DOI:10.22092/VJ.2020.351836.1766 شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

# پاتوتایپینگ و ارزیابی الگوی مقاومت چندآنتی بیوتیکی دراشریشیاکلی های جدا شده از مراکز فروش گوشت مرغ شهرشیراز

• ماندانا باصري
گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
• عباسعلی رضائیان (نویسنده مسئول)
گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۶-۲۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۹-۲۶

Email: Rezaeianfon45@gmail.com

## چکیده

باکترياشريشياكلي يکی از مهم‌ترين اعضاء خانواده انتروباکترياسه محسوب شده و عامل کلی‌باسیلوز در پرندگان، و به دنبال آن ناراحتی گوارشی در انسان است. هدف از این پژوهش، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پاتوتایپینگ اشریشیاکلی‌های جدا شده از مراکز فروش گوشت مرغ در شهر شیراز بوده است. در این مطالعه مقطعي-توصيفي از کلوآک ۱۸۳ مرغ عرضه شده در فروشگاه‌هاي گوشت مرغ، نمونه گرفته شد. پس از تشخيص فنوتيپي، براي تاييد ژنوتيپی از پرايمر 16S rRNAاستفاده شد. برای جدایه‌های اشریشیاکلي با استفاده از روش انتشار دیسك و بر اساس جداول استاندارد CLSI تست‌آنتي‌بيوگرام گذاشته شد. سپس با استفاده از آزمون PCR و پرايمرهاي اختصاصي ژن‌های *stx* ، *eae*، *aatA*،*LT* ، *ipaH* پاتوتايپ‌هاي مختلف از يکديگر جدا شدند. با استفاده از تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، ۱۰۰ نمونه اشريشياكلي (۵۵٪) جدا گرديد. فراوانی پاتوتايپ‌های EPEC، ETEC، EIEC، EHEC و EAEC به ترتيب ۳۴٪، ۲۶٪، ۲۳٪، ۱۰٪ و ۷٪ مشاهده شد. تست آنتي‌بيوگرام جدايه‌های اشريشياكلی نشان داد که بيشترين مقاومت آنتي‌بيوتيكي مربوط به تتراسيكلين (۸۳٪) و کمترين مقاومت در تمام پاتوتايپ‌ها مربوط به جنتامايسين (۱۰٪) بوده است. همچنين بررسي الگوي مقاومت چندگانه نشان داد که پاتوتايپ ETEC با ۹۶٪ بالاترين مقاومت چندگانه را داشته است. نتايج اين پژوهش موید انتقال پاتوتايپ‌های مختلف اشريشياكلی از حيوانات مزرعه به انسان است. لذا تشخيص و درمان صحيح و به موقع می‌تواند از شيوع و گسترش آن‌ها در سطح جامعه جلوگيری نمايد.

کلمات کلیدی: پاتوتايپينگ، اشريشياكلی، مقاومت چند آنتي‌بيوتيكی، گوشت مرغ

● Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 103-111

**Pathotyping and evaluation of multidrug resistancepattern in E.coli strains isolated from chicken meat retail stores in Shiraz**

*By:Baseri, M., Rezaeian, A.A., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.*

**Received:2020-09-12 Accepted: 2020-12-16**

Email: Rezaeianfon45@gmail.com

Escherichia coli is one of the most important members of the Enterobacteriaceae family and is a factor in causing generalized bacillosis in birds, followed by gastrointestinal upset in humans. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance and pathotyping of Escherichia coli isolated from chicken meat stores in Shiraz. In this cross-sectional descriptive study, the rectum of 183 chickens offered in chicken meat shops was sampled. After phenotypic diagnosis, 16S rRNA specific primers were used for genotypic confirmation. Antibiogram test was performed for Escherichia coli samples by using disk diffusion method based on CLSI standard tables.Then, with PCR test and using specific primers of *eae*, *LT*, *aatA*, *ipaH*, *stx* genes, different pathotypes were isolated from each other. Using phenotypic and genotypic tests, 100(55%) Escherichia coli samples were isolated. The frequencies of isolated pathotypes were EPEC (34%), ETEC (26%), EIEC (23%), EHEC (10%) and EAEC (7%), respectively. Antibiogram testing of Escherichia coli isolates showed that the highest antibiotic resistance was related to tetracycline (83%) and the lowest resistance in all pathotypes was related to gentamicin (10%). Also, the study of multiple resistance patterns showed that ETEC pathotype had the highest multiple drug resistance with 96%. The results of this study confirmed the transmission of various Escherichia coli pathotypes from farm animals to humans. Therefore, correct and timely diagnosis and treatment can prevent their spread in the community.

**Key words:** Pathotyping, Escherichia coli, MDR, Chicken meat

## مقدمه

اشریشیاکلی باسیلی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، بدون اسپور و متحرک است که جزء فلور طبیعی روده پستانداران و پرندگان محسوب می‌شود (۱۱). این باکتری باعث ایجاد کلی باسیلوزیس در جوجه‌های گوشتی، ماکیان و بوقلمون‌ها شده و در شدیدترین حالت باعث ایجاد سپتی‌سمی می‌شود (۲۰). به‌طوریکه ۵ تا ۵۰٪ از مرگ و میر در طیور ناشی از این بیماری است (۲۲). اشریشیاکلی با ماندگاری بالا در شرایط نامساعد می‌تواند از طریق تماس با مدفوع دفع شده‌ی پرندگان به انسان‌ها منتقل شود و بیماری را افزایش دهد (۱۶). سویه‌های بیماری‌زای این باکتری در انسان به ۶ پاتوتایپ تقسیم می‌شوند: ۱- اشریشیاکلی‌توکسیژنیک (ETEC): پاتوتیپ‌های ETEC توسط پیلی به ابتدای روده‌ی باریک متصل می‌شوند و قابلیت تولید یک یا هر دو نوع انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) یا مقاوم به حرارت (ST) را دارند و مهم‌ترین عامل ایجادکننده‌ی اسهال عفونی در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال و مسافران هستند (۱۰). ۲- اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC) و ۳- اشریشیاکلی‌با چسبندگی پراکنده (DAEC): این پاتوتیپ‌ها با آسیب به اپی‌تلیوم روده‌ی کوچک میزبان به سلول‌هاي روده متصل می‌شود و به واسطه ی ژن کروموزومی *eae* باعث ایجاد زخم هیستوپاتولوژیکی شده و باعث از دست رفتن آب و مرگ سلول می‌شود. این سویه عامل اسهال در کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۱۹). ۴- اشریشیاکلی انتراگریگیتیو (EAEC): پاتوتیپ‌های EAEC دارای ژن‌های بیماری‌زایی از جمله *aatA* هستند. این ژن مولد یک پروتئین غشایی است که در جابه‌جایی پروتئین‌های بیماری‌زا ضروری است (۱۴). ۵- اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC): مولد سم شیگا هستند به همین علت به آن‌ها اشریشیاکلی مولد سم شیگا (STEC) نیز می‌گویند. شیگاتوکسین‌های اشریشیاکلیاز دو ژن *Stx1* و *Stx2* منشاء می‌گیرند و در بیماری‌زایی باکتری تاثیرگذار هستند. این پاتوتیپ از عوامل اسهال ناشی از آلودگی آب و مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۷). ۶- اشریشیاکلی مهاجم روده‌ای (EIEC): از نظر خصوصیات ظاهری و بیماری‌زایی شبیه شیگلا هستند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی‌می شوند. ژن *ipaH* یا آنتی‌ژن تهاجمی پلاسمیدی تنها برروی کروموزوم و پلاسمید بیماري‌زايي سویه‌های EIEC قرار گرفته و در شناسایی این سویه اختصاصی هستند (۶). براي درمان بیماري‌های ناشی از اشریشیاکلی‌در پرندگان و انسان‌ها از آنتی‌بیوتیك‌هایی نظیر کلرامفنیکل، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، آمپي‌سلین و سولفانامیدها استفاده می‌شود (۵). اما استفاده از آنتی‌بیوتیك‌ها خالی از اشکال نیست و احتمال بروز

سویه‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug resistance or MDR) و انتقال ژن‌های مقاومت آنتي‌بیوتیکی را افزایش می‌دهد (۱۳). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی انتقال پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی‌از طریق عرضه‌ی طیور گوشتی و بررسي الگوهای مقاومت چند آنتي‌بیوتیکی بوده است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در یک مطالعه مقطعی- توصیفی (خرداد تا شهریور ماه ۱۳۹۸)، از کلوآک ۱۸۳ لاشه‌ی مرغ‌هاي بسته‌بندي شده‌ي موجود در ۷ مرکز فروش گوشت مرغ شهر شیراز به طور کاملا تصادفی، به وسیله‌ی سواپ استریل نمونه گرفته‌شد.

### جداسازی اشریشیاکلی

به منظور افزایش در تعداد باکتری و بالا بردن شانس جداسازی، نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط نوترینت براث (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس برای بررسی حضور اشریشیاکلی، نمونه‌ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های دارای جلای فلزی و مشکوک به اشریشیاکلی جداسازی شدند.

### بررسی فنوتیپی

جنس و گونه باکتری اشریشیاکلي بر اساس آزمون های TSI, Citrate, SIM, Urea, MR, VP, LD, OD (ساخت شرکت مرک آلمان) مورد تایید قرار گرفت (۵).

### استخراج DNA باکتری

تعداد دو تا سه کلنی از محیط کشت ۲۴ ساعته هر جدایه به ۱ µl ۲۰۰ آب مقطر استریل اضافه و پس از ورتکس، در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ min قرار داده شد. سپس به‌مدت ۵ min دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژو بعد فازرویی که محتوی DNA بود جمع‌آوری گردید. پس از تأیید درجه خلوص DNA بوسیله دستگاه نانودراپ (شرکت Peqlab آلمان)، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمون PCR نگهداری شدند (۱,۷).

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

پس از انجام تست‌های فنوتیپی، برای تایید جنس و گونه نمونه‌های

جدول ۱ - پرایمرها و برنامه دمایی مورد استفاده.

| ژن | پرایمر | واسرشت اولیه | واسرشت | اتصال | گسترش | گسترش نهایی | تعداد چرخه | طول قطعه |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *16S rRNA* | ´5 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´<br>´5 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC3´ | min۳ ،۹۴ °c | Sec۴۰ ،۹۴ °c | Sec۳۰ ، ۵۵ °c | min۱ ،۷۲ °c | min۱۰،۷۲°c | ۳۰ | bp۹۳۲ |
| *eae* | ´5 CTGAACGGCGATTACGCGAA3´<br>´5 CCAGACGATACGATGCAG3´ | min۵ ،۹۵ °c | Sec۴۰ ،۹۵ °c | min۳ ، ۵۸ °c | min۲ ،۷۲ °c | min۷ ،۷۲ °c | ۴۰ | bp۹۱۷ |
| *Stx* | ´5 GAGCGAAATAATTTATATGTG3´<br>'5 TGATGATGGCAATTCAGTAT3´ | min۵ ، ۹۵ °c | min۱ ،۹۵ °c | min۱ ، ۵۰ °c | min۱ ،۷۲ °c | min۷ ،۷۲ °c | ۴۰ | bp۵۱۸ |
| *elt* | ´5 GGCGACAGATTATACCGTGC3´<br>´5 CGGTCTCTATATTCCCTGTT3´ | min۵ ، ۹۵ °c | Sec۴۵ ،۹۵ °c | min۱ ، ۵۰ °c | min۱ ،۷۲ °c | min۷ ،۷۲ °c | ۴۰ | bp۴۴۰ |
| *aatA* | ´5 CTGGCGAAAGACTGTATCAT3´<br>´5 AAATGTATAGAAATCCGCTGTT3´ | min۲ ، ۹۵ °c | Sec۵۰ ،۹۴ °c | Sec۹۰ ، ۵۷ °c | Sec۹۰،۷۲ °c | min۱۰،۷۲°c | ۳۵ | bp۶۳۰ |
| *ipaH* | ´5 GAAAACCCCCTGGTCCATCAGG3´<br>´5 GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3´ | Sec۳۰ ، ۹۸ °c | Sec۱۰ ،۹۸ °c | min۱ ،۶۲/۵ °c | Sec۹۰،۷۲ °c | min۱۰،۷۲°c | ۳۵ | bp۴۳۷ |

جمع‌آوری شده و نیز پاتوتایپینگ، از Simple PCR (شرکت اپندورف آلمان) به حجم نهایی ۱۲/۵ µl شامل:۶/۲۵ µl مسترمیکس شرکت سیناژن، ۱/۲۵ µl از هر کدام از پرایمرها به غلظت ۱۰ pmol، ۱ µl از DNA الگو و ۲/۷۵ µl آب مقطر استریل استفاده گردید. به همین منظور از پرایمر 16S rRNA و از سویه استاندارد ATCC:25922 جهت تعیین جنس باکتری و از پرایمرهای اختصاصی و دستورالعمل دمایی جدول ۱ جهت شناسایی پاتوتایپ‌ها استفاده شد. برای شناسایی پاتوتایپ‌های EPEC از ژن *eae* با تشکیل باند ۹۱۷bp ، ETEC از ژن *elt* با تشکیل باند ۴۴۰ bp، EIEC از ژن *ipaH* با تشکیل باند ۴۳۷ bp، EAEC از ژن *aatA* با تشکیل باند ۶۳۰bp و EHEC از ژن *stx* با تشکیل باند ۵۲۱-۵۱۸bp استفاده شد. در پایان، برای الکتروفورز و مشاهده باندهای محصولات واکنش PCR، از مارکر ۱۰۰bp، ژل آگارز ۲-۱٪ و ولتاژ ۹۵ به مدت ۵۰ min استفاده شد (۲،۳،۶،۲۵).

## تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی-بوئر) و براساس جداول استاندارد CLSI ۲۰۱۸، حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، سفپیم، آزیترومایسین، جنتامایسین، سفوتاکسیم، آمیکاسین، کلرامفنیکل، آموکسی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، آمپی‌سیلین و ایمی‌پنم (شرکت اندیشه آزما)، در قالب ۸ کلاس آنتی‌بیوتیکی ارزیابی شدند (۸).

## آنالیز آماري

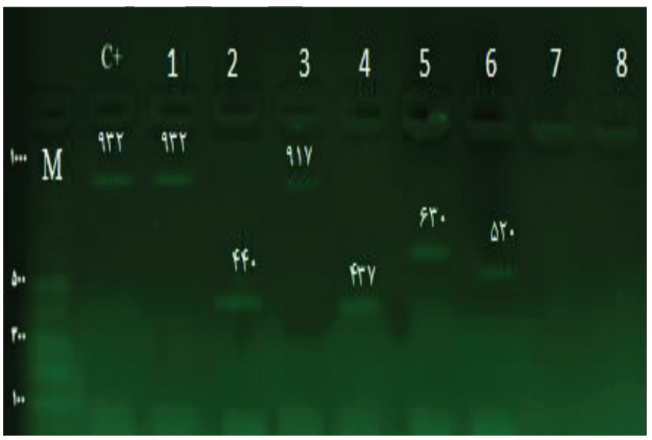
با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و Whonet 5.6 تمام داده‌هاي بدست آمده مورد ارزيابي آماري قرار گرفتند.

## نتایج

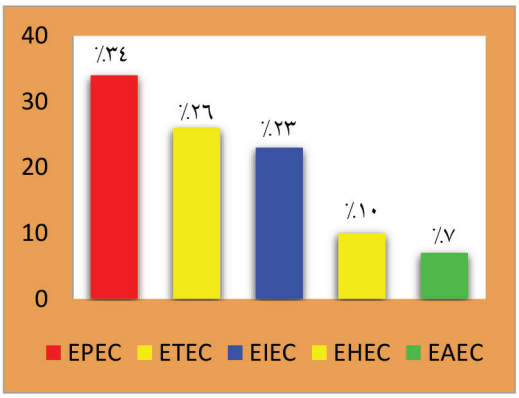
از ۱۸۳ نمونه جمع‌آوري شده از مراکز فروش گوشت مرغ در شهر شیراز، پس از انجام تست‌هاي فنوتيپي و ژنوتيپي كه برمبناي 16S rRNA با باند bp ۹۳۲ انجام شد (شکل۱)، تعداد ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی جداسازي گرديد. پس از انجام تست PCR (شکل۱) ، نتايج بدست آمده نشان داد كه پاتوتايپ EPEG بيشترين فراواني را در بين ساير پاتوتايپ‌ها داشته است (شكل ۲) طبق نتايج مندرج در شكل ۳ بيشترين ميزان مقاومت آنتي‌بيوتيكي نسبت به تتراسايكلين (۸۷٪)، وكمترين ميزان مقاومت به جنتامايسين (۱۰٪) بوده‌است. بالاترين درصد مقاومت همزمان به هر ۱۲ آنتی‌بیوتیک در پاتوتايپ EAEC (۲۹٪) و كمترين درصد مقاومت در پاتوتايپ EHEC (۱۰٪) ديده شد. سويه‌هايي كه به بيش از سه كلاس آنتي‌بيوتيكي مقاومت نشان دهند، جزء سويه‌هاي داراي مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) محسوب مي‌شوند. در اين پژوهش از ۱۲ آنتي‌بيوتيك در قالب هشت كلاس آنتي‌بيوتيكي استفاده شده است. پس از آنالیز سويه‌هاي مقاوم مشخص گرديد كه، ۹۳٪ جدايه‌هاي اشريشياكلي جز گروه MDR بوده‌اند. همچنين پس از تفكيك پاتوتيپ‌ها، بيشترين و كمترين درصد MDR به ترتيب مربوط به تايپ‌هاي ETEC (۹۶٪)، EPEG (۹۱٪) ، EHEC (۹۰٪)، EAEC (۸۶٪) و EIEC (۸۳٪) بوده است. همانگونه كه در جدول ۲ ديده مي‌شود الگوي مقاومت آنتي‌بيوتيكي در بين جدايه‌هاي اشريشياكلي بسيار متنوع بوده است. بطور مثال، ۱۴ سويه به ۱۱ آنتي‌بيوتيك مقاومت نشان داده‌اند. ولي مقاومت به ۱۱ آنتي‌بيوتيك با شش الگوي متفاوت رخ داده است و همين موضوع مي‌تواند روند درمان عفونت‌هاي طيور را با مشكل روبرو كند.

## بحث

پرندگان مختلف با حضور گسترده در محيط پيرامون ما همواره به عنوان يک عامل مهم در پخش عوامل بيماري‌زا شناخته مي‌شوند (۳). باکتری اشریشیاکلیيکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی از جمله گوشت طیور است (۱۷). در این مطالعه مقاومت آنتي‌بيوتيكی چندگانه و پاتوتايپينگ به ترتيب به روش هاي فنوتيپی و ژنوتيپی بر روی ۱۰۰ باکتري اشريشياكلی جدا شده از كلوآك لاشه‌هاي مرغ انجام شد.

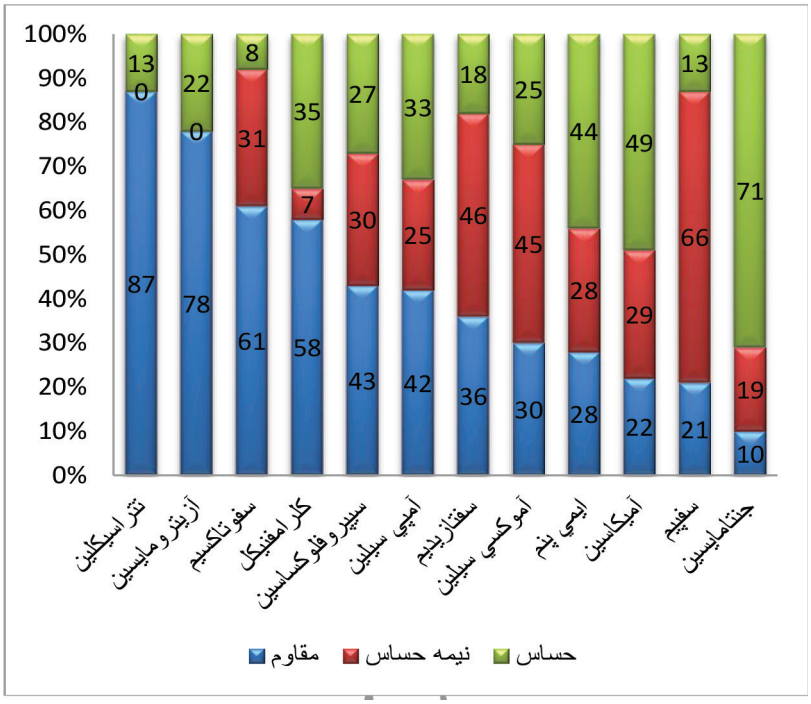



شکل۱- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز مربوط به تایپینگ جدایه هاي اشریشیاکلي . M : مارکر، C : کنترل مثبت ، ۱: 16S rRNA ، ۲: ETEC ، ۳: EPEG ، ۴: EIEC ، ۵: EAEG ، ۶: EHEC.




شکل ۲ - درصد فراواني پاتوتيپ هاي جدا شده.

اسدي و همکاران در سال ۱۳۹۶ با مطالعه بر روی۱۰۰ نمونه مدفوع شترمرغ به روش فنوتیپی و ژنوتیپی مشخص نمودند که ۴٪ جدایه‌ها مربوط به اشریشیاکلي بوده‌است (۴). در مطالعه حاضر از ۱۸۳ نمونه گرفته شده، (۵۵٪) ۱۰۰ مورد اشریشیاکلی جدا گردید که به مراتب از درصد بالاتری برخوردار بوده است. اشریشیاکلی مهم‌ترین عضو خانواده انتروباکتریاسه است که سویه‌های بیماري‌زای این باکتری بر طبق مشخصات بیماری‌زایی و یافته‌های اپیدمیولوژیک در انسان به شش گروه تقسیم مي‌شوند (۱). در مطالعه‌ی پیش رو پاتوتایپ‌های مختلف باکتری اشریشیاکلی به ترتیب (۳۴٪) EPEC، (۲۶٪) ETEC، (۲۳٪) EIEC و (۱۰٪) EHEC و (۷٪)EAEC تشخیص داده شد که نشان از پراکندگی و فراوانی زیاد نژادهای اشریشیاکلی دارد. میشل و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از روش‌های ژنوتیپی توانستند با نمونه‌گیري از ۱۲۴ مرغ، ۷۷ مورد EPEC و ۴۷ مورد ETEC جداسازی کنند (۲۲). در سال ۲۰۱۶ منته و همکاران از بین ۶۶ نمونه جدا شده از پرندگان، (۷۴٪) ۴۹ سویه اشریشیاکلی را جداسازی نمودند که (۵۶٪) ۳۷ مورد آن به دلیل داشتن ژن *stx*، پاتوتایپ EHEC تشخیص داده شد (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر کانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از ژن‌های اختصاصی *stx* و *elt* و به کمک روش PCR توانستند از میان ۱۶۳ نمونه گرفته شده از پرندگان، ۱۰۱ سویه اشریشیاکلی را جداسازی نمایند (۱۵). محمد و همکاران در سال ۲۰۱۷ با استفاده از ژن‌های اختصاصی *elt*، *stx*، *eae* و *ipaH* توانستند ۹۲ سویه‌ی APEC را از ۳۶ جوجه گوشتی جداسازی کنند (۲۳). در آزمایش حاضر نیز با استفاده از ژن‌هاي *ipaH*، *aatA*، *elt*، *stx*، *eae* و به کارگیري روش PCR دقت و سرعت تفکیك به طرز چشمگیري افزایش پیدا نمود. به منظور کنترل عوارض بیماری و تلفات ناشی از آن، آنتی بیوتیك‌های مختلفی در صنعت طیور به کار مي‌رود. درمان با آنتي‌بیوتیك‌ها یکی از ابزار مهم در کاهش میزان بروز و تلفات ناشی از کلی باسیلوزیس می‌باشد. اما استفاده از آنتی‌بیوتیک نیز مضرراتی را در پی دارد. تجویز و استفاده‌ی بی‌رویه باعث بروز مقاومت آنتي‌بیوتیکی چندگانه در باکتري‌ها بخصوص در سویه‌های اشریشیاکلی شده است (۲۲). حقیقي‌خوشخو و علي‌نژاد در سال ۱۳۸۸ با مطالعه بر روی ۱۵۰ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از جوجه‌های گوشتی با استفاده از روش انتشار دیسک دریافتند که بیش از ۸۰٪ اشریشیاکلی‌های جدا شده به کلیستین، تتراسایکلین، سولفادیازین+تری متوپریم، ائروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین مقاومت داشته اند(۱۷). مطالعه حاضر با مطالعات حقیقي‌خوشخو و علي‌نژاد همخوانی دارد به طوری که بیشترین میزان مقاومت به آنتي‌بیوتیک تتراسایکلین (۸۷٪) و کمترین میزان مقاومت به جنتامایسین (۱۰٪) بدست آمد. بررسی پاتوتیپ‌های مختلف نشان داد که




شکل ۳ - درصد فراواني مقاومت و حساسیت آنتي‌بیوتیکي در بین جدایه‌هایاشریشیاکلي.

جدول ۲ - تنوع الگوي مقاومت چندآنتي‌بيوتيكي در بين جدايه‌هاي اشريشياكلي.

| آنتي‌بيوتيك | تعداد آنتي‌بيوتيك | تعداد جدايه‌هاي مقاوم به آنتي‌بيوتيك | درصد كل جدايه‌هاي مقاوم |
|---|---|---|---|
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | ۱۲ | ۱۴ | ٪۱۴ |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | ۱۱ | ۶ | ٪۱۴ |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۲ | |
| Imi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۳ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Azi, Tetra | ۱۰ | ۱ | ٪۱۱ |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۴ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Cefe, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | ۹ | ۲ | ٪۱۴ |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Tetra | | ۲ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Genta, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۵ | |
| Ampi, Cefta, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Genta, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Tetra | ۸ | ۱ | ٪۱۸ |
| Imi, Cipro, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Cefta, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cipro, Cholo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Cipro, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Amo, Cholo, Cefo, Genta, Cefe, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Cefo, Cefe, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۲ | |
| Imi, Cefta, Cipro, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۵ | |
| Imi, Cefta, Amo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Ampi, Amo, Cholo, Ami , Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Cefta, Cipro, Amo, Cholo, Cefo, Azi, Tetra | | ۱ | |

میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در EHEC به ۱۰۰٪ نیز رسیده است. پس از آنالیز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشخص گردید که، ۹۳٪ از اشریشیاکلی‌ها مورد مطالعه جز گروه MDR بوده‌اند. بیشترین و کمترین درصد سویه‌های دارای مقاومت چندگانه به ترتیب مربوط به پاتوتیپ‌های ETEC و EIEC بوده است. در پژوهش مهرانی‌فر و همکاران در سال ۱۳۹۴ با بررسی ۶۰ جدایه اشریشیاکلی درصد MDR، ۷۵٪ گزارش گردیده است (۲۱) که به نتایج مطالعه حاضر تا حدودی نزدیک است. در سال ۲۰۱۲ حسن و همکاران در بنگلادش با مطالعه بر روی ۹۶ پرنده متوجه گردیدند که ۲۲/۷٪ اشریشیاکلی‌های جدا شده جزء گروه MDR بوده‌اند (۱۲). همچنین دی‌جسوسو همکاران در سال

ادامه جدول ۲ - تنوع الگوي مقاومت چندآنتي‌بيوتيكي در بين جدايه‌هاي اشريشياكلي.

| آنتي‌بيوتيك | تعداد آنتي‌بيوتيك | تعداد جدايه‌هاي مقاوم به آنتي‌بيوتيك | درصد كل جدايه‌هاي مقاوم |
|---|---|---|---|
| Imi, Cefta, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | ۷ | ۲ | ٪۸ |
| Ampi, Cefta, Amo, Cholo, Cefo, Cefe, Tetra | | ۱ | |
| Imi, Ampi, Cefta, Cipro, Cefo, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Cefta, Cipro, Amo, Ami , Cefo, Cefe , Tetra | | ۱ | |
| Imi, Cipro, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۲ | |
| Ampi, Cipro, Cholo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Amo, Cefo, Genta, Cefe, Azi, Tetra | ۶ | ۱ | ٪۲ |
| Ampi, Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Amo, Cefo, Cefe, Azi, Tetra | ۵ | ۳ | ٪۷ |
| Imi, Cipro, Cefo, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Cefta, Cipro, Amo, Cefo, Cefe | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Amo, Cefo | | ۱ | |
| Ampi, Cefta, Cipro, Cholo, Cefe | | ۱ | |
| Cefta, Cholo, Cefo, Cefe | ۴ | ۴ | ٪۷ |
| Cefo, Cefe, Azi, Tetra | | ۱ | |
| Cefta, Amo, Cefo, Cefe | | ۱ | |
| Cefta, Cipro, Amo, Cholo | | ۱ | |
| Cholo, Azi, Tetra | ۳ | ۱ | ٪۲ |
| Ampi, Cefta, Cefe | | ۱ | |
| Ampi, Cefta | ۲ | ۱ | ٪۳ |
| Cefo, Cefe | | ۲ | |

**Imipenem=Imi , Ampicillin=Ampi , Ceftazidime=Cefta , Ciproloxacin=Cipro , Amoxicillin=Amo , Choloramphenicol=Cholo , Amikacin=Ami , Cefotaxime=Cefo , Gentamicin=Genta , Cefepime=Cefe , Azitromycin=Azi , Tetracycline=Tetra**

۲۰۱۳ از ۱۱۲ پرنده تعداد ۳۵۳ سویه اشریشیاکلی جدا نمودند که در بین آنها ۴۳سویه، جزء گروه MDR بودند (۹). با توجه به اینکه ۹۳٪ از سویه‌های مورد مطالعه‌ی این تحقیق جزء گروه MDR بوده‌اند می‌توان چنین استنباط کرد که در اثر مصرف بی‌رویه دارو در طی سال‌های اخیر مقاومت آنتي‌بیوتیکی به طرز چشمگیری افزایش پیدا کرده‌است.

## نتيجه‌گيري كلي

از آن‌جایی که یکي از مشکلات عمده در درمان عفونت‌هاي ایجاد شده توسط تایپ‌های اشریشیاکلي، مقاومت این باکتري نسبت به آنتي‌بیوتیك‌هاي مختلف است و نیزسویه‌هاي مقاوم معمولاً از مزارع به انسان منتقل مي‌شوند، جداسازي ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی که معادل ۵۵٪ نمونه‌هاي جمع‌آوري شده در این تحقیق بوده است، مي‌تواند زنگ خطري براي عفونت‌هاي روده‌اي مقاوم به درمان باشد. لذا مي‌بایست بررسي مقاومت‌هاي آنتي‌بیوتیکي بصورت دوره‌اي انجام شود. همچنین به دلیل تنوع پاتوتایپ‌هاي جداسازي شده مي‌بایست از زمان پرورش تا کشتار و سپس انتقال طیور به دست مصرف‌کننده، تمام مراحل تحت نظارت قوی بهداشتی باشد تا میزان بروز احتمالی عفونت‌های ناشی از پاتوتیپ‌های مختلف اشریشیاکلي به حداقل برسد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه ( شماره ۱۹۳۳۰۵۰۷۹۶۲۰۰۱) خانم ماندانا باصري براي اخذ درجه کارشناسي ارشد در رشته میکروبیولوژي از دانشگاه آزاد اسلامي واحد جهرم استخراج شده است. نویسندگان از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامي واحد جهرم نهایت تشکر و سپاس را دارند.

## منابع مورد استفاده

1-Abe, C., F.A. Salvador, I.N. Falsetti, M.A.M. Vieira, J.Blanco, J.E. Blanco, M.Blanco, A.M.O. Machado, W.P. Elias, R.T. Hernandes and T.A.T. Gomes.2008. UropathogenicEscherichia coli (UPEC) strainsmay carry virulenceproperties of diarrhoeagenicE. Coli. FEMS *ImmunologyandMicrobiology* 52: 397–406.

2-Akbari Nakhjavani, F., M.Emaneini, , H.Hosseini, H. Iman-Eini, M. Aligholi, F. Jabalameli, M.T.Haghi-Ashtiani, M.Taherikalaniand A.Mirsalehian. 2012. Molecular analysis of typical and atypical Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhea. *Journal of Medical Microbiology* 62: 191-195.[In Farsi]

3-Aranda, K.R.S., U.Fagundes-Netoand I.C.A.Scaletsky. 2004. Evaluation of Multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenicEscherichia coli and Shigella spp.*Journal of Clinical Microbiology*42: 5849–5853.

4-Asadi, S., N.Shamsand M.NayebAghaei. 2017. Isolation and Frequency of Escherichia coli O157:H7 from Fecal Samples ofLorestan Ostrich Farms using Culture and Multiplex PCR. *Journal of Veterinary Microbiology* 13: 97-105.[In Farsi]

5-Asadi, A., T. Zahraei-Salehiand M.Jamshidian.2018.Molecular study of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolates in broilers of Shahrbabak city by multiplex PCR.*Iranian Animal Sciences* 49: 203-211.[In Farsi]

6- Bonkoungou, I. J. O., T. Lienemann, O. Martikainen, R. Dembelé, I. Sanou, A. S. Traoré, A. Siitonen, N. Barro and K. Haukka. 2012. Diarrhoeagenic Escherichia coli detected by 16-plex PCR in children with and without diarrhoea in Burkina Faso.*Clinical Microbiology and Infectious*18:901-6.

7-Bonyadian, M., H.Moshtaghiand P.Behrozi.2017. Occurrence of verotoxigenic E.coli in cow feces and antimicrobial resistance of the isolates in cattle farms in Shahrekord area .*Journal of Microorganism Biology* 6: 84-75.[In Farsi]

8- Clarke, L., B.Cherie millarand J.E. Moore. 2003. Extraction of genomic DNA from Pseudomonas aeruginosa: a comparison of three methods.*Biomedical Science* 60:34-35.

9- De Jesus, A.A.B., A.A.R.Freitas, J.C.de Souza, N.Martins, L.A.B.Botelho, V.B.C.Girão, L.M.Teixeira, L.Woodland Rileyand B.M.Moreira. 2018. High-Level Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolates from Wild Birds in a Large Urban Environment.*Microbial Drug Resistance*25:167-172.

10-Dutta.S., S. Guin, S.Ghosh, G.P. Pazhani, K.Rajendran, M.K. Bhattacharya, Y.Takeda, G.B.Nair and T.Ramamurthy.2013. Trends in the Prevalence of Diarrheagenic Escherichiacoli among Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata,India. *PLoS ONE* 8: 1-5

11- Foxman, B. 2014. Urinary Tract Infection Syndromes Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors,
and Disease Burden.Infectious Disease Clinics of North America28:1–13.

12- Hasan,B.,L.Sandegren, A.Melhus, M.Drobni,J.Hernandez,J. Waldenström, M.Alam and B.Olsen. 2012.Antimicrobial Drug–Resistant Escherichia coli in Wild Birds and Free-range Poultry. *Emerging Infectious Diseases*18:2055-2058.

13-Hemmerum, A.M and O.E, Heuer. 2009. Human Health Hazards from Antimicrobial-ResistantEscherichia coli of Animal Origin. *Clinical Infectious Diseases*48:916-921.

14-Imuta.N, J. Nishi, K. Tokuda, R. Fujiyama, K. Manago, M. Iwashita, J.Sarantuya, and Y. Kawano.2008. The Escherichia coli Efflux Pump TolC Promotes Aggregation ofEnteroaggregative E. coli 042. *Infection and immunity*76:1247–1256.

15-Kang, H.Y., Y.S.Jeong,J.Y. Oh, S.H.Tae, C.H. Choi, D.C.Moon, W.K. Lee, Y.C. Lee, S.Y.Seol, D.T. Choand J.C. Lee. 2005.Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea.*Journal of antimicrobial Chemotherapy*55:639-44.

16-Kimpe, A., A. Decostere, A. Martel, F. Haesebrouck, and L.

A. Devriese. 2014. Prevalence of antimicrobial resistance among-pigeon isolates of Streptococcus gallolyticus ,Escherichia coli and Salmonella enterica serotypeTyphimurium. *Avian Pathology* 31: 393-397.

17- Haghighi Khoshkhoo, P. andI. Ali-Nezhad. 2010.Antibacterial Resistance Patterns of Escherichia coli Isolated from Broilers Colibacillosis of Broilers chicks in Golestan *Province.Journal of Veterinary Clinical Reasearch*1:39-47.[In Farsi]

18-Livermore,D.M.2008. Defining an extended-spectrum b-lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*
14 : 3–10.

19-Madic.J, C. Peytavin de Garam, N. Vingadassalon, E. Oswald, P. Fach, E. Jametand F. Auvray. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for thedetection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin(eae) variants associated with enterohaemorrhagicEscherichia coli (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2,O111:H8, O145:H28 and O157:H7.*Journal of Applied Microbiology*109:1696-1705

20- Monte, D.F.,A.Mem, M.R.Fernandes, L.Cerdeira, F. Esposito, J.A.Galvão, B.D.G.M.Franco, N.Lincopanand M.Landgraf. 2017. Chicken Meat as Reservoir of Colistin-Resistant Escherichia coli Carrying mcr-1 Genes in South America.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*61: 1-4.

21-Mehrani Far, Z., M.Salehiand K.Amini. 2016. Detection of bla TEM, bla OXA and bla SHV genes in Escherichia coli isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR.*Veterinary Clinical Pathology*10: 81-90.[In Farsi]

22-Mitchel, N., J.Johnson, B. Johnston, R.Curtissand M.Mellata. 2015.Zoonotic potential of Escherichia coli isolates from retail chicken meat products and eggs.*Applied and environmental microbiology*81:1177-87.

23-Mohamed, L.,Z. Ge, L.Yuehua, G.Yubin, K.Rachid, O.Mustapha, W.JunweiandO. Karine. 2018. Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) E. coli isolated from broiler chickens in Algeria.*Tropical animal health and production*50:547-553.

24-Patel, J.B., M.P.Weinstein and G.M. Eliopoulos.2018.Zone Diameter and MIC Breakpoints for Enterobacteriaceae, pp.30-37, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing in: M100 28th ed., CLSI, Pennsylvania, USA

25-Soleimanifard, N. and K.Amini. 2016. Molecular identification of EAEC and EPEC pathotypes of Escherichia coli isolated from cow's milk with mastitis by multiplex PCR and determination of antibiotic resistance by disk diffusion method and E.test method. *Journal of comparative pathobiology Iran* 13:1849-1854.