Archive of SID

**Iranian Journal of Animal Science**
Vol 49, No 2, Summer 2018 (203-211)
DOI: 10.22059/ijas.2018.256297.653633

**علوم دامی ایران**
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷ (ص ۲۱۱-۲۰۳)

# بررسی مولکولی ژن‌های مقاومت پادزیستی در جدایه‌های اشریشیاکلی در طیور گوشتی شهرستان شهربابک به روش MULTIPLEX PCR

**اکبر اسدی[۱]، تقی زهرایی صالحی[۲*] و محمود جمشیدیان[۳]**
**۱ و ۳. دانشجوی دکتری و استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران**
**۲. استاد بخش ایمنی‌شناسی و میکروبیولوژی دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران**
**(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۰- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲۶)**

## چکیده

**اشریشیاکلی بیماری‌زای طیور عامل ایجاد طیف بسیار گسترده‌ای از بیماری‌های خارج روده‌ای ازجمله سلولیت و کلی باسیلوز است. مشکل مقاومت به پادزیست (آنتی‌بیوتیک)ها در سرتاسر جهان وجود دارد. هدف از این پژوهش ارزیابی مولکولی ژن‌های مقاومت پادزیستی مانند: aac، aad، qnr، tet، anr، sul و تعیین حساسیت پادزیستی بود. نمونه‌برداری از کشتارگاه صنعتی طیور شهربابک در ٦ ماه سال ۹۵ انجام و شمار ۸۳ جدایه از نمونه‌های کلی باسیلوزی و ۳٤ جدایه از نمونه‌های سلولیتی جدا و به روش‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. سپس آزمون‌های MultiplexPCR و تست حساسیت پادزیستی روی نمونه‌ها انجام شد. نتایج بررسی نشان داد، فراوانی ژن‌های $tet_A$ ٪۶۳/۸۵، $tet_B$ ٪۶۲/۶۵، $qnr_s$ ٪۴۹/۳، $qnr_B$ ٪۲۴/۰۹، $sul_1$ ٪۲۸/۹۱، $dhfr_v$ ٪۳۱/۳۲، $dhfr_{Ar}$ ٪۲۶/۵، aac(3) – ۱ ٪۲۵/۶۶، $aad_A$ ٪۲۲/۸۹، $flo_r$ ٪۲۸/۹۱، $sul_1$ ٪۳۳/۳۱ و $qnr_A$ ۱۲/۳۰درصد بود. هیچ‌کدام از نمونه‌ها از نظر ژن‌های $bla_{TEM}$، $bla_{SHV}$، $bla_{CTX}$، $bla_{OXA}$ مثبت نبودند. در این بررسی مشخص شد که ٤۰ تا ۹۰ درصد همهٔ جدایه‌ها به یک یا چند پادزیست مقاوم هستند. بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به پادزیست‌های تتراسایکلین، سولفومتوکسازول، کلرامفنیکل و تریمتوپریم بود. همچنین مشخص شد که بروز مقاومت پادزیستی به دلیل حضور ژن‌های مقاومت است. شناخت الگوی مقاومت و حساسیت ریزجانداران (میکروارگانیسم)ها نسبت به پادزیست‌ها در انتخاب مناسب و درست دارو و مهار (کنترل) عفونت‌ها نقش مؤثری دارد.**

**واژه‌های کلیدی:** *اشریشیاکلی*، جوجه‌های گوشتی، سلولیت، کلی باسیلوز، مقاومت پادزیستی.

# Molecular analysis of antibiotic resistance genes in Escherichia coli from broiler chickens in shahrebabak by Multiplex PCR Technique

**Akbar Asadi[1], Taghi Zahraei Salehi[2*] and Mahmoud Jamshidian[3]**
1, 3. Ph. D. Candidate and Professor, Department of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
(Received: May 10, 2018 - Accepted: Jun. 16, 2018)

## ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is responsible for an extremely wide range of extra intestinal diseases in poultry, including Colibacillosis and Cellulitis. There is the problem of antibiotic resistance all over the world. The aim of this study is the molecular study of antibiotic resistance genes, such as: aac, aad, qnr, tet, anr, sul and determination of antibiotic susceptibility. 83 strains of *E. coli* of Colibacillosis cases and 34 strains of Cellulitisin cases were gotten from in poultry slaughterhouses in Shahrebabak province within 6 months in 2017. *Strains of E. coli* were confirmed by biochemical methods. The results of the study showed that 63.85% for the $tet_A$ gene, 62.65% for the $tet_B$ gene were positive. The abundance of genes $qnr_s$ (49.3%), $qnr_B$ (24.09%), $sul_1$ (28.91%), $dhf_{rv}$ (31.32%), $dhfr_A$ (26.50%), aac (3)-1(25.66%), $aad_A$ (22.89%), $flo_R$ (28.91%), $sul_1$ (33.13%), $qnr_A$ (12.30%). None of the specimens was positive for $bla_{oxa}$, $bla_{CTX}$, $bla_{sHV}$, $bla_{TEM}$, genes. In this study, it was found that all of the suppositories were resist ant to one or more antibiotics between 40% and 90%. The highest resistance to antibiotics was tetracycline, sulfamethoxazole, chloramphenicol, terimetoprim. In this study, antibiotic resistance was found to be due to the presence of resistance genes. Recognition of resistance pattern and microorganisms susceptibility to antibiotics have an effective role on correct and suitable selection of antibiotic and infection control.

**Keywords:** Antibiotic resistance, broiler chicken, celluitis, collibacillosis, *Escherichia coli*.

* Corresponding author E-mail: r.ghanbar3412@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و پراکنش آن‌ها در کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراتوری بزرگ از سدهٔ ۵ پیش از میلاد تا حدود سدهٔ ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و پس از آن، در قرون‌وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل‌ونقل محصولات، مانند ماکیان از شرق به غرب، هم از راه خشکی و هم از راه دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را آسان کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi *et al*., 2010). بر پایهٔ تحقیقات West & Zhou (1989) استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپهٔ یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ پیش از میلاد و ۱۰۰۰ پیش از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال‌غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ پیش از میلاد (Mohammadabadi *et al*., 2010). از سوی دیگر عفونت ناشی از اشریشیاکلی در طیور انتشار جهانی دارد. بررسی‌های زیادی درزمینهٔ سازوکار بیماری‌زایی و نقش عامل‌های حدت و ژن‌های مقاومت پادزیستی (آنتی‌بیوتیکی) در بیماری کلی‌باسیلوز صورت گرفته است. (Gordon *et al*., 2011). اشریشیاکلی ( coli *Escherichia*) متعلق به خانوادهٔ آنتروباکتریاسه (Enterobacteriacae) است و حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد کلی‌فورم‌های (Coliform) رودهٔ مربوط به سروتیپ‌های بیماری‌زا این باکتری است. سروتیپ‌هایی از باکتری مانند $O_{78}$، $O_{35}$، $O_8$، $O_2$، $O_1$ در کلی‌باسیلوز طیور نقش دارند. (Suwanich *et al*., 2005). عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی در طیور شامل پریتونیت ناشی از تخم شکستگی (Egg-peritonitis)، عفونت کیسهٔ زرده (Yolk sac disease)، کلی‌گرانولوما (Coligranuloma)، سندرم سر باد کرده ( Swollen head syndrome)، سلولیت (Cellulitis)، سینوویت (Synovitis) و کلی‌سپتی سمی (Colisepticaemia) است (Barnes *et al*., 2008). عامل‌های مؤثر در بیماری‌زایی باکتری به‌عنوان عامل‌های حدت تلقی شده و با شدت بیماری و میزان تلفات رابطهٔ مستقیمی دارند. محصولات ژن‌های مانند sfa، afa، $PaP_c$، qer، fimH، crl، $cnf_1$، cdt، cnf، ipaH، $stx_2$، $eae_A$، tet، bla، qnr از مهم‌ترین عامل‌های حدت اشریشیاکلی به‌شمار می‌روند، که برخی از این ژن‌ها در این بررسی ارزیابی شدند (Johnson *et al*., 2013). عفونت‌های ناشی از اشریشیا را می‌توان با انواع پادزیست‌ها درمان کرد، اما در جهت درمان مؤثر، جداسازی باکتری و انجام آزمایش تعیین حساسیت به پادزیست‌ها ضروری است. یکی از مشکلات مهم در بخش درمان در حوزهٔ پزشکی و دامپزشکی روند پیشروندهٔ مقاومت پادزیستی باکتری‌ها و انتخاب پادزیست مناسب برای درمان است. بنابراین اهمیت تعیین حساسیت پادزیستی سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از طیور روشن است. بنا بر بررسی‌های انجام‌شده اشریشیا به بیشتر پادزیست‌ها مانند کلرامفنیکل، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، جنتامایسین، انروفلوکساسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، پلی‌میکسین B، سولفانامیدها، نیتروفورازون و اکسی تتراسایکلین حساس است (Lafont *et al*., 2009). با توجه به مصرف بی‌رویه و خودسرانهٔ پادزیست‌ها در صنعت طیور کشور، احتمال مقاومت دارویی بالاست. بررسی نژادگانی (ژنوتیپی) که در سال ۲۰۱۶ توسط دانشمندان ژاپنی صورت گرفته، نشان می‌دهد، برخی از سویه‌های اشریشیاکلی به علت وجود ژن مقاومت در برابر بعضی پادزیست‌ها مقاوم هستند و ازآنجایی‌که به روش‌های مختلف مانند پلاسیمدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قادر به انتقال عامل‌های ژنتیکی مقاومت به سویه‌های دیگر هستند، شاهد افزایش قابل‌ملاحظهٔ این مقاومت‌ها هستیم (Kawano *et al*., 2016). ژن‌های مسئول مقاومت پادزیستی سازوکار عمل متفاوتی دارند، به‌طوری‌که ژن‌های کدکنندهٔ بتالاکتاماز، $bla_{OXA}$، $bla_{CTX}$، $bla_{TEM}$ و $bla_{SHV}$، با تولید آنزیم بتالاکتاماز موجب شکافتن پیوند آمیدی حلقهٔ

www.SID.ir

Archive of SID



بتالاکتام و در نتیجه غیرفعال شدن پادزیست و مقاومت پادزیستی می‌شوند. آنزیم‌های حاصل از ژن‌های $aad_{A1}$ و aac(3)-1 موجب تغییر آمینوگلیکوزیدها و غیرفعال شدن داروهای آمینوگلیکوزید می‌شوند (Murray *et al*., 2014). ژن مقاومت $tet_C$، $tet_B$ و $tet_a$ با تولید پروتئین محلول با GTPase همسان (همولوگ) بوده و از ریبوزوم باکتری در برابر تتراسایکلین محافظت می‌کند. ژن $sul_{II}$ و $sul_I$ آنزیم دی‌هیدروپتروویک اسید سنتتاز را مهار کرده و سبب مقاومت پادزیستی در سولفانامیدها می‌شود. ژن $flo_R$، $cat_1$، استیل ترانسفراز را کد کرده و این آنزیم گروه استیل را به گروه هیدروکسیل روی کلرامفنیکل متصل و موجب استیل‌گذاری (استیلاسیون) دارو و مقاومت در برابر آمفیکل‌ها می‌شود. ژن dhfrv و $dhf_{rI}$ با ایجاد جهش (موتاسیون) در ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز سبب مقاومت به تری‌متوپریم می‌شود و بالاخره ژن $qnr_s$، $qnr_r$ باعث جهش در ژن‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز VI و ایجاد مقاومت نسبت به کوئینولون‌ها می‌شود (Murray *et al*., 2010). از سوی دیگر حیوان‌های اهلی می‌توانند منبع‌های مسمومیت غذایی انسان باشند، لذا برای کاهش یا حذف این خطر باید راهبردهایی برای جلوگیری از ورود عفونت‌های حیوانی به زنجیرهٔ غذایی انسان توسعه پیدا کنند (Ahsani *et al*., 2011). PCR از مدرن‌ترین فنّاوری‌ها در تشخیص بیماری‌های عفونی در مقایسه با روش‌های سنتی است و نشان داده شده که بسیار سریع‌تر و قابل‌اعتمادتر است و در طی چند ساعت نتایج قابل‌مشاهده هستند. PCR تشخیص سریع‌تر و مستقیم عفونت‌های باکتریایی را به‌طور مستقیم از نمونه‌های بالینی (کلینیکی) فراهم می‌آورد (Ahsani *et al*., 2010). همچنین با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد یاخته و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به‌این‌ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به‌منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دههٔ اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به‌طور گسترده‌ای افزایش‌یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو بررسی‌های رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به‌دست‌آمده از تحلیل داده‌های زیستی با علم اطلاعات زیستی (بیوانفورماتیک)، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن همانندی‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط تبارزایی (فیلوژنیک) میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh *et al*., 2013; Hadizadeh *et al*., 2014). اگرچه بررسی‌های مولکولی چندی روی طیور در ایران انجام شده است (Zandi *et al*., 2014; Mohammadifar *et al*., 2017; Shahdadnejad *et al*., 2016; Moazeni *et al*., 2016a; Moazeni *et al*., 2016b)، اما تاکنون هیچ‌گونه بررسی جامعی در ارتباط با اهمیت تعیین حساسیت پادزیستی و ژن‌های مقاومت پادزیستی در طیور صنعتی منطقه صورت نگرفته است. لذا، هدف از این تحقیق بررسی اهمیت تعیین حساسیت پادزیستی و همچنین شناسایی ژن‌های حدت و نقش آن‌ها در بروز مقاومت پادزیستی در طیور گوشتی شهرستان شهربابک بود.

## مواد و روش‌ها

این بررسی شامل: الف) جداسازی اشریشیاکلی، ب) تأیید سویه‌های اشریشیاکلی جداشده به روش‌های بیوشیمیایی، ج) آزمایش حساسیت دارویی (آنتی‌بیوگرام) و تعیین حساسیت پادزیستی، د) ذخیرهٔ نمونه، هـ) استخراج DNA، و) آزمایش PCR، ز) الکتروفورز، ح) تجزیهٔ محصولات PCR است. در یک دورهٔ زمانی ۶ ماهه در سال ۹۵ از کشتارگاه صنعتی طیور شهربابک ۸۳ نمونه طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز و ۴۳ نمونه مبتلا به سلولیت گردآوری شد. پس از سوزاندن سطح کبد و قلب لاشه‌های کالبدشکافی‌شده با اسپاتولای داغ کشت در محیط مک‌کانکی به‌وسیلهٔ انس حلقوی به روش خطی انجام شد. یک کلنی از باکتری رشد کرده در محیط لوریابرتانی LB را در محیط مولرهینتون کشت داده و سپس دیسک پادزیست‌های مورد بررسی را بر پایهٔ مرجع (رفرانس) CLSI 2004 در محیط کشت گذاشته، نگهداری (انکوباسیون) شدند و بر پایهٔ منطقهٔ رشد، ارزیابی انجام شد. سپس ۱ سی‌سی لوریابرتانی را درون ریزلولهٔ (میکروتیوب) ۲۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID



میکرولیتری ریخته، یک کلنی تأییدشدهٔ باکتری به آن افزوده، ۲۴ ساعت پیش و پس از رشد باکتری، ۱ سی‌سی گلیسرول ۳۰ درصد به آن اضافه و پس از تکان دادن (ورتکس)، تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA 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 ریزلوله‌های ۲۵ میکرولیتری حاوی سود سوزآور ۰/۵ نرمال اضافه و با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون (استریل) حجم محلول را به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و به‌عنوان DNA استخراج‌شده در آزمایش‌های بعدی استفاده شد. برای شناسایی ژن‌های مقاومت پادزیستی $bla_{OXA}$ ،$aad_A$، $bla_{SHV}$ ،$bla_{TEM}$ ،aac ،Tetc ،TetB ،TetA ،$sul_I$ ،$sul_{II}$، FLOR ،cat ،$dhfl_{rl}$ ،$qnr_A$ ،$dhfl_{rv}$ ،qnrb و qnrs با روش پیشنهادی Sharman *et al.* (2010) آزمایش Multiplex PCR انجام گرفت. برای کنترل مثبت از سویهٔ مرجع اشریشیاکلی ATCC35218 و سویهٔ مرجع کلبسیلا ATCC7006003 و برای کنترل منفی از سویهٔ مرجع اشریشیاکلی ATCC25922 استفاده شد (جدول ۱). الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد انجام و آنگاه ژن‌های الکتروفورز شده برای تشخیص تشکیل نوار (باند)های مورد نظر با دستگاه اشعهٔ فرابنفش (UV) بررسی شدند. بود و یا نبود ژن‌های یادشده در سویه، بستگی به تشکیل باند در جایگاه‌های خاص، داشت و در پایان اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه‌وتحلیل شدند (شکل‌های ۱ و ۲).

جدول ۱. آغازگرها و سویه‌های استاندارد به‌کاررفته در PCR چندگانه برای شناسایی ژن‌های مقاومت پادزیستی

Table 1. primers and standard devices used in PCR multiplex to identify antibiotic resistance genes

| | Gene | Sequences (5'-3') | Fragment size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| B-Lactamase | $bla_{CTX-15}$ | CGCTTTGCGATGTGCAG<br>ACCGCGATATCGTTGGT | 550 | 37 |
| | $bla_{TEM}$ | AAAATTCTTGAAGACG<br>TTACCAATGCTTAATCA | 445 | 47 |
| | $bla_{SHV}$ | TTAACTCCCTGTTAGCCA<br>GATTTGCTGATTTCGCCC | 747 | 47 |
| | $bla_{OXA}$ | TCAACTTTCAAGATCGCA<br>GTGTGTTTAGAATGGTGA | 591 | 2 |
| Aminoglycosides | $aad_A$ | TGATTTGCTGGTTACGGTGAC<br>CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG | 284 | 50 |
| | aac(3)-I | ACCTACTCCCAACATCAGCC<br>ATATAGATCTCACTACGCGC | 157 | |
| Tetracycline | $tet_A$ | GTGAAACCCAACATACCCC<br>GAAGGCAAGCAGGATGTAG | 887 | 50 |
| | $tet_B$ | CCTTATCATGCCAGTCTTGC<br>ACTGCCGTTTTTTCGCC | 773 | |
| Sulfonamides | $sul_I$ | TTCGGCATTCTGAATCTCAC<br>ATGATCTAACCCTCGGTCTC | 822 | 50 |
| | $sul_{II}$ | GCGCTCAAGGCAGATGGCATT<br>GCGTTTGATACCGGCACCCGT | 293 | 31 |
| Trimethoprim | $dhfr_V$ | CTGCAAAAGCGAAAAACGG<br>AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG | 432 | 50 |
| | $dhfr_I$ | AAGAATGGAGTTATCGGGAATG<br>GGGTAAAAACTGGCCTAAAATTG | 391 | |
| Chloramphenicol | $flo_R$ | TATCTCCCTGTCGTTCCAG<br>AGAACTCGCCGATCAATG | 399 | 50 |
| | $cat_1$ | AGTTGCTCAATGTACCTATAACC<br>TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC | 547 | |
| Quinolones | $qnr_A$ | AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG<br>TGCCAGGCACAGATCTTGAC | 580 | 13 |
| | $qnr_B$ | GGMATHGAAATTCGCCACTG<br>TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA | 264 | |
| | $qnr_S$ | GCAAGTTCATTGAACAGGGT<br>TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG | 428 | |

www.SID.ir

Archive of SID



## نتایج

اشریشیا در محیط مک‌کانکی کلونی صورتی‌رنگ داد. در تأیید تشخیص نمونه‌ها، اشریشیا در محیط TSI به علت تولید اسید و گاز زردرنگ شد، در محیط اوره تغییر رنگی مشاهده نشد، در محیط SIM عدم تولید گاز $H_2S$ را داریم، در محیط MR-VP هنگامی‌که معرف متیل‌رد به محیط MR اضافه شد متیل‌رد آن مثبت بود، ولی در محیط VP هنگامی‌که معرف باریت اضافه شد VP یا وژپرسکوئر آن منفی و بنابراین رابطهٔ Imvic آن به‌صورت − − + + دیده شد.

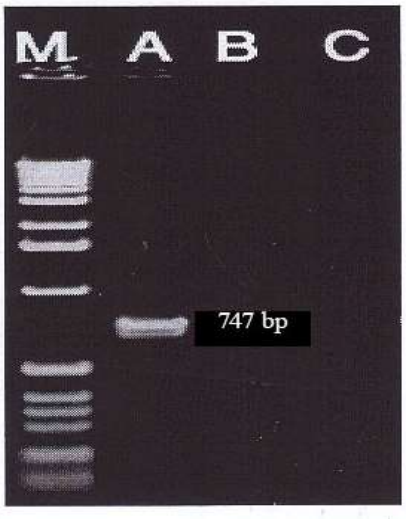
دیسک‌های مورد استفاده بین ۴۰ تا ۹۵ درصد به پادزیست‌های فلورفنیکل، تریمتوپریم، سولفامتوکسازول، انروفلوکساسین، جنتامایسین، سفالوتین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاوم بودند. همهٔ جدایه‌ها به یک یا چند پادزیست مورد بررسی مقاوم بودند. بیشترین مقاومت نسبت به پادزیست تتراسایکلین ۹۵/۸۱ درصد، سولفامتوکسازول ۶۰/۲۴ درصد، کلرامفنیکل ۴۰/۹۶ و تریمتوپریم ۴۰/۱۴ درصد بود.

نتایج نشان داد، به ترتیب ۵۳ جدایه، ٪۶۳/۸۵ برای ژن‌های $tet_A$ و ۵۲ جدایه، ٪۶۲/۶۵ برای ژن‌های $tet_B$ مثبت بودند. فراوانی ژن‌های $qnr_S$ ٪۴۹/۳، $qnr_B$ ٪۲۴/۰۹، $sul_1$ ٪۲۸/۹۱، $dnfr_v$ ٪۳۱/۳۲، $dhfrA_1$ ٪۲۶/۵، aac(3) −۱ ٪۲۵/۶۶ و $aad_A$ ۲۲/۸۹، $flo_r$ ٪۲۸/۹۱، $sul_{II}$ ٪۳۳/۱۳ و cat ۱۲/۳۰ درصد بود. ژن‌های $bla_{TEM}$، $bla_{SHv}$، $bla_{CTX}$ و $bla_{OXA}$ در هیچ‌کدام از جدایه‌ها مثبت نبودند (تصویر ۱).

جدول ۲. نتایج تعیین حساسیت پادزیستی به روش انتشار دیسکی

Table 2. Results of antibiotic susceptibility determination using disc diffusion method

| Antibiotic Type | Code | Sensitive (mm or Less) | Semi-sensetive | Resistant (mm or more) |
|---|---|---|---|---|
| Cephalexin | CN | 18 | 15-17 | 14 |
| Chloramphenicol | C | 18 | 13-17 | 12 |
| Enrofloxacin | NFX | 21 | 16-20 | 15 |
| Flumequine | FM | 19 | 14-18 | 13 |
| Lincospectin | LP | 17 | 13-16 | 12 |
| Streptomycin | S | 15 | 12-14 | 11 |
| Tetracycline | TE | 19 | 15-18 | 14 |
| Trimethoprim | STX | 16 | 11-15 | 10 |




شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن $bla_{SHV}$ (۷۴۷ bp) روی ژل آگارز ۲درصد،

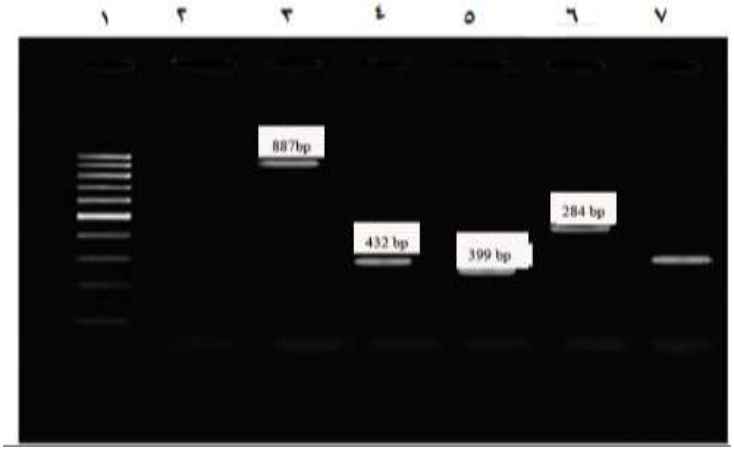
M: مارکر ۱ کیلو بازی، A: کنترل مثبت (سویهٔ استاندارد کلبسیلا ۷۰۰۶۰۳)، B: کنترل منفی (سویهٔ استاندارد اشریشیاکلی ATCC25922)، C: جدایهٔ منفی

Figure 1. Gel electrophoresis of the PCR products ofthe $bla_{SHV}$ gene (747 bp) on2% agarose gel
M: Marker 1 kb, A: Positive control (standard strain of Klebseilla 700603), B: Negative control (standard strain of Escherichiacoli ATCC25922), C: Negative isolate

www.SID.ir

Archive of SID






شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های $tet_A$ (۸۸۷bp)، $dhfr_V$ (۴۳۲ bp)، $flo_R$ (۳۹۹ bp) و $aad_A$ (۲۸۴ bp) روی ژل آگارز ۲درصد،

شماره ۱: مارکر ۱ کیلو بازی، شماره ۲: کنترل منفی (سویهٔ استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922)،

شماره ۳: جدایهٔ مثبت برای ژن $tet_A$، شماره ۴: جدایهٔ مثبت برای ژن $dhfr_V$، شماره ۵: جدایهٔ مثبت برای ژن $flo_R$،

شماره ۶: جدایهٔ مثبت برای ژن $aad_A$، شماره ۷: کنترل مثبت (سویهٔ استاندارد اشریشیاکلی R380)

Figure 2. The result of the PCR test to detect $tet_A$ (887 bp), $dhfr_V$ (432 bp), $flo_R$ (399 bp), $aad_A$ (284 bp) on 2% agarose gel

No. 1: Marker 1 kb, No. 2: Negative control (standard strain of Escherichiacoli ATCC25922), No. 3: Positive isolate for $tet_A$ gene, No. 4: Positive isolate for $dhfr_V$ gene, No. 5: Positive isolate for $flo_R$ gene, No. 6: Positive isolate for $aad_A$ gene, No. 7: Positive control (standard strain of Escherichiacoli R380)

## بحث

در بررسی انجام‌شده مشخص شد، ۶۳/۸۵ درصد نمونه‌ها برای ژن tetA و ۶۲/۶۵ درصد برای ژن tetB مثبت بودند. فراوانی ژن‌های qnrs ۴۹/۳ درصد، $qnr_B$ ۲۴/۰۹ درصد، $sul_1$ ۲۸/۹۱ درصد، $dhfr_v$ ۳۱/۳۲ درصد، $dhfr_{Ar}$ ۲۶/۵ درصد، aac(3) −1 ۲۵/۶۶درصد، $aad_A$ ۲۲/۸۹ درصد، flor ۲۸/۹۱ درصد، $sul_1$ ۳۳/۳۱ درصد و $qnr_A$ ۱۲/۳۰ درصد بود. ژن‌های $bla_{TEM}$،$bla_{SHV}$،$bla_{CTX}$،$bla_{OXA}$ در هیچ‌کدام از نمونه‌ها مثبت نبود. در این بررسی مشخص شد که ۴۰ تا ۹۰درصد همهٔ جدایه‌ها به یک یا چند پادزیست مقاوم بودند. بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به پادزیست تتراسایکلین (۹۵/۸۱درصد)، سولفامتوکسازول (۶۰/۲۴درصد)، کلرامفنیکل (۴۰/۹۶درصد) و تریمتوپریم (۴۰/۱۴ درصد) بود. بسیاری از جدایه‌ها (از ۴۰/۹۶ درصد تا ۹۵ درصد) به پادزیست‌های تریمتوپریم، کلرامفنیکل، سولفامتوکسازول، انروفلوکساسین، جنتامایسین، سفالوتین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاوم بودند. در این بررسی همچنین مشخص شد که بروز مقاومت پادزیستی به دلیل حضور ژن‌های مقاومت است.

در نتایج بیشتر بررسی‌های انجام‌شده در نقاط مختلف جهان، اشریشیاکلی یکی از باکتری‌های کومنسال روده معرفی‌شده که می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های گوارشی و خارج گوارشی در طیور شود. از سوی دیگر مصرف بی‌رویهٔ پادزیست‌ها باعث ایجاد مقاومت دارویی و افزایش روزافزون بیماری کلی‌باسیلوز شده است (Barnes *et al*., 2008). بر پایهٔ نتایج بررسی‌های انجام‌شده امکان دارد ژن‌های حدت و مقاومت پادزیستی به‌صورت افقی در بین سویه‌های اشریشیاکلی منتقل شوند و درنهایت منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی بین سویه‌های APEC از نظر حدت و مقاومت پادزیستی می‌شود، گرچه افزون بر انتقال افقی، پدیدهٔ جهش هم در ایجاد این تنوع ژنتیکی دخالت دارد (Fankhauser *et al*., 2011). بر پایهٔ نتایج این تحقیق بیشترین ژن‌های موجود در جدایه‌های اشریشیاکلی $tet_A$ و $tet_B$ بوده که این مسئله با نتایج بیشتر بررسی‌های صورت گرفته همخوانی داشته است.

www.SID.ir

Archive of SID



بررسی که توسط Ramazanzadeh *et al.* (2010) روی برش‌های فریزشدهٔ بافت‌های طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز به روش ایمونو فلورسانس انجام شد نشان می‌دهد، برخی از ژن‌های مقاومت پادزیستی در این جدایه‌ها وجود داشته و بیشترین موارد مربوط به $tet_A$ است. بنابر بررسی‌های صورت گرفته مشخص شد، مشخصهٔ ویژه‌ای که می‌توان برای سویه‌های APEC قائل شد، حضور ژن‌های حدت و مقاومت پادزیستی در این باکتری‌هاست که چنین ژن‌هایی را در سویه‌های غیربیماری‌زا را نمی‌توان مشاهده کرد یا حداقل فراوانی آن ژن‌ها خیلی کمتر است (McPeak *et al.*, 2005).

نتایج بیشتر بررسی‌هایی که در نقاط مختلف جهان صورت گرفته نشان می‌دهد، به دلیل مصرف خودسرانه و بی‌رویهٔ داروها، بیشتر ژن‌های مربوط به مقاومت پادزیستی در جدایه‌های اشریشیاکلی وجود دارند. در بررسی که درزمینهٔ تعیین حساسیت پادزیستی روی جدایه‌های کلی‌باسیلوزی صورت گرفت، مشاهده شد که بیشترین مقاومت پادزیستی نسبت به تتراسایکلین است به علت آنکه مرغداران در طول دورهٔ پرورش خودسرانه این دارو را به مدت‌های طولانی به جیرهٔ طیور اضافه می‌کنند، که این مسئله در بررسی اخیر نیز تأیید شد (Murray *et al.*, C2014). نتایج بررسی در سال ۲۰۱۰ نشان داد، از ۱۸۲ جدایهٔ اشریشیاکلی ۴۰/۲۳ درصد ژن $qnr_S$ داشتند (Johnson *et al.*, 2013) در بررسی که در دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال۲۰۱۷ روی صد جدایهٔ ایکولای صورت گرفت، ۵۳ جدایه ژن $tet_A$ داشتند و هیچ‌کدام ژن $bla_{TEM}$ را نداشتند (Ghanbarpour *et al.*, 2017). دانشمندان ژاپنی در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند، ۲۸/۸ درصد از سویه‌های APEC کلی‌باسیلوز ژن aac(3)-1 را دارند (Suwanich *et al.*, 2009). نتایج بیشتر بررسی‌هایی که در نقاط مختلف جهان صورت گرفته، نشان می‌دهد، به دلیل مصرف خودسرانه و بی‌رویهٔ داروها، بیشتر ژن‌های مربوط به مقاومت پادزیستی در جدایه‌های اشریشیاکلی وجود دارند در بررسی که در سال ۲۰۱۶ در ژاپن صورت گرفت، نشان داده شد ژن $tet_B$ در ۵۷/۳۳ درصد جدایه‌های اشریشیاکلی وجود دارد (Sader *et al.*, 2016). در نتایج بررسی‌های همسان دیگر فراوانی ژن‌های $tet_A$ و $tet_B$ بین ۲۳ تا ۶۵ درصد نیز گزارش شد (Suwanich *et al.*, 2005). و این گزارش‌ها همانند این بررسی نشان‌دهندهٔ این است که بیشترین مقاومت پادزیستی نسبت به این ژن‌ها وجود دارد. در بررسی که در کشور کانادا صورت گرفت، نشان داده شد که در آزمون تعیین حساسیت پادزیستی بیشتر جدایه‌ها دست‌کم به یک یا دو پادزیست مقاوم بودند و این مسئله، مؤید نتایج این بررسی است (Van Bost *et al.*,2016) نتایج بررسی گسترده در سال ۲۰۰۶ در ژاپن روی جدایه‌های سلولیت و کلی‌باسیلوز طیور گوشتی نشان داد، بیشتر ژن‌های مقاومت پادزیستی از جمله tet، qnr و $FLO_R$ در جدایه‌ها مثبت بوده و بیشترین مقاومت پادزیستی مربوط به ژن $tet_A$ و کمترین آن‌ها مربوط به ژن $bla_{CTR}$ بوده که این نتایج تا حدود زیادی در این بررسی نیز تأیید شده است (Murakamin *et al.*, 2006). برخی از محققان برای سویه‌هایی از APEC که احتمال بیماری‌زایی برای انسان را دارند اهمیت بیماری‌های مشترک انسان و دام (زئونوتیکی) قائل‌اند، به‌طوری‌که در سال‌های اخیر سویهٔ $O_{157}:H_7$ اشریشیاکلی به‌عنوان بیمارگر (پاتوژن) مهم مشترک بین انسان و دام مطرح شده که از طریق غذا به انسان منتقل می‌شود (Ragion *et al.*, 2009).

هم‌اکنون با توجه به مصرف خودسرانهٔ پادزیست‌ها و افزایش روزافزون بیماری‌های ناشی از اشریشیاکلی به‌نظر می‌رسد که توجه به نتایج آزمایش حساسیت دارویی می‌تواند راهگشای انتخاب مسیر درمانی مناسب باشد. نکته‌ای که هنوز در مورد کسب ژن حدت بی‌پاسخ مانده است اینکه آیا تنها دریافت ژن حدت قابلیت بیماری‌زایی و حدت را در باکتری دریافت‌کننده افزایش می‌دهد یا افزون بر دریافت ژن حدت و مقاومت دیگر عامل‌های زمینه‌ای نیز در مورد این ژن‌ها مؤثرند.

## نتیجه‌گیری

نکته‌ای که هنوز در مورد کسب ژن حدت بی‌پاسخ مانده است اینکه آیا تنها دریافت ژن حدت قابلیت

www.SID.ir

Archive of SID



بیماری‌زایی و حدت را در باکتری دریافت‌کننده افزایش می‌دهد یا افزون بر دریافت ژن حدت و مقاومت دیگر عامل‌های زمینه‌ای نیز در مورد این ژن‌ها مؤثرند. شیوع کلی باسیلوز طیور با وجود درمان پادزیستی ارتباط زیادی با مسائل مدیریتی و بهداشتی دارد که از حیطهٔ بحث این مقاله خارج است، اما قسمتی از این موضوع ارتباط با توانایی‌های باکتری در بقاء و بروز بیماری‌زایی در طیور دارد. نظر به افزایش روزافزون بیماری‌های ناشی از اشریشیاکلی در جهان و از جمله ایران به نظر می‌رسد که توجه به مسئله تعیین حساسیت پادزیستی در مقطع کنونی می‌تواند راهگشای انتخاب مسیر درمانی مناسبی باشد. با توجه به اینکه بسیاری از عامل‌ها وجود دارند که در ارتباط با ژن‌های حدت و مقاومت پادزیستی بوده و نه‌تنها در این بررسی بلکه در دیگر تحقیقات هم ارزیابی نشده یا به‌کل شناخته‌شده نیستند، لذا برای شناخت بیشتر سازوکارهای بیماری‌زایی و مقاومت پادزیستی، بررسی‌های بیشتری نیاز است که اهمیت بیماری کلی‌باسیلوز را در طیور مشخص کند.

## سپاسگزاری

از استاد محترم جناب آقای دکتر محمد مرادی شهربابک که در تهیه و تدوین این نوشتار همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES


1. Ahsani, M. R., Bafti, M. S., Esmailizadeh, A. K. & Mohammadabadi, M. R. (2011). Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research*, 95(1), 65-69.
2. Ahsani, M. R., Mohammadabadi, M. R. & Shamsaddini, M. B. (2010). *Clostridium perfringens* isolate typing by multiplex PCR. Journal of *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(4), 573-578.
3. Barnes, H. J., Nolan, L. K. & Vailan Court, J. P. (2008). *Colibacillosis*. In: Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E.: *Diseases of Poultry*. 12th Ed., Blackwell publishing, chapter 18, 691-738.
4. Dho, M. & Lafont, J. P. (2009). Adhesive properties and iron uptake abilities in E. coli lethal and non-lethal for chicks. *Avian Diseases*, 28, 1116-1125.
5. 5-Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Bouguenec C. Le. & Denamur, E. (2004a). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*, 21, 1085-1094.
6. 6-Ghanbarpour, R. (2017). Genetipicanalysis of virulence genes antimicrobial profile of diarrrea agenic *Escherichia coli* isolaited from disease poultray in Iran tropanima healtprod. *Dol* 10. 1007/s 11250-017-1234-7.
7. Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H. & Denamur, E. (2011). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*, 10, 2484-2496.
8. Fankhauser, C., Schrenzel, J., Prendki, V., Ris, F., Schiffer, E., Gastmeier, P. & Harbarth, S. (2015). Prevalence of extended-spectrum betalactamase producing–*Enterobacteriaceae* (ESBL-E) carriage on admission at Geneva University Hospitals (HUG). *Antimicrob Resist Infect Control*, 4(1), 120.
9. Facklam, R. R., Carvalho, M. & Teixeira, L. M. (2012). History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of *enterococci*. *Washington DC: ASM Science*, 1-54.
10. Hadizadeh, M. R., Mohammadabadi, A., Niazi, A. K., Esmailizadeh Koshkoiyeh, Y., Mehdizadeh Gazooei, Y. & Molaei, S. (2013). Use of bioinformatics tools to study *exon 2 of GDF9* gene in Tali and Beetal goats. *Modern Genetics Journal* (MGJ), 8(334), 283-288.
11. Hadizadeh, M., Niazi, A., Mohammad Abadi, M., Esmailizadeh, A. & Mehdizadeh Gazooei, Y. (2014). Bioinformatics analysis of the *BMP15 exon 2 in Tali and Beetal* goats. *Modern Genetics*, 9(1), 117-120
12. Jeffrey, J. S., Nolan, L. K., Tonooka, K. H. & *et al*. (2012). Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or *colisepticemia* lesions in chickens. *Avian Diseases*, 46, 48-52
13. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., Jimenez, M. T., de Anta, H. & Vila, J. (2013). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, *pyelonephritis*, or *prostatitis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 191, 46-50.
14. Kawano, M., Yaguchi, K. & Osawa, R. (2016). Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol Immunol*, 51, 961-966.


www.SID.ir

Archive of SID




15. McPeak, S. J. W., Smyth, J. A. &Ball, H. J. (2005). Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with *colisepticaemia* compared to fecal isolates from healthy bird. *Veterinary Microbiology*, 110,245-253.
16. Moazeni, S., Mohammd Adabadi, M. R., Sadeghi, M., Moradi Shahrbabak, H., Koshkoieh, A. & Bordbar, F. (2016a). Association between *UCP Gene Polymorphisms and Growth*, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open Journal of Animal Sciences*, 6(1), 1-8.
17. Moazeni, S. M., Mohammadabadi, M. R., Sadeghi, M., Moradi Shahrbabak, H. & Esmailizadeh, A. K. (2016). Association of the *melanocortin-3 (MC3R) receptor gene* with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4(2), 51-56.
18. Mohammadabadi, M. R., Nikbakhti, M., Mirzaee, H. R., Shandi, A., Saghi, D. A., Romanov, M. N. & Moiseyeva, I. G. (2010). *Genetic variability* in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46(4), 505-509.
19. Mohammadifar, A. & Mohammadabadi, M. R. (2017). The Effect of Uncoupling *Protein Polymorphisms* on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(4), 679-685.
20. Murakamin, M., Kwaga, J. K., White, D. G. & *et al*. (2006). Escherichia coli cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun*, 64, 3118-3126.
21. Murray, C., Ratcliff, R., Cameron, P. & Dixon, S. (2014). The resistance of antimicrobial agents in *salmonella* from veterinary sources in Australia from 1995-2011. *Australian Veterinary*, 63(9), 286-291.
22. Murray, P. R., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. & Rosenthal Ken, S. (2010). *Medical Microbiolog* (2nd Ed.). International Edition, 227-232.
23. Ragion, R. M., Sayers, A. R. & Woodward, M. J. (2009). The role of fimbriae and flagella in the in clonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78: K80 in the day-old chick model. *Epidemiology and Infection*, 124, 351-363.
24. Ramazanzadeh, R., Farhadifar, F. & Mansouri, M. (2010). Etiology and antibiotic resistance pattern of community-acquired extended-*spectrum beta-lactamas*-producing gram negative isolates in Sanandaj. *Research Journal of Medical Sciences*, 4, 243-7.
25. Sader, H. S. (2016). Antimicrobial activity of tetracycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 52(3), 203-8.
26. Shahdadnejad, N., Mohammadabadi, M. R. & Shamsadini, M. (2016). Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using *Multiplex PCR. Genetics in the 3rd millennium*, 14(4).
27. Stordeur, P., Bree, A., Mainil, J. & Moulin-Schouleur, M. (2007). Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions. *Microbes Infect*, 6, 637-645.
28. Suwanich Kul, A., Paningrahy, B. & Wagner, M. (2009). Antigen relateness and partial amino acid sequence of pili of *Escherichia coli* serotype $O_1$, $O_2$ and $O_{78}$ pathogenic to poultry. *Avian Diseases*, 31, 809-813.
29. Van Bost, S., Jacquemin, E., Oswald, E. & Mainil, J. (2016). Multiplex PCRs for indentification of necrotoxigenic *Escherichia coli. Clinical Microbiology*, 41(9), 4480-4482.
30. Zandi, E., Mohammadabadi, M. R., Ezzatkhah, M. & Esmailizadeh, A. K. (2014). Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4, 509-514.
31. West, B. & Zhou, B. X. (1989). Did Chicken go North? New Evidence for Domestication, *World's Poultry Science Journal*, 45, 205-218.


www.SID.ir