی و مدفوعی به وسیله‌ی سوآب استریل گردید. پرندگان ارجاعی در شرایط آرامش و با حفظ اخلاق و رعایت حقوق حیوانات روی

1- S. equi subspp. zooepidemicus
2- *Streptococcus bovis*
3- *Streptococcus gallolyticus*
4- *Streptococcus zooepidemicus*
5- *Streptococcus dysgalactiae*
6- *Streptococcus pleomorphus*
7- S*treptococcus mutans*
8- *Streptococcus gallinaceus*

میز قرار داده شدند و ابتدا دهان پرنده را باز کرده و یک سوآب داخل دهان قرار داده شد و به محوطه‌ی دهانی و حلقی آغشته شد. سپس یک سوآب دیگر به داخل کلوآک پرنده برده شد و بعد از آغشته‌سازی به مدفوع به آزمایشگاه بخش طیور بیمارستان دامپزشکی منتقل شد. نمونه‌های دهانی – مدفوعی بعد از اخذ توسط سوآپ‌های استریل در میکروتیوب استریل حاوی محلول PBS حل شدند و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جدول ۱: نمونه‌های اخذ شده از پرندگان سالم و بیمار و فراوانی گونه‌های استرپتوکوکوس جدا شده

پرنده	تعداد	نمونه مثبت		نام	Dysagalactiae	gallolyticus	Mutans	Zooepidemicus	Suis
		سالم	بیمار						
طوطی سبز	۲۰	۱(۵٪)	۱۲(۶۰٪)	Rose-ringed parakeet	۱۰(۷۷٪)	۰	۱ (۷.۷٪)	۲ (۱۵.۴٪)	۰
ماکیان	۳۷	۶(۱۶.۲٪)	۲(۵.۴٪)	Domestic fowl	۶ (۷۵٪)	۲ (۲۵٪)	۰	۰	۰
کبوتر	۱۰	۱(۱۰٪)	۴(۴۰٪)	domestic Pigeon	۴ (۸۰٪)	۱ (۲۰٪)	۰	۰	۰
مرغ مینا	۸	۲(۲۵٪)	۲(۲۵٪)	Myna common	۲ (۵۰٪)	۱ (۲۵٪)	۰	۱ (۲۵٪)	۰
کاسکو	۳	۰	۳(۱۰۰٪)	African grey parrot	۲ (۶۷٪)	۰	۱ (۳۳٪)	۰	۰
بلبل هزار دستان	۳	۳(۱۰۰٪)	۰	common nightingale	۲ (۶۷٪)	۰	۰	۰	۱ (۳۳٪)
سار	۶	۲(۳۳.۳٪)	۰	Common starling	۲ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰
قناری	۱۰	۰	۱(۱۰٪)	Canary	۱ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰
یاکریم	۳	۱(۳۳.۳٪)	۰	Eurasian collared dove	۱ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰
طوطی برزیلی	۳	۰	۱(۳۳.۳٪)	Rosy-faced lovebird	۱ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰
دلیجه	۱۰	۱(۱۰٪)	۰	common kestrel	۱ (۱۰۰٪)	۰	۰	۰	۰
سایر گونه‌ها	۳۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مجموع	۱۵۰	۴۲		_	۳۲	۴	۲	۳	۱

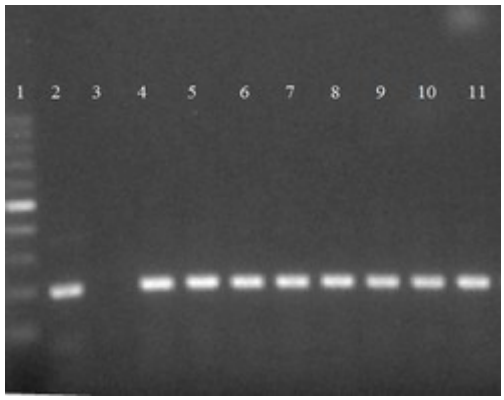
جهت جداسازی باکتری، سوآب‌های استریل را داخل میکروتیوب‌ها برده تا آغشته به مایع شوند سپس بر روی پلیت آگار خون‌دار کشیده شد. سپس پلیت‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. کلیه‌ی محیط‌ها از شرکت مرک آلمان خریداری شده بود. سپس پرگنه‌های سفید رنگ مشکوک به استرپتوکوک بر روی محیط آگار خون‌دار، به منظور تأیید تشخیص وجود باکتری‌های استرپتوکوکوس اقدام به رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و بررسی واکنش صفرا–آسکولین شد. سویه‌های کاتالاز منفی با چندین پاساژ روی آگار خون‌دار خالص‌سازی شدند. سپس، جدایه‌های دارای واکنش همولیز، روی محیط Bile Esculine agar (BEA) و BHI حاوی ۶/۵ درصد نمک کلرید سدیم کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. شناسایی گونه‌ها با تخمیر کربوهیدرات‌ها

(آرابینوز، رافینوز، مانیتول، اینولین، سوربیتول و ترهالوز) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدایه‌های استرپتوکوکوس تأیید شد (Knudtson et al. 1992).

حساسیت آنتی‌میکروبی با روش انتشار دیسک روی محیط مولر هینتون آگار طبق روش کمیته‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (Hakimiha et al. 2014; Hassan H. 2014; CLSI 2013) انجام شد. حساسیت جدایه‌های استرپتوکوکوس به ۱۶ آنتی‌بیوتیک مختلف بررسی شد: آموکسی‌سیلین (۲۵ µg)، ونکومایسین (۳۰ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ IU)، سفالکسین (۳۰ µg)، تیامولین (µg)، فلورفنیکول (۳۰ µg)، تایلوزین (۳۰ µg)، انروفلوکساسین (۵ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg)، داکسی سایکلین (µg ۳۰)، نئومایسین (۳۰ µg)، اکسی تتراسایکلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، فلومکوئین (۳۰ µg)، سفترياکسون (۳۰ µg) و سفازولین (۳۰ µg) (پادتن طب- ایران). بعد از تهیه‌ی محیط مولر هینتون آگار و محلول استاندار نیم مک فارلند که حاوی $۱/۵×۱۰^{۸}$ باکتری است، باکتری‌های استرپتوکوکوس مورد مطالعه بر روی محیط مولر هینتون کشت داده شد. بدین منظور ابتدا از باکتری‌های نگهداری شده به صورت استریل به محیط کشت آگار خون‌دار منتقل شدند تا باکتری‌های خالص شده رشد کنند. در مرحله‌ی بعد با استفاده از سوآب استریل شده از پرگنه-های باکتری استرپتوکوکوس روی محیط آگار خون‌دار برداشته و به داخل میکروتیوب‌های جدید حاوی ۱ سی-سی آب مقطر استریل شده منتقل شدند و مخلوط شدند تا در نهایت میزان کدورت محتوای میکروتیوب به صورت مقایسه‌ای به مقدار استاندارد نیم مک فارلند برسد. بعد از مشاهده کدورت مناسب با یک سوآب استریل داخل لوله‌ی حاوی غلظت استاندارد باکتری برده و سپس به داخل پلیت کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و سوآب به صورت خطی در تمام نقاط پلیت به حرکت در آورده شد. سپس پلیت‌ها در محیط قرار داده شد تا خشک شوند و در نهایت ۸ عدد دیسک آنتی‌بیوتیکی بر روی پلیت با رعایت فاصله‌ی استاندارد از یکدیگر قرار داده شد. سپس پلیت‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تا مشاهده و قرائت الگوی حساسیت باکتریایی قرار داده شد.

جهت استخراج DNA، هر یک از جدایه‌ها به درون محلول TE (حاوی تریس + EDTA) به حجم ۱۵۰ میکرولیتر تلقیح شد و ۱۵ دقیقه حرارت داده شد، سپس محلول حدود ۵ دقیقه در فریزر قرار داده شد و مجدداً برای ۵ دقیقه دیگر جوشانده شد. سپس میکروتیوب‌ها در دور ۸۰۰۰xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و لایه‌ی رویی حاوی DNA به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و تا زمان PCR در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

یک جفت پرایمر ژن Tuf جهت تأیید جدایه‌های استرپتوکوکوس (اختصاصی جنس) در واکنش PCR (Forward: GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC / Reverse: ACGTTCGATTTCATCACGTTG / 196 bp) استفاده شد (Picard et al. 2004). تکثیر ژن هدف جدایه‌ها در حجم نهایی ۲۵ µl حاوی ۱۲/۵ µl از مسترمیکس PCR (Ampliqon, Denmark) انجام شد. هر واکنش حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشتی و ۵/۵ µl الگوی DNA می‌باشد. واکنش PCR در ترموسایکلر (Techne, England) انجام شد. شرایط تکثیر به قرار ذیل بود: دناتوراسیون ابتدایی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۳ سیکل از قرار ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. کنترل مثبت از آزمایشگاه دکتر خرمیان فراهم شد (ATCC 12386) و از آب مقطر استریل دیونیزه جهت کنترل منفی استفاده شد. ۴ µl از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد (Merck, Germany) جهت تفریق باندها پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد مشاهده قرار گرفت (تصویر ۱).



تصویر ۱: تصویر باندهای تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز. از چپ به راست مارکر مولکولی استاندارد 100 bp (شماره ۱)، نمونه کنترل مثبت *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* **(شماره ۲)، نمونه‌ی کنترل منفی** *استافیلوکوکوس اورئوس* **(شماره ۳)، ۸ نمونه‌ی دیگر، ژن اختصاصی استرپتوکوکوس‌ها (شماره‌ی ۴ تا ۱۱ 196bp).**

باکتری استرپتوکوکوس از ۴۲ نمونه از ۱۵۰ نمونه اخذ شده (۲۸ درصد) جدا گردید. غالب‌ترین گونه‌ی جدا شده *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* با فراوانی ۲۱/۳۳ درصد بود. *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* از ۲/۶۶ درصد نمونه‌ها جدا گردید. ۲ درصد و ۱/۳۳ درصد نمونه‌ها به ترتیب آلوده به *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* و *استرپتوکوکوس موتانس* بودند. *استرپتوکوکوس سوئیس* از ۰/۶۶ درصد نمونه‌ها جدا شد. واکنش PCR کل جدایه‌های استرپتوکوکوس را تأیید کرد. از این ۴۲ ایزوله ۴۰/۵ درصد از پرندگان سالم و ۵۹/۵ درصد از پرندگان بیمار با علائم اسهال، عدم وزن‌گیری، بی‌حالی و ژولیدگی پرها و عفونت تنفسی، که ۷۵/۳ درصد جدایه‌ها مربوط به نمونه‌های اخذ شده از کلواک و ۲۴/۷ درصد از محوطه‌ی دهانی بوده است. در مطالعه‌ی حاضر، مقاومت جدایه-های استرپتوکوکوس به ۱۶ عامل آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در جدول ۲ خلاصه و نمایش داده شده است (جدول ۳).

جدول ۳: مقاومت آنتی‌میکروبی جدایه‌های استرپتوکوکوس

آنتی بیوتیک	قدرت دیسک (Mcg per disk)	مقاوم (درصد)	حدواسط (درصد)	حساس (درصد)
آموکسی سیلین	۲۵ µg	۵ (۱۲)	۶ (۱۴/۵)	۳۱ (۷۳/۵)
ونکومایسین	۳۰ µg	۵ (۱۲)	۷ (۱۶/۵)	۳۰ (۷۱/۵)
پنی سیلین	۱۰ Units	۱۴ (۳۳/۴)	۰	۲۸ (۶۶/۶)
سفالکسین	۳۰ µg	۲۱ (۵۰)	۶ (۱۴)	۱۵ (۳۶)
فلورفنیکول	۳۰ µg	۱۰ (۲۴)	۶ (۱۴)	۲۶ (۶۲)
تایلوزین	۳۰ µg	۳۳ (۷۸/۵)	۱ (۲/۵)	۸ (۱۹)
تیامولین	۳۰ µg	۳۳ (۷۸/۶)	۰	۹ (۲۱/۴)
انروفلوکساسین	۵ µg	۲۳ (۵۴/۵)	۸ (۱۹)	۱۱ (۲۶/۵)
استرپتومایسین	۱۰ µg	۳۴ (۸۱/۲)	۲ (۴/۸)	۶ (۱۴)
داکسی سایکلین	۳۰ µg	۳۰ (۷۱/۵)	۴ (۹/۵)	۸ (۱۹)
نئومایسین	۳۰ µg	۲۸ (۶۶/۶)	۹ (۲۱/۴)	۵ (۱۲)
اکسی تتراسایکلین	۳۰ µg	۳۵ (۸۴/۵)	۱ (۲/۵)	۶ (۱۴)
جنتامایسین	۱۰ µg	۲۴ (۵۷)	۸ (۱۹)	۱۰ (۲۴)
فلومکوئین	۳۰ µg	۳۶ (۸۵/۵)	۱ (۲/۵)	۵ (۱۲)
سفترياکسون	۳۰ µg	۳۹ (۹۲/۵)	۲ (۵)	۱ (۲/۵)
سفازولین	۳۰ µg	۴۰ (۹۵)	۲ (۵)	۰

بحث

Chadfield و همکاران در سال ۲۰۰۴، *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* را از گله‌ی جوجه‌ی گوشتی جداسازی کردند. در این گله مرگ و میر در هفته‌ی اول کم‌تر از یک درصد بود و در انتها به ۴/۳ درصد رسید. نشانه‌های کالبدگشایی شامل بزرگی کبد و طحال همراه با نقاط نکروزه چند کانونی بوده است. این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* از ۲/۶۶ درصد نمونه‌های زنده جداسازی گردید و به نظر می‌رسد مطالعه‌ی کامل‌تری روی جداسازی باکتری از ضایعات کالبدگشایی مورد نیاز باشد. در مطالعه‌ی ما، میزان آلودگی به *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ۲ درصد بوده است که در مطالعاتی چون Bisgaard و همکاران در سال ۲۰۱۲ *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* را از ۱۱۰۰۰هزار مرغ در سن ۴۷ هفتگی جدا کردند و Pan و همکاران در سال ۲۰۱۲ *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* را از جوجه‌هایی با علایم آمبولی برونشیال با ۷۰ درصد مرگ و میر در شمال چین جداسازی کردند که همزمان با آلودگی به *اورنیتو باکتریوم رینوترکئال* بود. نشانه‌های کلینیکی این جوجه‌ها، سختی تنفس، ترشحات خونی و انسداد تنفسی بود. بیماری‌زایی آن در پرندگان به اثبات رسیده است. اهمیت احتمالی در بیماری‌زایی در پرندگان و پستانداران و نقش زئونوز بودن با توجه به مطالعاتی چون راسموسن و همکاران در سال ۲۰۱۳ که در مطالعه‌ای نشان دادند گونه‌ی *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت گونه‌ی زواپیدمیکوس جدا شده از عفونت اندومتریت مادیان متعلق به یک گروه ژنتیکی متمایز می‌باشد. در این مطالعه مادیان‌های با علائم بالینی اندومتریت (۱۸ رأس) و بدون این علائم (۱۱رأس) به کار گرفته شدند. علاوه بر آزمایشات مولکولی و بررسی‌های ژنتیکی مختلف انجام شده در این مطالعه روش‌های میکروبی از جمله کشت روی آگار خون‌دار و مشاهده‌ی کلونی *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* و باکتری‌های گرم مثبت و تخمیر قندها بر روی نمونه‌ها انجام گرفت (Rasmussen et al. 2013). این باکتری همچنین از انسان‌های مبتلا به بیماری تنفسی ملایم، پنومونی، اندوکاردیت، اندوفتالمیت، آرتریت سپتیک، مننژیت، سپتی‌سمی و سندرم شوک سمی استرپتوکوکی جدا شده است . علاوه بر این، گلومرولونفریت گاهی اوقات پس از عفونت استرپتوکوکی ملایم گزارش شده است (Barnham et al. 1987). اپیدمی گسترده‌ای از نفریت حاد با درگیری ۲۵۳ نفر ناشی از مصرف پنیر غیرپاستوریزه آلوده در برزیل رخ داده بود. علایم ابتدایی شامل تب و لرز، درد عضلانی و نفریت شدید بود به طوری که از ۱۳۳ مورد تأیید شده، سه نفر فوت شده، هفت نفر نیازمند دیالیز و ۹۶ نفر بستری شدند . پنومونی، اندوکاردیت، مننژیت، پریکاردیت و دردهای شکمی نیز در این اپیدمی گزارش شده بودند (Balter et al. 2000).

استرپتوکوک موتانس که در این مطالعه به میزان کمتر از ۲ درصد جداسازی گردید و می‌تواند از نظر پتانسیل زئونوز بودن مورد توجه قرار گیرد، در سایر مطالعات چون Van Houte که گزارش کرد فقط نوزادانی که توسط *استرپتوکوک موتانس* کلونی‌زایی شوند خطر ابتلای به پوسیدگی شیرخواران را دارند (Van Houte et al. 1982). سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۹۱ به تعیین میزان *استرپتوکوکوس موتانس* در کودکان ۳-۵ سال مراجعه کننده به دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران در دو گروه حساس و مقاوم به پوسیدگی پرداخته‌اند. پس از بررسی ۱۲۰ بزاق کودک حساس و مقاوم به پوسیدگی مشاهده شد که تعداد کلنی‌های *استرپتوکوکوس* در دو گروه حساس و مقاوم دارای اختلاف معنی‌داری هستند. میزان بالای *استرپتوکوکوس موتانس*، افراد را در گروه پرخطر از نظر پوسیدگی دندان قرار می‌دهد (Soltan Dallal et al. 2012). نتایج حاصل از کشت ۸۵ نمونه‌ی سوآپ دهانی بر روی محیط‌های کشت انتخابی و

اختصاصی نشان داد که در مجموع ۵۶ عدد از کل نمونه‌ها، از نظر *استرپتوکوکوس موتانس* مثبت بودند. جهت تعین هویت از آزمون‌های تخمیر کربوهیدرات‌ها و اوره‌آز استفاده شد که در نهایت ۳۲ تعداد از کل ایزوله‌ها به عنوان *استرپتوکوکوس موتانس* شناسایی شدند. (Salehi et al. 2010).

در این مطالعه مقاومت نسبت ۱۶ آنتی‌بیوتیک به روش GDT مورد استفاده قرار گرفت که در کل، ۷۶/۱۹ درصد و ۱۹/۰۴ درصد جدایه‌ها به ترتیب به بیش از ۱۰ و ۵ عامل آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند. به عبارت دیگر، بیش از ۹۶ درصد جدایه‌های استرپتوکوکوس دارای مقاومت چندگانه (MDR) به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بودند . کل جدایه‌های *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* به سفازولین مقاوم بودند . همچنین، اغلب جدایه‌ها (۹۴ درصد) به سفتریاکسون مقاوم بودند. ۸۷/۶ درصد و ۸۴/۷ درصد جدایه‌های *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* به ترتیب به پنی‌سیلین و آموکس‌سیلین حساس بودند . ۷۸/۵ درصد جدایه‌ها حساس به ونکومایسین بودند. ۸۷/۵ درصد و ۸۴ درصد جدایه‌ها به ترتیب مقاوم به فلومکوئین و اکسی‌تتراسایکلین بودند. ۷۸/۵ درصد جدایه‌های *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* به استرپتومایسین و تایلوزین مقاومت نشان دادند. ۷۵ درصد و ۷۳ درصد جدایه‌ها به ترتیب به تیامولین و داکسی‌سایکلین مقاوم بودند.

در مطالعه‌ی Hassan در سال ۲۰۱۴ حساسیت صد در صدی نسبت به انروفلاکساسین و فلومکوئین در جدایه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* جدا شده از کبوتران مشاهده کرد و بیش‌ترین مقاومت را نسبت به اریترومایسین و آمپی‌سیلین (۸۷/۵) گزارش کرد. جدایه‌های *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل سفازولین، انروفلوکساسین، پنی‌سیلین، سفتریاکسون، داکسی‌سیکلین، نئومایسن، فلومکوئین، تیامولین، تتراسایکلین مقاوم بودند و به عوامل تایلوزین و فلورفنیکول حساس بوده و حالتی حد واسط را برای ونکومایسین و جنتامایسین نشان دادند . جدایه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل داکسی‌سایکلین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، پنی‌سیلین و نئومایسین مقاوم بودند و به باکتری تایلوزین حساسیت نشان دادند و در مواجهه با تیامولین حالت حد واسط نشان دادند . جدایه‌های *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل انروفلوکساسین، داکسی‌سیکلین مقاومت نشان دادند و در مواجهه با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین و نئومایسین حساسیت نشان دادند. جدایه‌ی *استرپتوکوکوس سوئیس* به آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل جنتامایسین، تتراسایکلین و سفتریاکسون، داکسی‌سیکلین، نئومایسن، فلومکوئین مقاوم بود و به پنی‌سیلین و سفتریاکسون حساسیت نشان داد.

با توجه به مشاهدات مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه و بالای ایزوله‌های این تحقیق، احتمال خطر شیوع سویه‌های *استرپتوکوکوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در صاحبان پرنده را بایستی مدنظر قرارداد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از آقای علی کارگر کارشناس آزمایشگاه بخش طیور دانشکده‌ی دامپزشکی فردوسی مشهد به دلیل کمک‌های بی دریغ در اجرای این تحقیق و معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل تأمین هزینه‌های اجرای این تحقیق به شماره‌ی ۲۹۹۰۱ قدردانی و تشکر نمایند.

منابع

Balter, S.; Benin, A.; Pinto, S.W.; Teixeira, L.M.; Alvim, G.G.; Luna, E. et al. (2000). Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. Lancet. 355 (9217): 1776-80.

Acha, P.N. and Szyfres, B. (2003). (Pan American Health Organization [PAHO]). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Volume 1. Bacterioses and mycoses. 3rd ed. Washington DC: PAHO; Scientific and Technical Publication No. 580. Streptococcosis, Pp: 257-265.

Barnham, M.; Ljunggren, A.; McIntyre, M. (1987). Human infection with *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C): three case reports. Epidemiology and Infection, 98(2): 183-190.

Benina, D.M.; Bidovec, N.A. and Zorman-Rojs, O. (2005). Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. Avian Pathology, 34(6): 463-472.

Bisgaard, M.; Bojesen, A.M.; Petersen, M.R. and Christensen, H.A. (2012). Major outbreak of *Streptococcus equi subsp.* Avian Diseases, 56: 561-566.

Burch, D. (2005). Problems of antibiotic resistance in the United Kingdom. In Practice, 27: 37-43.

Chadfield, M.S.; Christensen, J.P.; Christensen, H. and Bisgaard, M. (2004). Characterization of streptococci and enterococci associated with septicaemia in broiler parents with high prevalence of endocardtitis. Avian Pathology, 33(6): 610-617.

CLSI. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animal; Approved standard- fourth Edition. CLSI document Vet01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 33(7): 20.

Guardabassi, L.; Schwarz, S. and Lloyd, D.H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 54(2): 321-332.

Hakimiha, N.; Khoei, F.; Bahador, A. and Fekrazad, R. (2014). The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. Journal of Applied Oral Science, 22(2): 80-4.

Hardie, J.M. and Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 83: 1S-11S.

Hassan, H. (2014). *Streptococcus gallolyticus* infection in pigeons: pathogenicity and antibiotic susceptibility. Assiut Veterinary Medical Journal, 60(143): 133-141.

Knudtson, L.M. and Hartman, P.A. (1992). Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. Applied Environmental Microbiology, 58: 3027-3031.

Pan, Q.; Liu, A. and He, C. (2012). Co-infection of Ornithobacterium rhinotracheale with *Streptococcus zooepidemicus* in chickens. Avian Diseases, 56(4): 680-684.

Picard, F.J.; Ke, D.; Boudreau, D.K.; Boissinot, M.; Huletsky, A.; Richard, D. et al. (2004). Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. Journal of Clinnical Microbiology, 42: 3686-95.

Rasmussen, C.D.; Haugaard, M.M.; Petersen, M.R.; Nielsen, J.M.; Pedersen, H.G. and Bojesen, A.M. (2013). *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. Veterinary Research, 44(1): 26.

Saif, Y.M. (2008). Diseases of Poultry. 12th ed. Wiley-Blackwell, P: 891.

Salehi, M.; Moradi, S.; Aghili, T. and Razavipour, R. (2010). Detection of I/III and II mutation genes in *Streptococcus mutans* isolated from Iranian Patients. Journal of Islamic Azad Medicine Science, 21(2): 89-96.

Santos, T.; Silva, N.; Igrejas, G.; Rodrigues, P.; Micael, J.; Rodrigues, T. et al. (2013). Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. Anaerobe. 24: 25-31.

Smyth, J.A. and McNamee, P.T. (2008). *Staphylococci*, *streptococci* and *enterococci*. In: Poultry Diseases. Jordan F. 6th ed. Pp: 196-199.

Soltan Dallal, M.M.; Dargahi, H.; Mehrani, F.; Sharifi yazdi, M.K.; Rahimi Foroushani, A. and Miremadi, S.A. (2012). Investigation the role of *Streptococcus mutans* in Sensitive and resistant children to caries. Journal of Pirapezeshki Faculty of Tehran University of Medical Science (Payavard Salamat). 6(6): 467-477.

Van Houte, J.; Gibbs, G. and Butera, C. (1982). Oral flora of children with nursing bottle caries. Journal of Dental Research, 61(2): 382-5.

Isolation and Antimicrobial susceptibility profile of *streptococcus* spp. group C and D isolated from some birds by culture and PCR

Moeini, M.[1]; Kalidari, Gh.[2]; Hashemitabar, Gh.[3] and Razmyar, J.[4]

Received: 15.04.2016 Accepted: 28.10.2017

Abstract

The purpose of this study was streptococcus isolation from cloacal and oral cavity birds including :(chickens, amazon parrots, kestrels, starling, golden eagles, crows, mynahs, pigeons, canaries, finches african, brazilian parrot, australian parrots, ducks, african grey parrots, cocktail, nightingale, eurasian collared dove, balaban, pheasants, partridges) and identification to species level by biochemical tests, as well as the pattern of antibiotic resistance by disk diffusion method. One hundred and fifty birds referring to our hospital from different regions of province and species were included in this study. For streptococcal isolation, samples were streaked onto Blood agar plates. Biochemical tests were done on suspected colonies and finally, polymerase chain reaction (PCR) using specific primer was used for confirmation of *streptococcus* isolates. In this study, 42 strains were isolated and identified as *Streptococcus dysagalactiae*, the most frequently isolate 21.33%, *S.galloliticus* 2.66%, *S .zooepidermicus* 2%, *S.mutans* 1.33% and *S.suis* 0.66%. In addition the pattern of antibiotic resistance was assessed by diffusion method and showed high resistance to antibiotics such as: cefazolin, ceftriaxone, cephalexin, flumequine, oxytetracycline, and streptomycin. Presence of antibiotic resistance organisms in caged birds which lives in nearness of human has a public health importance.

Key Words: S*treptococcus* C & D, Caged Birds, PCR, Antibiotic Resistance

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Associate Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Razmyar, J., E-mail: jrazmyar@ut.ac.ir