Journal of Animal Biology, Summer 2025; 17(4):79-92

ISSN: 1735-9724

Research Article

The Status of Broiler Farms in Terms of the Distribution Pattern of Resistant *Escherichia coli* Bacteria and Resistance Genes to Fluoroquinolone Antibiotics Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Method

Darioush Behzadpour[1*], Kaveh Madhoush[2], Behzad Kaviani[3], Seyyed Mohammad Reza Tabatabaei Mehr[1]

1- Department of Veterinary Medicine, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2- Health Monitoring System, Rasht, Guilan, Iran
3- Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
*Corresponding author**:** dbehzadpour@gmail.com

Received: 18 February 2025 Accepted: 12 May 2025

DOI:

Abstract

Poultry colibacillosis is one of the most common pathogens in poultry and antibiotics play a significant role in controlling this disease. The aim of the present study was to study the frequency of *Escherichia coli* bacteria in broiler chickens in Guilan province and investigate the pattern of drug resistance due to the horizontal transfer of genes through plasmid-type resistance genes to quinolones and the detection of *qnrA* and *qnrB* genes in antibiotic-resistant isolates. *E. coli* bacteria were collected from pericarditis and perihepatitis lesions of 128 broiler chickens belonging to 26 broiler farms in Guilan province. The antibiotic sensitivity of each isolate was evaluated by disc diffusion method. The presence of *qnrA* and *qnrB* plasmid genes were checked by polymerase chain reaction using specific primers. Results showed that out of 128 pieces of chicken carcasses collected in autumn and winter, 21 pieces contained bacteria, and in 4 pieces, these bacteria was isolated from both liver and heart tissues. From 25 isolates of *Escherichia coli*; 24 isolates showed resistance to enrofloxacin, 23 isolates to danofloxacin, 24 isolates to flumequin and 16 isolates to norfloxacin. Out of 16 isolates resistant to all four quinolone antibiotics, 14 isolates carried *qnrA* and *qnrB* genes, 8 isolates had *qnrA* gene, 13 isolates had *qnrB* gene, and 7 isolates had both genes. Totally, the results of this research showed that the resistance to quinolone antibiotics is high and *qnrA* and *qnrB* genes are spread in Guilan province and *qnrB* gene is more abundant.

Keywords: Antibiotics, Drug resistance genes, Poultry, *E. coli*, PCR.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره چهارم، تابستان ۱٤۰٤، صفحات ۹۲-۷۹

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲٤

مقاله پژوهشی

وضعیت مرغداری‌های گوشتی از نظر الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم اشرشیا کولی و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

داریوش بهزادپور[۱*]، کاوه مدهوش[۲]، بهزاد کاویانی [۳]، سید محمدرضا طباطبائی‌مهر[۱]

۱- گروه دامپزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- سامانه پایش سلامت، رشت، گیلان، ایران

۳- گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: dbehzadpour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۲/۲۲

DOI:

چکیده

کلی‌باسیلوز طیور یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای طیور می‌باشد و آنتی‌بیوتیک‌ها نقش بارزی در کنترل این بیماری بر عهده دارند. هدف از پژوهش حاضر، مطالعه فراوانی باکتری *اشریشیا کولی* (*E. coli*) در جوجه‌های گوشتی استان گیلان و بررسی الگوی مقاومت دارویی به دلیل انتقال افقی ژن‌ها، به‌واسطه ژن‌های مقاومت از نوع پلاسمیدی به کینولون‌ها و ردیابی ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بود. باکتری‌های *E. coli* از ضایعات پری‌کاردیت و پری‌هپاتیت ۱۲۸ قطعه مرغ گوشتی متعلق به ۲٦ مرغداری گوشتی استان گیلان جمع‌آوری شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی هر یک از جدایه‌ها به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. حضور ژن‌های پلاسمیدی *qnrA* و *qnrB* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که از ۱۲۸ قطعه تلفات مرغداری که در فصول پاییز و زمستان جمع‌آوری شدند، ۲۱ قطعه حاوی باکتری بودند و در ٤ قطعه از هر دو بافت کبد و قلب این باکتری جدا شد. از ۲۵ جدایه *E. coli*؛ ۲٤ جدایه به انروفلوکساسین، ۲۳ جدایه به دانوفلوکساسین، ۲٤ جدایه به فلومکوئین و ۱٦ جدایه به نورفلوکساسین مقاومت نشان دادند. از ۱٦ جدایه مقاوم به هر چهار آنتی‌بیوتیک کینولون، ۱٤ جدایه حامل ژن‌های *qnrA* و *qnrB* بودند که ۸ جدایه دارای ژن *qnrA* و ۱۳ جدایه دارای ژن *qnrB* و ۷ جدایه دارای هر دو ژن بودند. در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون در صد بالایی را نشان می‌دهد و ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در استان گیلان گسترش یافته و ژن *qnrB* فراوانی بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت دارویی، طیور، اشریشیا کولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

اشرشیا کولی (*Escherichia coli*)، نوعی باسیل گرم-منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. وجود این باکتری در آب و غذا معرف آلودگی آن با مدفوع می‌باشد. *E. coli* به تنهایی و یا همراه با سایر عوامل بیماری‌زا، یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور (با میزان مرگ و میر ۵ تا ۵۰ درصد) به‌شمار می‌رود. باکتری *E. coli* مولد کلی‌باسیلوز پرندگان (APEC) با اخذ ژن‌های عفونت‌زا از سایر باکتری‌ها تبدیل به یک باکتری عفونت‌زای خارج روده‌ای شده و با تضعیف

سیستم ایمنی بدن انسان و حیوانات، ایجاد بیماری می‌کند (۱، ۲). مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک به بزرگ‌ترین تهدید سلامت جهانی و امنیت غذایی تبدیل شده است. یک مشکل روزافزون در مورد *E. coli* و بسیاری از باکتری‌های دیگر، بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این میکروارگانیسم‌ها است. بخشی از این مشکل، در اثر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک توسط انسان به وجود آمده است، اما بخش دیگر را می‌توان یکی از عواقب استفاده از این ترکیبات، به‌عنوان محرک‌های رشد در غذای حیوانات دانست (۳). کینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های با طیف وسیعی هستند که روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثرند. فلوروکینولون‌ها به‌طور مستقیم با مهار DNA–جیراز، به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی و توپوایزومراز IV، به‌ویژه در باکتری‌های گرم مثبت، در سنتز DNA باکتری‌ها تداخل ایجاد می‌کنند. مهار توپوایزومراز IV توسط فلوروکینولون‌ها باعث جلوگیری از تکرار مرحله‌ای که برای رونویسی و تکثیر طبیعی لازم است، می‌شود. بهره‌گیری از فلوروکینولون‌ها در درمان پنومونی بسیار مرسوم است، اما مقاومت به این دارو نیز سیر صعودی پیدا کرده است (٤، ٥). ژن‌های پلاسمیدی خانواده *qnr* که به ژن‌های *PMQR* شهرت دارند متعلق به یک خانواده پنتاپپتیدهای تکراری بوده و با مهار اتصال کینولون‌ها به DNA–جیراز و توپوایزومراز IV از DNA حفاظت می‌کنند. این ژن‌ها منجر به افزایش ۸ تا ۳۲ برابری در میزان MIC کینولون‌ها می‌شوند (٦). تا کنون تعداد کثیری از الل‌های ژن *qnr* در کروموزوم و پلاسمیدهای خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده‌اند که تعدادشان بالغ بر ۱۰۰ ژن *qnr* می‌باشد که در قالب ۵ خانواده از ژن‌های *qnr* یعنی *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* طبقه‌بندی می‌شوند (۷). برای مطالعه عناصر ژنتیکی مرتبط با مقاومت ضدمیکروبی بین جدایه‌های *E. coli* در بیماری‌های طیور گوشتی، بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داده است که بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، اسید نالیدیکسیک و کلرامفنیکل وجود دارد. مقاومت در برابر کینولون *gyrA* برابر ٥٦/۳ درصد بود (۸). مکانیسم‌های مقاومت در ۳٦ گونه *E. coli* جداشده از نمونه‌های زباله، بستر، خاک و آب مزارع مرغداری در جنوب غربی نیجریه مقاومت ۳۰ جدایه (۹٤ درصد) را به بیش از یک آنتی‌بیوتیک نشان داد (۹). غربالگری ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و آنالیز ژنومیک مقایسه‌ای *E. coli* نشان داد که سویه‌های *E. coli* از روده حیوانات و انسان‌ها، دارای محدوده وسیعی از ژن‌های مقاومت به دارو هستند. بسیاری از جدایه‌ها به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. ژنوم *D107* تعداد قابل توجهی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مانند *ermA* و *mphD* را نشان داد که در ژنوم *D4* وجود ندارد. محیط مزارع مرغداری در کشورهای مختلف ممکن است به‌عنوان یک مخزن بالقوه ژن‌های مقاومت ضدمیکروبی عمل کرده و همچنین تفاوت‌های تکاملی سویه‌ها از نظر بیان ژن‌های مقاوم را نشان دهد (۱۰). در مطالعه‌ای که در کشور کره در سال ۲۰۲۱ میلادی روی جوجه‌های گوشتی انجام شد، از تعداد ۲۳ جدایه *E. coli* مقاوم به کینولون‌ها که دارای ژن‌های *qnr* بودند، ۹/٤ درصد مربوط به *qnrS*، ٦/٦ درصد *qnrA* و ۳/۸ درصد از نوع *qnrB* بوده‌اند (۱۱). در پژوهشی دیگر، از ۹٦ جدایه *E. coli* مورد بررسی، ۵۳ جدایه (٤۰/۱٦ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه فلوروکینولون‌ها مقاوم بودند. همچنین، حضور ژن *qnrA* در ۱۸ جدایه (۳۳/۹٦ درصد)، ژن *qnrB* در ۸ جدایه (۱۵/۱۰ درصد) و ژن *qnrS* در ۵ جدایه (۹/٤۳ درصد) از ۵۳ جدایه مقاوم نسبت به فلوروکینولون توسط آزمون PCR تأیید گردید (۱۲). همچنین در

مطالعه دیگری در ایران ۱۷ الگوی مقاومت دارویی در بین ۳۰ جدایه *E. coli* نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک پرمصرف در صنعت طیور شناسایی گردید که ۲٦ جدایه (۸٦/٦۷ درصد) به بیش از یک الگو تعلق داشتند، در حالی‌که ٤ جدایه دیگر (۱۳/۳۳ درصد) هر کدام فقط به یک الگو تعلق داشتند. نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت جدایه‌ها نسبت به اکثریت داروهای با مصرف رایج در صنعت طیور ایران بالا می‌باشد که لزوم اجرای قوی طرح پایش ملی برای مقاومت ضدمیکروبی و مصرف اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۳). با توجه به اهمیت موضوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع آن در طیور پرورشی استان، هدف از پژوهش حاضر بررسی اختصاصی الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم *E. coli* و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در مرغداری‌های گوشتی با استفاده از روش PCR بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های اخذ شده در این پژوهش، تعداد ۱۲۸ قطعه از تلفات مرغداری‌های گوشتی بوده که به‌صورت تصادفی از ۲٦ فارم، از مرغداری‌های سراسر استان گیلان جمع‌آوری شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از هر سالن مرغداری، بین ۲ تا ٤ نمونه اخذ گردید. نمونه‌ها از مرغداری‌هایی جمع‌آوری شدند که تلفات غیر عادی نداشتند. در آزمایشگاه پس از کالبد گشایی، از قلب و کبد لاشه‌ها در شرایط استریل کنار شعله با سوزاندن سطح قلب و کبد نمونه‌برداری شد و به‌وسیله سوآپ استریل در محیط‌های کشت بلاد آگار، مکانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار مرک ساخت آلمان کشت داده شد. در نمونه‌برداری از لاشه‌ها، به‌علت اینکه غیر از *E. coli*، سایر باکتری‌ها حائز اهمیت نبودند، از نمونه‌برداری از نای، مفاصل و کیسه صفرا صرف‌نظر گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در شرایط هوازی و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خروج پلیت‌ها از انکوباتور و بررسی آنها، نمونه‌هایی که هیچ رشدی در آنها صورت نگرفته بود، کنار گذاشته شدند. کلنی‌های باکتریایی که فقط در بلاد آگار رشد کردند و در بقیه محیط‌ها رشدی نداشتند، به‌عنوان گرم مثبت تلقی شده و کنار گذاشته شدند. نمونه‌هایی که در محیط مکانکی آگار رشد کردند و رنگ محیط را به زرد تغییر دادند، *E. coli* منفی تلقی شدند و کنار گذاشته شدند. نمونه‌هایی که در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار، جلای سبز فلزی نشان دادند و همچنین در محیط مک‌کانکی آگار تشکیل کلنی صورتی دادند به احتمال قریب به یقین *E. coli* مثبت بودند که پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی کشت افتراقی جهت تایید انجام شد. در مورد بقیه نمونه‌ها که در هر سه محیط رشد داشتند ولی تشخیص با قطعیت ممکن نبود و نمونه‌هایی که احتمالا *E. coli* مثبت بودند، برای اطمینان پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم‌منفی اکسیداز منفی کشت افتراقی (اندول، متیل رد، ووگس پروسکوئر، سیترات، اوره و لایزین آیرون آگار) با استفاده از محیط‌های کشت ساخت شرکت مرک انجام شد. در نهایت، ۲۵ جدایه *E. coli* به‌دست آمد. بعد از تفکیک ۲۵ جدایه باکتریایی، از کلونی‌های خالص *E. coli* هر جدایه موصوف جهت تهیه غلظت، معادل کدورت نیم مک‌فارلند برداشته شد. برای تهیه کدورت، از دستگاه اسپکتروفتومتر UNICO ساخت آمریکا در طول موج ٦۲۵ نانومتر استفاده شد. جذب‌های بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ معادل کدورت نیم مک‌فارلند بودند. از کدورت مذکور توسط سواپ استریل روی محیط کشت مولر هینتون آگار مرک ساخت کشور آلمان جهت انجام آنتی‌بیوگرام به‌روش انتشار دیسک Kirby-Bauer

کشت داده سپس دیسک‌های آنتی‌بیوگرام با استفاده از پنس و در شرایط استریل با فاصله حداقل دو سانتی‌متر از هم و یک سانتی‌متر از لبه پلیت‌ها قرار داده شدند و پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفتند. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد هر داروی ضد میکروبی بر اساس جداول استاندارد CLSI انجام شد و باکتری در یکی از دسته‌های مقاوم، نیمه‌حساس و حساس قرار گرفت (۱٤، ۱۵). در پژوهش حاضر، برای ۲۵ جدایه *E. coli*، از چهار دیسک آنتی‌بیوتیک: انروفلوکساسین (Enrofloxacin) ۵ میکروگرم، دانوفلوکساسین (Danofloxacin) ۱۰ میکروگرم، فلومکوئین (Flumequine) ۳۰ میکروگرم و نورفلوکساسین (Norfloxacin) ۱۰ میکروگرم، ساخت شرکت پادتن طب استفاده شد. برای استخراج DNA پلاسمیدی، ابتدا باکتری *E. coli* در محیط LB (Lauria Bertani Broth) مرک ساخت آلمان کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت انکوبه گردید. سپس محتویات لوله کشت، سانتریفیوژ گردید و از رسوب حاصل برای استخراج پلاسمید استفاده شد. استخراج DNA پلاسمیدی بر اساس شیوه‌نامه کیت استخراج، ساخت شرکت سیناژن انجام شد. ژن‌های مقاومت در برابر فلوروکینولون که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت شامل ژن‌های *qnrA* و *qnrB* بودند. توالی ژن‌های موصوف با استفاده از سایت NCBI برای دو ژن مذکور به‌دست آمد و پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷، به‌منظور تکثیر آنها طراحی و سپس بلاست گردید. توالی‌های طراحی‌شده برای ساخت به شرکت سینا کلون داده شد. برای تکثیر ژن‌های *qnrA* و *qnrB* آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری و ویال مستر میکس حاوی دزوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات، Taq-پلیمراز، بافر، کلرید منیزیم، آب دو بار تقطیر شده استریل، پرایمرهای فوروارد، ریورس و DNA الگو استخراجی با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت Applied Biosystem مدل en61327 و بر اساس اطلاعات مندرج در جدول ۱ انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز حاوی رنگ Safe stain در حضور لدر DNA کنترل مثبت و کنترل منفی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و باندهای تشکیل‌شده روی ژل بر اساس اندازه، تحت نور ماورای بنفش ارزیابی گردیدند. سپس ژل آگارز از قالب خارج شده و داخل دستگاه ژل داک ساخت شرکت دنا ژن تجهیز قرار داده شد و از آن عکس تهیه گردید. با توجه به طول ژن که قبلا محاسبه شده بود و از مقایسه باندهای تشکیل شده با لدر وجود یا عدم وجود ژن‌های مورد نظر تحت بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده

Table 1. Designed primers

Gene name	Primer sequence	Annealing temperature	Gene length
qnrA	(F) 5-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3 (R) 5-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3	58°C for 60 sec.	562 bp
qnrB	(F) 5-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA–3 (R) 5-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT-3	48°C for 60 sec.	562 bp

نتایج

در مجموع، ۱۲۸ نمونه از ۲٦ فارم مرغداری، بین سنین ۳ تا ٤۷ روز جمع‌آوری شدند که از این تعداد، ۲۱ نمونه (۱٦/٤ درصد) حاوی باکتری *E. coli* بود، که در ٤ مورد از نمونه‌های مورد بررسی، از هر دو

بافت کبد و قلب این باکتری جدا شد. بنابراین، ۲۵ جدایه اشرشیا کولی (۱۹/۵۳ درصد)، از ۱۲۸ نمونه جوجه گوشتی مورد بررسی به‌دست آمد. پراکندگی نمونه‌های مثبت از نظر جدایه *E. coli* از نظر آماری معنادار بود ($p \leq$۰/۰۵). بیشترین فراوانی (۲۰ درصد) مربوط به شهرهای رشت، آستانه اشرفیه و املش بود (جدول ۲، شکل ۱). همه نمونه‌های مورد بررسی از شهرستان املش از نظر *E. coli* آلوده بودند. حساسیت باکتری‌های جداشده به داروهای ضد میکروبی نشان داد که فقط یک مورد از باکتری‌های جداشده (٤ درصد) به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی حساس بود. بیشترین مقاومت، نسبت بـه آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین بود که سه مورد از جدایه‌ها (۱۲ درصد) نسبت به آن حساس و ۱٦ جدایه (٦٤ درصد) مقاوم بودند. حساسیت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک دیگر مشابه و برابر ٤ درصد از موارد جداسازی شده بود. مقاومت همزمان نسبت به دو آنتی‌بیوتیک، در ۲٤ جدایه (۹٦ درصد) مشاهده شد، همچنین تعداد ۲۳ (۹۲ درصد) و ۱٦ (٦٤ درصد) مورد از جدایه‌ها به‌ترتیب همزمان به سه و چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند. جداول ۳ و ٤ و شکل ۲ توزیع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه *اشریشیا کولی* به‌دست آمده از نمونه‌های مرغ را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. میانگین سن گله در نمونه‌های جوجه‌های گوشتی مثبت از نظر جدایه اشرشیا کولی، ۲۵/٤٤ و در نمونه‌های منفی، ۲۵/٤۳ روز بود که از نظر آماری معنادار نبود ($p \geq$ ۰/۰۵). تعداد ۱۵ مورد از ۲۵ جدایه به‌دست آمده (٦۰ درصد)، در محیط کشت EMB جلای فلزی داشتند، که از این تعداد ۹ جدایه (۳٦ درصد) از کبد و ۱٦ مورد (٦٤ درصد) از قلب نمونه‌های مرغ به‌دست آمدند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ارتباط بین بافت و جلای فلزی در محیط EMB از نظر آماری معنادار بود، به طوری که ۱۰۰ درصد جدایه‌های کبد فاقد جلای فلزی در محیط EMB و ۹۳/۷۵ درصد از جدایه‌های قلب دارای جلای فلزی بودند (روش آماری K2، $p \leq$ ۰/۰۵). تعداد ۱٦ نمونه از ۲۵ نمونه *E. coli* که به هر چهار آنتی‌بیوتیک کینولون مقاومت نشان داده بودند، برای انجام PCR جدا شده و در مرحله بعد، تخلیص ژنومی جدایه‌های *E. coli* انجام شد. درجه خلوص و غلظت DNA موجود در جدایه‌ها توسط الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگاروز یک درصد (شکل ۳) تعیین گردید که همه نمونه‌ها از درجه خلوص و غلظت مناسبی برخوردار بودند. سپس، تکثیر ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های *E. coli* با پرایمرهای مورد نظر و برنامه PCR بهینه‌شده انجام شد و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان‌دهنده تکثیر ژن‌های مورد بررسی در ۱٤ جدایه از ۱٦ جدایه بود. بر اساس شکل ۳، هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* باندی معادل ٥٦۲ جفت باز را روی ژل آگاروز نشان دادند. تعداد ۱٤ جدایه از ۱٦ جدایه مورد بررسی (۸۷/۵ درصد)، حداقل یکی از ژن‌های *qnrA* یا *qnrB* را حمل می‌کنند. همچنین، ارزیابی فراوانی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون نشان داد که از میان ژن‌های مورد بررسی، ژن *qnrB* دارای بیشترین فراوانی می‌باشد. نتایج بررسی حالت‌های مختلف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli* در جدول ۵ و شکل ٤ نشان داده شده است. کلیه جدایه‌های حامل هر دو ژن مورد بررسی، از بافت قلب به‌دست آمدند (۷ جدایه از ۱٦ جدایه، معادل ٤۳/۷۵ درصد). از طرف دیگر، کلیه جدایه‌های استخراج شده از بافت کبد نیز تنها حامل ژن *qnrB* بودند (۲۵ درصد) (جدول ٦). بررسی فراوانی ژن‌های *qnrA* و *qnrB* نشان داد که از ۱٦ جدایه *E. coli* مقاوم به هر چهار نوع آنتی‌بیوتیک، ۸ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن *qnrA* بودند که از این میان، ۷ جدایه (۸۷/۵

درصد) دارای جلای فلزی بودند. همچنین، تعداد ۱۳ جدایه (۸۱/۲۵ درصد) دارای ژن *qnrB* بودند که از این میان، ۸ جدایه (٦۱/۵۳ درصد) جلای فلزی داشتند و ۵ جدایه (۳۸/٤٦ درصد) فاقد جلای فلزی بودند. فقط یک جدایه از مجموع ۸ جدایه دارای ژن *qnrA* و فاقد ژن *qnrB* بودند. به عبارت دیگر، ۷ جدایه (٤۳/۷۵ درصد) از مجموع ۱٦ جدایه مورد بررسی دارای هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حضور همزمان ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در ۷ جدایه از ۱٦ جدایه مورد بررسی، سبب افزایش قابل توجه مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شده است.

جدول ۲ – توزیع پراکندگی نمونه‌های منفی و مثبت از نظر جدایه *E. coli* در سطح استان گیلان

Table 2. Distribution of negative and positive samples in terms of *E. coli* isolates in Guilan province

City	Positive [No. (%)]	Negative [No. (%)]
Rasht	5 (20)	29 (27.1)
Langaroud	4 (16)	10 (9.3)
Roudbar	2 (8)	9 (8.4)
Roudsar	2 (8)	12 (11.12)
Anzali	0 (0)	8 (7.5)
Shaft	0 (0)	4 (3.7)
Astaneh Ashrafieh	5 (20)	3 (2.8)
Rezvanshahr	0 (0)	11 (10.3)
Sowme éh Sara	1 (4)	8 (7.5)
Amlash	5 (20)	0 (0)
Lahidjan	1 (4)	5 (4.7)
Fooman	0 (0)	8 (7.5)

جدول ۳ – الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه *E. coli* به‌دست آمده از جوجه‌های گوشتی نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی

Table 3. Antibiotic resistance pattern in 25 *E. coli* isolates obtained from broiler chickens to the four antibiotics studied

Resistant cases [No. (%)]	Semi-sensitive cases [No. (%)]	Sensitive cases [No. (%)]	Antibiotic type
24 (96)	0	1 (4)	Enrofloxacin
23 (92)	1 (4)	1 (4)	Danofloxacin
24 (96)	0	1 (4)	Flumequine
16 (64)	6 (24)	3 (12)	Norfloxacin

جدول ٤– مقاومت همزمان به آنتی‌بیوتیک‌ها در ۲۵ نمونه باکتری *E. coli* جداشده از جوجه‌های گوشتی در گیلان

Table 4. Simultaneous resistance to antibiotics in 25 *E. coli* bacteria samples isolated from broilers in Guilan

Resistant cases [No. (%)]	Antibiotic type
24 (96)	Flumequine + Enrofloxacin
23 (92)	Danofloxacin + Flumequine + Enrofloxacin
16 (64)	Norfloxacin + Danofloxacin + Flumequine + Enrofloxacin

جدول ۵– فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli*

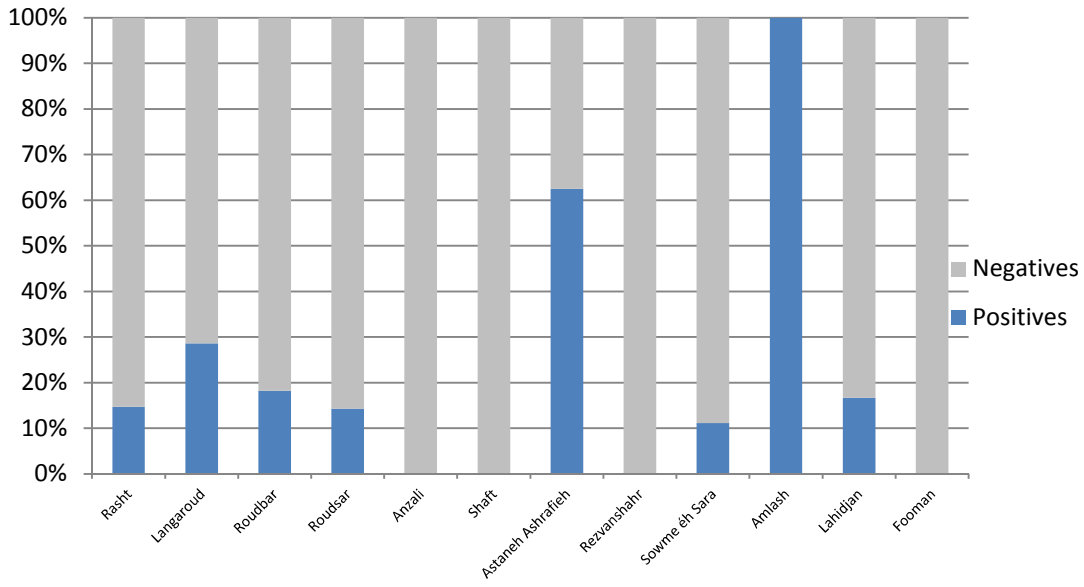
Table 5. Frequency of antibiotic resistance genes in *E. coli* bacteria

Evaluated genes	Number	Percentage
qnrA	8	50
qnrB	13	81.25
qnrB و *qnrA*	7	43.75

جدول ٦- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بافت‌های مورد بررسی

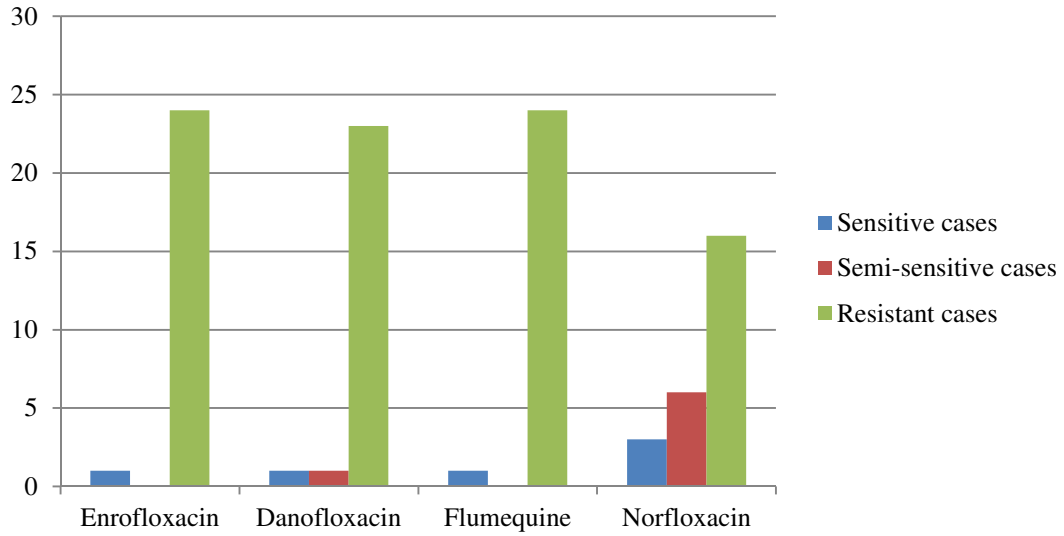
Table 6. Frequency of antibiotic resistance genes in the investigated tissues

Tissue	Percentage	Number	Antibiotic resistant gene	
			qnrB	*qnrA*
Heart	43.75	7	+	+
Heart	6.25	1	-	+
Heart	12.5	2	+	_
Heart	12.5	2	-	-
Liver	25	4	+	_



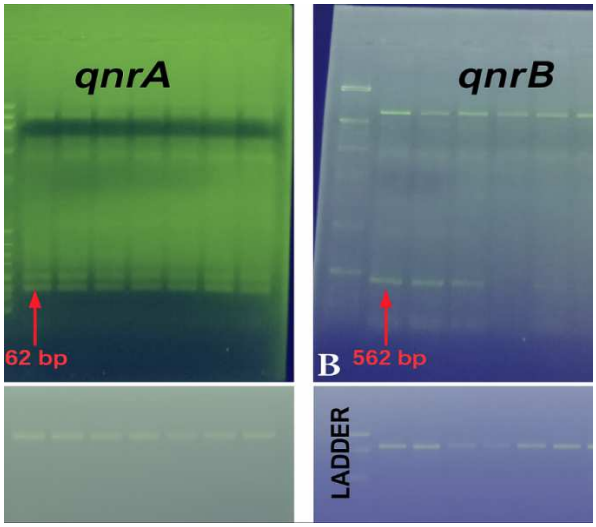
شکل ۱- درصد نمونه‌های مثبت به کل نمونه‌های اخذ شده در هر شهرستان

Fig 1. The percentage of positive samples to the total samples taken in each city



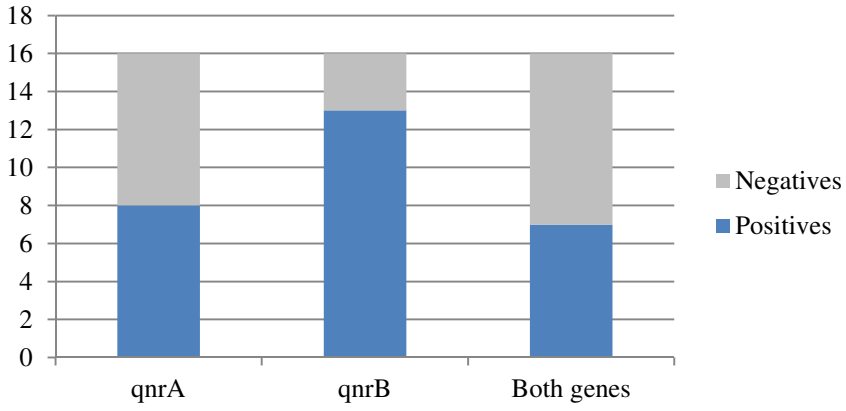
شکل ۲- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۲۵ جدایه *E. coli* به‌دست آمده از جوجه‌های گوشتی نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مورد بررسی

Fig 2. Antibiotic resistance pattern in 25 *E. coli* isolates obtained from broiler chickens to the four antibiotics studied



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن *qnrA* (A) و *qnrB* (B) روی ژل آگاروز

Fig 3. Electrophoresis of *qnrA* (A) and *qnrB* (B) gene PCR product on agarose gel



شکل ٤- فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli*

Fig 4. Frequency of antibiotic resistance genes in *E. coli* bacteria

بحث

آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل نوع عملکردشان در رشد و پیشگیری از بیماری‌ها، به طور گسترده‌ای در صنعت دامپروری استفاده می‌شوند و این موضوع باعث مقاومت میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک در دام، طیور و انسان شده است. پتانسیل دستکاری میکروبیوتا در طیور برای افزایش بیشتر در بهره‌وری، از اهمیت تجاری و علمی زیادی برخوردار است که منجر به استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت طیور می‌شود. میکروبیوتای موجود در دستگاه گوارش طیور، علاوه بر ایفای نقش مهم در حفاظت از پرنده در مقابل پاتوژن‌ها و توسعه سیستم ایمنی، نقش مهمی در تغذیه حیوان ایفا می‌کند. یک مطالعه نشان داد که ۲۱ درصد از تغییرات توده چربی شکم مرغ را می‌توان به ترکیب میکروبیوتای روده نسبت داد (۱٦). میکروفلور روده به عنوان یک مانع موثر در برابر میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زا عمل می‌کند و "مقاومت میکروبی" یکی از مهمترین عملکردهای آن است. متابولیسم باکتری می‌تواند منجر به اثرات سودمند از جمله تولید ویتامین‌ها، تعدیل سیستم ایمنی، افزایش هضم و جذب خوراک، مهار گونه‌های مضر و حذف مواد سرطان‌زا و سایر سموم شود. با وجود تمام پیشرفت‌هایی که در صنعت

پرورش طیور گوشتی و خصوصاً مرغ انجام شده است، باز هم بیماری‌های منتقل شونده از طریق مصرف گوشت آلوده گریبان‌گیر بسیاری از اقشار جامعه است. از بین مطالعاتی که در این زمینه انجام شده‌اند، توانایی بالای باکتری *E. coli* به عنوان عاملی برای فساد گوشت مرغ، به مراتب بیشتر گزارش شده است (۱۷). *E. coli* مهمترین پاتوژن گرم منفی و میله‌ای شکلی است که موجب بروز مسمومیت غذایی مهلک در انسان می‌گردد. این باکتری قابلیت انتقال از حیوانات به ویژه طیور را به علت تماس نزدیک با انسان و مصرف گوشت آن داشته و می‌تواند خطر بالقوه در انتقال سویه‌های مقاوم و عوامل حدت داشته باشد. عفونت‌های ناشی از *E. coli* از اهمیت ویژه‌ای در صنعت طیور برخوردار است. بررسی الگوی پراکندگی باکتری‌های مقاوم *E. coli* و بررسی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در مرغداری‌های گوشتی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام سویه‌های *E. coli* جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور در مطالعه اخیر نشان می‌دهد که درصد بالایی از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون که جزء آنتی‌بیوتیک‌های معمول و رایج در صنعت طیور هستند، مقاومت نشان می‌دهند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی به *E. coli* در جوجه‌های گوشتی استان گیلان، درصد نسبتاً بالایی را به خود اختصاص داده است. باکتری *E. coli* در هر سنی در جوجه‌های گوشتی مشاهده شده و شدت آن وابسته به سن نیست. به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت مرغداری کشور، مقاومت دارویی چندگانه در باکتری *E. coli* فزونی یافته و شایع‌ترین آن به‌دلیل مقاومت به‌واسطه پلاسمید می‌باشد که از مشکلات عمده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان نیز محسوب می‌گردد. در ارتباط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون مورد آزمایش در این پژوهش، بیشترین مقاومت مربوط به انروفلوکساسین و فلومکوئین و کمترین مقاومت مربوط به نورفلوکساسین بود که دلیل آن‌را می‌توان به عدم استفاده از نورفلوکساسین در صنعت طیور کشور نسبت داد، در صورتی که انروفلوکساسین بیشترین استفاده را در صنعت طیور به خود اختصاص داده است. برخی مطالعات، مقاومت به انروفلوکساسین را در جوجه‌های گوشتی، ۸۱ درصد گزارش کردند (۱۸)، در صورتی که در پژوهش حاضر مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، ۹٦ درصد بود. این یافته، لزوم جلوگیری از استفاده بی‌رویه و بی‌دلیل از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور توسط مرغداران را برجسته‌تر می‌کند. اما سایر مطالعات در ایران مربوط به استان‌های فارس، تهران، خوزستان و آذربایجان شرقی نشان می‌دهد که این الگو تا حدود زیادی مشابه است و نشان از توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *E. coli* دارد. در همین رابطه، جعفری و همکاران (۲۰۱٤) بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در جدایه‌های *E. coli* طیور در اهواز با ۹۰ درصد مقاومت نسبت به انروفلوکساسین مشاهده کردند (۱۹). قانعی و همکاران (۲۰۱٤) در تحقیقی که در استان اصفهان به عنوان قطب صنعتی کشور به انجام رساندند اعلام داشتند که مقاومت ۷۰ درصدی در برابر انروفلوکساسین و نیز مقاومت ۵۰ درصدی در برابرسولفانامید به علاوه تری‌متوپریم نشان‌دهنده مقاومت بالای جدایه‌های *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در صنعت پرورش طیور در اصفهان است (۲۰). رفیعی طباطبایی و نصیریان (۲۰۰۳) در تهران بیشترین مقاومت را مربوط به تتراسایکلین (۹٤ درصد) و سپس سولتریم (٥٦ درصد) و انروفلوکساسین (٤٤ درصد) گزارش کردند (۲۱). زهرایی صالحی و فراشی بناب (۲۰۰٦) در

تبریز نیز بیشترین مقاومت را نسبت به داکسی‌سایکلین گزارش کردند (۸۸ درصد) اما مقاومت در برابر انروفلوکساسین نیز با ۷٦ درصد در رده سوم قرار داشت (۲۲). مصرف گسترده انروفلوکساسین به تنهایی و مصرف هم‌زمان با برخی از خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند دلیل این مقاومت بالا باشد که در مزارع پرورش طیور در سراسر ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، مطالعات خارج از کشور نیز نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک در سایر کشورها نیز از مقاومت بالایی برخوردار است و بیشترین درصد مقاومت را به خود اختصاص داده است. در بررسی Gregova و همکاران (۲۰۱۲) در اسلواکی و Yang و همکاران (۲۰۰٤) در چین نیز بیشترین مقاومت در جدایه‌های *E. coli* طیور نسبت به انروفلوکساسین گزارش شده است (۲۳، ۲٤). وجود مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی نسبت به انروفلوکساسین، سولفونامید به همراه متوپریم، فلورفنیکل و داکسی‌سایکلین می‌تواند به دلیل استفاده متداول از این آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری کلی باسیلوز باشد که تجویز پی در پی این آنتی‌بیوتیک‌ها، گاهی بدون انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی باعث ظهور و گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. از آن جایی که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گسترش مقاومت در بین میکروارگانیسم‌ها نقش عمده‌ای دارند، اخیراً برای شناسایی سویه‌های مقاوم بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حری و غلامی آهنگران (۲۰۲۲) در اصفهان به پایش ژن‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون و سولفونامید که از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت هستند، پرداخته شد (۲۵). در مطالعه اخیر از ۵۰ سویه *E. coli* مورد بررسی، ۲۱ جدایه (٤۲ درصد) دارای ژن مقاومت به کینولون و ۱۵ جدایه (۳۰ درصد) دارای ژن مقاومت به سولفانامیدها بودند (۳). در همین راستا، Ponce-Rivas و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که حدود ۵۲ درصد از جدایه‌های *E. coli* واجد ژن *qnrA* بوده و در مجموع حدود ۷۳ درصد از جدایه‌ها یکی از ژن‌های مقاومت کینولون را دارا بودند که در بسیاری از جدایه‌ها ژن‌های *qnr* همراه با کلاس یک اینتگرون ردیابی نمودند (۲٦). فراوانی بالا و حدود ٤۸ درصدی *Sul1* (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک سولفانامید) در سویه‌های مقاوم علیه سولفانامیدها و نیز ردیابی ۵٤ درصدی ژن *qnrA* در سویه‌های مقاوم به کینولون‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر ژن‌های مورد بررسی، ژن‌های دیگری هم در مقاومت علیه سولفانامیدها و کوینولون‌ها نقش دارند و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی مستلزم وجود ژن و بیان مناسب ژن است تا منجر به ظهور فنوتیپ مقاومت شود. سویه‌های حامل ژن‌های مقاومت و بیماری‌زا می‌توانند به عنوان مخزن ژن‌های مقاومت در محصولات طیور و مصرف کننده نهایی یعنی انسان باشند (۳). با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به‌واسطه پلاسمید، ممانعت از مصرف خودسرانه و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداری‌های کشور به‌طور اکید توصیه می‌گردد. چنانچه ژن‌های مذکور در سویه‌های *E. coli* حساس به کینولون‌ها مشاهده شوند، احتمال ایجاد موتاسیون در ایجاد این وضعیت خارج از تصور نخواهد بود. طی مطالعات انجام شده امکان جهش در کدون‌های ۸۳ و ۸۷ از *gyrA* و کدون‌های ٤۲٦ و ٤٦٦ از *gyrB* نشان داده شده است (۱). یافته‌های این مطالعه نشان داد که ژن *qnrB* تنها در جدایه‌های کبدی باکتری *E. coli* حضور داشت، در حالی که در جدایه‌های قلبی هر دو ژن *qnrA* و *qnrB* شناسایی شدند. این الگوی پراکندگی ممکن است به واسطه مجموعه‌ای از عوامل بیولوژیکی و اکولوژیکی تبیین گردد. نخست، تفاوت‌های فیزیولوژیکی بین بافت کبد و قلب

می‌تواند در بقای پلاسمیدها و بیان ژن‌های مقاومتی نقش ایفا کند؛ به‌ویژه اینکه کبد به‌عنوان اندامی غنی از آنزیم‌های متابولیک و سم‌زدا، ممکن است محیطی انتخابی علیه پلاسمیدهای بزرگ‌تر و پرهزینه‌تر نظیر آن‌هایی که *qnrA* را حمل می‌کنند، فراهم کند (۲۷). از سوی دیگر، حضور هم‌زمان دو ژن *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های قلبی ممکن است منعکس‌کننده ورود چندین کلون متفاوت از *E. coli* به این اندام باشد یا ناشی از سازگاری بهتر پلاسمیدهای ترکیبی با شرایط خاص فیزیولوژیکی و همودینامیکی قلب باشد (۲۸). همچنین تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان ژن‌های مقاومت توسط عوامل درون‌زای میزبان نظیر سطح اکسیژن، pH و میزان فلزات سنگین می‌تواند به سرکوب یا افزایش بیان برخی ژن‌ها در بافت‌های خاص منجر گردد. در نهایت، هزینه زیستی مرتبط با هر پلاسمید نیز نقش تعیین‌کننده‌ای دارد؛ به‌گونه‌ای که پلاسمیدهای حامل *qnrA* در مقایسه با *qnrB*، بار متابولیکی بیشتری برای سلول میزبان ایجاد می‌کنند که ممکن است در محیط‌های پرتنش مانند کبد، موجب حذف انتخابی آن‌ها شود (۲۹). توجه به استانداردها و مقررات ایمنی زیستی در مرغداری‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در ایران، علی‌رغم وجود برخی چارچوب‌های قانونی، نظارت بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداری‌ها همچنان ناکافی است. برای کاهش این بحران، اجرای مجموعه‌ای از اقدامات ایمنی زیستی بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت دام (WOAH) و سازمان جهانی بهداشت (WHO) ضروری است (۳۰، ۳۱). همچنین استفاده از روش‌های آزمایشگاهی دقیق‌تر برای شناسایی ژن‌های مقاومت، همچون Real-time PCR یا توالی‌یابی کل ژنوم، می‌تواند در آینده اطلاعات ژرف‌تری برای سیاست‌گذاری ارائه دهد. در مجموع، بررسی‌های حاضر نشان داد که بدون دخالت‌های مدیریتی، آموزشی و قانونی گسترده، روند گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مرغداری‌ها، به‌ویژه در سویه‌های *E. coli*، می‌تواند به یک تهدید جدی برای سلامت عمومی منجر شود.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از قطعات تلفات مرغداری‌ها در استان گیلان به باکتری *E. coli* آلوده هستند. این آلودگی‌ها به‌ویژه در رابطه با مقاومت بالای جدایه‌های این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون، از جمله انروفلوکساسین و دانوفلوکساسین، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. در این مطالعه، ۹۶ درصد از جدایه‌های *E. coli* به انروفلوکساسین و ۹۲ درصد به دانوفلوکساسین مقاومت نشان دادند. در میان سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، بیش از ۸۷ درصد حامل ژن‌های مقاومت *qnrA* و *qnrB* بودند که به وضوح نشان‌دهنده گسترش این ژن‌های مقاومت در استان گیلان است. از طرفی، این یافته‌ها بر لزوم توجه به پایش و کنترل دقیق مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور تأکید می‌کند. ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها، می‌تواند به انتقال این مقاومت‌ها از طریق زنجیره غذایی به انسان‌ها منجر شود. بنابراین، نظارت دقیق و مدیریت بهینه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور، به‌ویژه از طریق پایش مولکولی ژن‌های مقاومت، برای حفاظت از سلامت انسان و حفظ اثربخشی درمان‌ها ضروری است. در این راستا، استفاده از روش‌های جایگزین مانند پروبیوتیک‌ها، که می‌توانند به کنترل عفونت‌ها و ارتقاء سلامت روده کمک کنند، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر در بهبود عملکرد صنعت طیور و حفاظت از سلامت انسان مطرح گردد.

منابع

1. Karimi P, Jafarpour M, Nazemi A. Molecular identification of enrofloxacin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens in Tehran and Tonekabon. Vet J. 2011;5(2):61-68. [In Persian]

2. Shams Goli S, Moradli GhA, Amini K. Molecular identification of adhesion virulence, necrosis and hemolysin genes in UPEC and APEC strains isolated from clinical and poultry samples. Appl Biol. 2016;7(26):35-42. [In Persian]

3. Naimi S. Resistance to antibiotics (antimicrobial drugs), the sixth book "Rational Use of Drugs". From the Training Set for Health Volunteers. Deputy Health Minister of the Ministry of Health and Medical Education. 2015. [In Persian]

4. Dolatyabi S, Peyghambari SM. A review of fluoroquinolones and their use in poultry. The 7th Scientific Research Conference, Development and Promotion *of* Agricultural Sciences and Natural Resources of Iran.. Tehran, 2020.

5. Katzung BG, Kruidering-Hall M, Trevor AJ. Katzung and Trevor's Pharmacology Examination and Board Review. 12th Edition. 2019; 592 p.

6. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;17(2):149-182.

7. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. Antimicrob. Resist. Infect Control. 2019; 8:104.

8. Awad A, Arafat N, Elhadidy M. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016;15(59):1-8.

9. Adelowo OO, Fagade OE, Agersø Y. Antibiotic resistance and resistance genes in Escherichia coli from poultry farms, southwest Nigeria. J. Infection Dev. Countries. 2014;8(9):1103-1012.

10. Abdelgader SA, Shi D, Chen M, Zhang L, Hejair HMA, Muhammad U., et al. Antibiotics resistance genes screening and comparative genomics analysis of commensal *Escherichia coli* isolated from poultry farms between China and Sudan. Biomed. Res. Int. 2018;26:5327450.

11. Seo KW, Lee YJ. Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from broiler breeder farms. Poultry Sci. 2021;100:101250.

12. Ebrahimian M, Mohammadi-Sichani M. The frequency of plasmid *qnr* genes in quinolone-resistant isolates of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. J Isfahan Univ Med Sci. 2018;36(499):1213-1218. [In Persian]

13. Ghasemian SO, Mahmoudipour H. Isolation, identification and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with Coli Bacillus to fifteen common antibiotics in Iran's poultry industry. Vet Microbiol. 2024;19(1):80-90. [In Persian]

14. Belotindos LP. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from livestock and related materials in the Philippines. Ph.D. Thesis. Hokkaido Univ. Collection Scholarly Acad. Papers. 2021; HUSCAP.

15. CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th Ed. CLSI Supplement VET08. Wayne, PA: Clinic. Lab. Standards Instit. 2018.

16. Zaghari M, Zhendi M, Parhizkar S. Evaluation of the effects of *Bacillus coagulans* on functional traits and microbial flora of the gastrointestinal tract of broilers. Res. Anim Prod. 2023;13(38):19-27. [In Persian]

17. Gholami F, Mehrabian S, Tabarsi Z, Amini K. Investigation of isolated enterobactin genes isolated from food (poultry meat) by multiplex-PCR method. J Comp Pathobiol. 2019;16(2):2819-2826. [In Persian]

18. Liu B-T, Liao X-P, Yang S-S, Wang X-M, Li L-L, Sun J. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. J Med Biotechnol. 2012;61:1591-1599.

19. Jafari R, Ghanbarpour R, Ghorbanpour Najafabadi M, Miyahi M. Determination of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from healthy broiler chickens and those suffering from septicemia in air. J Vet Microbiol. 2014;11(2):116-109. [In Persian]

20. Ghaniei A, Mojaverrostami S, Lotfallahzadeh B, Darzi Lemraski M, Sepehrnia P, Imani Jajarmi A. Geographical and seasonal variation in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken carcasses in Iran. Eur J Exp Biol. 2014;4:173-177.

21. Tabatabaei R, Nasirian A. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolated from chicken flocks. Iran J Pharmacol Ther. 2003; 2(2):39-42.

22. Zahraei Salehi T, Farashi Bonab S. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. Int J Poult Sci. 2006;5:677-684.

23. Gregova G, Kmetova M, Kmet V, Venglovsky J, Feher A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. Ann Agric Environ Med. 2012;19:75-77.

24. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol. 2004;42:3483-3489.

25. Horri M, Gholami-Ahangaran M. The frequency of *qnra* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolated from pericarditis and perihepatitis lesions of broilers in Isfahan province. Anim Physiol Dev. 2022; 15(2):47-58. [In Persian]

26. Ponce-Rivas E, Muñoz-Márquez M-E, Khan AA. Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(15):5444-5447.

27. Vanacker M, Lenuzza N, Rasigade J-P. The fitness cost of horizontally transferred and mutational antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2023; 14: 1186920.

28. Helekal D, Keeling M, Grad YH, Didelot X. Estimating the fitness cost and benefit of antimicrobial resistance from pathogen genomic data. J R Soc Interface. 2023; 20(203):20230074.

29. San Millan A, MacLean RC. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. Microbiol Spectr. 2017;5(5): MTBP-0016-2016.

30. WHO (World Health Organization). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 6th Revision, Geneva. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528. 2019.

31. WOAH (World Organization for Animal Health). OIE standards, guidelines and recommendations on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents. Paris. Available from: https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance. 2021.