الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی جدایه‌های *Escherichia coli* از موارد کلی‌باسیلوز طیور

دکتر پیام حقیقی خوشخو[1] دکتر سید مصطفی پیغمبری[1]*

دریافت مقاله: ۱۸ فروردین ماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۷ آبان‌ماه ۱۳۸۴

هدف: تعیین میزان مقاومت به ترکیبات آنتی‌باکتریال و الگوی محتوی پلاسمیدی در جدایه‌های *Escherichia coli* از موارد کلی‌باسیلوز طیور.

طرح: بررسی توصیفی.

نمونه‌ها: تعداد ۱۵۰ جدایه *E. coli* از جراحات پریکاردیت جوجه‌های گوشتی تلف شده از بیماری کلی‌باسیلوز (با توزیع ۵ نمونه از هر مرغداری).

روش: حساسیت هر کدام از ۱۵۰ جدایه نسبت به ۲۰ ترکیب آنتی‌باکتریال تعیین گردید. همچنین محتوی پلاسمیدی تعداد ۱۰۰ جدایه *E. coli* از ۲۰ مرغداری (با توزیع ۵ نمونه از هر مرغداری) نیز مشخص شد.

نتایج: همه جدایه‌ها حساس به سفتیوفور و جنتامایسین بودند و درصد وقوع مقاومت به دیگر ۱۸ ترکیب آنتی‌باکتریال در بین جدایه‌ها به ترتیب عبارت بود از: نالیدیکسیک اسید، ۹۸/۷؛ اریترومایسین، ۹۷/۳؛ آمپی‌سیلین، ۹۶/۷؛ کلیستین، ۹۶/۷؛ تتراسیکلین، ۹۴؛ فلومکوئین، ۹۲؛ اکسی تتراسیکلین، ۹۰/۷؛ دیفلوکساسین، ۸۴؛ نیتروفورانتوئین، ۸۱/۳؛ فورازولیدون، ۷۹/۳؛ سولفامتوکسازول+تری‌متوپریم، ۷۲/۶؛ انروفلوکساسین، ۶۶؛ لینکواسپکتین، ۶۴/۷؛ نورفلوکساسین، ۵۲/۷؛ نئومایسین، ۵۲؛ کلرامفنیکل، ۴۶/۷؛ سیپروفلوکساسین، ۴۴؛ و استرپتومایسین، ۲۶/۷. نسبت به ۱۰ ترکیب آنتی‌باکتریال رایج در صنعت طیور ۸۲ الگوی مقاومت شناسایی شد که ۸۶ جدایه (۵۷/۲درصد) به بیش از یک الگو و ۶۴ جدایه (۴۲/۷درصد) هر کدام فقط به یک الگو تعلق داشتند. محتوی پلاسمیدی ۱۰۰ جدایه مورد بررسی نیز در محدوده وزن ملکولی یک تا بیش از ۶۸ Kb، ۶۲ الگو را تشکیل دادند. ۱۲ درصد جدایه‌ها نیز فاقد پلاسمید بودند.

نتیجه‌گیری: هر چند محتوی پلاسمیدی و الگوی مقاومت دارویی برای تمایز اشریشیاکلی‌های جداشده از یک مزرعه مفید بود ولیکن الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی، هیچ‌کدام به‌عنوان نشانگر *E. coli* کلی باسیلوز طیور قابل استفاده نبودند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۲، ۱۰۵-۹۷.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، کلی‌باسیلوز، مقاومت دارویی، پلاسمید، جوجه گوشتی.

Drug resistance patterns and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis

Khoshkhoo, P.H.[1], Peighambari, S.M.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Objective: Determine the antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of the *Escherichia coli* isolates from avian colibacillosis.

Design: Exploratory study.

Samples: One-hundred and fifty *Escherichia coli* isolates from broiler's pericarditis lesions (5 samples from each of 30 farms).

Procedure: Determine resistance to 20 antibacterial drugs and also determine plasmid profiles among E. coli isolates.

Results: All isolates were susceptible to ceftiofur and gentamicin. The percentages of isolates that were resistant to the other 18 antibacterial agents were as follows: nalidixic acid, 98.7; erythromycin, 97.3; ampicilin, 96.7; colistin, 96.7; tetracycline, 94; flumequine, 92; oxytetracycline, 90.7; difloxacin, 84; nitrofurantoin, 81.3; forazolidone, 79.3; sulfamethoxazol & trimethoprim, 72.6; enrofloxacin, 66; lincospectin, 64.7; norfloxacin, 52.7; neomycin, 52; chloramphenicol, 46.7; ciprofloxacin, 44; and streptomycine, 26.7. There were 82 resistance patterns among the isolates to 10 most commonly used drugs in poultry industry. Eighty-six isolates (57.2 %) belonged to more than one pattern, whereas the remaining 64 isolates (42.7%), each belonged to one pattern only. Plasmid profiles revealed 62 patterns in which molecular weights of the plasmid pecies ranged between 1- >68 Kb. No plasmid bands were found in 12 isolates.

Conclusion: Neither drug resistance pattern, nor plasmid profile could be used as a marker of avian colibacillosis E. coli but plasmid profiles and drug resistnace pattern were useful in distinguishing among isolates from the same farm. ***J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran. 60,2:97-105,2005.***

Keywords: *Escherichia coli*, Drug resistance, Plasmid profile, Colibacillosis, broilers

Corresponding author's email: mpeigam@ut.ac.ir

اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) جزء فلور طبیعی روده انسان، پستانداران و پرندگان است. عموماً *E.coli* یک پاتوژن فرصت‌طلب به‌شمار می‌رود که در پی سرکوب سیستم ایمنی میزبان و وقوع بیماری اولیه ویروسی و میکروبی دستگاه تنفس به‌طور ثانویه بروز می‌کند(۳۰،۴۰). غالباً *E.coli* در انسان و پستانداران مسئول عفونت‌های گوارشی است، در حالی‌که در گونه‌های اهلی پرندگان موجب عفونت‌های غیرگوارشی عمومی و یا موضعی می‌شود که متعاقب آسیب‌دیدگی یا درهم شکستن سد دفاعی پرنده وقوع می‌یابد(۱۷). غالباً جدایه‌های *E. coli* پاتوژن طیور متعلق به گروههای سرمی O1، O2 و O78 می‌باشند(۴،۵).

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: *mpeigham@ut.ac.ir*

کلی‌باسیلوز در تمام گونه‌های پرندگان اهلی و در سنین مختلف بروز می‌کند اما عفونت در پرندگان جوان شایعتر از بالغین است و بیشتر در سنین ۴ تا ۹ هفتگی رخ می‌دهد. از علایم بارز بالینی این بیماری ناراحتی تنفسی، تلفات کمتر از ۵ درصد و شیوع بیش از ۵۰ درصد همراه با یافته کالبدگشایی به صورت پلی‌سروزیت است (۵،۴۰). عفونت‌های حاصل از *E.coli* صدمات اقتصادی قابل توجهی را سالیانه به صنعت طیور تحمیل می‌کنند. این کاهش سودآوری می‌تواند تمام مراحل تولید از جوجه‌کشی گرفته تا فرآوری کشتارگاهی را در برگیرد. ارزیابی دقیق خسارات اقتصادی مرتبط با اشکال مختلف عفونت‌های *E.coli* مشکل است چرا که تفاوت در حدت جدایه‌های مختلف *E. coli* و تعامل آنها با پاتوژنهای دیگر و عوامل استرسزای محیطی در این میان تأثیرگذار هستند (۵،۹،۳۰،۳۱،۴۰). به‌دلیل فقدان یک واکسن تجارتی مؤثر جهت کنترل کلی‌باسیلوز طیور، امروزه مقابله با این بیماری بیشتر متکی بر استفاده از ترکیبات آنتی‌باکتریال می‌باشد. با این وجود امروزه افزایش مقاومت نسبت به این ترکیبات دارویی، درمان این بیماری را با مشکل مواجه نموده است (۱۸).

هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی مقاومت جدایه‌های *E. coli* کلی‌باسیلوز طیور نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال مختلف و شناسایی الگوی محتوی پلاسمیدی در این جدایه‌ها بود و اینکه آیا امکان استفاده از الگوی مقاومت دارویی و محتوی پلاسمیدی به‌عنوان نشانگرهای اپیدمیولوژیک در سویه‌های *E. coli* پاتوژن طیور وجود دارد.

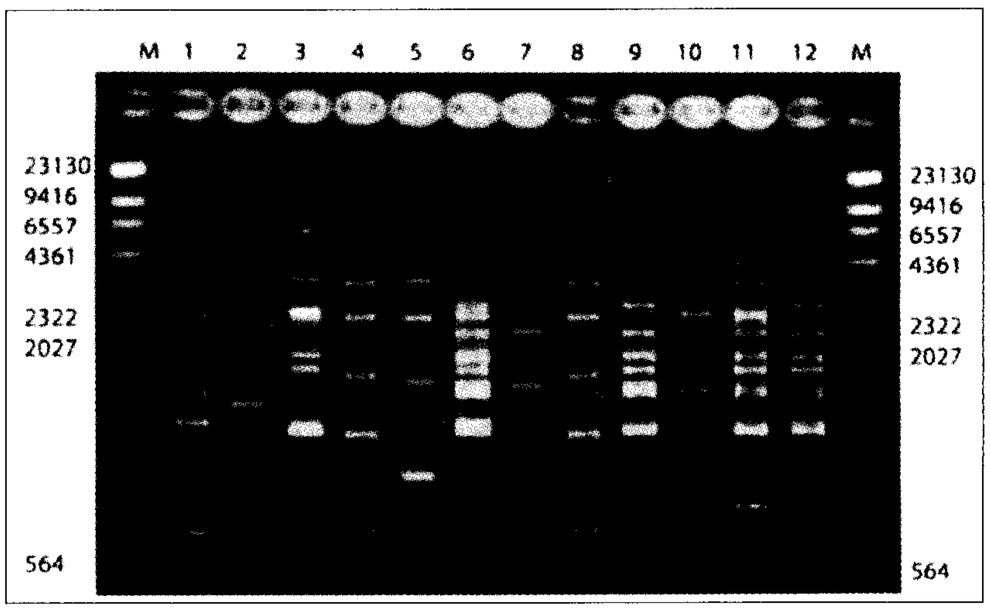
مواد و روش کار

نمونه‌برداری: در طی مدت ۴ ماه به هنگام اخذ تاریخچه بیماری، ۳۰ واحد صنعتی پرورش جوجه گوشتی استان تهران از بین مجموع مراجعین بیمارستان آموزشی و پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که احتمال درگیری آنها به بیماری کلی‌باسیلوز می‌رفت، شناسایی شدند. سپس تلفات تازه این مرغداریها مورد کالبدگشایی قرار گرفت و پس از تأیید بیماری کلی‌باسیلوز، از آنها نمونه‌برداری به‌عمل آمد. اساس نمونه‌برداری بدین شرح بود که هنگام کالبدگشایی ۵ قلب مبتلا به عارضه پریکاردیت از بین مجموع تلفات هر مرغداری در داخل یک پتری‌دیش استریل جمع‌آوری شدند و به‌منظور کشت باکتریایی سریعاً به آزمایشگاه میکروب‌شناسی بخش بیماریهای طیور دانشکده انتقال یافتند. بدین منوال ۱۵۰ نمونه (با توزیع ۵ نمونه از هر مرغداری) به‌منظور جداسازی عامل مسبب پریکاردیت جمع‌آوری گردید.

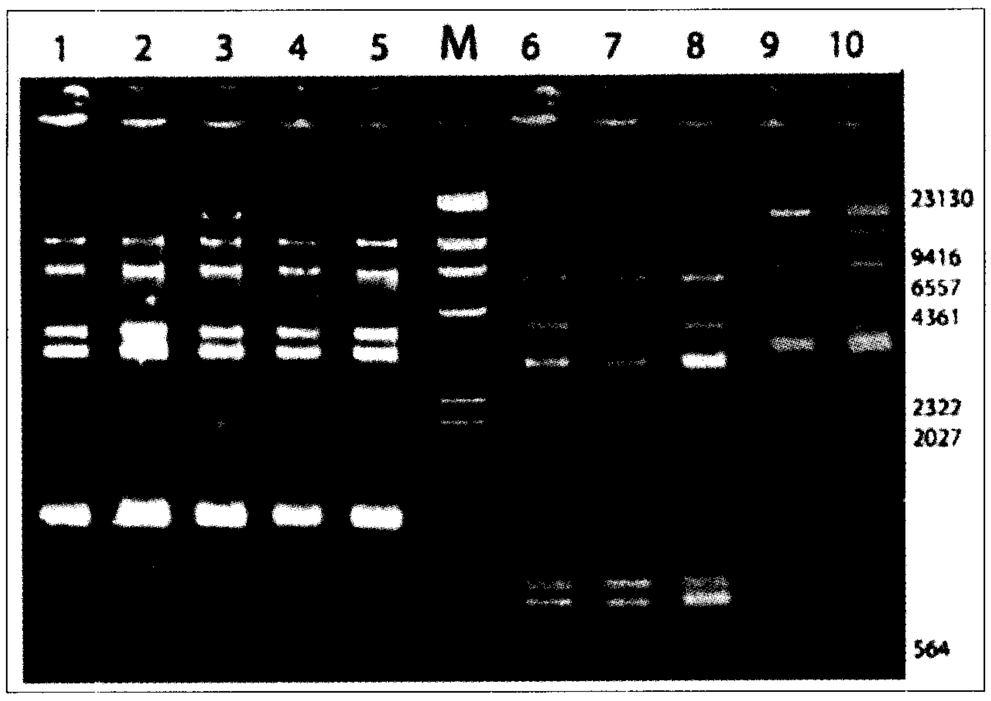
کشت باکتری‌شناسی: در آزمایشگاه پس از سوزاندن سطح هر قلب پریکاردیتی توسط تیغ اسکالپل داغ توسط یک آنس پلاتین استریل از منطقه داغ‌شده و از خون قلب اقدام به اخذ نمونه شد و با استفاده از روشهای استاندارد کشت باکتریولوژیک انجام و *Escherichia coli* لاکتوز مثبت دارای کلنی صاف (مورفولوژی نوع غالب برروی پلیت مک‌کانکی) جدا گردید (۲۵). جهت تأیید قطعی هویت *E. coli* و تفریق آن از سایر باکتری‌ها از کیت تشخیصی میکروبی آنتروباکتریاسه (شرکت ایران دارو) که ۱۱ آزمایش تشخیصی را در برمی‌گرفت، استفاده شد. این کیت آزمایشات تشخیصی زیر را دربرداشت: تولید اندول، تخمیر گلوکز، تولید سولفید هیدروژن، مصرف سیترات، دکربوکسیلاسیون ارنیتین، دکربوکسیلاسیون لیزین، تولید اوره، دآمیناز اسیون فنیل آلانین، تولید بتا گالاکتوزیداز در آزمون ONPG، واکنش متیل رد و واکنش وژز - پروسکوئر. به‌منظور استفاده بعدی، *E. coli* جدا شده با استفاده از روشهای معمول در نوترینت براث (Merck) کشت شده و به همراه محلول گلیسرول ۵۰ درصد (Merck) در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۲۷).

مقاومت دارویی (Drug Resistance): برای تعیین حساسیت ۱۵۰ جدایه *Escherichia coli* نسبت به داروهای آنتی‌باکتریال روش دیسک دیفوزیون (Disk diffusion) بر اساس روش استاندارد Kirby-Bauer و بر روی محیط آگاردار مولر هینتون (Merck) مورد استفاده قرار گرفت (۲۵). بیست عامل آنتی‌باکتریال مورد آزمایش و غلظت بالقوه آنها (بر حسب میکروگرم) عبارت بودند از: آمپی‌سیلین (۱۰)، سفتیفور (۳۰)، کلرامفنیکل (۳۰)، سیپروفلوکساسین (۵)، کلیستین (۱۰)، دیفلوکساسین (۱۰)، انروفلوکساسین (۵)، اریترومایسین (۱۵)، فلومکوئین (۳۰). فورازولیدون (۱۰۰)، جنتامایسین (۱۰). لینکواسپکتین (۲۰۰/۱۵)، نالیدیکسیک اسید (۳۰)، نئومایسین (۳۰)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰)، نورفلوکساسین (۱۰)، اکسی‌تتراسیکلین (۳۰)، استرپتومایسین (۱۰)، سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم (۱۲۵/۲۳۷۵) و تتراسیکلین (۳۰). دیسک‌های دیفلوکساسین از BBL (USA) و بقیه از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند.

آزمایش برای هر کدام یک از ۱۵۰ جدایه به شرح ذیل انجام شد. ابتدا *E. coli* برداشت‌شده از محیط ذخیره TSA بر روی محیط مک‌کانکی کشت خطی داده‌شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس ۴ تا ۵ کلنی تک *E.coli* از محیط مک‌کانکی برداشت شده و به یک لوله آزمایش استریل درب‌دار حاوی ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط مایع تریپتون سوی براث (Diagnostic,UK TSB,Antec) انتقال داده‌شد. محیط مایع تلقیح شده معمولاً به مدت ۲ تا ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا مشاهده یک کدورت واضح و قابل قبول و منطبق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (0.5 turbidity standard McFarland) انکوبه گردید. سپس یک سواپ استریل را به درون این سوسپانسیون باکتریایی نموده مایع اضافی سواپ را با فشار و چرخاندن به جداره داخلی لوله حاوی سوسپانسیون باکتریایی گرفته و بعد سواپ به صورت خطی و بدون فاصله بین خطوط کشت بر روی سطح محیط مولر هینتون که ۲۰ دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج گردیده بود، کشت داده شد. به‌منظور تلقیح یکنواخت کشت خطی سه مرتبه انجام شد، بدین نحو که هر مرتبه پلیت حاوی محیط کشت به‌میزان ۶۰ درجه نسبت به دفعه قبل چرخانیده شده و مجدداً سواپ بر روی آن به‌صورت خطی کشیده شد. در نهایت سر سواپ را به لبه داخلی پلیت و در تماس با سطح محیط کشت چسبانده و یک دور کامل چرخانده شد. پلیتهای تلقیح شده به مدت ۳ تا ۵ دقیقه به همان حال باقی ماندند تا رطوبت اضافی قبل از گذاشتن دیسکهای آنتی بیوگرام توسط آگار جذب شود. بعد دیسکهای مورد آزمایش را که یک ساعت قبل به‌منظور رسیدن به درجه حرارت آزمایشگاه از



تصویر ۱- باندهای پلاسمیدی در ۱۲ جدایه اشریشیا کلی انتخاب شده از موادر کلی با سیلوز طیور در الکتروفورز آگارژل. دامنه گسترده تعداد و وزن ملکولی پلاسمیدهای جدایه‌های اشریشیا کلی از موارد کلی باسیلوز طیور به وضوح در تصویر قابل مشاهده می‌باشد. وزن ملکولی باندهای مارکر بر حسب bp در کنار تصویر درج شده است.



تصویر ۲- الگوی محتوی پلاسمیدی جدایه‌های اشریشیا کلی از مواردکلی باسیلوز طیور دو مرغداری در الکتروفورز آگارژل. ستون‌های ۵ ـ ۱ الگوی محتوی پلاسمیدی کاملاً مشابه را در ۵ جدایه از مرغداری اول و ستون‌های ۱۰ ـ ۶ الگوی محتوی پلاسمیدی بصورت تشابه ۲+۳ را در ۵ جدایه از مرغداری دوم را نشان می‌دهد. وزن ملکولی باندهای مارکر بر حسب bp در کنار تصویر درج شده است.

یخچال خارج شده بودند توسط پنس استریل برروی سطح محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار داده شدند. به‌منظور رعایت فاصله بین دیسکها برروی محیط کشت به میزان ۲۴ میلیمتر از همدیگر و ۱۵ میلیمتر از جدار پلیت فقط ۶ دیسک برروی یک پلیت ۹۰ میلیمتری گذاشته شد. ظرف مدت ۱۵ دقیقه پس از دیسک‌گذاری پلیتها جمع‌آوری شده و در وضعیت وارونه و به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از این مدت برای قرائت نتیجه آزمایش از چشم غیرمسلح و در حضور نور متمرکز، قطر هاله ممانعت شونده از رشد هر آنتی‌باکتریال بر حسب میلیمتر توسط خطکش اندازه‌گیری شد و با مقایسه با جدول تفسیر قطر هاله ممانعت شونده براساس حساس (Susceptible) و مقاوم (Resistance) طبقه‌بندی شدند.

تعیین الگوی محتوی پلاسمیدی (Plasmid profile): در این تحقیق از کیت Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals,Switzerland) High Pure Plasmid به‌منظور استخراج و پالایش پلاسمید DNA خالص ۱۰۰ جدایه *E.coli* استفاده شد. اساس کار این کیت، استخراج DNA پلاسمیدی به روش Alkaline lysis بود(۲۷). الکتروفورز پلاسمید DNA خالص هم به روش توصیه شده Sambrook and Russell (2001) انجام شد. اساس این روش استفاده از آگاروز ۰/۸ درصد حل شده در[1] TAE (Tris Acetate-EDTA) x است. مخلوط ۸ میکرولیتر DNA پلاسمیدی استخراج شده از هر جدایه *E. coli* مورد بررسی با ۴ میکرولیتر Gel-loading buffer به داخل هر گوده ژل افزوده شد. این بافر مرکب از ۰/۲۵ گرم بروموفنل بلوو ۴ گرم ساکاروز در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. جهت تعیین وزن ملکولی پلاسمیدهای جدایه‌های مورد آزمایش برروی هر ژل از مارکر DNA MW Marker II (Roche Molecular Biochemicals) و پلاسمید ۶۸Kb استخراج شده از سویه MK11 (گنجینه میکروبی بخش بیماریهای طیور) استفاده شد. نحوه آماده‌سازی مارکر تجاری براساس توصیه کارخانه سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (Applex,France) و بافر TAE ×۱ جریانی به ظرفیت ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه از ژل عبور داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) (سیناژن) جهت رنگ آمیزی و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر جهت شستشو قرار داده شد. باندهای DNA روی ژل، بلافاصله، با استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل (Visi- Doc-It system; UVP,UK) مشاهده و تصویربرداری شدند. برای تعیین وزن ملکولی پلاسمیدها از نرم‌افزار کامپیوتری (State University Seqaid II (Ver.3.5,Kansas استفاده شد.

نتایج

به هنگام کالبدگشایی در تمام ۱۵۰ لاشه انتخابی از تلفات ۳۰ مرغداری صنعتی پرورش جوجه گوشتی، پریکاردیت به وضوح دیده شد. ضایعه پریکاردیت در لاشه‌های فوق از یک کدورت کیسه پریکاردیوم تا تجمع اکسودای فیبرینی درون آن و حتی در برخی موارد تا بروز چسبندگی بین پریکاردیوم و میوکاردیوم قابل رؤیت بود. در اکثریت قریب به اتفاق تلفات کالبدگشایی شده، به همراه پریکاردیت، پری‌هپاتیت و در برخی موارد تورم کیسه‌های هوایی و پریتونیت خفیف تا شدید مشاهده شدند. سن همه گله‌های مورد بررسی به هنگام نمونه‌برداری مابین ۳ تا ۷ هفتگی بود.

در مطالعه باکتری‌شناسی، باکتری غالب در مورد هر ۱۵۰ نمونه پریکاردیت برروی محیط مک‌کانکی *E.coli* لاکتوز مثبت بود. نتایج تعیین بیوتیپ در قالب ۱۱ آزمون برای تمام ۱۵۰ نمونه *E.coli* که توسط یک کیت تجارتی تشخیص تفریقی میکروبهای آنتروباکتریاسه انجام گردید، یکسان بود.

تمام ۱۵۰ جدایه *E.coli* به سفتیوفور و جنتامایسین حساس بودند در حالی‌که به چهار آنتی باکتریال کلیستین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین و نالیدیکسیک اسید مقاومت دارویی بالای ۹۶ درصد را نشان دادند. مقاومت این جدایه‌ها به سایر آنتی‌باکتریال‌ها بین ۲۶ تا ۹۴ درصد متغیر بود (جدول ۱). در بین جدایه‌های مقاوم، وقوع مقاومت چندگانه بسیار شایع بود به‌طوری که ۱۰۰ درصد آنها حداقل به ۴ ترکیب و ۰/۷ درصد آنها حداقل به ۱۷ ترکیب از مجموع ۲۰ آنتی‌باکتریال مورد آزمایش مقاوم بودند (جدول ۲). چگونگی حساسیت جدایه‌های *E. coli* در این

جدول ۱- درصد مقاومت دارویی ۱۵۰ جدایه *Escherichia coli* از مواردکلی باسیلوز طیورنسبت به ۲۰ ترکیب آنتی باکتریال.

ترکیبات آنتی باکتریال *	٪ جدایه‌های E.coli مقاوم
نالیدیکسیک اسید	۹۸/۷
اریترومایسین	۹۷/۳
آمپی‌سیلین	۹۶/۷
کلیستین	۹۶/۷
تتراسیکلین	۹۴
فلومکوئین	۹۲
اکسی‌تتراسیکین	۹۰/۷
دیفلوکساسین	۸۴
نیتروفورانتوئین	۸۱/۳
فورازولیدون	۷۹/۳
سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم	۷۲/۶
انروفلوکساسین	۶۶
لینکواسپکتین	۶۴/۷
نورفلوکساسین	۵۲/۷
نئومایسین	۵۲
کلرامفنیکل	۴۶/۷
سیپروفلوکساسین	۴۴
استرپتومایسین	۲۶/۷
جنتامایسین	صفر
سفتیوفور	صفر

مطالعه نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک مصرفی شایع در صنعت طیور ایران مؤید وجود ۸۲ الگوی مقاومت دارویی است. جدول ۳ نشان می‌دهد که ۵۷/۲ درصد جدایه‌ها در ۱۸ الگوی مقاومت دارویی (بیش از یک جدایه در هر الگو) و ۴۲/۸ درصد جدایه‌ها در ۶۴ الگوی مقاومت دارویی (یک جدایه در هر الگو) قرار گرفتند. حداکثر درصدی از جدایه‌ها که به یک الگومتعلق بودند برابر با ۱۱/۴ بود. مقایسه الگوی مقاومت دارویی ۵ جدایه *E. coli* جمع‌آوری شده از هر مرغداری مشخص نمود که مابین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های ۲۳ مرغداری (۷۷/۷ درصد) تشابهاتی وجود داشت اما ۷ مرغداری باقیمانده (۲۳/۳ درصد) هیچ‌گونه تشابهی در الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های خود نداشتند. فقط در ۱۰ درصد مرغداری‌ها هر پنج جدایه *E. coli* از یک مرغداری دارای الگوی مقاومت دارویی مشابه بودند (جدول ۴).

وزن ملکولی پلاسمید ۱۰۰ جدایه مورد بررسی بین ۱ تا بیش از Kb۶۸ بود و براساس همین اوزان ملکولی، محتوی پلاسمیدی این جدایه‌ها در ۶۲ الگو قرار گرفت. جدول ۵ طیف متنوع تعداد پلاسمیدهای جدایه‌ها را که از صفر تا ۱۱ متغیر بود، نشان می‌دهد. فقط ۳۳ درصد جدایه‌ها حاوی یک یا بیشتر از یک پلاسمید بزرگ (>۳۰Kb) بودند. در ۲۰ درصد مرغداری‌ها هیچ‌گونه تشابهی در محتوی پلاسمیدی ۵ جدایه *E.coli* از همان مرغداری وجود نداشت، در حالی که محتوی پلاسمیدی جدایه‌ها در ۸۰ درصد مرغداری‌ها حداقل در دو و حداکثر در ۵ مورد

جدول ۲- مقاومت چندگانه جدایه‌های *Escherichia coli* از مواردکلی باسیلوز طیور به ترکیبات آنتی باکتریال از مجموع ۲۰ ترکیب.

درصد جدایه‌های مقاوم	تعداد ترکیبات آنتی باکتریال
۱۰۰	۱
۱۰۰	۱<
۱۰۰	۲<
۱۰۰	۳<
۱۰۰	۴<
۹۹/۳	۵<
۹۳/۳	۶<
۹۰	۷<
۸۷/۳	۸<
۸۶/۷	۹<
۸۲/۷	۱۰<
۷۵/۳	۱۱<
۶۶	۱۲<
۵۵/۳	۱۳<
۳۶/۷	۱۴<
۱۸	۱۵<
۹/۳	۱۶<
۰/۷	۱۷<
صفر	۱۸<

جدول ۳- الگوی مقاومت دارویی ۱۵۰ جدایه *Escherichia coli* از موارد کلی باسیلوز طیور نسبت به ۱۰ ترکیب آنتی باکتریال[1] رایج در صنعت طیور ایران

شماره الگوی مقاومت دارویی	مقاوم به	درصد جدایه‌های متعلق به الگوها	
۱	Amp,Col,Tet,Flu,Fur,Sul,Enr,Lin, Neo,Chl	۱۱/۴	۵۷/۲
۲	همه بجز Chl	۹/۴	
۳	همه بجز Neo	۸	
۴	همه بجز Chl,Neo	۶	
۵	همه بجز Enr	۴	
۶	همه بجز Sul	۲/۸	
۷	همه بجز Col	۱/۳	
۸	همه بجز Col,Chl	۱/۳	
۹	همه بجز Lin,Neo	۱/۳	
۱۰	همه بجز Flu,Enr	۱/۳	
۱۱	همه بجز Sul,Enr	۱/۳	
۱۲	همه بجز Lin,Chl	۱/۳	
۱۳	همه بجز Lin,Enr,Chl	۱/۳	
۱۴	همه بجز Sul,Neo,Lin	۱/۳	
۱۵	همه بجز Neo,Lin,Chl	۱/۳	
۱۶	همه بجز Lin,Flu,Enr,Chl	۱/۳	
۱۷	همه بجز Tet,Sul,Neo,Lin,Chl	۱/۳	
۱۸	همه بجز Sul,Neo,Fur,Enr,Chl	۱/۳	
۱۹-۸۲	متنوع	هر الگو ۰/۶	۴۲/۸

۱) Amp = آمپی‌سیلین، Col = کلیستین، Tet = تتراسیکلین، Flu = فلومکوئین، Fur = فورازولیدون، Enr = انروفلوکساسین، Sul = سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم، Lin = لینکواسپکتین، Neo = نئومایسین، Chl = کلرامفنیکل.

جدول ۴- میزان تشابه در الگوهای مقاومت دارویی بین پنج جدایه *Escherichia coli* جداشده از هر واحد مرغداری.

تعداد جدایه‌های E.coli با الگوی مقاومت دارویی مشابه	درصد مرغداری‌ها
۵	۱۰
۴	۱۶/۷
۳+۲	۱۰
۳	۳/۳
۲+۲	۱۰
۲	۲۶/۷
صفر	۲۳/۳

جدول ۵- درصد پراکندگی تعداد پلاسمیدها در بین ۱۰۰ جدایه *Escherichia coli* از موارد کلی‌باسیلوز طیور

درصد جدایه‌های حاوی پلاسمید	تعداد پلاسمید
۱۲	۰
۱	۱
۱۱	۲
۸	۳
۱۲	۴
۱۱	۵
۱۷	۶
۱۱	۷
۹	۸
۶	۹
۱	۱۰
۱	۱۱

جدول ۶- میزان تشابه در الگوی محتوی پلاسمیدی پنج جدایه *Escherichia coli* از هر واحد مرغداری

تعداد جدایه‌های E.coli با محتوی پلاسمیدی یکسان	درصد مرغداری‌ها
۵	۵
۳+۲	۱۰
۳	۱۰
۲+۲	۱۰
۲	۴۵
صفر	۲۰

یکسان بودند (جدول ۶). تنوع در تعداد پلاسمیدها در بین ایزوله‌ها و همچنین دو الگوی متفاوت پلاسمیدی متعلق به دو فارم در تصاویر ۱ و ۲ نشان داده شده است.

بحث

کلی‌باسیلوز طیور از نقطه نظر اقتصادی یکی از مهمترین بیماریهای صنعت طیور در ایران و جهان است. اشریشیا کلی، عامل ایجاد کننده کلی باسیلوز، به دلیل دارا بودن خصوصیات گوناگون قادر است به بدن پرنده وارد شده و ایجاد بیماری نماید (۵،۱۲،۱۷،۲۰،۲۴،۳۶،۳۷). مقاومت اشریشیا کلی طیور نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال مورد استفاده در صنعت طیور یکی از علل مهم بقای باکتری در محیط و گسترش بیماری در گله‌های طیور می‌باشد. الگوی مقاومت در همه جا یکسان نیست و در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت حتی در یک ناحیه ممکن است متفاوت باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف آنتی‌باکتریال‌ها باشد (۲۷). گزارشات در رابطه با افزایش مقاومت ترکیبات آنتی‌باکتریال نسبت به *E. coli* پاتوژن طیور در حال افزایش و الگوی مقاومت دارویی نواحی مختلف جغرافیایی متنوع و در حال تغییر است (۱،۳۳).

حساسیت ۱۰۱ جدایه *E. coli* با منشاء گاو و طیور جداشده در بین سالهای ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۶ نسبت به ۱۳ ترکیب آنتی‌باکتریال در الجزایر نشان داد که بدون توجه به منشاء، میزان مقاومت جدایه‌ها به تتراسیکلین و استرپتومایسین بالا، کلرامفنیکل، سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم، فورازولیدون و آمپی‌سیلین متوسط و نالیدیکسیک اسید کم بود. همچنین همه جدایه‌های *E. coli* مورد بررسی به جنتامایسین و کلیستین حساس بودند (۲۱). مطالعه‌ای گذشته‌نگر در ترینیداد برروی عفونت‌های *E. coli* در جوجه‌های گوشتی در حد فاصل بین سالهای ۱۹۹۰ الی ۱۹۹۷ نشان داد که تقریباً بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های *E.coli* به ۹ آنتی‌باکتریال از ۱۱ ترکیب مورد آزمایش مقاوم بودند. بیش از ۴۰ درصد جدایه‌ها به استرپتومایسین، سولفانامیدها، تتراسیکلین، سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، آپرامایسین، جنتامایسین و نئومایسین مقاوم بودند ولی فقط ۱۶/۱ و ۳۰/۹ درصد جدایه‌ها به ترتیب به نورفلوکساسین و نیترو فورانتوئین مقاوم بودند (۱۸).

ارزیابی مقاومت آنتی‌باکتریال جدایه‌های *E. coli* طیور در استان کبک کانادا در فاصله زمانی ۱۹۹۳ الی ۱۹۹۹ نشان‌دهنده افزایش مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین، سفتیوفور و انرو فلوکساسین می‌باشد، در حالی که از میزان مقاومت به نئومایسین و تری‌متوپریم کاسته شده و تغییر اندکی در مقاومت نسبت به تتراسیکلین و جنتامایسین به وجود آمده است (۲۲). در بررسی ۱۵۸ جدایه *E.coli* از موارد کلی‌باسیلوز جوجه‌های گوشتی در مراکش نیز ملاحظه گردید که بیش از ۴۰ درصد جدایه‌ها به سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم، اکسی‌تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم بودند. ۱۵ تا ۴۰ درصد آنها نیز به استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، فلومکوئین و انرو فلوکساسین مقاومت داشتند و کمتر از ۱۵ درصد جدایه‌ها هم به آمپی‌سیلین، جنتامایسین، نیترو فوران و کلیسین مقاوم بودند (۳). تحقیقات برروی *E.coli* جداشده از طیور در ژاپن نیز نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی بیشترین مقاومت را نسبت به سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم و کمترین مقاومت را به جنتامایسین دارا بودند که علت آن نیز مصرف فراوان سولفامتاکسازول + تری‌متوپریم و استفاده محدود جنتامایسین در صنعت طیور این کشور ذکر شده است (۸).

در مطالعات اخیر در ایران، مقاومت ۵۰ جدایه *E. coli* از کلی‌باسیلوز طیور نسبت به سه ترکیب فلوروکینولونی فلومکوئین، انرو فلوکساسین و نورفلوکساسین به ترتیب ۶۷/۵، ۳۴/۸ و ۲۰/۴ درصد تعیین گردید (۲). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۶۴ جدایه *E. coli* از نمونه‌های مرضی جوجه‌های گوشتی بیشترین (۹۴/۵) و کمترین (۴/۸) درصد مقاومت به ترتیب به پنی‌سیلین و جنتامایسین گزارش شد (۱).

افزایش قابل توجه در بروز مقاومت‌های چندگانه (Multiple resistance) جدایه‌های *E.coli* طیور به آنتی‌باکتریال‌ها نیز در دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است(۷،۱۵،۱۶،۲۱،۲۳). در مطالعه حاضر طیف و میزان مقاومت جدایه‌ها به ترکیبات آنتی‌باکتریال گسترده و بالا بود، به نحوی که ۱۳۰ (۸۶/۲ درصد) جدایه مورد بررسی به ۱۰ و یا حتی تعداد بیشتری از مجموع ۲۰ آنتی‌باکتریال مورد آزمایش مقاوم بودند و همچنین تمام ۱۵۰ جدایه به ۹ ترکیب آنتی‌باکتریال نیز مقاومتی بالای ۸۰ درصد داشتند که بی‌تردید عمدتا به‌دلیل مصرف فراوان و بی‌رویه این ترکیبات دارویی در قالب برنامه‌های درمانی، متافیلاکسی و پروفیلاکسی گله‌های طیور می‌باشد. حساسیت کامل جدایه‌ها در این مطالعه به سفتیوفور و جنتامایسین و درصد مقاومت پایین نسبت به استرپتومایسین ناشی از عدم مصرف یا استفاده محدود از این ترکیبات دارویی در عرصه پیشگیری و درمان گله‌های طیور است.

تنوع فراوان در الگوی مقاومت دارویی در بین ۱۵۰ جدایه مورد بررسی (۸۲ الگو) و همچنین تنوع فراوان حتی در الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های متعلق به یک واحد مرغداری، اتخاذ برنامه‌های درمانی بر علیه بیماری‌های باکتریایی حاضر در مرغداری‌ها را با مشکل مواجه می‌نماید. باید توجه داشت که الگوی مقاومت دارویی یک پدیده محلی است و استفاده از آنتی‌باکتریال‌ها با توجه به الگوی مقاومت دارویی دیگر مناطق یا کشورها چندان جایز نیست چرا که بنا به مکان و زمان این الگوها تغییر می‌نمایند(۳،۱۸،۲۲،۲۴). لذا آزمون حساسیت ضد میکروبی باید برای هر مرغداری مستقلا پیش از تجویز آنتی‌باکتریال‌ها انجام شود(۲۶). البته آزمون تعیین حساسیت میکروبی به تنهایی ملاک انتخاب برای ترکیب مورد نظر نیست، زیرا دستیابی به حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در بافت مورد نظر نیز حائز اهمیت است. پایداری آنتی‌بیوتیک، توانایی آنتی‌بیوتیک در عبور از سدهای طبیعی بدن و فعال بودن در محل اثر نیز سه شاخص مهم در انتخاب داروهای آنتی‌باکتریال می‌باشند(۶). روند استفاده بی‌رویه و نادرست از آنتی‌باکتریال‌ها در واحدهای پرورشی طیور، بدون ارزیابی دقیق از حساسیت باکتریایی، منجر به گسترش ژن‌های مقاومت به داروهای ضدمیکروبی و متعاقبا گزینش شمار بیشتری از کلون‌های *E. coli* مقاوم می‌گردد که تاثیر بسیار منفی بر روی صنعت طیور دارد(۱۸). البته این واقعیت مهم را نیز نباید از نظر دور داشت که ممانعت از مصرف یک آنتی‌باکتریال ضرورتا منجر به کاهش دراماتیک فراوانی مقاومت به داروی مربوطه نمی‌شود و لذا این باور که بروز مقاومت تنها به‌دلیل فشار ناشی از استفاده مداوم از عوامل ضدمیکروبی است مورد سؤال قرار می‌گیرد و این امکان را مطرح می‌کند که عوامل دیگری در بقای ژن‌های مقاومت دارویی نقش داشته‌اند یا می‌توانند نقش داشته باشند(۳۴، ۱۴). که از آن جمله می‌توان به وجود ژن‌های مقاومت علیه داروهای ضدمیکروبی از زمانی بسیار پیشتر از آنکه این داروها کاربرد بالینی در پزشکی و دامپزشکی پیدا کنند، و همچنین توانایی تبادل ژن‌های مقاومت و فعالیت عملی آن‌ها در میزبان‌های باکتریایی گوناگون اشاره نمود(۲۸). بر این اساس اگر ژن‌های مقاومت دارویی روی عناصر متحرک ژنتیکی مانند پلاسمیدها قرار داشته باشند می‌توانند به باکتری‌های هم گونه و جنس و حتی متفاوت با آن‌ها از طرق مختلف انتقال یابند(۱۰،۳۶).

مطالعات بر روی پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت نشان داده است که آنها قادرند در دیگر باکتری‌های آن جنس و حتی در باکتری‌های جنس‌های دیگر تکثیر و ژن‌های مقاومت را بیان نمایند(۲۸). که این مسئله از نظر گسترش ژن‌های مقاومت میکروبی به بسیاری از باکتری‌ها از جمله پاتوژن‌های انسانی مهم است. گرچه باکتری‌های حیوانات ممکن است منبع بالقوه‌ای از پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت برای باکتری‌های انسانی باشند، اما اهمیت این خطر از نظر بعضی پژوهشگران در دورنما باید نگه داشته شود(۱۴،۲۸). پژوهشگران بریتانیایی اخیرا نقش کاربرد آنتی‌باکتریال‌ها در حیوانات را در بروز مشکلات مقاومت دارویی در انسان کمتر از ۴ درصد ارزیابی نموده‌اند(۲۸).

ارتقاء سطح مدیریت بهداشتی واحدهای تولیدی، مقابله با بیماریهای واگیر از طریق واکسن، نظارت منظم و مداوم بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و پایش مقاومت آنتی‌باکتریال در حیوانات خوراکی توسط مراکز ذیربط، استفاده از ترکیبات پروبیوتیک و برپایی برنامه‌های آموزشی برای تولیدکنندگان اقداماتی هستند که بی‌تردید در کاهش مقاومت به ترکیبات آنتی‌باکتریال مؤثرند(۷،۱۹).

گرچه الگوی مقاومت دارویی می‌تواند نشانگر مفیدی برای جدایه‌های *E. coli* پاتوژن طیور یک منطقه به‌شمار رود اما به تنهایی به عنوان یک مارکر اپیدمیولوژیک نمی‌تواند ارزشمند باشد. تعیین پروفایل پلاسمیدی در این خصوص دقیق‌تر از تست مقاومت دارویی و کمک کننده‌تر می‌تواند باشد. محتوی پلاسمیدی ممکن است دلالت بر وقوع پلاسمیدهای حدت، یعنی پلاسمیدهایی که حامل ژن‌های فاکتورهای حدت می‌باشند، داشته باشد. Sekizaki و همکاران در ۱۹۸۹(۲۹) کاهش حدت یک جدایه پاتوژن *E.coli* طیور را با حذف یک پلاسمید ۹۵Kb نشان دادند. همچنین انتقال یک پلاسمید ۱۰۰ مگادالتونی به یک جدایه *E. coli* طیور باعث افزایش حدت باکتری گیرنده شد زیرا توانایی تولید ائروباکتین و مقاومت سرمی را در آن القا نمود(۱۳). ژن tsh که پژوهشگران در کلونیزاسیون اولیه *E.coli* در دستگاه تنفسی طیور برای آن نقشی قائل شده‌اند و بر روی پلاسمید Col V قرار دارد در یک بررسی در ۹۶ درصد جدایه‌های *E.coli* بیماریزای طیور شناسایی گردید. در حالی که جدایه‌های غیر بیماریزا (همزیست) *E.coli* طیور فاقد این ژن بودند(۱۲). مطالعات بعدی بر روی یک جدایه E.coli از سندرم کله بادی روشن نمود که ژن tsh قابل شناسایی بر روی سایر پلاسمیدها غیر از پلاسمید Col V نیز می‌باشد ضمن اینکه محرز گردید که پلاسمیدهای با وزن مولکولی بیش از ۶۰ مگادالتون هم حاوی ژنهای چسبندگی می‌باشند و احتمالا نقش اولیه را در کلونیزاسیون جدایه‌های *E. coli* بیماریزای طیور در قسمت فوقانی دستگاه تنفس طیور دارا هستند. مشاهده شد که چنین پلاسمیدهایی حاوی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی و کلیسین نیز می‌باشند و قادرند از طریق مکانیسم‌های نوترکیبی همچون آمیخته‌گری (Conjugation) اقدام به معاوضه ژنی در بین جدایه‌های مختلف *E.coli* نمایند(۳۳).

فراوانی پلاسمیدها و نقش احتمالی آنها به عنوان یک مارکر اپیدمیولوژیک مورد بررسی محققین مختلف قرار گرفته است. Davies و همکاران در ۱۹۸۱، ۱۶ محتوی پلاسمیدی در ۲۰ جدایه *E. coli* کلی‌باسیلوز طیور را شناسایی نمودند. یک تا هشت پلاسمید در بین جدایه‌های مورد بررسی موجود بود که وزن ملکولی

آنها بین ۱/۵۴ تا ۳۴/۶۷Kb تخمین زده شد(۱۰). حضور باندهای پلاسمیدی متعدد در ژل الکتروفورز با طیف و دامنه گسترده‌ای از اوزان مولکولی در سویه‌های *E. coli* طیور توسط محققین هم نشان داده شده است(۳۲،۳۷). این محققین به وجود پلاسمیدهایی با وزن مولکولی ۲۳ تا ۸۲Kb تأکید نموده‌اند. Wooley و همکاران در ۱۹۹۲، گزارش کردند که چندین پلاسمید که در *E. coli* حاد طیور شناسایی کرده‌اند اما در یک جدایه *E. coli* غیر حاد طیور مورد مطالعه آنها هیچ پلاسمیدی یافته نشده است(۳۹). در ۱۹۹۲، Wooley و همکاران در مطالعه‌ای دیگر، یک پلاسمید R منفرد و با وزن ملکولی بالا را به دو سویه *E. coli* گیرنده انتقال دادند و دریافتند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آنها انتقال یافته اما سایر خصوصیات حدت به گیرنده‌ها منتقل نشده است. آنها چنین نتیجه‌گیری نمودند که ارتباطی بین پلاسمیدهای R و نشانگر حدت که مورد بررسی قرار داده بودند وجود ندارد(۳۸).

Tsubokura و همکاران در ۱۹۹۵، به هنگام بررسی دارویی پلاسمیدهای R الحاق پذیر در جدایه‌های *E. coli* از پرندگان مهاجر بین سالهای ۱۹۸۶-۱۹۸۳ در ژاپن ملاحظه نمودند که همه جدایه‌های *E.coli* به چندین آنتی بیوتیک از بین ۷ آنتی بیوتیک آزمایش شده مقاوم بودند که موید پدیده مقاومت چندگانه در بین جدایه‌ها بود(۳۵). این پژوهشگران همچنین گزارش نمودند که از بین ۲۳۳ سویه مورد مطالعه ۱۲۸(۵۵درصد) حامل پلاسمید R الحاق پذیر بودند و نتیجه‌گیری نمودند که پلاسمیدهای R الحاق پذیر احتمالا با حدت ارتباط دارند.

Peighambari و همکاران در ۱۹۹۵، گزارش نمودند که ۴۸ درصد جدایه‌های مدفوعی *E. coli* فاقد محتوی پلاسمیدی بودند در حالی‌که این درصد در مورد جدایه‌های *E. coli* جدا شده از سلولیت جوجه‌های گوشتی فقط ۱۲ درصد بوده است(۲۴). در بررسی آنها مشخص گردیده که در ۴۹درصد موارد، جدایه‌های سلولیتی یا فقط پلاسمیدهای بزرگ (>۳۰Kb) داشته‌اند و یا اینکه واجد پلاسمیدهای بزرگ و کوچک به‌طور توأم بوده‌اند. این در حالی است که تنها ۸ درصد جدایه‌های مدفوعی چنین خصوصیتی را دارا بودند. برخی از محققین ادعا نموده‌اند که پلاسمیدهای بزرگ با سویه‌های حاد «*E. coli*» در ارتباط هستند و چنین پلاسمیدهایی شاید تولید آئروباکتین و مقاومت سرمی را رمز می‌کنند(۳۷،۳۹)، در حالی‌که دیگران در مطالعه خود متوجه شدند که پلاسمیدهای بزرگ به‌عنوان یک نشانگر حدت مطرح نمی‌باشند(۲۴). ضمناً این گروه از محققین اختلاف معنی‌داری را بین گروههای سرمی جدایه‌های حاد *E. coli* سلولیت طیور همچون O1، O2 و O78 و سایر گروههای سرمی O از نظر دارا بودن پلاسمیدهای با وزن ملکولی بالا (>۳۰Kb) مشاهده نکردند.

Wooley و همکاران در ۱۹۹۲، در رابطه با وزن ملکولی پلاسمیدهای *E. coli* اعلام نموده‌اند که از بین ۴۰ جدایه *E. coli* جداشده از کلی‌سپتی‌سمی طیور ۵۵درصد حاوی پلاسمیدهای بزرگ(>۱۵MD) و ۴۵درصد حاوی پلاسمیدهای بزرگ و کوچک بودند در حالی‌که از ۴۰ جدایه *E. coli* جداشده از روده طیور سالم ۳۵درصد حاوی پلاسمید بزرگ، ۲۲/۵درصد پلاسمید کوچک (<۱۵MD)، ۴۰درصد پلاسمید بزرگ و کوچک و ۲/۵درصد بدون پلاسمید بودند(۳۹). گزارشی دیگر در رابطه با ۱۰۰ جدایه *E. coli* از سلولیت طیور و ۲۵ جدایه *E. coli* از مدفوع طیور نشان داد که محتوی پلاسمیدی جدایه‌های سلولیتی در محدوده وزن ملکولی ۲/۱ تا ۱۲۵< Kb و محتوی پلاسمیدی جدایه‌های مدفوعی در محدوده وزن ملکولی ۲/۲ تا ۳۹Kb به ترتیب دارای ۶۵ و ۱۴ الگو بود(۲۴). Doetkott و همکاران نیز در ۱۹۹۶ مشاهده نمودند که از بین ۱۳ جدایه *E. coli* از طیور سالم ۸ جدایه و از ۱۷ جدایه *E. coli* از طیور بیمار، ۷ جدایه حاوی پلاسمیدهای با وزن ملکولی بیش از ۵۰Kb بودند(۱۱). در مطالعه این محققین هفده جدایه از مجموع ۳۰ جدایه مورد بررسی دارای حداقل یک و حداکثر ۴ پلاسمید ۵۰Kb و بزرگتر بود. کم وزن‌ترین پلاسمید ۵۰ و سنگین‌ترین آن ۲۲۰ Kb بود(۱۱). در مطالعه حاضر، دامنه گسترده‌ای از تنوع و تفاوت در بین محتوی پلاسمیدی جدایه‌های *E. coli* کلی‌باسیلوز طیور مشاهده گردید که قابل مقایسه با یافته‌های قبلی در رابطه با *E. coli* طیور بود. مطالعه ما نشان داد که محتوی پلاسمیدی ۱۰۰ جدایه *E. coli* مورد بررسی در قالب ۶۲ الگو قابل طبقه‌بندی بود. در حالی‌که ۱۲درصد جدایه‌ها فاقد هر گونه پلاسمیدی بودند، در برخی جدایه‌ها تا ۱۱ پلاسمید شناسایی شد. ۳۳درصد جدایه‌های مورد مطالعه نیز حاوی یک یا بیشتر از یک پلاسمید بزرگ(>۳۰Kb) و یا پلاسمید بزرگ و کوچک بودند.

میزان تشابه الگوی محتوی پلاسمیدی جدایه‌های یک فارم مورد توجه بعضی محققین قرار گرفته است(۲۴). در بررسی انجام گرفته بر روی ۱۰۰ جدایه *E. coli* از موارد سلولیت طیور مربوط به ۲۰ مرغداری مشاهده شد که در ۶ (۳۰درصد) مرغداری حداقل سه محتوی پلاسمیدی مشابه در بین ۵ *E. coli* جداشده از هر مرغداری وجود داشت. در ۱۱ (۵۵ درصد) مرغداری هم حداقل دو جدایه سلولیتی دارای گروه سرمی و محتوی پلاسمیدی یکسانی داشتند(۲۴). بررسی ما نیز نشان داد که حداقل سه جدایه از مجموع ۵ جدایه *E. coli* ۵ (۲۵درصد) مرغداری دارای محتوی پلاسمیدی یکسان بودند و ۴ (۲۰درصد) مرغداری هم هیچ‌گونه تشابهی در محتوی پلاسمیدی جدایه‌های خود نداشتند. مقایسه الگوی مقاومت دارویی جدایه‌هایی که محتوی پلاسمیدی یکسانی داشتند هویدا نمود که در ۵ (۲۵درصد) مرغداری، این جدایه‌های واجد الگوی مقاومت دارویی کاملاً یکسان بودند، در ۵ (۲۵درصد) مرغداری دیگر این جدایه‌ها در بیش از ۵۰درصد موارد الگوی مقاومت دارویی یکسان داشتند و در ۱۰ (۵۰درصد) مرغداری الباقی هیچ یکنواختی و تشابهی در الگوی مقاومت دارویی ملاحظه نگردید.

نتایج مطالعات ما نیز مانند تحقیقات قبلی(۲۴) نشان داد هر چند محتوی پلاسمیدی و الگوی مقاومت دارویی در تمایز بین جدایه‌های *E.coli* یک مرغداری مفید بودند اما هیچ‌کدام به‌عنوان نشانگر *E.coli* جداشده از کلی‌باسیلوز طیور قابل استفاده نبودند.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از محل اعتبارات طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۲۱۸/۲/۵۰۶ و قطب علمی علوم درمانگاهی دامپزشکی وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری تامین گردیده است.

References

۱. رجائیان، ح.، فیروزی، ر.، جلایی، ج.، حیدری دزفولی، ف. (۱۳۸۲): مقاومت آنتی بیوتیکی چندین گونه باکتریایی معمول جدا شده از جوجه‌های گوشتی منطقه شیراز، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۸، صفحه: ۲۲۶-۲۲۳.

2. Alimehr, M., Sadeghi-Hashjin, G., Pourbakhsh, S.A. and Nofouzi, K. (1999): Isolation, identification and in vitro susceptibility of avian *Escherichia coli* to selected fluoroquinolones. Arch. Razi Ins. 50: 77-82.
3. Amara, a., Ziani, Z. and Bouzoubaa, K. (1995): Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in morocco from chickens with colibacillosis. Vet. Microbiol. 43: 325-330.
4. Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B.E., Hacker, J. and Ron, E.Z. (1997): Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. FEMS Microbiol. Lett. 149: 99-10.
5. Barnes, H.J., J.P. Vaillancourt, and R.G. Gross (2003): Colibacillosis. In Diseases of Poultry. Edited by YM Saif, BW Calnek, HJ Barnes, CW Beard, and LR MacDougal. 11th ed. Iowa State University Press, Iowa, USA. PP: 631-647.
6. Barragry, T.B. (1999): Veterinary Drug Therapy, 1st ed., Lea & Febiger Ltd, Philadelphia, PP: 282-291.
7. Barton, M.D., Pratt, R. and Hart, W.S. (2003): Antibiotic resistance in animals. Commun. Dis. Intell. 27 Suppl: S121-6.
8. Bebora, L.C., Oundo, J.O. and Yamaato, H. (1999): Resistance of *Escherichia coli* strains recovered from chickens to antibiotics with particular reference to tri-sulfonamides. East African J. 10: 624-627.
9. Berkhott, H.A. and Vinal, A.C. (1985): Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. Avian Dis. 30: 117-121.
10. Davies, D.L., Falkiner, F.R. and Hardy, K.G. (1981): Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 31: 574-579.
11. Doetkott, D.M., Nolan, L.K., Giddings, C.W. and Berry hil, D.L. (1996): Large Plasmids of avian *Escherichia coli* isoltes. Avian Dis. 90: 927-930.
12. Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desaultels, C. and Curtis III, R. (2000): Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. Infect. Immun. 68: 4145-4154.
13. Ginns, C.A., Benham, M.L., Adams, L.M., Whithear, K.G., Bettelheim, K.A., Crabb, B.S. and Browning, G.F. (2000): Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. Infect. Immun. 68: 1535-1541.
14. Ginns, C.A., Browning, G.F., Ben ham, M.L., Anderson, G.A. and Whithear, K.G. (1996): Antimicrobial resistance and epidemiology of *Escherichia coli* in broiler breeder chickens. Avian Pathol. 25: 591-605.
15. Gopee, N.V., Adesiyun, A.A. and Caesar, K. (2000): A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds, and reptiles in Trinidad. J. Zoo Wildl. Med. 31: 353-360.
16. Gross. W.G. (1994): Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Edited by CL Gyles. CAB International, Wallingford, UK. PP: 237-259
17. Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S. and Helmuth, R. (2003): Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. J. Antimicrob. Chemother. 52: 489-92.
18. Lambie, N., Ngeleka, M., Brown, G. and Ryan, J. (2000): Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examinations and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. Avian Dis. 44: 155-160.
19. McEwen, S.A. and Fedorka-Cray, P.J. (2003): Antimicrobial use and resistance in animals. Clin. Infect. Dis. 34 Suppl 3: S93-106.
20. Mellata, M., Bakour, R., Jacquemin, E. and Mainil, J.G. (2001): Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. Avian Dis. 45: 670-679.
21. Mellata, M., Jacquemin, E., Bakour, R. and Mainil, J. (1998): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains of bovine and avian origin isolated in Algeria.

Ann. de Med. Vet. 142: 129-138.

22. Nadeau, M., Cote, G. and Higgins, R. (2000): Surveillance of antibiotic resistance in bacteria isolated from pigs and poultry in Quebec from 1993 to 1999. Med. Vet. du Que. 30: 195-199.

23. Ngeleka M., Brereton L., Brown G., Fairbrother J.M. (2002): Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. Avian Dis. 46: 143-52.

24. Peighambari, S.M., Vaillancourt, J.P., Wilson, R.A. and Gyles, C.L.(1995): Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulites. Avian Dis. 39: 116-124.

25. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1994): Clinical Veterinary Microbiology, Wolf publishing, London. PP: 95-102.

26. Salmon, S.A. and Watts, J.L. (2000): Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults. Avian Dis. 44: 85-98.

27. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001): Molecular Cloning. A laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. PP: 1031-1034 and 504-5017.

28. Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T.R. (2001): Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrob. Agents. 17: 431-437.

29. Sekizaki, T., Nonomura, I. And Imada, Y. (1989): Loss of virulence associated with plasmid curing of chicken pathogenic *Escherichia coli*. Jap. J. Vet. Sci. 51: 659-661.

30. Shane, S.M. (2001): Coliform infections are responsible for heavy losses, part one. World Poult. 17: 58-59.

31. Shane, S.M. (2001): Significant *Escherichia coli* related conditions of poultry, part two. World Poult. 17: 35-37.

32. Spears, K.R., Wooley, R.E., Brown, J. and Nolan, L.K. (1992): Failure of the congo red dye uptake test to discriminate between virulent and avirulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 1012-1014.

33. Stehling, E.G., Yano, T., Brocchi, M. and Silveira, W.D. (2003): Characterization of a plasmid encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrom (SHS). Vet. Microbiol. 95: 111-120.

34. Teuber, M. (2001): Veterinary use and antibiotic resistance. Curr. Opin. Microbiol. 4: 493-499.

35. Tsubokura, M., Matsumoto, A, Otsuki, K., Animas, S.B. and Sanekata, T. (1995): Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from migratory waterfowl. Wildl. Dis. 31: 352-357.

36. Van-den-bogaard, A., London, N., Driessen, C. and Stobberingh, E. (2001): Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemother. 47: 763-71.

37. Vidotto, M.C., Muller, E.E., Freitas, J.C., Alfieri, A.A., Guimaraes, I.G. and Santos, D.S. (1990): Virulence factors of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 34: 531-538.

38. Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K. and Dekich, M.A. (1992): Characteristic of conjugative R-plasmids from pathogenic avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 348-352.

39. Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K. and Fletcher, O.S. (1992): Relation of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian Escherichi coli. Avian Dis. 36: 679-684.

40. Wray C. and Davies R.H. (2002): Colibacillosis. In Poultry Diseases. Edited by F.T.W. Jordan, M. Pattison, D. Alexande, and T. Faragher. 5th ed. W.B. Saunders Company, USA. PP:125-130.