DOI: 10.22092/vj.2020.351681.1760
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی میزان آلودگی اشریشیاکلی در تخم‌مرغ‌های شهر اردبیل و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

• آیدین عزیزپور (نویسنده مسئول)
بیماری‌های طیور، دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۶-۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۷-۲۱
Email: aidin_azizpour@uma.ac.ir

چکیده

باکتری اشریشیاکلي (*E.coli*) عامل ایجادکننده بیماري کلی باسیلوز است که تخم‌مرغ‌های آلوده مي‌تواند بعنوان منابع انتشار این بیماري باشند. درمان با مواد ضدمیکروبی یک روش مهم برای کنترل و کاهش این بیماری می‌باشد. اما در طی دهه‌های اخیر، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب گسترش ژن‌های مقاوم و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها شده است که در حال حاضر افزایش مقاومت آنتي بیوتیکي بعنوان یک مشکل بهداشتی جهانی مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی تخم‌مرغ‌های طیور بومی و صنعتی شهرستان اردبیل به باکتری اشریشیاکلی و ارزیابی میزان مقاومت دارویی آنها بود. تعداد ۲۵۰ تخم مرغ شامل۸۱ تخم‌مرغ بومی، ۸۶ تخم‌مرغ فله‌ای و ۸۳ تخم‌مرغ صنعتی مارک‌دار به صورت تصادفی از فروشگاه‌های خرده‌فروشی در سطح اردبیل طی دوره شش ماهه جمع‌آوری شدند و از نظر آلودگی اشریشیاکلي با روش‌های استاندارد کشت مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تشخیص قطعي سویه‌ها از آزمایش‌هاي بیوشیمیایي و PCR استفاده گردید. سپس تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک (Disc diffusion) انجام شد. از ۲۵۰ نمونه مورد بررسی، تعداد پنج جدایه اشریشیاکلي (۲ ٪) به دست آمد که سه جدایه (۱/۲۰ ٪) از پوسته و دو جدایه (۰/۸۰٪) از محتویات تخم‌مرغ‌ها شناسایی شدند. ۲/۴۷ ٪ (۲ مورد) از پوسته تخم‌مرغ‌های بومی و ۱/۱۶ ٪ (۱ مورد) از پوسته تخم‌مرغ‌های فله‌ای آلوده به اشریشیاکلي بودند. ۱/۲۳ ٪ (۱ مورد) محتویات تخم‌مرغ‌های بومی و ۱/۱۶ ٪ (۱ مورد) محتویات تخم‌مرغ‌های فله‌اي آلودگي اشریشیاکلي داشتند. در پوسته و محتویات تخم‌مرغ‌های صنعتی هیچ‌گونه باکتري اشریشیاکلي جداسازي نشد. در بررسي الگوي مقاومت آنتي‌بیوتیکي سویه‌هاي جدا شده بیشترین مقاومت مربوط به نئومایسین، کلرآمفنیکل، نالیدیکسیک اسید، لینکومایسین و آموکسی سیلین و کمترین مقاومت کانامایسین، سفتازدیم و سفالکسین بود. نتایج این بررسی نشان داد که در تخم‌مرغ‌های بومی و تخم‌مرغ‌های فله‌ای آلودگی اشریشیاکلي وجود دارد که توجه به بهداشت نگهداري و طبخ آنها ضروري است. همچنین با توجه به مقاومت بالاي آنتي‌بیوتیکي باکتري‌هاي جدا شده بایستی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداري‌ها جلوگیري بعمل آید.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تخم‌مرغ، اردبیل

● Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 112-120

A survy of *Escherichia coli* Contamination in eggs of Ardabil and determination of their Antibiotic Resistance

By:Azizpour, A., (Corresponding Author) Poulry Diseases, Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Received:2020-08-31 Accepted: 2020-10-12

Email: aidin_azizpour@uma.ac.ir

Escherichia coli is causative agent of colibacillosis, which contaminated eggs are important sources of of spread of this disease. Antimicrobial therapy is an important way to control and reduce this disease. But in recent years, the widespread use of antibiotics has led to the proliferation of resistant genes and increased antibiotic resistance among bacterial strains. Increasing antibiotic resistance is currently a global health problem. The aim of this study was to determine contaminated rate of *Escherichia coli* in native and industrial poultry eggs of Ardabil city and to evaluate their drug resistance. 250 eggs including 81 native eggs, 86 bulk eggs and 83 labeled industrial eggs were randomly collected from retail stores in Ardabil during a period of 6 months and were examined in terms of *E.coli* contamination by standard culture methods. Biochemical tests and PCR were used for definitive diagnosis of strains. Then, antibiotic resistance was determined by disk diffusion method. From 250 samples examined, five isolates (2%) were identified, of which three isolates (1.20%) were obtained from the egg shells and two isolates (0.80%) from the egg contents. 2.47% (two cases)of native egg shells and 1.16% (one case) of bulk egg shells were contaminated with *E. coli*. 1.23% (one case) of native egg contents and 1.16% (one case) of bulk egg contents had *E. coli* contamination. *E. coli* was not isolated in the shell and contents of industrial eggs. In the study of antibiotic resistance pattern of isolated strains, the highest resistance was observed to neomycin, chloramphenicol, nalidixic acid, lincomycin and amoxicillin and the lowest resistance was to kanamycin, ceftazidium and cephalexin. The results of this study showed that native eggs and bulk eggs are *E.coli* contamination, which is necessary to pay attention to their hygienic maintenance and cooking. Also, due to the high antibiotic resistance of the isolates, the excessive use of antibiotics in poultry farms should be prevented.

Key words: *Escherichia coli*, Antibiotic resistance, eggs, Ardabil

مقدمه

اشريشياكلي (*E.coli*) يكي از شايع‌ترين عامل باكتريايي است كه از عفونت‌هاي انساني و طيور جدا شده است و عموما بعنوان يک بيماري‌زاي فرصت‌طلب محسوب مي‌شود (۱۹). اين باكتري از مهم‌ترين علل ميكروبي شايع در عفونت‌هاي اداري و بسياري از عفونت‌هاي بيمارستاني از قبيل سپتي سمي، عفونت‌هاي زخم، گاستروآنتريت و مننژيت نوزادي به شمار مي‌رود (۲۵). همچنين باكتري *E.coli* عامل ايجادكننده بيماري كلي باسيلوزيس در طيور است. بطوري‌كه كلي‌باسيلوزيس يكي از مهم‌ترين بيماري‌هاي باكتريايي ماكيان و بوقلمون است كه در اثر عفونت با سويه‌هاي بيماري‌زاي پرندگان APEC (Avian Pathogenic E.Coli) ايجاد مي‌شود (۴). علل شيوع اين بيماري در گله‌هاي طيور پايين بودن سطح بهداشت، شرايط نامناسب محيطي و عفونت‌هاي ثانويه يا تضعيف سيستم ايمني مي‌باشد (۱۴، ۱۹). عفونت‌هاي حاصل از *E.coli* در طيور صنعتي اهميت ويژه‌اي دارند و صدمات اقتصادي قابل توجهي را ساليانه به كشورها تحميل مي‌كنند. اين صدمات اقتصادي مي‌تواند تمامي مراحل توليد از جوجه‌كشي تا فرآوري كشتارگاهي را در بر گيرد (۳، ۱۳، ۱۸). امروزه مقابله با باكتري *E.coli* بيشتر متكي بر بكارگيري تركيبات آنتي‌باكتريال است (۷، ۲۰، ۲۴). در واقع درمان آنتي‌بيوتيكي يكي از روش‌هاي مهم در كنترل عوارض بيماري و كاهش خسارات ناشي از عفونت اشريشياكلي مي‌باشد (۱۶، ۲۷). اما در دهه‌هاي اخير، تجويز گسترده و طولاني مدت آنتي‌بيوتيک‌ها بعنوان محرک رشد طيور و يا جهت كنترل بيماري سبب پيدايش و انتشار ژن‌هاي مقاوم و در نتيجه افزايش مقاومت آنتي‌بيويتكي در برابر برخي از گونه‌هاي باكتري‌ها شده است كه اين امر منجر به عدم كارايي داروها گرديده است و نهايتا درمان اين بيماري را با مشكل مواجه كرده است (۲، ۸، ۲۲، ۲۶). از طرفي ديگر پديده مقاومت آنتي‌بيوتيكي به جهت گسترش باكتري‌هاي مقاوم در جوامع انساني از لحاظ بهداشت عمومي نيز از اهميت ويژه‌اي برخوردار است (۳، ۷). لازم بذكر است كه افزايش مقاومت ضد ميكروبي در برابر اين باكتري در سراسر جهان گزارش شده است و نگراني‌هاي زيادي را در كشورهاي در حال توسعه و توسعه يافته ايجاد كرده است.

تخم‌مرغ با داشتن ۷ گرم پروتئين و ۷۶ كيلو كالری انرژي بالاترين جذب پروتئيني را در بين مواد غذايي به خود اختصاص داده است. پوسته تخم‌مرغ داراي ۱۰۰۰۰ منفذ كوچک كه در روي آن ماده‌اي به نام كوتيكول قرار دارد. اين منافذ محل مناسبي براي نفوذ ميكروارگانيسم‌ها به داخل تخم‌مرغ مي‌باشند كه سبب آلودگي و فساد تخم‌مرغ مي‌شوند (۱۹). به هر حال تخم‌مرغ‌های آلوده مي‌توانند بعنوان منابع آلودگی ميكروارگانسيم‌هايي نظير E.coli باشند (۱۳). گفته می‌شود اشريشياكلي مهم‌ترين پاتوژن روده‌اي گرم منفي است كه سبب مسموميت غذايي در انسان مي‌گردد (۲۵). از آنجا كه اطلاعات و آمار كاملی در رابطه با ميزان آلودگی تخم‌مرغ‌های شهرستان اردبيل به باكتري اشريشياكلی و ميزان مقاومت دارويی آن وجود ندارد. انجام اين تحقيق جهت توجه به بهداشت نگهداري تخم‌مرغ‌ها در مراكز فروش آن‌ها و مصرف اصولی آنتی‌بيوتيک‌ها در مراكز پرورش طيور ضروری به نظر می‌رسد. بنابراين هدف از اين مطالعه بررسی ميزان آلودگی تخم‌مرغ‌های طيور بومی و صنعتی شهرستان اردبيل به اشريشياكلی و ارزيابی ميزان مقاومت دارويی آنها نسبت به ۱۵ تركيب ضد ميكروبی مصرفی در مراكز درماني ايران بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوري نمونه ها

اين بررسی به صورت توصيفی-مقطعی طی يک دوره شش ماهه (از اول دي ماه سال ۱۳۹۸ تا آخر خردادماه ۱۳۹۹) در شهرستان اردبيل انجام گرفت. در اين مطالعه ۲۵۰ تخم‌مرغ شامل ۸۱ تخم‌مرغ بومی، ۸۶ تخم‌مرغ صنعتی فله‌ای در شانه‌هاي معمولي و بدون بسته بندي و ۸۳ تخم‌مرغ صنعتی بسته‌بندي شده مارک‌دار مورد بررسي واقع شدند. بدين منظور تخم‌مرغ‌ها به صورت تصادفی از مراكز توزيع تخم‌مرغ در چهار قسمت شهر نمونه‌برداری و جمع‌آوری شدند و تحت شرايط استريل به آزمايشگاه منتقل شدند. سپس پوسته و محتويات داخلی تخم‌مرغ‌ها به طور جداگانه از نظر آلودگی به باكتری اشريشياكلي تحت آزمايش‌های ميكروبی قرار گرفتند.

كشت، جداسازی و شناسايی باكتری

برای تهيه نمونه از پوسته تخم‌مرغ‌ها ابتدا سواب استريل روی سطح پوسته تخم‌مرغ‌ها كشيده و در cc ۱ آب مقطر شستشوی داده شدند. سپس به cc ۹ محيط غنی كننده سلنيت (F) Hi media, India اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انكوبه شدند. تهيه نمونه از محتويات داخلی تخم‌مرغ ها به شرح زير انجام گرفت كه هر تخم‌مرغ به طور جداگانه در داخل ظروف استريل حاوی الكل ۷۰ ٪ به مدت ۱۵ دقيقه غوطه‌ور شدند. پس از خشک شدن آنها به روش استريل پوسته آهکی تخم‌مرغ‌ها شكسته و در ظروف استريل زرده و سفيده آنها مخلوط و همگن گرديدند. سپس cc ۱ از محتويات همگن شده به cc ۹ محيط غنی‌كننده سلنيت F اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انكوبه شدند. در ادامه نمونه‌های پوسته و محتويات غنی‌شده به طور جداگانه بر روی محيط جامد انتخابی شامل مكانكی آگار (Hi media, India) منتقل و كشت داده شدند و پس از مدت ۲۴ ساعت انكوباسيون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد كلني‌ها بررسي قرار گرفتند. كلونی‌های لاكتوز مثبت جدا و مجددا بر روی مک‌كانكی آگار كشت داده شدند تا كشت خالص بدست آمد (۱۹). در مرحله بعدي، يک كلونی از كشت خالص بر روی محيط آگار ائوزين متيلن بلو Eosin Methylene Blue agar (EMB) كشت داده شدند و سپس كلونی‌هاي واجد جلای سبز فلزی توليدي با انجام ساير تست‌های بيوشيميايی (Hi media, Merk and BioLife) تفريقی از قبيل TSI، اوره آگار، اندول، واكنش متيل رد و واكنش وگس پروسكائر، سيمون سيترات و تخمير گلوكز مورد بررسي قرار گرفتند. در نهايت جدايه‌هاي كه نسبت به آزمايشات متيل رد و اندول مثبت و به آزمايشات وگس پروسكائر، سيترات و اوره منفي بودند، بعنوان باكتري اشريشياكلي شناسايي گرديدند (۱۵، ۲۲). جدايه‌های E.coli تاييد شده با آزمون‌های بيوشيميايی، در محيط Luria Bertani (LB) به همراه ۳۰ ٪ گليسرول تا انجام آزمايش در فريزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند

آزمايش PCR

به منظور تأييد تشخيص باكتري اشريشياكلي، از روش واكنش زنجيره‌اي پليمراز (PCR) استفاده شد. DNA ژنومي با استفاده از روش جوشاندن استخراج گرديد. بدين ترتيب كه نمونه‌های مثبت باكتری *E. coli* در محيط LB در ۳۷ درجه سانتی‌گراد كشت و پس از ۲۴ ساعت µl ۱/۵ از آن را با µl ۲۰۰ آب مقطر به مدت ۱۰ دقيقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. پس از سانتريفيوژ كردن نمونه‌ها در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقيقه، مايع‌رويی رسوب به عنوان DNA در نظر گرفته شد، پرايمرهای به كار رفته برای تكثير ژن *hlya* جدايه‌هاي اشريشياكلي و جزئيات توالی پرايمرهای (Metabion ,Germany) جلودار و برگشتی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۲). برای انجام واكنش زنجيرهای پليمراز و تكثير قطعات ژنی از مواد و واكنشگرهای PCR در يک حجم µl ۲۵ شامل: µl ۱ از هريک از پرايمرها،

جدول ۱ - توالی و موقعيت پرايمرهای مورد استفاده جهت تشخيص جدايه هاي اشريشياكلي.

ژن	توالی پرايمرها ($5' \rightarrow 3'$)	اندازه باند (bp)
hlya	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC	۵۳۴
	R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

۰/۵ µl آنزیم Taq DNA پلیمراز، ۱ µl dNTP، ۲ µl Mgcl، ۲/۵ µl (x ۱۰) بافر، ۱ µl PCR، ۱ µl الگو و ۱۷ µl آب مقطر استریل استفاده شد (۲۲). برنامه دمایی مخلوط PCR به این صورت بود. واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و به دنبال آن ۳۰ سیکل دمایی انجام شد. در طی این ۳۰ سیکل، واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و مرحله امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، انجام شد و نهایتا امتداد نهایی نمونه‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسیکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان پایان یافت. در پایان الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت در مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

آزمون آنتی‌بیوگرام

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *E.coli* با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (شرکت پادتن طب، ایران) شامل تتراسایکلین (۳۰ µg)، تریمتوپریم- سولفادیازین (۱,۲۵/۲۳,۷۵ µg)، آموکسی سیلین (۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، کلرآمفنیکل (۳۰ µg)، انروفلوکساسین (۵ µg)، کانامایسین (۳۰ µg)، کلیستین (۱۰ µg)، لینکومایسین (۱۵/۲۰۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، فورازولیدون (۱۰۰ µg)، سفالکسین (۳۰ µg)، داکسی سایکلین (۳۰ µg)، نئومایسین (۳۰ µg) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg) به روش کیفی انتشار دیسک (Disc diffusion) بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) سال ۲۰۱۸ بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند (۵). بدین منظور ، ابتدا ۴ تا ۵ پرگنه از محیط مک کانکی آگار به لوله آزمایش حاوی Trypicase Soy Broth (TSB) منتقل و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت تهیه کدورت ۰/۵ مک فارلند انکوبه شدند. سپس با سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت تقریبا ۱۰ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انگوبه گردیدند (۲۱). در نهایت با اندازگیری قطر هاله ممانعت شونده از رشد اطراف هر ترکیب ضدمیکروبی بوسیله خط‌کش و مقایسه با اطلاعات موجود در جدول استاندارد تفسیر آنتی‌بیوتیک (شرکت پادتن طب) به صورت مقاوم، نیمه حساس و حساس طبقه‌بندی شدند (۴).

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه حاضر در جداول ۲ تا ۴ نشان داده شده است. از تعداد ۲۵۰ تخم‌مرغ جمع‌آوری شده از مراکز توزیع تخم‌مرغ در شهرستان اردبیل، در پنج مورد (۲ ٪) باکتری اشریشیاکلي جداسازی شد که سه نمونه

جدول ۲- فراوانی آلودگی *E.coli* در پوسته تخم مرغ های جمع آوری شده در شهرستان اردبیل.

ردیف	نوع نمونه	تعداد نمونه های مورد آزمایش	تعداد موارد مثبت	درصد آلودگي
۱	تخم مرغ بومی	۸۱	۲	۲/۴۷
۲	تخم مرغ فله ای	۸۶	۱	۱/۱۶
۳	تخم مرغ صنعتی	۸۳	۰	۰
۴	مجموع	۲۵۰	۳	۱/۲۰

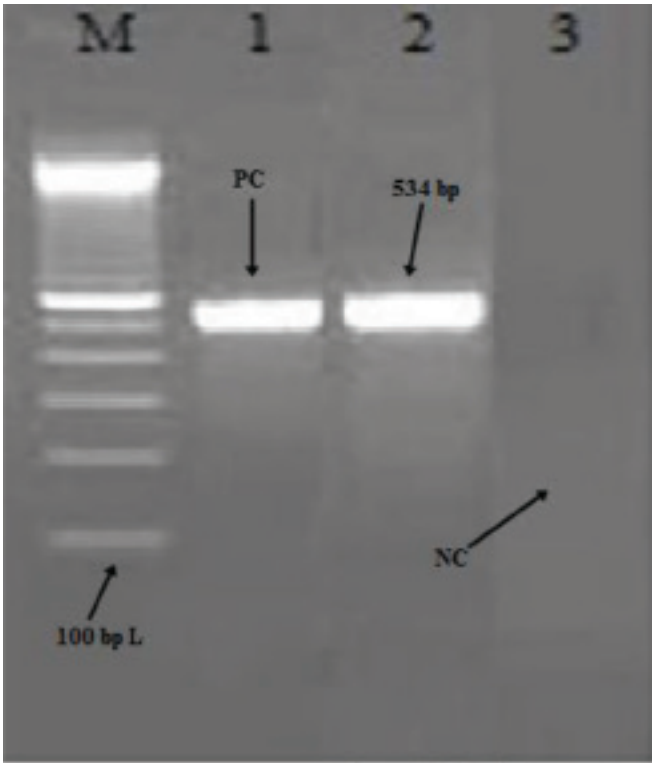
جدول ۳- فراوانی آلودگی *E.coli* در محتویات تخم مرغ های جمع آوری شده در شهرستان اردبیل.

ردیف	نوع نمونه	تعداد نمونه های مورد آزمایش	تعداد موارد مثبت	درصد آلودگي
۱	تخم مرغ بومی	۸۱	۱	۱/۲۳
۲	تخم مرغ فله ای	۸۶	۱	۱/۱۶
۳	تخم مرغ صنعتی	۸۳	۰	۰
۴	مجموع	۲۵۰	۲	۰/۸۰

با ۱/۲۰ ٪ آلودگی پوسته با باکتری اشریشیاکلي را نشان دادند (دو نمونه تخم‌مرغ بومی و یک عدد تخم‌مرغ فله‌ای) و دو نمونه معادل ۰/۸۰ ٪ تخم‌مرغ‌های مورد بررسی، آلودگی محتویات داخلی را داشتند (جداول ۲ و ۳). آلودگی اشریشیاکلي در پوسته تخم‌مرغ‌های بومی و فله‌ای به ترتیب ۲/۴۷ ٪ و ۱/۱۶ ٪ بود (جدول۲) و همچنین آلودگی محتویات داخلی به باکتری اشریشیاکلي در تخم‌مرغ‌های بومی و فله‌اي به ترتیب ۱/۲۳ ٪ و ۱/۱۶ ٪ مشاهده گردید. درحالی‌که در پوسته و محتویات تخم‌مرغ‌های صنعتی هیچ گونه باکتری اشریشیاکلي جداسازی نشد (جداول ۲و۳). در آزمون PCR که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به منظور تشخیص ژن *hlya* جدایه‌هاي اشریشیاکلي صورت گرفت، باند ۵۳۴ bp مشاهده شد. فراواني مقاومت و حساسیت سویه‌هاي اشریشیاکلي جداسازی شده از تخم‌مرغ‌ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک مصرفی در مراکز درماني در جدول ۴ ارائه شده است. تمامی جدایه‌ها در مقابل نئومایسین، کلرآمفنیکل، نالیدیکسیک اسید، لینکومایسین، و آموکسی سیلین کاملا مقاوم (۱۰۰ ٪) بودند. بعد از این ترکیبات ضدمیکروبی، بیشترین مقاومت در مقابل اریترومایسین، تتراسایکلین، داکسی سایکلین، انروفلوکساسین، کلیستین و سولفادیازین +تریمتوپریم با ۸۰ ٪ و فورازولیدون با ۶۰ ٪ مشاهده گردید. کانامایسین، سفتازدیم و سفالکسین با ۴۰ ٪ کمترین میزان مقاومت را در بین جدایه‌ها داشتند.

بحث

باکتری‌های گرم منفی روده‌ای نظیر *E.coli* جزوه فلور طبیعی روده انسان و حیوانات هستند. این باکتری‌ها قادر به ایجاد بیماری‌های مختلفی هستند (۱۹). گوشت مرغ و تخم‌مرغ آلوده از مهم‌ترین انتقال‌دهنده‌هاي باکتري به انسان محسوب مي‌شوند (۱۳، ۲۵). درمان با ترکیبات آنتی‌باکتریال یک روش مهم برای کنترل بیماری‌هاي ناشي از آنها است. اما در سال‌های اخیر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها بعنوان پیشگیری از عفونت و تقویت‌کننده در حیوانات سبب گردیده است که میکرو فلور طبیعی تغییر کند و مقاومت باکتری‌های گرم منفی روده‌ای به آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یابد (۱، ۷، ۱۲). بطوری‌که طبق گزارشات محققین



شکل ۱- نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگارز جهت تشخیص ژن ***hlya*** جدایه هاي اشریشیاکلي.

ستون M: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۱: کنترل مثبت (PC) *E. coli* O157:H7 ، ستون ۲: محصول PCR اشریشیاکلي با باند ۵۳۴ bp (نمونه های مثبت)، ستون ۳: کنترل منفی(NC)

PC:Positive control; NC: Negative control.

(۲، ۷، ۱۲، ۱۹، ۲۰، ۲۳) الگوی مقاومت دارویی در نواحی مختلف جغرافیایی و حتی در مقاطع زمانی متفاوت در یک منطقه متنوع و در حال تغییر است. از طرف دیگر سویه‌های مقاوم می‌توانند از طرق مختلف به انسان انتقال یابند و سلامتی انسان‌ها را به خطر بیندازند. در سال ۱۳۷۲ تعداد ۵۰۰ عدد تخم‌مرغ از فروشگاه‌های شیراز جمع‌آوري و مورد بررسي قرار گرفتند که ۲ ٪ از نمونه‌ها آلوده به باکتری اشریشیاکلی مشاهده شدند (۱۸). در سال ۲۰۰۴، در ایالت گوآناجواتو مکزیک ۰/۷ ٪ تخم‌مرغ‌هاي صنعتي مورد بررسي آلوده به باکتری اشریشیاکلی گزارش شدند (۶). در سال ۲۰۰۵ در منطقه ترینیداد و توباگو هند از ۱۸۴ تخم‌مرغ بررسي شده ۲۸/۳ ٪ از پوسته تخم‌مرغ‌ها ۳/۸ ٪ از محتویات تخم‌مرغ‌ها آلودگي اشریشیاکلی داشتند (۳). در سال ۱۳۸۵ نیز مطالعه‌ای دیگر بر روي ۱۱۴ تخم‌مرغ صنعتي در شیراز انجام شد که ۳/۵ ٪ آلوده به باکتری اشریشیاکلی بودند (۱۷). در سال ۱۳۸۷ در شهرکرد تعداد ۱۰۰ تخم‌مرغ بطور تصادفی از فروشگاه‌های مختلف نمونه‌برداری شد که از ۱۹ ٪ آنها باکتری اشریشیاکلی جداسازي گردید (۹). در سال ۱۳۹۰ از فروشگاه‌های اصفهان تعداد ۶۰ تخم‌مرغ بوقلمون جمع‌آوري و از نظر آلودگي اشریشیاکلی بررسي شد که از ۱۱/۶ ٪ نمونه‌ها، باکتری جداسازي گردید که در نمونه‌های مثبت ۶۶/۶ ٪ آلودگی در پوسته و ۳۳/۳ ٪ آلودگی در محتویات تخم‌مرغ‌ها بود (۱۰). در سال ۲۰۰۵ تعداد ۲۰۰ تخم‌مرغ محلي از استان شارکیا مصر جمع‌آوري و میزان آلودگي اشریشیاکلی ۱۸ ٪ گزارش شد که باکتري از پوسته، محتویات و هر دو پوسته و محتویات به ترتیب ۱۰/۵ ٪، ۴/۵ ٪ و ۶ ٪ جداسازي شد (۷). در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۵ در شهر سوکوتو نیجریه تعداد ۱۶۰ تخم‌مرغ بطور تصادفي از ۱۶ فروشگاه خرده‌فروشي جمع‌آوري شد که ۹۰ ٪پوسته و ۴۱ ٪ محتویات تخم‌مرغ‌هاي بررسي شده آلوده به اشریشیاکلی گزارش شد (۲۴). در پژوهشي که در سال ۹۴ بر روي ۱۰۰ تخم‌مرغ صنعتي فله‌اي در قم انجام گرفت، ۴ ٪ و ۱ ٪ آلودگي اشریشیاکلی به ترتیب از پوسته و محتویات تخم‌مرغ‌ها تشخیص داده شد (۲۳). در سال ۲۰۱۷ تعداد ۱۳۲ تخم‌مرغ از منطقه جاپور هندوستان جمع‌آوري و از لحاظ آلودگي باکتریایي مطالعه شدند که ۲۴/۲ ٪ پوسته تخم‌مرغ‌ها و ۴/۵ ٪ درون تخم‌مرغ‌ها آلودگي داشتند (۱۳). در سال ۲۰۱۸ بطور تصادفي از ۲۰ فروشگاه در شهر دهاکا بنگلادش تعداد ۱۰۰ تخم‌مرغ تهیه و مورد بررسي قرار گرفت که

جدول ۴- فراوانی مقاومت و حساسیت اشریشیاکلي هاي جدا شده از تخم مرغ ها نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک.

ردیف	ترکیبات آنتی بیوتیک	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
۱	اریترومایسین	۸۰	۰	۲۰
۲	فورازولیدون	۶۰	۰	۴۰
۳	تتراسایکلین	۸۰	۲۰	۰
۴	داکسی سایکلین	۸۰	۰	۲۰
۵	نئومایسین	۱۰۰	۰	۰
۶	کلرآمفنیکل	۱۰۰	۰	۰
۷	نالیدیکسیک اسید	۱۰۰	۰	۰
۸	انروفلوکساسین	۸۰	۰	۲۰
۹	کلیستین	۸۰	۲۰	۰
۱۰	کانامایسین	۴۰	۲۰	۴۰
۱۱	لینکومایسین	۱۰۰	۰	۰
۱۲	آموکسی سیلین	۱۰۰	۰	۰
۱۳	سولفادیازین +تریمتوپریم	۸۰	۰	۲۰
۱۴	سفتازدیم	۴۰	۰	۶۰
۱۵	سفالکسین	۴۰	۲۰	۴۰

۳۴/۶۴ ٪ آنها آلوده به اشريشياكلی بودند كه ميزان آلودگي پوسته و محتويات تخم‌مرغ‌ها به ترتيب ۲۱/۴۳ ٪ و ۱۳/۲۱ ٪ گزارش شد (۱۲). در مطالعه حاضر ميزان آلودگي به باكتري اشريشياكلی در پوسته تخم‌مرغ‌هاي محلي ۲/۴۷ ٪ و تخم‌مرغ‌هاي فله اي ۱/۱۶ ٪گزارش شد و در محتويات تخم‌مرغ‌هاي محلي ۱/۲۳ ٪ و تخم‌مرغ‌هاي فله‌اي ۱/۱۶ ٪ بود. درحالی‌كه در پوسته و محتويات تخم‌مرغ‌های صنعتی مارک‌دار هيچ گونه آلودگی مشاهده نشد. اين ميزان آلودگی در پوسته تخم‌مرغ‌ها از اكثريت گزارش‌های محققين (۳، ۷، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۸، ۲۴) كمتر و برخی گزارشات (۶، ۲۳) نيز بيشتر می‌باشد. طبق گزارش‌هاي پيشين ميزان آلودگی می‌تواند در اثر شرايط مختلف جغرافيايی، وضعيت بهداشتی مراكز نگهداری و فروش تخم‌مرغ، نوع تخم‌مرغ (محلی و صنعتی)، تغييرات فصلی، نحوه نمونه‌گيری و تكنيک‌های آزمايشگاهی متغير باشد. آلودگی پوسته ممكن است در اثر تماس مستقيم با مدفوع مرغ آلوده در حال تخم‌گذاری و يا تماس با ساير تخم‌مرغ‌های آلوده پس از جمع‌آوری، انتقال به جعبه تخم‌مرغ هنگام بسته‌بندی و ذخيره‌سازی و يا در حين حمل و نقل رخ دهد (۱۸)، اما آلودگی محتويات تخم‌مرغ مستقيما می‌تواند از طريق تخمدان اتفاق بيفتد و هرچند كه به طور غير مستقيم پوسته آلوده در حين شكسته شدن تخم‌مرغ می‌تواند آلودگی را به داخل تخم‌مرغ منتقل كند (۱۹). در خصوص مقاومت آنتی‌بيوتيكی جدايه‌هاي باكتری *E.coli* گزارشاتی متعدد در ايران و ساير كشورها وجود دارد كه نشان دهنده متنوع بودن مقاومت دارويی در مناطق مختلف می‌باشد. پاپادوپولو و همكاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند كه باكتري اشريشياكلی جدا شده از تخم‌مرغ‌ها نسبت به تتراسايكلين، آمپي سيلين اريترومايسين مقاوم بودند (۲۱). ملاتا و همكاران (۱۹۹۸) در بررسی ۱۰۱ جدايه *E.coli* جدا شده از گله‌های طيور در الجزاير، بالاترين مقاومت و حساسيت را به ترتيب نسبت به تتراسايكلين و كليستين مشاهده كردند (۱۶). حنسون و همكاران (۲۰۰۲) با بررسی ۵۴ جدايه اشريشياكلی از فارم‌های گوشتی تايلند بيشترين ميزان مقاومت را مربوط به تتراسايكلين (۷۷/۸ ٪)، فلورفنيكل(۵۰ ٪)، آمپی سيلين (۳۸/۹ ٪) و انروفلوكساسين (۹/۳ ٪) گزارش كردند (۱۱). در مطالعه ژاو و همكاران (۲۰۰۵) روی ۹۵ سويه APEC اشريشياكلی در گرجستان، بيشترين مقاومت مربوط به سولفامتوكسازول (۹۳ ٪) و سپس تتراسايكلين (۸۷ ٪) و انروفلوكساسين (۵۲ ٪) گزارش گرديد (۲۷). ناظر و همكاران (۲۰۰۶) گزارش كردند كه جدايه‌هاي باكتري اشريشياكلی بدست آمده از تخم‌مرغ‌هاي شيراز نسبت به اريترومايسين با ۷۵ ٪، تريمتوپريم با ۲۵ ٪، كلرآمفنيكل با ۲۵ ٪، فورازوليدون با ۲۵ ٪ مقاومت داشتند (۱۷). اوزاوا و همكاران (۲۰۰۸) با مطالعه ۸۳ سويه APEC اشريشياكلی در ژاپن طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ بالاترين مقاومت را در برابر آمپی‌سيلين (۷۷/۱ ٪) مشاهده كردند و پس از آن اكسی تتراسايكلين (۷۵/۹ ٪)، تريمتوپريم (۲۵/۳ ٪)، انروفلوكساسين (۲۱/۷ ٪) و فلورفنيكل(۶/۰ ٪) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (۲۰). فيروزي و همكاران (۲۰۰۸) با بررسی ۵۸ جدايه اشريشياكلی اطراف شيراز نشان دادند كه ميزان مقاومت به داكسی سايكلين، انروفلوكساسين و كلرآمفنيكل به ترتيب ۸۶/۲ ٪، ۳۹/۱ ٪ و ۲۷/۲ ٪ بود (۸). تحقيقات انجام شده توسط خوشخو و پيغمبری (۲۰۰۵) نشان داد كه در بين ۱۵۰ سويه باكتری جدا شده در استان تهران بيشترين مقاومت دارويي به ترتيب اريترومايسين (۹۷/۳ ٪)، كليستين (۹۷/۷ ٪)، تتراسايكلين (۹۴ ٪)، سولفامتوكسازول + تريپريم (۶۷/۷ ٪)، انروفلوكساسين (۶۶ ٪)، نئومايسين (۵۲ ٪) و كلرامفنيكل (۴۶/۷ ٪) بود (۱۴). ذاكری و كاشفی (۲۰۱۲) از ۱۰۰ سويه باكتری *E. coli* جدا شده از ۵۰ گله گوشتی در منطقه تبريز تست آنتی‌بيوگرام انجام دادند كه كمترين ميزان مقاومت در برابر انروفلوكساسين (۲۳ ٪) و سفالكسين (۲۶ ٪) و بيشترين مقاومت را به تتراسايكلين (۹۹ ٪) و ارتيرومايسين (۱۰۰ ٪) مشاهده نمودند (۲۶). صفرپور دهكردي و همكاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند كه در جدايه‌هاي اشريشياكلی جمع‌آوری شده از نمونه‌هاي گوشت مرغ در استان اصفهان بيشترين ميزان مقاومت آنتی‌بيوتيكی نسبت به آمپي سيلين (۸۰ ٪) و كمترين آن مربوط به سولفامتوكسازول (۲۰ ٪) بود و همچنين درصد مقاومت به انروفلوكساسين اريترومايسين تتراسايكلين به ترتيب ۶۶/۶، ۶۲/۲ و ۵۵/۵ عنوان شد (۲۵). در مطالعه‌اي كه ايد و همكاران (۲۰۰۵) روي تخم‌مرغ‌هاي جمع‌آوري شده در مصر انجام دادند، مشخص شد كه بيشترين ميزان مقاومت آنتی‌بيوتيكی نسبت به سولفامتوكسازول+تريمتوپريم (۹۴/۱ ٪) و كمترين آن مربوط به كليستين (۰/۶ ٪) بود و درصد مقاومت به داكسي سايكلين، تتراسايكلين ، آموكسي سيلين، انروفلوكساسين و كلرآمفنيكل به ترتيب ۹۳/۲، ۹۲/۹، ۹۲/۳، ۶۸/۶ و ۵۱/۸ عنوان شد (۷). طبق يافته‌های عزيزپور و سعيدی نمين (۲۰۱۷) درصد مقاومت جدايه‌ها نسبت به تتراسايكلين، اريترومايسين، تريمتوپريم-سولفاديازين (سولتريم)، انروفلوكساسين، نئومايسين، دانوفلوكساسين، كليستين، آمپی سيلين، فلورفنيكل و لينكواسپكتين به ترتيب ۹۹/۴۳، ۹۷/۷۵، ۸۰/۳۴، ۷۷/۵۳، ۷۵/۸۴، ۶۹/۶۶، ۶۸/۵۴، ۶۰/۱۱، ۵۸/۹۹ و ۳۶/۵۲ بود (۲). پيرحاجاتي مهابادي و همكاران (۲۰۱۷) بيان كردند كه باكتري‌هاي جدا شده از محتويات تخم‌مرغ‌ها در قم نسبت به آمپي سيلين، جنتامايسين، سفتياكسون، پني سيلين و كلينداميسين مقاوم بودند، اما در برابر سفوتاكسيم، تتراسايكلين، سفتازيديم و آميكاسين مقاومتي نداشتند. همچنين جدايه‌هاي بدست امده از پوسته تخم‌مرغ‌ها در برابر آمپي سيلين، سفوتاكسيم، سفتياكسون و پيپراسيلين مقاوم، ولي در برابر تتراسايكلين و سفتازيديم مقاومتي نشان ندادند (۲۳). جين و يادا (۲۰۱۷) در تخم‌مرغ‌هاي بررسي شده در هندوستان نشان دادند كه باكتري بيشترين مقاومت را در برابر سيفكسيم (۸۸/۶ ٪) و بعد از آن آموكسي سيلين (۸۰ ٪) و تترا سايكلين (۴۶/۶ ٪) و بيشترين حساسيت را نسبت به جنتامايسين (۱۰۰ ٪) و سيپروفلوكساسين (۱۰۰ ٪) داشتند (۱۳). بخشی و همكاران (۲۰۱۷) در يزد بالاترين ميزان مقاومت را در برابر ناليديكسيک اسيد (۱۰۰ ٪) و سيپروفلوكساسين (۸۶ ٪) و بالاترين حساسيت را در مقابل كليستين (۱۰۰ ٪) و جنتامايسين (۹۳ ٪) گزارش كردند (۴). ايسلام و همكاران (۲۰۱۸) در مطالعه اي كه روي تخم مرغ ها در بنگلادش انجام دادند بيشترين ميزان مقاومت باكتري را نسبت به تتراسايكلين (۱۰۰٪)، آموكسي سيلين (۸۸/۹ ٪)، آمپي‌سيلين (۷۷/۸ ٪)، كلرآمفنيكل (۴۴/۵٪) و ناليديكسيک اسيد (۴۴/۵٪) و بيشترين حساسيت را به سيپروفلوكساسين (۱۰۰ ٪)، سفتياكسون (۸۸/۹ ٪)، اريترومايسين (۶۶/۷ ٪)، جنتامايسين (۵۵/۶ ٪) و كانامايسين (۵۵/۶ ٪) گزارش كردند (۱۲). در اين مطالعه نيز بالاترين ميزان مقاومت جدايه‌های باكتري مربوط به نئومايسين، كلرآمفنيكل، ناليديكسيک اسيد، لينكومايسين و آموكسی

سیلین بود (۱۰۰٪) و سپس در برابر اریترومایسین، تتراسایکلین، داکسی سایکلین، انروفلوکساسین، کلیستین، سولفادیازین +تریمتوپریم و فورازولیدون وجود داشت که این داروها بطور گسترده در قالب برنامه‌های درمانی و تحت درمانی و همچنین محرک رشد در مزارع پرورش طیور استفاده می‌شوند. همچنین کمترین مقاومت در برابر کانامایسین، سفتازدیم و سفالکسین مشاهده شد که این یافته‌ها با نتایج برخی مطالعات همسو و برخی گزارشات متفاوت می‌باشد. به نظر می‌رسد این اختلاف در فراوانی و نوع مقاومت دارویی می‌تواند به علت تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف ترکیبات ضدمیکروبی و تفاوت زمانی و مکانی و تفاوت در جدایه‌های مورد بررسی باشد. لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با توجه به الگوی مقاومت دارویی سایر مناطق بدلیل قابل تغییر بودن مکان و زمان این الگوها امکان‌پذیر نیست.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که در پوسته و محتویات تخم‌مرغ‌های بومی و تخم‌مرغ‌های فله‌ای آلودگی اشریشیاکلي وجود دارد و میزان مقاومت آنتي‌بیوتیکي جدایه‌هاي باکتري بالا است. با توجه به این که تخم‌مرغ‌هاي آلوده مي‌تواند بطور بالقوه سبب بیماري مصرف کنندگان شود، لازم است نسبت به بهداشت نگهداري و طبخ تخم‌مرغ‌ها توجه ویژه‌اي صورت گیرد. جهت جلوگیري از پیدایش و گسترش سویه‌های مقاوم و انتقال آن به انسان بایستی از مصرف خود سرانه آنتی‌بیوتیک‌ها در مرغداري‌ها جدا اجتناب شود.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر مساعدت در انجام این طرح تحقیقاتی مصوب کمال تشکر و قدردانی را دارد. همچنین از آقای دکتر سیامک قضایی به خاطر همکاری در انجام آزمایشات میکروبی و مولکولی این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

پاورقی

1.Avian Pathogenic E.coli.

منابع مورد استفاده

1.Azizpour, A. 2020. A Study of Salmonella Spp. Contamination Rate of Eggs and Assessment of their Antibiotic Resistance Pattern in Ardabil, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal* 14(1): 38-50. (In Farsi)

2.Azizpour, A and V. Saeidi Namin. 2017. Investigation of antibiotic resistance patterns in Escherichia coli isolated from broiler chickens with colibacillosis to ten antibacterial agents commonly used in the Iranian poultry industry. *Journal of Comparative Pathobiology Iran*.14 (4): 2345- 2352. (In Farsi)

3.Adesiyun, A., N. Offiah, N. Seepersadsingh, S. Rodrigo, V. Lashley, L.Musai and K. Georges. 2005. Microbial health risk posed by table eggs in Trinidad. *Epidemiology and infection* 133: 1049-1056.

4.Bakhshi, M., M. Fatahi Bafghi, A. Astani, V.R. Ranjbar, H. Zandi and M. Vakili. 2017. Antimicrobial Resistance Pattern of Escherichia coli Isolated from Chickens with Colibacillosis in Yazd, Iran. *Journal of food quality and hazards control* 4: 74-78.

5.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28th Edn. Informational Supplement.CLSI Document M100-S28. Wayne, PA, USA. PP: 98-150.

6.Cortes, C.R., G.T. Isaias, C.L. Cuello, J.M.V. Flores, R.C. Anderson and C.E. Campos. 2004. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac Infection. Revista Latinoamericana de Microbiologia 46: 12-6.

7. Eid, S., S.A. Nasef and A.M. Erfan. 2005. Multidrug resistant bacterial pathogens in eggs collected from backyard chickens. Assiut *Veterinary Medical Journal* 61: 87-103.

8.Firouzi, R., H. Rajaian and P. Daneshgar. 2008. Antibiotic resistance of salmonella and escherichia coli isolated from chicken in shiraz area. *Journal of Veterinary Research* 62: 341-344. (In Farsi)

9.Ghasemian Safaei, H., M. Jalali, A. Hosseini, T. Narimani, A. Sharifzadeh, and E. Raheim. 2011. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retails markets by Salmonella spp., Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni and Escherichia coli in Shahrekord, Iran. Jundishapur *Journal of Microbiology* 4: 249-253.

10.Gholami-varnamkhasti, M., H. Hossein Sadeghian and M. Momeni shahraki. 2011. Studying the degree of pollution of salmonella and E. coli bacteria in turkey eggs on Esfahan City. 2nd International Congress of Food Hygiene, Tehran, Iran.

11.Hanson, R., J.B. Kaneene, P. Padungtod, K. Hirokawa and C. Zeno. 2002. Prevalence of salmonella and E.coli, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in northern thailand. Southeast Asian *Journal of Tropical Medicine and Public* Health 33: 120-126.

12.Islam, M., M.S. Sabrin, H.B. Kabir and M.D. Aftabuzzaman. 2018. Antibiotic sensitivity and resistant pattern of bacteria isolated from table eggs of commercial layers considering food safety issue. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 4:323-329.

13.Jain, A.K. and R.Yadav. 2017. Study of antibiotic resistance in bacteria Isolated from table egg. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 8:(B) 668-674.

14.Khoshkhoo, P.H. and S.M. Peighambari. 2005. Drug resistance patterns and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from cases of avian Collibacilosis. *Iranian Journal of Veterinary Research* 60: 97-105.

15.Lih-chingChiueh, L.C., W.H. Shiang and D.Y.C.Shih. 2001.

Characterization of Escherichia coli serotype O157 strains isolated in Taiwan by PCR and Multilocus enzyme analysis. *Journal of Food and Drug Analysis* 9:129-204

16.Mellata, M., E. Jacquemin, R. Bakour and J. Mainil. 1998. Resistance to antibiotic of escherichia coli strains of bovine and avian origin isolated in algeria. *Annals Medicine Veterinary* 142: 12-13.

17.Nazer, A.H.K., H. Dadras and S. Eskandari. 2006. Aerobic bacteria isolated from eggs and day-old chicks and their antibacterial resistance in Shiraz. Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 7: 20 -30.

18.Nemati, H. 1993. Survey on contamination of consumed eggs in Shiraz city with aerobic food poisoning bacteria and their effects on public health. D.V.M. thesis, School of Veterinary Medicine, Shiraz University. (In Farsi)

19.Nolan, L.K., H.J. Barnes, J.P.,Vaillancourt, T. Abdul-Aziz and C.M. Logue. 2013. colibacillosis. In: diseases of poultry. 12th edition. (Swayne, D. E., L.Mcdougald, K. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair). Iowa, USA: John Wiley and Sons; Pp:751-805.

20.Ozawa, M., K. Harada, A.Kojima, T. Asi and T. Sameshima. 2008. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic escherichia coli isolates in japan. *Avian Diseases* 52: 392-397.

21.Papadopoulou, C., D. Dimitriou, S. Levidiotou, H. Gessouli, A. Panagiou, S. Golegou, S. Golegou and G. Antoniades. 1997. Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: is there a health hazard for consumers? *Immunology Microbiology Infectious Disease* 20: 35-40.

22.Pelayo, J. S., A. R. Elias Junio, N. R. De Lima, A. Navarro and S. P.Dejato da Rocha,. 2019. Detection of Diarrheagenic Escherichia coli in Bovine Meat in the Northern Region of Paraná State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 62: e19180012.

23.Pirhajati Mahabadi, R., M.Tabibi, S. Yaghoubi, F. Bakhtiarizadeh and N.S. Mousavi. 2017. Investigation of Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from the Contents and Shell of Industrial Eggs in Qom City, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 9 : 69-75. (In Farsi)

24.Salihu, M.D., B. Garba and Y. Isah. 2015. Evaluation of microbial contents of table eggs at retail outlets in Sokoto metropolis, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences* 13: 22-28.

25.Safarpor Dehkordi, F., E.Yahaghi and E.Khodaverdi Darian. 2014. Prevalence of Antibiotic Resistance in Escherichia coli Isolated from Poultry Meat Supply in Isfahan. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 8: 41-47. (In Farsi)

26.Zakeri, A and P. Kashefi. 2012. Antimicrobial susceptibilities of avian escherichia coli isolates in tabriz, Iran. *African Journal of Biotechnology* 11: 4467-4470.

27.Zhao, S., J. Maurer, S. Hubert, J. Devillena, P. McDermott, J. Meng, S. Ayers, L. English and D.White. 2005. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Avian Pathogenic Escherichia Coli Isolates. *Veterinary Microbiology* 107: 215-224.