

بررسی شیوع ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اش‌شیاکلی جدا شده از شترمرغ و عفونت ادراری انسان

• حمیدرضا فرزین

بخش تحقیقات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

• ابوالفضل غنی‌ئی

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
• مجید جمشیدیان مجاور (نویسنده مسئول)

بخش تحقیقات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

• محدثه امیری

بخش تحقیقات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.



تاریخ دریافت: ۱۴-۰۸-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۱۱-۱۱-۱۳۹۹

Email: mjmojaver@yahoo.com

چکیده

باکتری اش‌شیاکلی از اعضای مهم فلور طبیعی روده انسان، حیوانات خون گرم و پرندگان می‌باشد. اغلب، عفونت‌های ایجاد شده توسط اش‌شیاکلی به صورت فرصت طلب رخ می‌دهند و از عفونت‌های اصلی و شایع می‌توان به اش‌شیاکلی اوروپاتوژنیک (UPEC) و اش‌شیاکلی بیماریزا در پرندگان (APEC) اشاره نمود. در مطالعه‌ی حاضر، ۳۰ نمونه اش‌شیاکلی خارج روده‌ای از ۳۰ شترمرغ مشکوک به کلی‌سپتی سمی و ۳۰ پلیت حاوی باکتری اش‌شیاکلی از مبتلایان به عفونت ادراری از جمع‌آوری گشت. جدایه‌های مورد مطالعه از نظر ۸ ژن حدت مشترک (*tetA*، *blaTEM*، *sul1*، *aadA1*، *aac(3)-IV* و همچنین ۶ ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی (*astA*، *iss*، *irp2*، *papC*، *iucD*، *tsh*، *vat*، *cva A/B*، *evi*، *cvaC*، *OnRA*، *OnRA*، *OnRA*) بررسی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه در میزان شیوع و فراوانی عوامل حدت بیانگر این بود که بیشترین میزان فراوانی در سویه‌های APEC مربوط به ژن‌های *papC* (۱۶/۶۶ درصد) و *iss* (۲۰ درصد) و در سویه‌های UPEC مربوط به ژن‌های *irp2* (۵۳/۳۳ درصد) و *cva/cvi* (۴۰ درصد) بوده است. همچنین در بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های APEC بیشترین فراوانی مربوط به ژن *aac(3)-IV* (۳۰ درصد) و بیشترین میزان مقاومت مربوط به ژن *aadA1* (۴/۴ درصد) بوده است. با وجود تفاوت‌های ژنتیکی در برخی از عوامل حدت بین دو گروه باکتری‌های مطالعه حاضر، نتایج ما نشان داد که شباهت‌های ژنتیکی عمده‌ای در جدایه‌های باکتری از انسان و شترمرغ وجود دارد. ضروری است مطالعات بیشتری در مورد اهمیت شیوع این عوامل حدت و ژن‌های مقاومت در اپیدمیولوژی و پاتوژنز باکتری در جمعیت انسانی و شترمرغ صورت گیرد.

کلمات کلیدی: اش‌شیاکلی، UPEC، APEC، عوامل حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

• Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 92-100

Investigation of the prevalence of virulence and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from ostriches and human urinary tract infections

By: Farzin, H.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. Ghaniei, A., Department of clinical sciences, Faculty of veterinary medicine, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran. Jamshidian-Mojaver, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. and Amiri, M., Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

Received: 2020-11-04 Accepted: 2021-01-20

Email: mjmojaver@yahoo.com

Escherichia coli is an important member of the natural gut flora of humans, warm-blooded animals and birds. Often, infections caused by *Escherichia coli* occur opportunistically, and the main and most common infections are uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and pathogenic *Escherichia coli* in birds (APEC). In the present study, 30 extra-intestinal *Escherichia coli* samples were collected from 30 ostriches suspected of having septicemia and 30 plates containing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections. The isolates were studied for 8 common virulence genes (*aStA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cva A / B* *cvi* *cvaC*, as well as 6 antibiotic resistance genes (*tetA*, *blaTEM*, *sulI*, *aadA1*, *aac* (3) -IV, *OnRA*) were examined. The results of this study on the prevalence and frequency of virulence factors indicated that the highest frequency in APEC strains was related to *papC* genes (16/66%) and *iss* (20%). In UPEC strains, it was related to *irp2* (53.33%) and *cva A/B* *cvi* *cvaC* (40%) genes. Also, in the study of antibiotic resistance in APEC isolates, the highest frequency was related to *aac* (3) -IV gene (30%) and the highest resistance was to the *aadA1* gene (8.4%). Despite the genetic differences in some virulence factors between the two groups of bacteria in the present study, our results showed that major genetic similarities Bacterial isolates from humans and ostriches, and further studies on the importance of the prevalence of these viruses and resistance genes in the epidemiology and pathogenesis of bacteria in the human and ostrich populations.

Key words: UPEC, APEC, Virulence factors, Antibiotic resistance

رودهای و سویه‌های ایجاد کننده‌ی بیماری‌های خارج روده‌ای دسته‌بندی نمود. سویه‌های ایجاد کننده‌ی بیماری‌های روده‌ای دارای پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (EPEC)، اشریشیاکلی اشریشیاکلی (EPEC)، اشریشیاکلی تولیدکننده‌ی شینگاتوکسین (STEC)، اشریشیاکلی انترواگریگیتیو (EAEC)، اشریشیاکلی انترواینویسیو (EIEC)، اشریشیاکلی چسبنده منتشر (DAEC) و سویه‌های بیماری‌زای غیر روده‌ای (EXPEC) دارای پاتوتیپ‌های سویه ایجاد کننده‌ی عفونت دستگاه ادراری (UPEC)، سویه‌های ایجاد کننده‌ی بیماری در پرندگان (APEC) و عامل مننژیت نوزادان (NMEC) می‌باشند (۱۷،۳). سویه‌های خارج روده‌ای (UPEC) و این پاتوژن دارای عوامل حدتی همچون چسبندگی که به وسیله‌ی فیمبری و فلاژل مانند فیمبری *P* (*papC*) ایجاد می‌شود و همچنین عوامل دیگری از قبیل آئروباکتین (*iucD*)، سیستم جذب آهن (*irp2*)، سیستم افزایش پروتئین بقاء سرم (*iss*)، سیستم توزیع کننده‌ی توکسین (*tsh*)، پروتئین کلی سین (*cva/cvi*)، هموگلوبین حساس به دما (*vat*)

مقدمه

اغلب، باکتری اشریشیاکلی بی‌ضرر یا کم‌حدت بوده و حضور آن به عنوان یک ارگانیسم همزیست در بخش‌های پایینی روده انسان و حیوانات خون گرم برای حفظ سلامت آن‌ها، ضروری می‌باشد (۱۲،۴). اشریشیاکلی ممکن است عفونت‌های فرصت‌طلبی را در مکان‌های خارج روده‌ای مانند مجاری ادراری ایجاد نماید. همچنین، برخی سویه‌ها نیز با داشتن یا کسب عوامل ژنتیکی حدت، جزو عوامل بیماری‌زای اصلی به شمار می‌آیند (۴). سویه‌های بیماری‌زا عواملی دارند که اجازه کلونیزه شدن باکتری در سطوح مخاطی را می‌دهد و پس از آن با کمک آن عوامل، ایجاد آسیب نماید. از عوامل مستعد کننده‌ای که در کلونیزاسیون باکتری نقش دارند می‌توان به سن، وضعیت سیستم ایمنی بدن، تغذیه و در معرض قرار گرفتن سویه‌های با بیماری‌زایی بالا اشاره نمود (۱۰). سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی را می‌توان بر اساس دارا بودن فاکتورهای حدت، محل و نوع آسیب‌زایی شان به دو گروه سویه‌های ایجاد کننده‌ی بیماری‌های

دلایل بروز این مشکل، استفاده‌ی بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام، طیور و در عرصه‌ی پزشکی است (۱). مقاومت می‌تواند در میان باکتری‌های فلور طبیعی (میکروبیوتا) انسان و حیوان سالم رخ دهد (۱۴). استفاده‌ی مداوم از آنتی‌بیوتیک، موجب مرگ باکتری‌های حساس فلور طبیعی بدن می‌شود (۱۰). در چنین شرایطی سویه‌های دارای ژن‌های مقاومت، به فضای بیشتری برای رشد و تکثیر دست خواهند یافت

و انتروتوکسین (*astA*) می‌باشند که تمامی این عوامل حدت سبب بدتر شدن و وخیم شدن بیماری می‌گردند و شرایط مساعد را برای زیستن این پاتوژن در خارج از روده مهیا می‌سازند (۱۳). مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، یکی از چالش‌های مهم در پیشگیری، درمان و کنترل بیماری‌های عفونی است (۱۱). مقاومت‌های دارویی منجر به کاهش تاثیر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر روی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۸). از مهم‌ترین

جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه.

منبع	اندازه محصول (bp)	توالی	نام آغازگر
(۱۶)	۱۱۶	TGCCATCAACACAGTATATCC	<i>astA</i>
		TCAGGTCGCGAGTGACGGC	
	۳۰۹	ATCACATAGGATTCTGCCG	<i>iss</i>
		CAGCGGAGTATAGATGCCA	
	۵۰۱	AACTCCTGATACAGGTGGC	<i>papC</i>
		TGATATCACGCAGTCAGTAGC	
	۷۱۴	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	<i>iucD</i>
		CCTGATCCAGATGATGCTC	
	۸۲۴	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	<i>tsh</i>
		CTCCGATGTTCTGAACGT	
	۹۸۱	TCCTGGGACATAATGGTCAG	<i>Vat</i>
		GTGTCAGAACGGAATTGT	
	۱۱۸۱	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	<i>cva A/B</i> <i>cvi cvaC</i>
		GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	

جدول ۲ - پرایمر های مورد استفاده برای ردیابی ژن های مقاومت ضد میکروبی در این مطالعه.

منبع	اندازه محصول	عوامل آنتی میکروبیال
۲	۵۰۲	<i>tetA</i>
۲	۲۴۷	<i>blaTEM</i>
۲	۴۳۳	<i>Sul1</i>
۲	۴۴۷	<i>aadA1</i>
۲	۲۸۶	<i>aac(3)-IV</i>
۱	۵۸۰	<i>qnrA</i>

(Sugar Iron) (مرک-آلمان)، متیل رد و وگس پروسکوئر (مرک-آلمان) و همچنین رنگ آمیزی گرم بر روی جدایه‌ها صورت پذیرفت (۲۰).

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده گردید؛ در ابتدا به میزان ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل درون میکروتیوب‌های استریل ریخته شد و سپس یک کلنی در آن حل گردید. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه هیتینگ بلاک (اپندورف-آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد، میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت، میکروتیوب‌ها ۲ دقیقه، با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. میکروتیوب‌ها به آرامی از دستگاه خارج شده و ۳۰۰ میکرولیتر از مایعروبی آن‌ها به میکروتیوب‌های استریل جهت انجام PCR منتقل گردید (۱۲).

روش PCR جهت ردیابی ژن‌های حدت مطالعه

جهت شناسایی ژن‌های حدت از پرایمرهای اختصاصی جدول شماره ۱ استفاده گردید. برای تهیه مسترمیکس واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی از مواد مختلفی استفاده شده که نام و غلظت نهایی آن‌ها در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر عبارتند از: مستر میکس آماده (BIOFACT- کره) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای (۱۰۰ pmol) مورد استفاده هر کدام ۰/۱ میکرولیتر (ژن فناوران - ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش استفاده گردید. برای ژن‌های حدت از کنترل‌های مثبت مطالعه امانی و همکاران استفاده گردید همچنین از آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۳).

برنامه دمایی مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های مذکور در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف-آلمان) شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه و پس از اتمام سیکل‌ها ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه؛ پس از اتمام برنامه مربوطه محصولات PCR به ژل آگارز (سیناژن-ایران) ۰/۸ درصد حاوی گرین ویور (پارس توس بیوتکنولوژی) انتقال داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه محصولات PCR الکتروفورز گردید و برای مشاهده‌ی باندهای مربوطه از دستگاه ژل داگ (Optigo ISOGEN) استفاده گردید (۱۶).

روش PCR جهت ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی

برای شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از پرایمرهای اختصاصی جدول ۲ استفاده گردید. برای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از کنترل‌های مثبت مطالعه امیری و همکاران استفاده گردید همچنین از آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۲).

برای تهیه مسترمیکس جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی از مواد مختلفی استفاده شده که نام و غلظت نهایی آن‌ها در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر عبارتند از: مستر میکس آماده (BIOFACT- کره) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمر مورد استفاده هر کدام ۰/۵ میکرولیتر (ژن فناوران - ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های مذکور در دستگاه

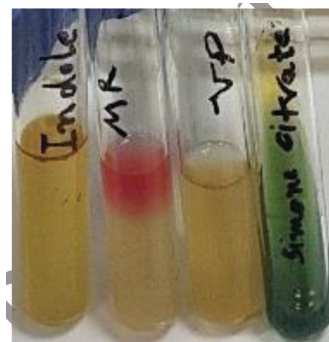
و بعد از مدتی جمعیت غالب میکروبیوتا را تشکیل خواهند داد (۶). با توجه به اهمیت شناخت خصوصیات سویه‌های اشریشیاکلی ایجاد کننده‌ی عفونت ادراری در انسان و سویه‌های بیماری‌زا در پرندگان، مطالعه حاضر به بررسی فراوانی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های خارج روده‌ای APEC و UPEC می‌پردازد.

مواد و روش کار جمع‌آوری و تأیید نمونه‌ها

در مطالعه‌ی حاضر جهت تهیه‌ی سویه‌های UPEC از ۳۰ کشت مثبت عفونت‌های ادراری از آزمایشگاه بیمارستان تامین اجتماعی بجنورد و همچنین جهت تهیه‌ی سویه‌های APEC از خون قلب و کبد ۳۰ شترمرغ مشکوک به کلی سپتی سمی استفاده گردید. نمونه‌های مورد مطالعه در آزمایشگاه بر روی محیط مک کانکی (مرک- آلمان) کشت داده شدند. باکتری‌هایی که در محیط محیط مک کانکی دارای کلنی‌های صورتی و صاف بودند به عنوان جدایه‌های مشکوک به اشریشیاکلی برای هر دو سویه انتخاب شدند. جهت تأیید، آزمایش‌های بیوشیمیایی از قبیل تولید اندول (مرک-آلمان)، مصرف سیترات (مرک آلمان، TSI (Triple



شکل ۱ - نتیجه تست TSI.



شکل ۲ - نتایج تست های بیوشیمیایی.

کننده‌ی ایندول، بدون ایجاد هیدروژن سولفید، دارای حرکت در SIM +MR-مثبت، VP-منفی و فاقد سیراتاز بود، مورد تایید قرار گرفت.

نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به جدایه‌های اشریشیاکلی بدست آمده از موارد عفونت اداری

نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول بوده و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بعد از آن قرار گرفتند (جدول ۳).

نتایج میزان فراوانی ژن‌های حدت مورد مطالعه

نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فراوانی ژن‌های حدت در سویه‌های APEC مربوط به ژن *iss* و کمترین میزان فراوانی مربوط به ژن *vat* (سیستم توزیع کننده‌ی توکسین) بوده است. همچنین در بررسی فراوانی ژن‌های حدت در سویه‌های UPEC بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژن *irp2* (سیستم افزایش پروتئین بقاء سرم) و کمترین میزان فراوانی مربوط به ژن *vat* (سیستم توزیع کننده‌ی توکسین) بوده است. در بررسی ژنوتیپی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های UPEC و APEC، بیشترین میزان مقاومت جدایه در سویه APEC مربوط به ژن

ترموسایکلر (اپندورف-آلمان) صورت پذیرفت (جدول ۱). پس از اتمام برنامه مربوطه محصولات PCR به ژل آگارز (سینا ژن-ایران) ۰/۸ درصد حاوی گرین ویور (پارس توس بیوتکنولوژی) انتقال داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه محصولات PCR الکتروفورز گردید و برای مشاهده‌ی باندهای مربوطه از دستگاه ژل داگ (Optigo ISOGEN) استفاده گردید.

آنالیز آماری

جهت ارزیابی نتایج از نرم‌افزار spss ورژن ۲۲ استفاده گردید. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

از میان ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده‌ی مربوط به عفونت اداری و ۴۰ نمونه خون قلب و کبد شتر مرغ مشکوک به کلی سپتی سمی ۳۰ نمونه از هر دو سویه توسط تست‌های بیوشیمیایی تایید گردید. در محیط مک کانکی، تمامی جدایه‌های اشریشیاکلی، پرگنه‌ی تک، گرد، صورتی تا قرمز با اندازه‌ی متوسط و محدب و تخمیرکننده‌ی لاکتوز ایجاد کرده بودند. در تست‌های بیوشیمیایی، به صورت اسید/اسید (در TSI)، تولید

جدول ۳ - فراوانی مقاومت و حساسیت جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه.

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	۴۰ درصد	۲۰ درصد	۴۰ درصد
جنتامایسین	۷۸ درصد	۲ درصد	۲۰ درصد
کوتریماکسازول	۴۰ درصد	۰ درصد	۶۰ درصد

جدول ۴ - میزان فراوانی ژن‌های حدت مورد مطالعه در جدایه‌های مختلف اشریشیاکلی.

عوامل حدت مورد مطالعه	APEC	UPEC	P value
<i>astA</i>	۱۶/۶۶ درصد	۲۰ درصد	۰/۰۸
<i>iss</i>	۲۰ درصد	۲۲ درصد	۰/۷
<i>irp2</i>	۱۲/۲۳ درصد	۵۲/۲۳ درصد	۰/۰۰۷
<i>papC</i>	۱۶/۶۶ درصد	۲۳/۲۳ درصد	۰/۵۲
<i>iucD</i>	۲۰ درصد	۱۰ درصد	۰/۰۸۳
<i>tsh</i>	۲/۲۳ درصد	۶/۶ درصد	۰/۵۳
<i>vat</i>	۳/۳ درصد	۰ درصد	۰/۳
<i>cvaA/B</i>	۱۰ درصد	۴۰ درصد	۰/۰۳

انتروباکتریاسه در روده انسان، حیوانات خونگرم و پرندگان وجود دارد (۵). اشریشیاکلی اوروپاتوژنیک (UPEC)، شایع‌ترین پاتوژن و همچنین مسئول ۸۵-۵۰ درصد عفونت‌های ادراری در جوامع و بیمارستان‌ها است. این پاتوژن دارای عوامل حدتی چون چسبندگی که به وسیله‌ی فیمبریه نوع ۱، فیمبریه P و فلاژل ایجاد می‌شود و همچنین عوامل دیگری از قبیل همولیزین، آئروباکتین و سیتوتوکسیک‌ها که تمامی این عوامل حدت سبب بدتر شدن و وخیم شدن عفونت می‌گردند. عفونت ایجاد شده توسط این پاتوژن سبب ایجاد تغییرات و نقص در عملکرد کلیه‌ها و

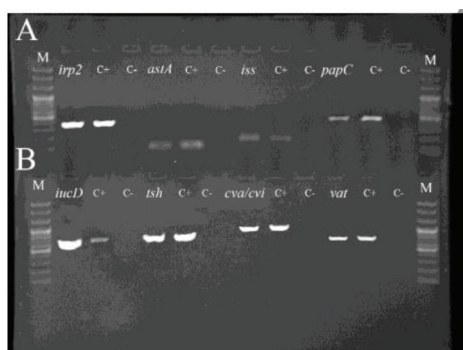
aac(3)-IV (۳۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به ژن *OnRA* (صفر درصد) بود همچنین در بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های UPEC بیشترین میزان مقاومت مربوط به ژن *aadA1* (۸/۴ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به ژن *OnRA* (صفر درصد) بود. (جدول‌های ۴ و ۵) (شکل‌های ۳-۶).

بحث

باکتری اشریشیاکلی به عنوان یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده‌ی

جدول ۵ - میزان فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی مورد مطالعه.

عوامل آنتی میکروبیال	APEC	UPEC	P value
<i>tetA</i>	۲۰ درصد	۳ درصد	۰/۱
<i>blaTEM</i>	۲۰ درصد	۷/۲ درصد	۰/۱۲
<i>Sul1</i>	۱۲/۳۳ درصد	۲/۴ درصد	۰/۸۵
<i>aadA1</i>	۱۰ درصد	۸/۴ درصد	۰/۰۵
<i>aac(3)-IV</i>	۳۰ درصد	۳/۶ درصد	۰/۰۲۰
<i>OnRA</i>	۰ درصد	۰ درصد	



شکل ۳- نتیجه‌ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های حدت *irp2*، *iss*، *astA*، *papC* (ردیف A).

M: نردبان ۱۰۰ جفت بازی (BIOFACT-Korea)؛ ستون شماره ۱ ژن *irp2* (۴۱۳ جفت باز)؛ ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *irp2* (۴۱۳ جفت باز)؛ ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *irp2*؛ ستون شماره ۴ ژن *astA* (۱۱۶ جفت باز)؛ ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *astA* (۱۱۶ جفت باز)؛ ستون شماره ۶ کنترل منفی ژن *astA*؛ ستون شماره ۷ ژن *iss* (۳۰۹ جفت باز)؛ ستون شماره ۸ کنترل مثبت ژن *iss* (۳۰۹ جفت باز)؛ ستون شماره ۹ کنترل منفی ژن *iss*؛ ستون شماره ۱۰ ژن *papC* (۵۰۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۱۱ کنترل مثبت ژن *papC* (۵۰۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۱۲ کنترل منفی ژن *papC*.

تصویر ۳- نتیجه‌ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های حدت *iucD*، *tsh*، *cvaA/B*، *vat* (ردیف B).

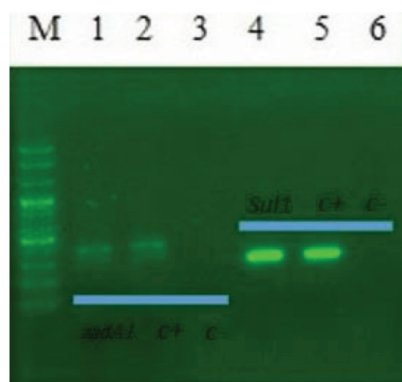
M: نردبان ۱۰۰ جفت بازی (BIOFACT-Korea)؛ ستون شماره ۱ ژن *iucD* (۷۱۴ جفت باز)؛ ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *iucD* (۷۱۴ جفت باز)؛ ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *iucD*؛ ستون شماره ۴ ژن *tsh* (۸۲۴ جفت باز)؛ ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *tsh* (۸۲۴ جفت باز)؛ ستون شماره ۶ کنترل منفی ژن *tsh*؛ ستون شماره ۷ ژن *cva A/B* (۱۱۸۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۸ کنترل مثبت ژن *cva A/B* (۱۱۸۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۹ کنترل منفی ژن *cva A/B*؛ ستون شماره ۱۰ ژن *vat* (۹۸۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۱۱ کنترل مثبت ژن *vat* (۹۸۱ جفت باز)؛ ستون شماره ۱۲ کنترل منفی ژن *vat*.

Rodriguez-Siek و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی شیوع ژن‌های حدت در سویه‌های UPEC و APEC پرداختند. در این مطالعه ژن‌های *cva A/B cvi cvaC* و *iss*، *tsh*، *papC*، *irp2* بیشترین میزان شیوع در سویه‌های APEC مربوط به ژن *iss* (۸۱/۵ درصد) و بیشترین میزان شیوع در سویه‌های UPEC مربوط به ژن *irp2* (۸۳/۵ درصد) بود (۱۷). نتایج حاصل از این مطالعه در بیشترین میزان شیوع ژن‌های حدت در سویه‌های UPEC و APEC با مطالعه‌ی Rodriguez مشابه بوده و در هر دو مطالعه میزان شیوع ژن *iss* برای سویه‌های APEC و ژن *irp2* بالا می‌باشد (۲۲). با توجه به شباهت‌های موجود در ژنوتیپ حدت می‌توان ادعان داشت که طیور می‌توانند به عنوان حامل اشریشیاکلی ایجادکننده‌ی عفونت ادراری مطرح باشند.

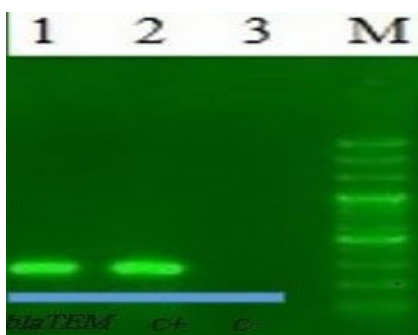
نجفی و همکاران در سال ۲۰۱۹ در کرمانشاه به بررسی شیوع

دستگاه ادراری می‌شود. اشریشیاکلی بیماریزا در پرندگان (APEC)، سبب ایجاد کلی باسیلوز در پرندگان می‌شود. عفونت ایجاد شده باعث درگیری سیستم ایمنی می‌شود. این نوع عفونت با استنشاق گرد و غبار آلوده به مدفوع منجر به سرکوب سیستم ایمنی بدن و آسیب به آن و یا درگیری دستگاه تنفسی می‌گردد (۲۰،۸).

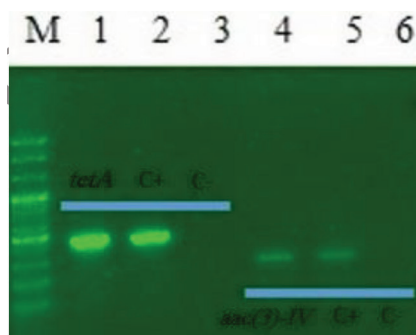
نتایج حاصل از این مطالعه در میزان شیوع و فراوانی عوامل حدت بیانگر این بود که بیشترین میزان فراوانی در سویه‌های APEC مربوط به ژن‌های *papC* (۳۳/۳۳ درصد) و *iss* (۲۰ درصد) و در سویه‌های UPEC مربوط به ژن‌های *irp2* (۵۳/۳۳ درصد) و *cva/cvi* (۴۰ درصد) بوده است. همچنین در بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های APEC بیشترین فراوانی مربوط به ژن *aac(3)-IV* (۳۰ درصد) و بیشترین میزان مقاومت مربوط به ژن *aadA1* (۸/۴ درصد) بوده است.



شکل ۴ - نتیجه‌ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های *aadA1* و *aadA1* (BIOFACT-Korea) ۱۰۰ bp ladder. ستون شماره ۱ ژن *aadA1* (447 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *aadA1*، کنترل منفی ژن *aadA1*، ستون شماره ۳ کنترل مثبت ژن *Sull*، ستون شماره ۴ کنترل منفی ژن *Sull*، ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *Sull*، ستون شماره ۶ کنترل منفی ژن *Sull*.



شکل ۶. *blaTEM* جهت شناسایی ژن PCR نتیجه‌ی آزمایش
M: lad ۱۰۰ bp (BIOFACT-Korea)
ستون شماره ۱ ژن، *blaTEM* (247 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *blaTEM*، ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *blaTEM*



شکل ۵. نتیجه‌ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های *tetA* و *aac(3)-IV*
M: lad ۱۰۰ bp (BIOFACT-Korea)
ستون شماره ۱ ژن *tetA* (502 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *tetA*، ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *tetA*، ستون شماره ۴ ژن *aac(3)-IV* (286 bp)، ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *aac(3)-IV*، ستون شماره ۶ کنترل منفی ژن *aac(3)-IV*

and Genotypic Study of Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Human Urinary Infection Cases in Bojnord Province. *AJCM* 26: 173-180.

3. Amani, F., Hashemitabar, G., Ghaniei, A. et al. 2020. Antimicrobial resistance and virulence genes in the *Escherichia coli* isolates obtained from ostrich. *Trop Anim Health Prod.* 52: 3501-3508

4. Askari, N., Ghanbarpour, R. 2019. Molecular investigation of the colicinogenic *Escherichia coli* strains that are capable of inhibiting *E. coli* O157: H7 in vitro. *BMC* 15: 14-18.

5. Bekal, S., Lin, A., Vincent, A., Berry, C., Gilmour, M., Fournier, É Tremblay, C. 2015. Draft genome sequence of a necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolate. *Genome announcements. ASM* 3: 250-258.

6. Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Denamur, E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental microbiology* 8:1975-1984.

7. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kieβling, S., Alt, K., Antáo, E. M., Böhnke, U. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they. *IJMM* 297: 163-176.

8. Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Martin, C. 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *JCM* 43:6098-6107.

9. Hojati, Z., Zamanzad, B., Hashemzadeh, M., Molaie, R., Ghoslipour, A. 2015. The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. *IJM* 8: 180-186.

10. Jajarmi, M., Ghanbarpour, R., Sharifi, H., Golchin, M. 2015. Distribution pattern of EcoR phylogenetic groups among shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from healthy goats. *Int J Enteric Pathog* 3: 1-27971.

11. Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A. L. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *IJID* 183: 78-88.

12. Jamshidian-Mojaver M, Amiri M, Farzin H. 2020. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolones resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections in Bojnord city. *MJMS* 63: 2335-40

13. Kader, A. A., Kumar, A., Kamath, K. A. 2007. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. *ICHE* 28: 1114-1116.

ژن‌های حدت *iss* و *sfa*، *papG II*، *ompT*، *iutA* و UPEC در سویه‌های APEC پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی نجفی نشان داد که بیشترین میزان شیوع در سویه‌های APEC مربوط به ژن *iss* (۸۹ درصد) و در سویه‌های UPEC مربوط به ژن و *iutA* (۷۴ درصد) بود (۱۸). نتایج حاصل از مطالعه‌ی نجفی و همکاران در میزان فراوانی ژن *iss* دارای مغایرت بسیار زیادی با مطالعه حاضر می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی نجفی و همکاران در میزان فراوانی ژن *iss* دارای مغایرت بسیار زیادی با مطالعه حاضر می‌باشد. از علت‌های تفاوت می‌توان به شیوه‌های پرورش، شرایط آب و هوایی و روش‌های جداسازی باشد اشاره نمود که احتمالاً بر فراوانی‌های حدت در این دو سویه موثر است.

شکوهی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی میزان شیوع ژن‌های *tsh* و *astA*، *iss*، *tsh*، *cvaA/B* در ۱۰۰ جدایه بدست آمده از عفونت ادراری پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که بیشترین میزان شیوع مربوط به ژن *iss* (۴۷ درصد) بوده است و ژن‌های *astA* (۲۹ درصد)، *cvaA/B* (۱۹ درصد)، *vat* (۱۸ درصد) و *tsh* (۱ درصد) بعد از آن قرار گرفته‌اند (۲۳). نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعه‌ی شکوهی و همکاران در ارتباط با میزان شیوع ژن‌های حدت دارای مغایرت می‌باشد که این مغایرت می‌تواند در نتیجه شرایط زیستی این باکتری و سطح بهداشتی متفاوت در دو منطقه در این دو مطالعه را بیانگر باشد.

مشایخی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران به بررسی شیوع ژن‌های حدت *tsh* و *atsA*، *iss*، *irp2*، *vat* در ۱۲۱ بیمار مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان فراوانی متعلق به ژن *iss* (۹ درصد)، *atsA* (۶ درصد)، *irp2* (۴/۵ درصد)، *tsh* (۴/۵ درصد) و *vat* (۳ درصد) بعد از ژن *iss* قرار گرفتند (۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار spss ورژن ۲۲ مورد بررسی قرار گرفت میزان فراوانی ژن *irp2* در سویه‌های UPEC به طور معنی‌داری بالاتر از جدایه‌های APEC بود. همچنین میزان فراوانی تمامی عوامل حدت سویه UPEC مورد مطالعه از APEC به طور معنی‌داری بالاتر می‌باشد لذا بررسی سایر ژن‌های حدت در این دو سویه ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق کشور و پرسنل آزمایشگاه تامین اجتماعی بجنورد که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Amiri, M., Jajarmi, M., Ghanbarpour, R. 2017. Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of qnr genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. *Int J Enteric Pathog* 5:100-105.
2. Amiri, M., Farzin, H., Jamshidian-Mojaver, M. 2019. Phenotypic

- 14) Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpoor M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Tarhriz V, Dormanesh B. 2014. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biotechnology* 12: 32-40.
15. Micenková, L., Bosák, J., Štaudová, B., Kohoutová, D., Čejková, D., Woznicová, V., Šmajš, D. 2016. Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal *Escherichia coli* isolates. *Microbiology Open* 5: 490-498.
16. Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., Sarantuya, J. 2017. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *JIDC* 11: 51-57.
17. Naderi, Z., Ghanbarpour, R., Sami, M. 2016. Antimicrobial resistance characteristics and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in southeast of Iran. *Int J Enteric Pathog* 4: 1-7.
18. Najafi, S., Rahimi, M., Nikousefat, Z. 2019. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian origin: Detection of the most common virulence-encoding genes. *VRF* 10: 43-48.
19. Nateghi, F., Jafarpour, M., Nazemi, A. 2010. A Survey for Detection of Eight Correlated Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Human Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbial World* 3:169-176.
20. Nisa, S., Scanlon, K. M., Donnenberg, M. S. 2013. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*, *Academic Press* 5: 75-119.
21. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. 2012. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary microbiology* 15:300-306.
22. Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., Nolan, L. K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Journal of General Microbiology* 151:2097-2110.
23. Shookohi, M., Rashki, A. 2016. Prevalence of toxigenic genes in *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients in Zabol, Iran. *Int J Enteric Pathog* 4: 1-5.
24. Sun, H., Liu, P., Nolan, L. K., Lamont, S. J. 2015. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) infection alters bone marrow transcriptome in chickens. *BMC genomics* 16: 690-698.

