

Molecular study of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* strains from broiler chickens in Kerman by multiplex PCR technique

Akbar Asadi^{1*}, Navid Asadi²

1. Shahr Babak Islamic Azad University, Shahr Babak, Iran
2. Student of Bahonar university, kerman ,Iran

Abstract

Aim and Background: Avian pathogenic *E. coli* is responsible for an extremely wide range of extraintestinal diseases in poultry, such as *colibacillosis*, *cellulitis*, *coligranuloma*, and yolk sac infection. The aim of this study is the molecular study of antibiotic-resistant resistance genes, such as *bla*, *aac*, *aad*, *qnr*, *sul*, *tet*, and *cat*, by the multiplex PCR method and the determination of antibiotic susceptibility.

Materials and Methods: One hundred and twelve strains of *E. coli* from *colibacillosis* cases and fifty-six strains from *cellulitis* cases were isolated from poultry slaughterhouses in Kerman province during eight months in 2021. The strains of *E. coli* were confirmed by biochemical methods, and then the PCR experiment and antibiotic susceptibility test were performed on the samples.

Results: The results of the studies showed that 65.85% of the samples for the *tetA* gene and 64.65% of those for the *tetB* gene were positive. Percentage of genes *qnrS* (47.3), *qnrB* (24.09), *sulI* (28.91), *dhfrV* (41.32), *dhfrA* (26.5), *aac* (3)-1 (25.66), *aadA* (32.89), *floR* (28.95), *sulII* (43.31), and *qnrA* (22.30) %. None of the samples were positive with regard to *bla_{oxa}*, *bla_{CTX}*, *bla_{SHV}* and *bla_{TEM}* genes. In this study, it was specified that 50-85 percent of isolates of all strains were resistant to one or more antibiotics. The highest percentage of resistance to antibiotics was, respectively, to tetracycline (94.18%), sulfamethoxazole (61.24), chloramphenicol (45.96), and trimethoprim (46.36) %.

Conclusion: In this study. Recognition of resistance patterns and microorganisms to susceptibility to antibiotics plays an effective role in the correct and suitable selection of antibiotics and infection control.

Keywords: *Escherichia coli*, *celluitis*, *colibacillosis*, Broiler chicken, Antibiotic resistance.

Corresponding author:

Shahr Babak Islamic Azad University, Shahr Babak, Iran.

Email: Dr. asadi44@yahoo.com

مطالعهٔ مولکولی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیاکلی* جداسده از لاشه‌های طیور گوشتی در کرمان به روش PCR چندگانه

اکبر اسدی^{۱*}، نوید اسدی^۲

۱. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرباک، ایران

۲. گروه دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیاکلی*، بیماری‌زای پرندگان مسئول ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های خارج روده‌ای طیور مانند کلی‌باسیلوز، سلولیت، کلی‌گرانولوما و عفونت کیسهٔ زرده می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از قبیل *cat* و *bla sul tet qnr aad aac* به روش PCR چندگانه و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری از کشتارگاه صنعتی کرمان طی ۸ ماه در سال ۱۴۰۰ انجام و تعداد ۱۱۲ جدایه از نمونه‌های مبتلا به کلی‌باسیلوز و ۵۶ نمونهٔ سلولیتی جدا گردید و پس از تأیید بیوشیمیایی، آزمون‌های PCR چندگانه و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی نمونه‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۶۵/۸۵ درصد نمونه‌ها برای ژن *tetA* و ۶۴/۶۵ درصد برای *tetB* مثبت بودند. درصد فراوانی ژن‌های *qnrS* (۴۷/۳)، *qnrB* (۲۴/۰۹)، *sulI* (۲۸/۹۱)، *dhfrV* (۴۱/۳۲)، *dhfrA* (۲۶/۵)، *aac* (۳)-۱ (۲۵/۶۶)، *aadA* (۳۲/۸۹)، *flor* (۲۸/۹۵)، *sulII* (۴۳/۳۱) و *qnrA* (۲۲/۳۰) درصد بود. هیچ کدام از نمونه‌ها از نظر ژن‌های *blaOXA*، *blaTEM*، *blaCTX*، *blaSHV* مثبت نبودند. همچنین ۵۰ تا ۸۵ درصد جدایه‌ها به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. بیشترین درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۹۴/۱۸)، سولفامتوکسازول (۶۱/۲۴)، کلرامفنیکل (۴۵/۹۶) و تری‌متوپریم (۴۶/۳۶) درصد بود. **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشخص گردید که جهت درمان قطعی و جلوگیری از بروز مقاومت‌های روزافزون در سویه‌های پاتوژن، تعیین الگوی مقاومتی میکروارگانیسم و انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی قبل از تجویز دارو نقش مؤثری دارد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی*، سلولیت، کلی‌باسیلوز، جوجه‌های گوشتی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

۱- مقدمه

دارند (۱). عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی* در طیور شامل پریتونیت^۳ (التهاب صفاق) ناشی از تخم‌شکستگی، عفونت کیسهٔ زرده، کلی‌گرانولوما^۴، سندرم سر‌بادکرده^۵، سلولیت^۶، سینوویت^۷ و کلی‌سپتی سمی^۸ می‌باشد (۲).

فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی باکتری به‌عنوان عوامل حداث تلقی شده و با شدت بیماری و میزان تلفات رابطهٔ مستقیمی دارند. ژن‌هایی از قبیل *fimH*، *qnr*، *afa*، *sfa*، *chu*، *cat*، *flor*، *crl* و *dhfr* از مهم‌ترین فاکتورهای حداث *اشریشیاکلی* به‌شمار می‌روند که برخی از این ژن‌ها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳). یکی از مشکلات مهم در بخش درمان در حوزهٔ پزشکی و دام‌پزشکی، سیر پیشروندهٔ مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها

عفونت ناشی از *اشریشیاکلی*^۱ در طیور انتشار جهانی دارد. حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد کلی‌فرم‌های روده مربوط به سروتیپ‌های بیماری‌زا می‌باشد. سروتیپ‌هایی از باکتری مانند O₁، O₂، O₈، O₃₅، O₇₈ در کلی‌باسیلوز^۲ طیور نقش

نویسنده مسئول:

استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرباک، ایران

پست الکترونیکی:

Dr. asadi44@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۸

⁵ Cranial Deformation Syndrome

⁶ Cellulitis

⁷ Synovitis

⁸ Colisepticemia

¹ Escherichia Coli

² Colibacillosis

³ Peritonitis

⁴ Coligranuloma

آنتی‌بیوتیکی و همچنین شناسایی ژن‌های حدت و نقش آن‌ها در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طیور گوشتی شهرستان کرمان می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه شامل جداسازی /شریشی‌کلی و تأیید سویه‌های جدا شده آن به روش‌های بیوشیمیایی، تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، ذخیره نمونه، استخراج DNA، آزمایش PCR، الکتروفورز و آنالیز محصول‌های PCR است. در یک دوره زمانی ۸ ماهه در سال ۱۴۰۰ از گشتارگاه صنعتی طیور کرمان، ۱۱۲ نمونه طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز (کل نمونه جدا شده از لاشه‌ها) و ۵۶ نمونه مبتلا به سلولیت جمع‌آوری گردید. بعد از سوزاندن سطح کبد و قلب لاشه‌های کالبدشکافی شده با اسپاتولای داغ، کشت در محیط مک‌کانکی آگار^۱ به روش خطی انجام شد (۸). یک کلنی از باکتری رشد کرده در محیط لوریابرتانی LB (این محیط شامل تریپتون، عصاره مخمر و کلرید سدیم بوده و /شریشی‌کلی در این محیط به خوبی رشد نموده و یکی از رایج‌ترین محیط‌ها برای نگهداری آن می‌باشد) را در محیط مولر هینتون کشت داده و سپس دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه را بر اساس رفرانس CLSI 2004 در محیط کشت گذاشته و بعد از انکوباسیون براساس منطقه رشد، ارزیابی انجام شد. سپس یک سی‌سی لوریابرتانی را داخل میکروتیوب ۲۰۰۰ میکرولیتری ریخته، یک کلنی تأیید شده باکتری به آن افزوده، ۲۴ ساعت بعد و پس از رشد باکتری، یک سی‌سی گلیسرول ۳۰ درصد به آن اضافه و پس از ورتکس، تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

برای استخراج DNA نیز نمونه‌های فریز شده را از فریزر خارج و پس از ذوب در دمای اتاق، در محیط لوریابرتانی جامد کشت داده و از کلنی رشد یافته به میکروتیوب‌های ۲۵ میکرولیتری حاوی سود سوزآور نیم‌نرمال اضافه و با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حجم محلول را به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و به عنوان DNA استخراج شده که برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد. بررسی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی *bla_{OXA}*، *aadA*، *qnr_B*، *sul_{II}*، *qnr_A*، *dhfr_V*، *cat*، *flor*، *tetA*، *tetB*، *bla_{TEM}*، *sul_I*، *aac* و *qnr_S* طبق روش پیشنهادی Sharman و همکاران

و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت درمان است. بنابراین اهمیت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های /شریشی‌کلی جدا شده از طیور واضح است. طبق مطالعات انجام شده /شریشی‌کلی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کلرامفنیکل، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، پلی‌میکسین B، سولفانامیدها و نیترو فورازون حساس است (۴). بررسی ژنوتیپی که در سال ۲۰۱۶ توسط Osawa و Kawano صورت گرفت نشان داد که برخی از سویه‌های /شریشی‌کلی به علت وجود ژن مقاومت در برابر بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و از آنجایی که به روش‌های مختلف مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قادر به انتقال عوامل ژنتیکی مقاوم به سویه‌های دیگر هستند، افزایش قابل ملاحظه این مقاومت‌ها قابل مشاهده است (۵). ژن‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مکانیسم عمل متفاوتی دارند؛ به طوری که ژن‌های کد کننده بتالاکتاماز *bla_{OXA}*، *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}* و *bla_{CTX}* بوده که به دلیل داشتن آنزیم بتالاکتاماز موجب شکافتن پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام و در نتیجه غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شوند. آنزیم‌های حاصل از ژن‌های *aadA_I* و ۱- (۳) *aac* موجب تغییر آمینوگلیکوزیدها و غیرفعال شدن داروهای آمینوگلیکوزیدی می‌شوند (۶). ژن مقاومت *tetC*، *tetA* با تولید پروتئین محلول با GTPase همولوگ بوده و از ریبوزوم باکتری در برابر تتراسایکلین محافظت می‌نماید. ژن *sul_I*، *sul_{II}* و آنزیم دی‌هیدروپتروویک اسید سنتتاز را مهار می‌کند و سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سولفانامیدها می‌گردد. ژن *cat*، *flor* استیل ترانسفراز را کد کرده و این آنزیم گروه استیل را به گروه هیدروکسیل روی کلرامفنیکل متصل و موجب استیل‌اسیون دارو و مقاومت در برابر کلرامفنیکل‌ها می‌شود. ژن *dhfr_V* و *dhfr_A* با ایجاد موتاسیون در ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز سبب مقاومت به تری‌متوپریم می‌شود و بالاخره ژن *qnr_B* و *qnr_S* باعث جهش در ژن‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز VI و ایجاد مقاومت نسبت به کوئینولون‌ها می‌شود (۷).

تاکنون هیچ‌گونه مطالعه جامعی در ارتباط با اهمیت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طیور صنعتی منطقه صورت نگرفته است. لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی اهمیت تعیین حساسیت

¹ Macconkey Agar

در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت (جدول ۱). همچنین برای کنترل مثبت از سویهٔ رفرانس/شریشیاکلی ATCC 35218 و سویهٔ رفرانس کلبسیلا^۱ ATCC 700603 و برای کنترل منفی از سویهٔ رفرانس/شریشیاکلی ATCC 25922 استفاده شد (شکل ۱).

جدول ۱ - پرایمرها و سویه‌های استاندارد مربوط به PCR چندگانه برای شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی

منبع	اندازهٔ قطعه (bp)	(5'-3') توالی	ژن	آنتی‌بیوتیک
۳۷	۵۵۰	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	<i>bla_{CTX-15}</i>	بتالاکتاماز
۴۷	۴۴۵	AAAATTCTTGAAGACG TTACCAATGCTTAATCA	<i>bla_{TEM}</i>	
۴۷	۷۴۷	TTAACTCCCTGTTAGCCA GATTGCTGATTTCGCCC	<i>bla_{SHV}</i>	
۲	۵۹۱	TCAACTTTCAAGATCGCA GTGTGTTTAGAATGGTGA	<i>bla_{OXA}</i>	
۵۰	۲۸۴	TGATTTGCTGGTTACGGTGAC CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	<i>aad_A</i>	آمینوگلیکوزیدها
	۱۵۷	ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	<i>aac(3)-I</i>	
۵۰	۸۸۷	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	<i>tetA</i>	تتراسایکلین
	۷۷۳	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	<i>tetB</i>	
۵۰	۸۲۲	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCCTCGGTCTC	<i>sul_I</i>	سولفونامیدها
۳۱	۲۹۳	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTTGATACCGGCACCCGT	<i>sul_{II}</i>	
۵۰	۴۳۲	CTGCAAAAGCGAAAAACGG AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG	<i>dhfr_v</i>	تری‌متوپریم
	۳۹۱	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG GGGTAAAACTGGCCTAAAATTG	<i>dhfr_I</i>	
۵۰	۳۹۹	TATCTCCCTGTCGTTCCAG AGAACTCGCCGATCAATG	<i>flor</i>	کلرآمفنیکل
	۵۴۷	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	<i>cat_I</i>	
۱۳	۵۸۰	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	<i>qnr_A</i>	کینولون‌ها
	۲۶۴	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	<i>qnr_B</i>	
	۴۲۸	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCCGGCG	<i>qnr_S</i>	

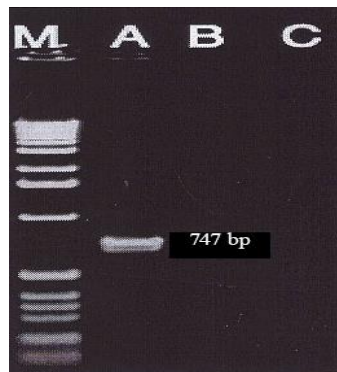
¹ *Klebsiella*

الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد انجام و سپس ژن‌های الکتروفورز شده، جهت تشخیص تشکیل باندهای موردنظر با دستگاه UV موردبررسی قرار گرفتند.

وجود یا عدم وجود ژن‌های بیان‌شده در سویه، بستگی به تشکیل باند در جایگاه‌های خاص داشت (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲- الگوی تشخیص ژن‌های حدت ویروسی در ارتباط آن‌ها با زیرگروه‌های فیلوژنی/گروهی از/کولای‌های جداشده از موارد کلی‌باسیلوز و سلولیت در نمونه‌های جوجه‌های گوشتی

Phylogenetic group Phylogenetic subgroup	A	B1	B2	D	Total No. (%)				
A0	A1	B1	B2-2	B2-3	D1	D2			
Patterns of detected genes	APEC								
<i>crl fimH papC sfa/foc</i>	Colibacillosis	۲۳	۴	۳	-	-	۱۰	-	۴۰ (۳۴/۱۸)
<i>crl fimH sfa/foc</i>	Colibacillosis	۳	۳	-	-	-	-	۱	۷ (۵/۹۸)
<i>crl fimH iucD</i>	Colibacillosis	۱	۲	-	-	-	-	-	۳ (۲/۵۶)
<i>crl- fimH</i>	Colibacillosis	۳	-	۱	۱	-	-	-	۵ (۴/۲۷)
<i>crl- papC</i>	Colibacillosis	-	۳	۱	۲	-	۱	-	۷ (۵/۹۸)
<i>fimH-papC</i>	Colibacillosis	-	-	-	-	-	۱	-	۱ (۰/۸۵)
<i>fimH-sfa/foc</i>	Colibacillosis	۱	-	-	-	-	-	-	۱ (۰/۸۵)
1	Colibacillosis	۱	۱	۱	۱	۱	-	-	۵ (۴/۲۰)
<i>fimH</i>	Cellulitis	۱۶	-	۲	-	-	-	۳	۲۱ (۱۷/۹۰)
<i>crl</i>	Cellulitis	-	۲	-	-	-	۴	۳	۹ (۷/۶۹)
<i>papC</i>	Cellulitis	۱	-	-	-	-	-	-	۱ (۰/۸۵)
Non detected	-	-	-	-	-	۱۴	۳	(۱۴/۵۲) ۱۷	
Total phylosubgroup	۴۹	۱۵	۸	۴	۱	۳۰	۱۰	۱۱۷	
Total phylogroup	۶۴	-	۸	۵	-	۴۰	-	۱۱۷	



شکل ۱- آزمایش PCR جهت شناسایی ژن *blaSHV* (۷۴۷ bp): M: مارکر ۱ کیلوبازی، A: کنترل مثبت (سویه استاندارد کلبسیلا ۷۰۰۶۰۳)، B: کنترل منفی (سویه استاندارد/شریشیائلی ATCC25922)، C: جدایه منفی

۳- نتایج

آمپی سیلین، استرپتومايسين و تتراسایکلین که تو سط شرکت پارس پیوند ساخته شده، بین ۵۰ تا ۸۵ درصد بود. تمام جدایه‌ها به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه مقاوم بودند. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۹۴/۱۸ درصد، سولفامتوکسازول ۶۱/۲۴ درصد، فلورفنیکل ۴۵/۹۶ و تری‌متوپریم ۴۶/۳۶ درصد بود (جدول ۳).

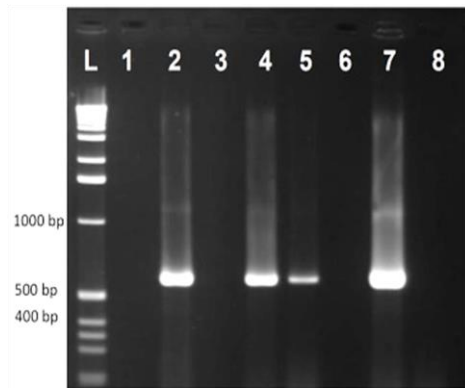
درمورد تأیید نمونه‌های /شریشیائلی از محیط مک‌کانکی آگار استفاده شد (۱۷) و در مورد تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی مقاومت دیسک‌های مورد استفاده به آنتی‌بیوتیک‌های فلور فنیکل، تری متوپریم، سولفامتوکسازول، انروفلوکساسین، جنتامایسین،

جدول ۳- نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسکی

نوع آنتی‌بیوتیک	کد	میانگین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها	مقاوم (میلی متر یا بیشتر)	نیمه حساس	حساس (میلی متر یا کمتر)
سفالکسین	CN	۳۹/۴۱	۱۴	۱۵-۱۷	۱۸
کلرامفنیکل	C	۶۱/۵۳	۱۲	۱۳-۱۷	۱۸
انروفلوکساسین	NFX	۵۷/۵۲	۱۵	۱۶-۲۰	۲۱
فلومکوئین	FM	۴۵/۹۶	۱۳	۱۴-۱۸	۱۹
لینکواسپکتین	LP	۶۵/۶۸	۱۲	۱۳-۱۶	۱۷
استرپتومايسين	S	۴۲/۳۹	۱۱	۱۲-۱۴	۱۵
تتراسایکلین	TE	۹۴/۱۸	۱۴	۱۵-۱۸	۱۹
تری‌متوپریم	STX	۴۶/۳۶	۱۰	۱۱-۱۵	۱۶

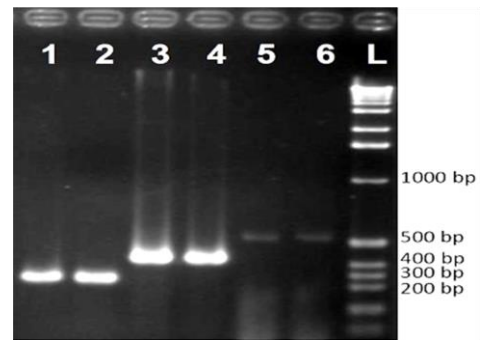
(۲۵/۶۶)، *aadA* (۳۲/۸۹)، *flor* (۲۸/۹۵)، *sulII* (۴۳/۳۱) و *qnrA* (۲۲/۳۰) درصد بود. هیچ کدام از نمونه‌ها از نظر ژن‌های *blaSHV*، *blaCTX*، *blaTEM* و *baloxA* مثبت نبودند (شکل های ۲-۵).

نتایج حاصل از PCR ژن‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۶۵/۸۵ درصد نمونه‌ها برای ژن *tetA* و ۶۴/۶۵ درصد برای ژن *tetB* مثبت بودند. درصد فراوانی ژن‌های *qnrS* (۴۷/۳)، *qnrB* (۲۴/۰۹)، *sulI* (۲۸/۹۱)، *dhfrv* (۴۱/۳۲)، *dhfrA* (۲۶/۵)، *aac* (۳)-۱



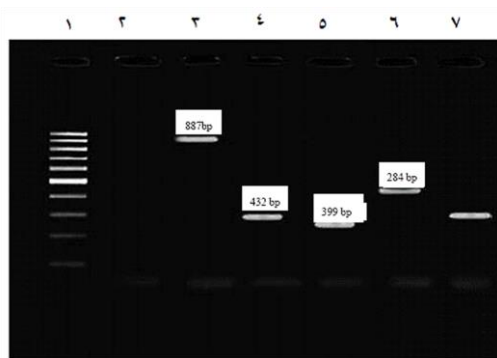
شکل ۳- نتیجه آزمایش PCR برای شناسایی ژن *iucD* جدا شده از کلی باسیلوز

مارکر L: ۱ کیلوبازی، شماره ۱: کنترل منفی (اشریشیاکلی MG 1655)، شماره ۲: کنترل مثبت برای ژن *iucD* (ا.کولای ۲۳۹)، شماره ۴، ۵ و ۷: جدایه مثبت برای ژن *iucD*



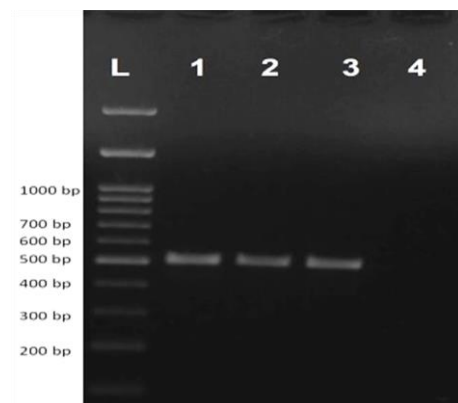
شکل ۲- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *crl*، *fimH* و *saf/foc* جدا شده از کلی باسیلوز

مارکر L: ۱ کیلوبازی، شماره ۱: کنترل مثبت برای ژن *crl* (ا.کولای ۱۹۶)، شماره ۲: جدایه مثبت برای ژن *crl*، شماره ۳: کنترل مثبت برای ژن *saf/foc* (سویه استاندارد/اشریشیاکلی ۱۹۶)، شماره ۴: جدایه مثبت برای ژن *saf/foc*، شماره ۵: کنترل مثبت برای ژن *fimH* (ا.کولای ۱۹۶)، شماره ۶: جدایه مثبت برای ژن *fimH*



شکل ۵- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *tetA*، *aadA* (bp 399)، *floR* (bp 432)، *dhfrV* (bp 887) و *aadA* (bp 284)

مارکر L: ۱ کیلوبازی، شماره ۲: کنترل منفی (سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922)، شماره ۳: جدایه مثبت برای ژن *tetA*، شماره ۴: جدایه مثبت برای ژن *dhfrV*، شماره ۵: جدایه مثبت برای ژن *floR*، شماره ۶: جدایه مثبت برای ژن *aadA*، شماره ۷: کنترل مثبت (سویه استاندارد/اشریشیاکلی R380).



شکل ۴- نتیجه آزمایش PCR برای شناسایی ژن *fimH* جدا شده از نمونه سلولیت

مارکر L: ۱ کیلوبازی، شماره ۱: کنترل مثبت برای ژن *fimH* (ا.کولای ۱۹۶)، شماره ۲ و ۳: جدایه مثبت برای ژن *fimH*، شماره ۴: کنترل منفی (سویه اشریشیاکلی MG 1655).

۴- بحث

در بیشتر مطالعه‌های انجام‌شده، *اشریشیاکلی* یکی از باکتری‌های هم‌زیست معرفی شده که می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های گوارشی و خارج گوارشی در طیور گردد. از طرفی مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت دارویی و افزایش روزافزون بیماری *کلی‌باسیلوز* شده است (۲). براساس پژوهش‌های صورت گرفته امکان دارد ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌صورت افقی در بین سویه‌های *اشریشیاکلی* منتقل شوند و دلیل انتشار ژن‌های حدت در گروه‌های فیلوژنی می‌تواند کسب این ژن‌ها به‌صورت افقی از سایر سویه‌های *اشریشیاکلی* باشد که نهایتاً منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی بین سویه‌های *APEC Avian* (*Pathogenic E.coli*) از نظر حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد، اگرچه علاوه بر انتقال افقی، موتاسیون هم در ایجاد این تنوع ژنتیکی دخالت دارد (۹). براساس نتایج این پژوهش ژن‌های *bla_{CTX}*، *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}*، *bla_{OXA}* و *aac(3)-1* در نمونه‌های موردبررسی حضور نداشته، در صورتی که در سایر تحقیقات در کشورهای ژاپن و کانادا این ژن‌ها وجود داشتند (۱۰). براساس نتایج بیان‌شده ژن‌های *tetA* و *tetB* در جدایه‌های *اشریشیاکلی* دارای بیشترین درصد مقاومت بوده که این مسئله با بیشتر مطالعات صورت‌گرفته هم‌خوانی داشته است. همچنین مطالعه‌ای که توسط Remazanzadeh و همکاران (۲۰۱۷) بر روی مقاطع فریزشده بافت‌های طیور مبتلا به *کلی‌باسیلوز* به‌روشنایمونی فلورسانس انجام شد، نشان داد که برخی از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این جدایه‌ها وجود داشته و بیشترین موارد مربوط به ژن *tetA* می‌باشد (۱۱). در مطالعه Ganbarpor و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ۱۰۰ جدایه *کولای*، ۵۳ جدایه دارای ژن *tetA* بوده و هیچ‌کدام ژن *bla_{TEM}* را نداشتند (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Murray (۲۰۱۹) در زمینه تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی جدایه‌های *کلی‌باسیلوزی* صورت گرفت، مشاهده گردید که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به تتراسایکلین بوده و علت آن این است که مرغداران در طول دوره پرورش خودسرانه، این دارو را به مدت‌های طولانی به جیره طیور اضافه می‌نمایند که این مسئله در مطالعه اخیر نیز تأیید گردید (۱۹). به علاوه در بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۹ در ژاپن صورت گرفت، نشان داده شد که ژن *tetB* در ۵۷/۳۳ درصد جدایه‌های *اشریشیاکلی* وجود دارد (۷). همچنین در

مطالعه‌های مشابه دیگر، فراوانی ژن‌های *tetA* و *tetB* بین ۲۳ تا ۶۵ درصد گزارش گردید (۱۳) و نیز نتایج مطالعه گسترده Murakamin و همکاران (۲۰۱۶) در ژاپن بر روی جدایه‌های سلولیت و *کلی‌باسیلوز* طیور گوشتی نشان داد که بیشتر ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله *tet*، *qnr* و *flor* در جدایه‌ها مثبت بوده و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ژن *tetA* و کمترین آن‌ها مربوط به ژن *bla_{CTX}* بوده که این نتایج تا حدود زیادی در مطالعه اخیر نیز تأیید شده است (۱۰). بر طبق تحقیقات صورت‌گرفته نیز تعیین گردید که مشخصه ویژه‌ای که می‌توان برای سویه‌های *APEC* قائل شد، حضور ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بیماری‌زا است که چنین ژن‌هایی را در سویه‌های غیربیماری‌زا نمی‌توان مشاهده نمود یا حداقل، فراوانی آن‌ها خیلی کمتر است (۱۸). علاوه بر این نتایج Johnson (۲۰۱۷) حاکی از آنست که از ۱۸۲ جدایه *اشریشیاکلی* ۴۰/۲۳ درصد دارای ژن *qnr_s* بودند (۳). Marthin و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش کردند که ۲۸/۸ درصد از سویه‌های *APEC کلی‌باسیلوز*، ژن *aac(3)-1* را دارند (۱۶). بیشتر مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان صورت گرفته نیز نشان می‌دهند که به‌دلیل مصرف خودسرانه و بی‌رویه داروها، بیشتر ژن‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اشریشیاکلی* وجود دارند. این گزارش‌ها همانند مطالعه اخیر نشان‌دهنده این است که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این ژن‌ها وجود دارد. به‌علاوه در مطالعه‌ای که توسط Van Bost (۲۰۱۹) در کشور کانادا صورت گرفت، نشان داده شد که در تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی بیشتر جدایه‌ها حداقل به یک یا دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و این مسئله، مؤید نتایج مطالعه حاضر است (۲۰). برخی از محققان برای سویه‌هایی از *APEC* که احتمال بیماری‌زایی برای انسان را دارند، اهمیت زئونوتیکی قائل‌اند، به‌طوری‌که در سال‌های اخیر سویه *O₁₅₇:H₇* *اشریشیاکلی* به‌عنوان پاتوژن مهم مشترک بین انسان و دام مطرح گردیده که از طریق غذا به انسان منتقل می‌شود (۱۵).
در حال حاضر با توجه به مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش روزافزون بیماری‌های ناشی از *اشریشیاکلی* و مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم‌منفی از جمله *اشریشیاکلی* به‌نظر می‌رسد توجه به نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی قبل از تجویز دارو می‌تواند راه‌گشای انتخاب مسیر درمانی مناسب باشد.

٨- تعارض منافع

نکته‌ای که هنوز در مورد کسب ژن حدت بی‌پاسخ مانده این است که آیا فقط دریافت ژن حدت قابلیت بیماری‌زایی و حدت را در باکتری دریافت‌کننده افزایش می‌دهد یا علاوه بر دریافت ژن حدت و مقاومت، سایر عوامل زمینه‌ای نیز در مورد این ژن‌ها مؤثرند؟ از آنجایی که حضور و شیوع کلی‌سپتی‌سمی طیور با وجود درمان آنتی‌بیوتیکی ارتباط زیادی با مسائل مدیریتی و بهداشتی دارد که از حیطه بحث این پژوهش خارج است، اما قسمتی از این موضوع ارتباط با توانایی‌های باکتری در بقا و بروز بیماری‌زایی در طیور دارد. با نظر به افزایش روزافزون بیماری‌های ناشی از اشریشیاکلی در جهان و از جمله ایران به نظر می‌رسد که توجه به مسئله تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مقطع کنونی می‌تواند راهگشای انتخاب مسیر درمانی مناسب باشد. با توجه به وجود بسیاری از عوامل مرتبط با ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی که بررسی‌نشده یا اصلاً شناخته‌شده نیستند، لذا جهت شناخت بیشتر مکانیسم‌های بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه‌های بیشتری نیاز است که اهمیت بیماری کلی‌باسیلوز را در طیور مشخص نماید.

٦- ملاحظات اخلاقی

این مقاله به کاهش پیامدهای منفی مقاومت آنتی بیوتیکی در سطح ملی کمک می کند. ملاحظات اخلاقی شامل ارائه دقیق داده ها، خطرات مرتبط با ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی، افشای تعارض منافع واعلام حمایت مالی شرکت ها، ارجاع صحیح منابع مورد استفاده، حقوق ورفاه طیور، توجیه ضرورت پژوهش، تاکیدبر خطرات مقاومت آنتی بیوتیکی، ارائه راهکار عملی برای کاهش مصرف آنتی بیوتیک، پرهیز از ایجاد ترس، حفظ اطلاعات محرمانه مرغداری از جمله عدم افشای نام مرغدار، تاثیر ژنهای مقاومت بر محیط زیست، برطرف نمودن نیازهای مناطق کم درآمد و دسترسی آزاد به اطلاعات مقاله از جمله ملاحظات اخلاقی این مقاله است.

۷- تشکر و قدردانی

از کلیه افرادی که در نمونه گیری ها (از جمله کارکنان کشتارگاه) و پرسنل آزمایشگاه دانشگاه شهید باهنر و دانشگاه شهر یابک تشکر مینمایم.

1. Suwanich Kul, A., Paningrahy, B., Wagner, M. Antigen relateness and partial amino acid sequence of pili of *Escherichia coli* serotype O₁, O₂ and O₇₈ pathogenic to poultry. *Avian diseases* 2019; 31(3) , 809-813.
2. Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vailan Court, J.P. Colibacillosis. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D. E.: ۱۲ edition: *Diseases of Poultry* 2018 ; 18(4) , 691-738.
3. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J.P., Jimenez, M.T., de Anta, H., Vila, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *Jornal Infect Disease* 2017; 191(6) , 46-50.
4. Dho, M., Lafont, J.P. Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Diseases* 2019; 28(2) , 1116-1125.
- 5-Kawano, M., Yaguchi, K., Osawa, R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbial Immunology* 2016; 51(3) , 961-966.
6. Vanderson, Cindy. Great Adventures in the Microbiology Laboratory (7th ed.). Pearson. pp.2013 3(6) , 175-176.
7. Marthin. JS, Nolan LK, Tonooka KH et al Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Disease* 2019; 46(5) , 48-52.
8. Jeffrey JS, Nolan LK, Tonooka KH, et al. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis* . (2015); 49(1)
9. Fankhauser, C., Schrenzel, J., Prendki, V., Ris, F., Schiffer, E., Gastmeier, P., Harbarth, S. Prevalence of extended-spectrum betalactamase producing-Enterobacteriaceae (ESBL-E) carriage on admission at Geneva University Hospitals (HUG). *Antimicrob Resist Infect Control* 2015; 4(3) , 120-12.
10. Murakamin, M., Kwaga, J.K., White, D.G., et al. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immunology* 2016 ; 64(8) , 3118-3126.
11. Ramazanzadeh, R., Farhadifar, F., Mansouri, M. Etiology and antibiotic resistance pattern of community-acquired extended-spectrum beta-lactamas-producing gram negative isolates in Sanandaj. *ResearchJornalMedicin Science* 2017 ; 4(9) , 243-7.
12. Ghanbarpour, R. genetipicanalysis of virulence genes antimicrobial profile of diarrhea agenic *Escherichia coli* isolaited from disease poultray in Iran tropanima healtprod. *Dol report microbiology* 2017; 10(6) , 017-1234.
- 13- Suwanich Kul, A., Paningrahy, B., Wagner, M. Antigen relateness and partial a; mino acid sequence of pili of *Escherichia coli* serotype O₁, O₂ and O₇₈ pathogenic to poultry. *Avian diseases* 2019 ; 31(4) , 809-813.
14. Van Bost, S., Jacquemin, E., Oswald, E., mainil, J. Multiplex PCRs for indentification of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology* 2019; 41(13) , 4480-4482.
15. La Ragione, R.M., Woodward, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research Veterinary Science* 2018; 73(2) , 27-35.
16. Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Bouguenec C.Le., Denamur, E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol biology evolutionary* 2019; 21(7) , 1085-1094.
- 17- Gordon, D.M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 2018; 10(3) , 2484-2496.
18. Facklam, R.R., Carvalho, M., Teixeira, L.M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. Washington DC: *ASM jornal Science* 2017; 6(5) , 1-54.
19. Jeffrey, J.S., Nolan, L.K., Tonooka, K.H., et al. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Disease* 2018; 46(8) , 48-52.
20. McPeak, S.J.W., Smyth, J.A., Ball, H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to fecal isolates from healthy bird. *Veterinary Microbiology* 2018 ; 110(12) , 245-253
21. Sader, H.s. Antimicrobial activity of tetracycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagnosise Microbial Infect Disease* 2015; 52(3) , 203-8..
22. Stordeur, P., Bree, A., Mainil, J., and Moulin-Schouleur, M. Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes Infect* 2017; 6(4) , 637-645.