

شناسایی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های/شریشیالکی جدا شده از عفونت کیسه زرده جوجه‌های گوشتی در اصفهان

حبیب حیدری^۱، سیده ام البنین قاسمیان^{۲*}، مجید غلامی آهنگران^۳

^۱. دانش آموخته گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

^۲. استادیار، گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

^۳. دانشیار، گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

مؤلف مسئول: سیده ام البنین قاسمیان، گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران،

ghasemian1249@yahoo.com

خلاصه

به منظور شناسایی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های/شریشیالکی جدا شده از عفونت کیسه زرده در جوجه‌های گوشتی اصفهان، ۱۰۰ سویه/شریشیالکی از ۲۰ فارم مشکوک به عفونت کیسه زرده در سال ۱۴۰۲ تهیه شد. سویه‌ها با کشت بر روی محیط مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو و نیز انجام تست‌های بیوشیمیایی تایید شدند. در نهایت، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در نهایت با روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) میزان حساسیت آنتی بیوتیکی بررسی شد. سپس با پرایمرهای اختصاصی به شناسایی ژن‌های حدت *fimC*، *hlyF*، *iss* و *iutA* پرداخته شد. نتایج نشان داد از ۱۰۰ نمونه کشت تهیه شده ۶۰ سویه/شریشیالکی در کشت و تست‌های بیوشیمیایی تایید شد. بیشترین درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا شده علیه تتراسایکلین دیده شد. بیشترین فراوانی ژن حدت شناسایی شده در سویه‌های/شریشیالکی جدا شده از عفونت کیسه زرده مربوط به *fimC* بود (۷۰ درصد) در حالیکه *iss* واجد کمترین درصد فراوانی بود (۳۵ درصد). بیشترین ژنوتیپ مشاهده شده *fimC-hlyF-iutA-iss* بود (۳۵/۷۱ درصد) که بالاترین درصد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک تجاری مورد مطالعه را نشان داد (۹۲ درصد). لذا به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های دخیل در عفونت کیسه زرده واجد تنوع بالایی هستند و سویه‌های واجد ژن‌های حدت بیشتر می‌توانند از مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتری برخوردار باشند.

واژه‌های کلیدی: /شریشیالکی، جوجه گوشتی، ژن‌های حدت

مقدمه

اشریشیاکلی یک باکتری گرم منفی و از خانواده/نتروباکتریاسه است که عمدتاً در دستگاه گوارش حیوانات خونگرم شامل انسان و پرندگان رشد و تکثیر می کند. این فلور دستگاه گوارش می تواند در پرندگان موجب بیماری تنفسی و در انسان تحت شرایط خاصی برای دستگاه گوارش بیماری زا باشد (Dziva and Stevens, 2008).

جدایه های بیماری زای اشریشیاکلی در پرندگان می تواند منجر به بروز عوارض مختلفی مانند عفونت کیسه زرده در جوجه های تازه تفریخ شده، سلولیت، کلی سپتی سمی، التهاب مجرای اویداکت در مرغ های تخم گذار و کلی گرانولوما شود و باعث هزینه های آنتی بیوتیک درمانی، کاهش رشد، تلفات و حتی حذف لاشه ها در کشتارگاه شود. عموماً عفونت اشریشیاکلی که تحت عنوان کلی باسیلوز شناخته می شود، می تواند به عنوان یک عفونت ثانویه باعث پیچیده سازی سایر بیماری های ویروسی و باکتریایی در طیور شود (Nolan et al., 2020).

پلاسمید اشریشیاکلی بیماری زا پرندگان، دارای چندین فاکتور حداث مشخص می باشد. اگر چه برخی از این عوامل حداث از اشریشیاکلی جدا شده از پرندگان به ظاهر سالم هم جدا شده است لذا بررسی و الگوی ژن های حداث در جدایه های بیماری زا می تواند در تفریق جدایه های بیماری زا از غیر بیماری زا نقش داشته باشد (Johnson and Stell, 2000). عموماً جدایه های بیماری زا از طریق مکانیسم های مختلفی می توانند در ایجاد بیماری کنند. جدایه های بیماری زای اشریشیاکلی در طیور با عوامل حداث متفاوت منجر به بروز بیماری کلی باسیلوز در طیور می شوند (Janben et al., 2001). عمده این عوامل حداث در اتصال، حمله، حفاظت جدایه ها، کسب آهن در محیط فقر آهن، توکسین ها، ترشح و متابولیسم نقش دارند که می توانند در اتصال باکتری به سلول میزبان، حمله به سلول میزبان، بقا در داخل ماکروفاژهای فاگوسیتوز کننده، کلونی سازی باکتری در بافت میزبان، بقا در جریان خون، تکثیر در بافت میزبان، تکثیر در بافت میزبان، آسیب و تخریب سلول های میزبان، به دست آوردن آهن از مایعات بدن برای رشد، بقا در مقابل فعالیت ضد باکتری سرم، بقا در مقابل اکسیداسیون و استرس های محیطی، حرکت و تولید بیوفیلیم نقش داشته باشند (Roch et al, 2008; Abd El Tawab et al, 2016; Johnson et al, 2008).

در اشریشیاکلی اتصال عمدتاً توسط فیمبریه انجام می شود. ژن های کد کننده فیمبریه مانند *fimC* (فیمبریه تیپ ۱)، *papA*، *papG* و *papC* (فیمبریه P) و *tsh* (هماگلوئینین حساس به حرارت) هستند (Kathayat et al, 2021). آهن یکی از املاح ضروری برای رشد و تکثیر اشریشیاکلی است که این توانایی اشریشیاکلی را از سیستم ایمنی میزبان و سایر شرایط نامساعد محافظت می کند. این فعالیت توسط لیپوپلی ساکارید، کپسول و پروتئین های غشای خارجی انجام می شود. چندین ژن در کد کردن پروتئین های پروتکین نقش دارند. یکی از مهم ترین آنها *iss* است که باعث بقا در مقابل سرم میزبان می شود (Won et al, 2009). توکسین ها سموم

بیولوژیک هستند که باعث حمله و تخریب سلول‌های بافتی می‌شوند. چندین ژن در تولید این سموم نقش دارند که *hlyF*، *hlyE*، *hlyA* (همولیزین‌ها) مهم‌ترین آن‌ها هستند (Roch et al, 2008). هدف از مطالعه اخیر بررسی الگوی ژن‌های حدت مربوط به اتصال، پروتکتین، بقا در شرایط فقر آهن و سم بیولوژیک در جدایه‌های /شریشیاکلی عامل عفونت کیسه زرده در جوجه‌های گوشتی اصفهان است که با ردیابی ژن‌های *hlyF*، *iutA*، *iss*، *fimC* و مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در این پژوهش مقطعی طی مدت یک سال، از فروردین ۱۴۰۲ تا فروردین ۱۴۰۳ از ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی متعلق به ۲۰ فارم جوجه گوشتی واقع در حومه اصفهان (استان اصفهان) نمونه‌گیری شده است. نمونه‌ها به صورت هدفمند و از فارم‌هایی انجام شده که سن زیر ۱۰ روز داشتند و دارای تلفات با تشخیص عفونت کیسه زرده بودند. از هر فارم به طور تصادفی ۵ لاشه جوجه تلف شده در کنار یخ، برای کشت و شناسایی /شریشیاکلی برداشت شد.

شناسایی /شریشیاکلی

به منظور شناسایی باکتری /شریشیاکلی در جوجه‌های تلف شده، تمامی لاشه‌ها در سینی تشریح کالبدگشایی شدند و در کنار شعله با لوپ استریل از کیسه زرده بر روی محیط کشت مک کانگی آگار به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در صورت رویت شدن پرگنه‌های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ)، از پرگنه‌های مشکوک بر روی محیط ائوزین متیلن بلو به صورت کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پرگنه‌های لاکتوز مثبت که بر روی محیط ائوزین متیلن بلو ایجاد جلای سبز فلزی نمودند به صورت اولیه به عنوان باکتری /شریشیاکلی شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه‌ها تست‌های افتراقی IMVIC انجام شد. در صورتیکه از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، وی - پی و احیای سیترات به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی بودند به عنوان /شریشیاکلی شناسایی شدند (Gholami-Ahnagaran and Zia-Jahromi, 2014).

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری جدا شده نسبت به داروهای آنتی‌باکتریال رایج، از روش انتشار دیسکی ساده به روش استاندارد کربی بائر استفاده شد. معمولاً این روش بر اساس انتشار آنتی‌بیوتیک بر روی محیط جامد و ممانعت از رشد باکتری حساس در محوطه حرکت استوار است.

در این آزمون از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک‌های آنتی بیوتیکی شرکت پادتن طب ایران استفاده شد که شامل: انروفلوکساسین (۵ میکروگرم بر دیسک)، سولفانامید (۲۳/۷۵ میکروگرم) + تری متوپریم (۱/۲۵ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، اکسی تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، لینکواسپکتین (۱۵/۲۰۰ میکروگرم بر دیسک)، داکسی سیکلین (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، دیفلوکساسین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، نتومایسین (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، کلستین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم بر دیسک) است.

برای انجام آزمایش انتشار از دیسک، هر جدایه باکتری را بر روی محیط مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. سپس ۴ تا ۵ پرگنه از محیط مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی تریپتیک سوی براث (TSB)، پارس پیوند، ایران) منتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای تهیه کدورت نیم مک فارلند انگوبه شدند. پس از آن با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت تقریباً ۱۰ دقیقه، دیسک‌های آنتی بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انگوبه گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد هر دیسک اندازه‌گیری و در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی CLSI قرائت شد (Horri and Gholami-Ahangaran, 2022).

شناسایی ژن‌های حدت

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت تجاری استخراج ژنوم (سیناژن، ایران) استفاده شد.

مراحل انجام PCR

پس از جداسازی/شریشیالکی و تخلیص ژنوم، ژن‌های حدت دخیل در محافظت باکتری علیه سرم، آئروباکتین، همولیزین و فیمبریه در جدایه‌های شناسایی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش PCR به صورت Multiplex PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده از باکتری و با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) در غلظت ۰/۳ میکرومول، هر کدام از تری فسفات دزوکسی ریبونوکلوئوتیدها (dNTPs، سیناکلون، ایران) در غلظت ۰/۲۵ میلی مول، کلرید منیزیم ۴ میلی مول و آنزیم Taq polymerase (سیناکلون، ایران) به میزان یک واحد استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در PCR شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، و شامل ۲۵ سیکل متوالی به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR رنگ آمیزی شده با safe stain (سیناکلون، ایران) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و با UV doc مشاهده و ثبت شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر اپندورف آلمان انجام شد.

جدول ۱- اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن‌های حدت در/شریشیالکی

منبع	طول قطعه (جفت بازی)	توالی پرایمر	ژن
Janben et al, 2001	۴۹۶	GGTAGAAAATGCCGATGGTG	FimC
		CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	
Johnson et al., 2008	۴۵۰	GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	Hly F
		GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	
Johnson et al., 2008	۳۲۳	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	iss
		AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	
Johnson et al., 2008	۳۰۲	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	iutA
		CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	

نتایج

شناسایی/شریشیکلی

جدایه های مورد بررسی از جهت خصوصیات کشت بر روی محیط مک کانکی و محیط ائوزین متیلن بلو مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تایید، تست های بیوسیمیایی IMViC در مورد آنها انجام شد. تمامی ۶۰ جدایه مورد بررسی با ایجاد رنگ ارغوانی بر روی محیط کشت مک کانکی و ایجاد جلای سبز فلزی بر روی ائوزین متیلن بلو آگار تایید اولیه شدند و تست IMViC را به صورت ایندول مثبت، ام - آر مثبت، وی - پی منفی و سیترات منفی نشان دادند.

نتایج آنتی بیوگرام

پس از تایید باکتری و انجام آنتی بیوگرام، جدایه های مورد نظر کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به جنتامایسین (۱۵ درصد) و بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین (۶۵ درصد) نشان دادند.

جدول ۲- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ۶۰ سویه/شریشیکلی جدا شده از عفونت کیسه زرده در جوجه های گوشتی

اصفهان

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
-------------	-------	-----------	------

فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
۵	۸/۳۳	۱۷	۲۸/۳۳	۳۸	۶۳/۳۳	انروفلوکساسین
۱۵	۲۵	۱۲	۲۰	۳۳	۵۵	سولفانامید+ تری متوپریم
۱۹	۳۱/۶۶	۹	۱۵	۳۲	۵۳/۳۳	فلورفنیکل
۱۰	۱۶/۶۶	۱۱	۱۸/۳۳	۳۹	۶۵	تتراسایکلین
۱۰	۱۶/۶۶	۱۳	۲۱/۶۶	۳۷	۶۱/۶۶	آمپی سیلین
۴۶	۷۶/۶۶	۵	۸/۳۳	۹	۱۵	جنتامایسین
۱۵	۲۵	۱۵	۲۵	۳۰	۵۰	نئومایسین
۲۵	۴۱/۶۶	۱۵	۲۵	۲۰	۳۳/۳۳	لینکواسپکتین
۱۰	۱۶/۶۶	۱۳	۲۱/۶۶	۳۷	۶۱/۶۶	اکسی تتراسایکلین
۱۲	۲۰	۱۳	۲۱/۶۶	۲۵	۴۱/۶۶	کلرامفنیکل
۱۰	۱۶/۶۶	۱۳	۲۱/۶۶	۳۷	۶۱/۶۶	کلستین
۲۰	۳۳/۳۳	۱۷	۲۸/۳۳	۲۳	۳۸/۳۳	دیفلوکساسین
۲۵	۴۱/۶۶	۱۵	۲۵	۲۰	۳۳/۳۳	داکسی سیکلین

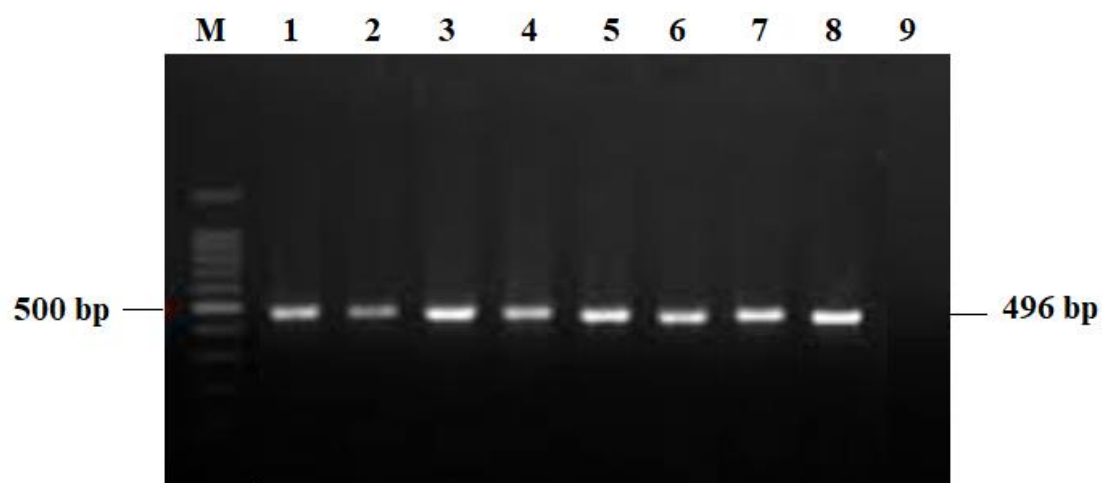
ردیابی ژن‌های حدت

الکتروفورز محصول PCR نشان داد ۴۲، ۳۰، ۳۰ و ۲۱ سویه از ۶۰ جدایه مورد بررسی توانستند قطعات ۴۹۶ (شکل ۱)، ۴۵۰ (شکل ۲)، ۳۰۲ (شکل ۳) و ۳۲۳ (شکل ۴) جفت بازی را تکثیر کنند و به ترتیب، حامل ژن های *hlyF*، *iutA* و *iss* باشند. به عبارتی، ۷۰ درصد جدایه‌ها حاوی ژن *hlyF*، ۵۰ درصد جدایه‌ها حاوی ژن *hlyF*، ۵۰ درصد جدایه‌ها حاوی ژن *iutA* و ۳۵ درصد جدایه‌ها حامل ژن *iss* بودند.

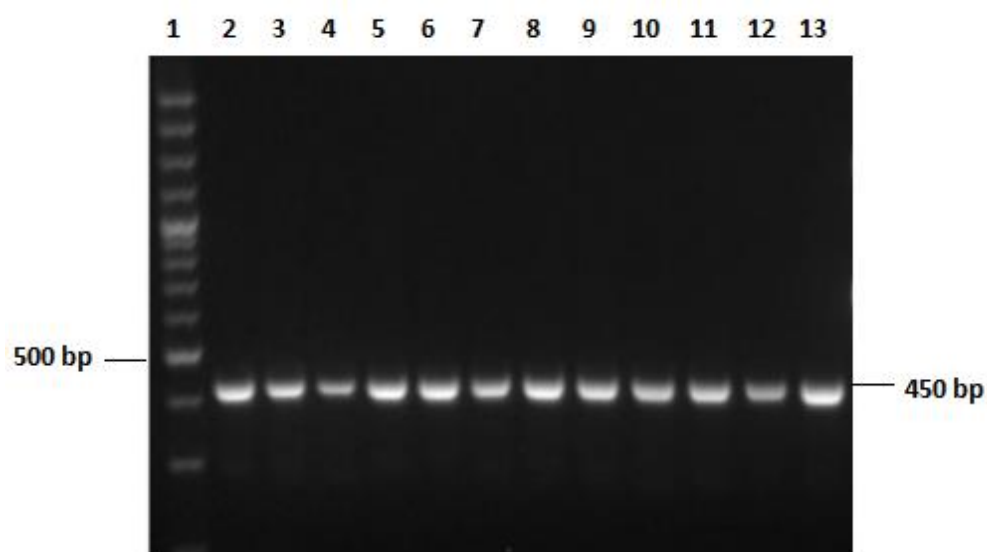
جدول ۳- فراوانی ژن‌های حدت در ۶۰ سویه/شریشی‌کلی جدا شده از موارد عفونت کیسه زرده

ژن حدت	فراوانی	درصد
<i>hlyF</i>	۴۲	۷۰
<i>iss</i>	۲۱	۳۵

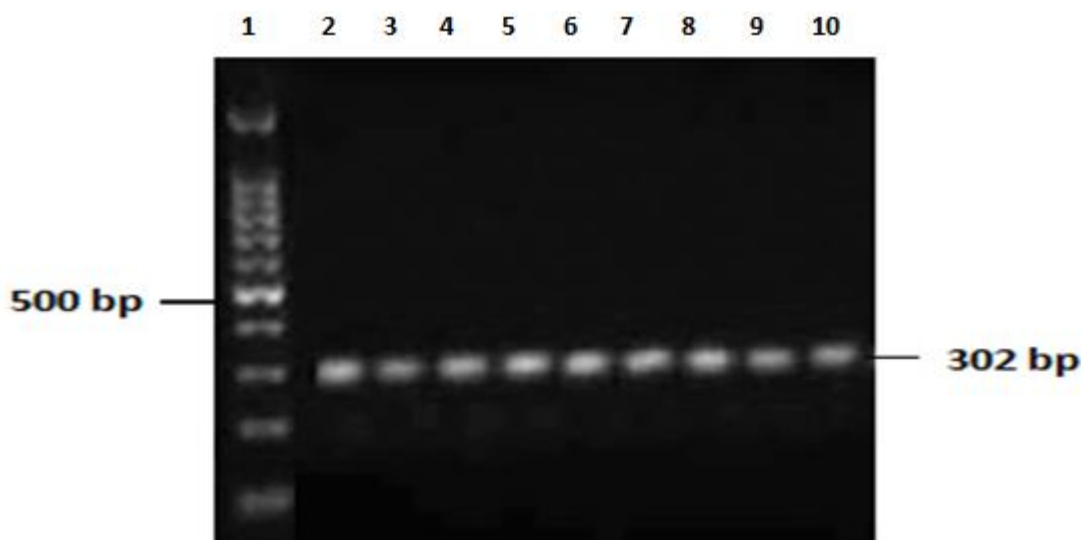
۵۰	۳۰	<i>hlyF</i>
۵۰	۳۰	<i>iutA</i>



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *fimC* (نمونه‌های مثبت ۴۹۶ جفت بازی).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *hlyF* (نمونه‌های مثبت ۴۵۰ جفت بازی).



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *iutA* (نمونه‌های مثبت ۳۰۲ جفت بازی).



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *iss* (نمونه‌های مثبت ۳۲۳ جفت بازی).

بررسی الگوهای ژنوتیپی ژن‌های حدت در جدایه‌ها نشان داد بیشترین فراوانی (۱۵ جدایه، ۳۵/۷۱ درصد) الگوی *fimC-hlyF-iss-iutA* را نشان دادند. سایر الگوهای مشاهده شده به همراه فراوانی آن‌ها در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴- الگوهای ژنوتیپی ژن‌های حدت در جدایه‌های/شریشیالکی جدا شده از عفونت کیسه زرده

الگو	فراوانی	درصد
<i>fimC-hlyF-iss-iutA</i>	۱۵	۳۵/۷۱
<i>fimC-hlyF-iss</i>	۳	۷/۱۴

۲۱/۴۲	۹	<i>fimC-hlyF -iutA</i>
۷/۱۴	۳	<i>fimC -iss-iutA</i>
۷/۱۴	۳	<i>fimC -iutA</i>
۷/۱۴	۳	<i>fimC-hlyF</i>
۱۴/۲۸	۶	<i>fimC</i>

علاوه بر آن، بیشترین فراوانی و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌هایی مشاهده شد که به‌طور همزمان ژن‌های حدت *fimC-hlyF-iss-iutA* را داشتند. در این الگوی ژنوتیپی ۹۲/۳۰ درصد جدایه‌ها نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک تجاری مطالعه شده مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند در حالی که کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌ها دیده شد که فقط حامل ژن حدت *fimC* بودند. به عبارتی ۵۱/۲۸ درصد جدایه‌های حامل ژن *fimC* به‌طور همزمان نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک تجاری مطالعه شده مقاومت نشان دادند. فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در الگوهای مختلف ژنوتیپی در جدول ۵ آمده است.

جدول ۵- فراوانی و درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در الگوهای مختلف ژن‌های حدت

الگو	فراوانی جدایه‌ها	فراوانی مقاومت نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک تجاری	درصد مقاومت نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک تجاری
<i>fimC-hlyF-iss-iutA</i>	۱۵	۱۸۰	۹۲/۳۰
<i>fimC-hlyF-iss</i>	۳	۳۵	۸۹/۷۴
<i>fimC-hlyF -iutA</i>	۹	۱۰۵	۸۹/۷۴
<i>fimC -iss-iutA</i>	۳	۳۳	۸۴/۶۱
<i>fimC -iutA</i>	۳	۳۰	۷۶/۹۲
<i>fimC-hlyF</i>	۳	۲۶	۶۶/۶۶
<i>fimC</i>	۶	۴۰	۵۱/۲۸
فاقد ژن های حدت	۱۲	۱۲	۷/۷

جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زا در انسان و حیوانات تحت عنوان/شریشیکلی بیماری‌زای خارج روده‌ای مطرح می‌شوند که می‌تواند در انسان و حیوانات باعث سپتی سمی شوند. در انسان عمدتاً در ایجاد عفونت دستگاه ادراری و مننژیت نوزادان نقش دارند (Dziva and Stevens, 2008). ارزیابی و تعیین فراوانی ژن‌های حدت در جدایه‌های بیماری‌زای/شریشیکلی، نقش این ژن‌ها را در ایجاد بیماری مشخص کرده و در تفریق و گروه بندی جدایه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا کمک می‌کند. بنابراین شناخت ژن‌های حدت در هر ضایعه می‌تواند به روشن سازی ارتباط بین ژن‌های حدت و ایجاد یک ضایعه کمک کند (Johar et al, 2021).

ژن‌های اصلی حدت جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زا به ۵ دسته دخیل در چسبیدن، تهاجم، کسب آهن، محافظت در برابر سرم و تولید توکسین تقسیم می‌شود. فاکتورهای دخیل در چسبیدن شامل اجزای سطح سلول می‌باشند که باعث چسبیدن باکتری به سطح سلول می‌شوند (Gregova et al., 2012). چسبیدن برای کلونیزاسیون لازم است و مرحله لازم برای بیماری‌زایی یا عفونت باکتریایی است. در/شریشیکلی چسبیدن توسط فیمبریه نوع یک، فیمبریه P و فیمبریه S تسهیل می‌شود. چندین ژن در این فرایند نقش دارند که *fimH* و *fimC* (از نوع فیمبریه نوع ۱) هستند. فیمبریه تیپ ۱ در چسبیدن باکتری به سلول‌های پوششی یا تنفسی در مراحل اولیه عفونت نقش دارد در حالی که فیمبریه P و فیمبریه S در مراحل آخر عفونت نقش دارند (Kim et al, 2020). در مطالعه حاضر، در بین ژن‌های حدت مورد بررسی بیشترین فراوانی ژن حدت مربوط به *fimC* مشاهده شده است (۷۰ درصد). مرور مطالعات قبلی نشان می‌دهد این ژن حدت در جدایه‌های غیربیماری‌زا نیز به کرات مشاهده و گزارش شده است (Joeng et al, 2013) که نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط این ژن با بیماری‌زایی جدایه‌های/شریشیکلی است. با این حال مشاهده *fimC* در جدایه‌های بیماری‌زا به عنوان یک فاکتور اساسی در کلونیزاسیون باکتری محسوب می‌شود و لازمه بیماری‌زایی جدایه‌های پاتوژنیک است.

پروتکتین‌ها در حفظ باکتری از سیستم ایمنی میزبان نقش دارند. کپسول باکتری، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی ساکارید، باکتری را از فاگوسیتوز ماکروفاژی و اثرات سیستم کمپلمان محافظت می‌کند. چندین ژن در ایجاد این فرایند نقش دارند که ژن بقای سرمی (iss) یکی از مهمترین آن‌ها است و باعث حفاظت باکتری در مقابل سرم می‌شود (Janben et al, 2001). یکی از دلایل سپتی سمی در جدایه‌های بیماری‌زای/شریشیکلی توانایی بقای این باکتری در مقابل عوامل کمپلمان و حفظ شدن باکتری در داخل خون است لذا مقاومت سرمی جدایه‌های/شریشیکلی نقش اساسی در بروز بیماری‌زایی این جدایه‌ها دارد. باکتری‌های سپتی سمیک از طریق چندین فاکتور سطح تحمل در مقابل عوامل کمپلمان را افزایش می‌دهند (Johnson et al, 2008). عملکرد ژن بقای سرمی با مقاومت در مقابل کمپلمان و مرگ و میر جنینی ارتباط دارد لذا به نظر می‌رسد بیان این ژن می‌تواند با بیماری‌زایی جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زا ارتباط داشته باشد. بیان ژن iss در ۶۰ درصد جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زای عامل عفونت ادراری و مننژیت در نوزادان اهمیت این ژن حدت در بیماری‌زایی جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زا در عفونت‌های انسانی را نشان می‌دهد (Hussein and Hussein, 2022). قبلاً کلونیزاسیون ژن iss در جزایر بیماری‌زایی (Pathogenicity islands, PAIs) روی پلاسمید کد کننده کلیسین (Col V/BM) در جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زای طیور اثبات شده است. نتایج مطالعات مختلف حضور ژن iss را در درصد بالایی از جدایه‌های/شریشیکلی بیماری‌زای طیور نشان می‌دهد (Delicato et al, 2003; Janben et al, 2001). در مطالعات مختلف درصد موارد iss ردیابی شده متفاوت است. در ضایعات مختلف ناشی از APEC از ۳۸/۵ درصد در برزیل (Delicato et al, 2003) تا ۸۲/۷ درصد در آلمان (Janben et al, 2001) متفاوت گزارش شده است. در مطالعه حاضر نیز میزان ردیابی ژن iss در موارد عفونت کیسه زرده ۳۵ درصد گزارش می‌شود که درصد ردیابی نسبت به سایر گزارش‌ها کمتر است و به گزارش Delicato و همکاران (۲۰۰۳) از برزیل نزدیک تر است. اگرچه عفونت کیسه زرده در فرم اولیه بیماری یک عفونت موضعی در

پرندهگان محسوب می‌شود اما وجود این ژن در توانایی باکتری در ایجاد یک عفونت خونی و بقای باکتری در خون نقش مهمی دارد که عمدتاً به دنبال عفونت موضعی مشاهده می‌شود.

توکسین‌ها از جمله فاکتورهای حدت باکتری‌ها هستند که با حمله و آسیب سلولی باعث جراحت می‌شوند. چندین ژن وجود دارد که محصول نهایی آنها سموم بیولوژیک است که از جمله می‌توان به توکسین واکوئوله کننده سلولی (*vac*)، توکسین کشنده (*cdtb*)، شینگاتوکسین (*stx*)، اندوتوکسین مقاوم به حرارت (*ast*) و همولیزین (*hly*) اشاره کرد. مطالعات مختلف نشان داده است (Murase et al, 2016) این فاکتور حدت در بین جدایه‌های /شریشیالکی بیماری‌زای طیور و جدایه‌های /شریشیالکی موارد عفونت ادراری در انسان مشترک است لذا جدایه‌های /شریشیالکی واجد *hly* می‌توانند در ایجاد بیماری‌های مرتبط با UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*) نقش داشته باشند و به عنوان یک عامل زئونوز مطرح می‌باشند (Janben et al, 2001). با توجه به اهمیت این فاکتور حدت در عفونت‌های انسانی، بررسی مطالعات مختلف در طیور نشان می‌دهد که ردیابی ژن حدت همولیزین به طور معنی‌دار در جدایه‌های بیماری‌زای طیور بیشتر از جدایه‌های فلور گوارشی غیربیماری‌زا است (Johnson and Stell, 2000; Li et al., 2015). در مطالعات مختلف میزان ردیابی ژن *hly* بین ۵۹/۳ تا ۸۰/۴ درصد گزارش شده است و به نظر می‌رسد پس از وجود فیمبریه بیشترین شیوع را در جدایه‌های /شریشیالکی بیماری‌زای طیور داشته باشند. به‌طوری که Jeong و همکاران (۲۰۱۳) با آنالیز ۱۰۱ سویه جدا شده از ماکیان بیمار و ارزیابی ژن *hly* بیان کردند *hlyF* در ۸۷/۱ درصد جدایه‌ها ردیابی شد (Joeng et al., 2013). همچنین حسین و حسین (۲۰۲۲) ردیابی ۹۰ درصدی جدایه‌ها /شریشیالکی بیماری‌زای طیور با ژن *hlyF* را نشان دادند (Hussein and Hussein, 2022) و Radwan و همکاران (۲۰۱۴) آلودگی بالای ۸۰ درصد جدایه‌های واجد ژن *hlyF* را گزارش کردند (Radwan et al, 2014). در مطالعه اخیر نیز ژن *hlyF* در ۵۰ درصد جدایه‌های /شریشیالکی جدا شده از عفونت کیسه زرده ردیابی شده است که پس از *fimC* بالاترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. درصد بالای ردیابی ژن *hlyF* نشان می‌دهد جدایه‌های عامل عفونت کیسه زرده با تولید همولیزین از بیماری‌زایی بالایی برخوردار هستند.

آهن یکی از مواد غذایی مورد نیاز برای رشد باکتری و کلونیزاسیون و یا تهاجم موفق به سلول میزبان است. /شریشیالکی بیماری‌زای پرندهگان (Avain Pathogenic *Escherichia coli*; APEC) سیستم‌های مختلفی برای تامین آهن دارد که یکی از این سیستم‌ها سیدوفورهای چندگانه (مانند آئروباکترین) است که ژن *iutA* تحت عنوان ژن اصلی دخیل در تولید آئروباکترین مطرح است (Johnson and Stell, 2000). آئروباکترین یک پروتئین چند عملکردی است که با اتصال باعث بروز سایر فاکتورهای حدت می‌شود (Murase et al, 2016). در خصوص ردیابی ژن *iutA* در جدایه‌های /شریشیالکی، Delicato و همکاران در سال ۲۰۰۳ ژن *iutA* را در جدایه‌های جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور و مدفوع پرندهگان سالم ردیابی کردند و بیان کردند که به‌طور معنی‌دار به میزان بالاتری در جدایه‌های بیماری‌زای /شریشیالکی قابل ردیابی است (Delicato et al., 2003). در خصوص فراوانی ژن *iutA* در جدایه‌های /شریشیالکی بیماری‌زای طیور گزارشات متفاوتی وجود دارد. در برخی گزارشات ردیابی ۱۰۰ درصدی بیان شده است (Trampel et al, 2008; Varga et al, 2018) در حالی که در برخی گزارشات فراوانی بسیار کمتری گزارش شده است به‌طوری که Won و همکاران در سال ۲۰۰۹ آلودگی ۵۰ درصدی (Won et al, 2009) و Rocha و همکاران در سال ۲۰۰۸ آلودگی ۴۵/۹ درصدی را بیان کرده اند که با یافته ۵۰ درصد آلودگی (Roch et al., 2008) در مطالعه اخیر مطابقت دارد. درصد کمتر آئروباکترین در مطالعه اخیر می‌تواند نشان‌دهنده توان بیماری‌زای کمتر جدایه‌های /شریشیالکی مولد عفونت کیسه زرده در مقایسه با جدایه‌های سیتی سمیک باشد. از آنجایی که سویه‌های مولد عفونت کیسه زرده به شکل موضعی قادر به عفونت هستند (Guabira and Schouler, 2015) و درصدی از

این جدایه‌ها سبکی می‌شوند درصد ردیابی پایین‌تر در عفونت کیسه زرده نسبت به گزارشات مشابه در خصوص موارد سبکی سمیک را می‌تواند توجیه کند.

در خصوص همزمانی ژن‌های حدت در جدایه‌های مورد بررسی، بیشترین درصد الگوی ژنوتیپی ژن‌های حدت در همزمانی چهار ژن *fimC-hlyF-iss-iutA* دیده شده است (۳۵/۷۱ درصد) و الگوی ژنوتیپی *iutA-iss* در هیچ یک از جدایه‌های مورد بررسی دیده نشد. در مطالعه Varga و همکاران نیز ژنوتیپ *iutA-iss* دیده نشد (Varga et al, 2018) اما در جدایه‌های ردیابی شده توسط نیک پیران و همکاران (۱۳۹۷) در ایران، ۳۷ درصد جدایه‌ها به‌طور همزمان این دو ژن را دارا بودند. در اکثر جدایه‌های ردیابی شده واجد ژن حدت، ژن *fimC* مشاهده شده است و فقط در ۶ جدایه (۱۴/۲۸ درصد) ژن *fimC* به شکل تنهایی دیده شده است (Nikpiran et al., 2018). همزمانی ژن حدت *fimC* با سایر ژن‌های حدت نشان‌دهنده لازمه وجود ژن *fimC* در بروز و بیان سایر ژن حدت و توان بالقوه بیماری‌زایی جدایه‌ها می‌باشد. در مطالعه اخیر در ۳۰ جدایه از ۴۲ جدایه واجد ژن‌های حدت (۷۱/۴۲ درصد)، حداقل ۳ ژن حدت به‌طور همزمان مشاهده شد. در مطالعه Varga و همکاران (۲۰۱۸) نیز ۹۴ درصد جدایه‌های/شریشیالکی جدا شده از موارد کلی باسیلوز واجد حداقل ۳ ژن حدت بودند (Varga et al, 2018).

بررسی مقاومت دارویی در جدایه‌های/شریشیالکی مولد عفونت کیسه زرده نشان‌دهنده گستردگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های/شریشیالکی جدا شده از جوجه‌های گوشتی است که منجر به انتشار جدایه‌های مقاوم و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سنین بالاتر و حتی میزبان‌های اصلی مصرف کننده گوشت طیور از طریق آلودگی‌های متقاطع می‌شود (Suarez-Prez et al, 2021). در این میان مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک در مزارع مرغ مادر و امکان انتقال افقی و عمودی ژن‌های مقاومت باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی اکتسابی در جوجه‌های تازه تفریخ شده است که باعث بقا و دوام جدایه‌های مقاوم در محیط مرغداری و عدم پاسخ به درمان مناسب در سنین بالاتر می‌شود (Shahiri et al., 2018). در میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بیشترین مقاومت دارویی علیه تتراسایکلین مشاهده شده است. مصرف گسترده تتراسایکلین در دوز پیشگیری در فارم‌های مرغ مادر به دلیل کنترل آلودگی‌های خفیف باکتریایی به صورت دوره‌های متوالی در طول دوره پرورش می‌تواند (Gholami-Ahangaran et al., 2021) توجیه کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در موارد عفونت کیسه زرده در جوجه‌های تازه تفریخ شده باشد. از طرفی مصرف محدود جنتامایسین در فارم‌های پرورش طیور توجیه کننده حداقل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های/شریشیالکی جدا شده از موارد عفونت کیسه زرده است. مطالعات خارج از کشور نیز نشان می‌دهد که تتراسایکلین در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است. در بررسی Sigirci و همکاران (۲۰۲۰) در ترکیه، Horn و همکاران (۲۰۱۵) در ایتالیا و Suarez Perez و همکاران (۲۰۲۱) در مکزیک نیز بیشترین مقاومت در جدایه‌های/شریشیالکی نسبت به تتراسایکلین گزارش کردند.

مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های واجد ژن‌های حدت نشان می‌دهد بیشترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌هایی مشاهده شده است که تمامی ژن‌های حدت مورد بررسی را به‌طور همزمان دارا بودند به عبارتی ۹۲/۳۰ درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های/شریشیالکی واجد الگوی ژنوتیپی *fimC-hlyF-iss-iutA* مشاهده شد. به نظر می‌رسد حضور همزمان ژن‌های مقاومت و ژن‌های حدت بر روی پلاسمید باکتری می‌تواند علت حضور مقاومت بالا در جدایه‌هایی باشد که واجد چند ژن حدت به طور همزمان باشند. بروز کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۱۶ جدایه فاقد هر گونه ژن حدت (۷/۷ درصد) می‌تواند صحتی بر این یافته باشد.

به‌طور کلی، براساس داده‌های موجود انتقال ژن‌های حدت به صورت افقی در جدایه‌های/شریشیالکی امکان پذیر است و موجب تنوع بالای ژنوتیپی جدایه‌های/شریشیالکی بیماری‌زا می‌شود. هر چند علاوه بر انتقال افقی، موتاسیون هم در ایجاد این تنوع ژنتیکی موثر است اما تغییر حدت و تنوع بیماری‌زایی جدایه‌ها به دنبال انتقال افقی ژن‌های حدت نیاز به مطالعات گسترده ای دارد. به‌هر حال تنوع و الگوهای متفاوت ژن‌های حدت در سوبه‌های جدا شده از عفونت کیسه زرده به همراه مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی نشان‌دهنده تنوع بیماری‌زایی/شریشیالکی و تنوع توان اثرگذاری آنتی بیوتیک‌های تجاری بر جدایه‌های مولد عفونت کیسه زرده است که منجر به بروز ضایعات و تلفات متنوع، و پاسخ متفاوت در درمان عفونت کیسه زرده می‌شود. ردیابی ژن‌های حدت متفاوت در عفونت کیسه زرده نشان‌دهنده تاثیر ژن‌های متفاوت در بیماری‌زایی جدایه‌های مولد عفونت کیسه زرده است. از طرفی ردیابی جدایه‌های فاقد ژن‌های حدت مورد بررسی نشان از تاثیر سایر ژن‌های حدت است که در مطالعه اخیر مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

منابع

- Abd El Tawab, A. A., El-Hofy, F. I., Ammar, A. M., & Abdel Galil, N. M. (2016). Molecular screening of virulence genes in avian pathogenic escherichia coli. *Benha Veterinary Medical Journal*, 30(1), 137-149.
- Delicato, E.R., Guimaraes, D.B.B., Gaziri, L.C. J., & Vidotto, M. C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 94(2), 97-103.
- Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366.
- Gholami-Ahangaran, M., Karimi-Dehkordi, M., Miranzadeh-Mahabadi, E., & Ahmadi-Dastgerdi, A. (2021). The frequency of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic pet birds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, doi: 10.22099/ijvr.2021.38454.5592
- Gholami-Ahangaran, M., & Zia-Jahromi, N. (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). *Toxicology and Industrial Health*, 30(8), 724-727.
- Gregova, G., Kmetova, M., Kmet, V., Venglovsky, J., & Feher, A. (2012). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19, 75-7.
- Guabiraba, R., & Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), fmv118.
- Horn, R.V., Cardoso, W.M., Lopes, E.S., Teixeira, R.S., Albuquerque, Á.H., Rocha-e-Silva, R.C., & Bezerra, W.G., (2015). Identification and antimicrobial resistance of members from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 552-556.
- Horri, M., & Gholami-Ahangaran, M. (2022). Phenotypic and Genotypic Characterization of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Suspected Colibacillosis in Isfahan Province, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 8(3), 193-201.
- Hussein, K. A., & Hussein, A. N. (2022). Phenotypic and genotypic characterization of the hemolysin enzyme produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2398, No. 1). AIP Publishing.
- Janben, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 371-378.
- Jeong, K. C., Hiki, O., Kang, M. Y., Park, D., & Kaspar, C. W. (2013). Prevalent and persistent *Escherichia coli* O157: H7 strains on farms are selected by bovine passage. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 912-920.
- Johar, A., Al-Thani, N., Al-Hadidi, S. H., Dlissi, E., Mahmoud, M. H., & Eltai, N. O. (2021). Antibiotic resistance and virulence gene patterns associated with avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Qatar. *Antibiotics*, 10(5), 564.

- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 3987-3996.
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*, 10(4), 467.
- Kim, Y. B., Yoon, M. Y., Ha, J. S., Seo, K. W., Noh, E. B., Son, S. H., & Lee, Y. J. (2020). Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. *Poultry Science*, 99(2), 1088-1095.
- Li, Y., Chen, L., Wu, X., & Huo, S. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry science*, 94(4), 601-611.
- Mahmud, Z., Shabnam, S. A., Mishu, I. D., Sadique, A., Islam, L. N., & Alam, M. (2024). Unveiling the spectrum of antibiotic resistance and virulence genes in *Escherichia coli*: A comparative study of clinical and environmental isolates. *Gene Reports*, 101987.
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., & Oswald, E. (2016). HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. *The Journal of infectious diseases*, 213(5), 856-865.
- Nikpiran, H., Peighambari, M., & Abdi, A. (2018). The frequency of *tsh*, *iutA* and *iss* in *Escherichia coli* strains suspected to colibacillosis, *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 14 (4), 106-114 (In Persian).
- Nolan, L.K. Vaillancourt, J. Barbieri, N.L. & Logue, C.M. (2020). Colibacillosis. In: Swayne, DE; Boulianne, M; Logue, CM; McDougald, LR; Nair, V and Suarez, DL (Eds.), *Disease of Poultry*. (14th Edn.), Massachusetts, W.B. Publishing. PP. 770-790.
- Radwan, I.A., Hassan, H.S., Abd-Alwanis, S.A., & Yahia, M.A. (2014). Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chicken. *International Journal of Advanced Research*, 2(12), 867-874.
- Rocha, A. C., Rocha, S. L., Lima-Rosa, C. A., Souza, G. F., Moraes, H. L., Salle, F. O., ... & Salle, C. T. (2008). Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28, 183-186.
- Shahiri, M.R., Gholami_ahangaran, M., & Rahimi, E. (2018). The comparison of antibiotic resistance pattern in *Escherichia coli* strains, isolated from chickens reared on conventional and without antibiotic consumption. *Iranian Journal of Food Microbiology*, 5 (2), 11-18 (In Persian).
- Sigirci, B. D., Celik, B., Halac, B., Adiguzel, M. C., Kekec, I., Metiner, K., ... & Kahraman, B. B. (2020). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from companion birds. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1069-1073.
- Suárez-Pérez, A., Corbera, J. A., González-Martín, M., & Tejedor-Junco, M. T. (2021). Multidrug-Resistant Phenotypes of *Escherichia coli* Isolates in Wild Canarian Egyptian Vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). *Animals*, 11(06), 1692.
- Trampel Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T., & Coloe, P.J. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 217-223.
- Varga, C., Brash, M. L., Slavic, D., Boerlin, P., Ouckama, R., Weis, A., & Guerin, M. T. (2018). Evaluating virulence-associated genes and antimicrobial resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *Avian Diseases*, 62(3), 291-299.
- Won, G. Y., Moon, B. M., Oh, I. G., Matsuda, K., Chaudhari, A. A., Hur, J., ... & Lee, J. H. (2009). Profiles of virulence-associated genes of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chickens with colibacillosis. *The journal of poultry science*, 46(3), 260-266.

Identification of Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Escherichia coli* Strains Causing Yolk Sac Infection in Broiler Chickens in Isfahan, Iran

Habib Heidari¹, Seyedeh Ommolbanin Ghasemian^{2*}, Majid Gholami-Ahangaran³

1. Graduated of Veterinary Department, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
2. Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: Seyedeh Ommolbanin Ghasemian, Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran, ghasemian1239@yahoo.com

Abstract:

To identify virulence and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* (*E. coli*) strains responsible for yolk sac infection in broiler chickens in Isfahan (Center of Iran), 100 culture samples were collected from the of yolk sacs from 20 farms suspected of yolk sac infection. The samples were cultured on MacConkey and EMB agar, and confirmed with biochemical tests. The isolates were then cultured on Mueller Hinton agar and subjected to antibiogram testing using commercial antibiotic discs. Specific primers were used to detect the virulence genes *fimC*, *hlyF*, *iss*, and *iutA*. The results revealed that out of the 100 cultured samples, 60 *E. coli* strains were confirmed through culture and biochemical tests. The highest percentage of antibiotic resistance among the isolated strains was observed against tetracycline. The most frequently identified virulence gene in *E. coli* strains isolated from yolk sac infections was *fimC* (70%), while *iss* had the lowest frequency (35%). The most common genotype observed was *fimC-hlyF-iutA-iss* (71.35%), which exhibited the highest percentage of antibiotic resistance against 13 commercial antibiotics studied (92%). These findings suggest that genotypes involved in yolk sac infection exhibit significant diversity, and strains carrying virulence genes are more likely to possess higher levels of antibiotic resistance.

Keywords: *Escherichia coli*, Broiler Chickens, Virulence Genes, Antibiotic Resistance, Yolk Sac Infection