نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

بررسی وجود ژن‌های blaTEM، blaCTX-M و blaSHV در نمونه‌های *اشریشیا کلی* جداشده از طیور به روش Multiplex-PCR و تعیین الگوی حساسیتی این سویه‌ها در استان کرمان

• **رمضانعلی حسن نژاد**
کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
• **رضا قنبرپور (نویسنده مسئول)**
استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.
• **کیومرث امینی**
استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
• **جواد نصر**
استادیار، گروه علوم دامی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: مهر ۹۴ **تاریخ پذیرش: دی ۹۴**
E-mail: ghanbar@uk.ac.ir

چکیده

کلی باسیلوز یک بیماری شایع در واحدهای پرورش مرغ های گوشتی بوده که بواسطه مقاومت باکتریائی و استفاده بی‌رویه از داروها طی سالیان متمادی تلفات و خسارات زیادی را به بار آورده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی وجود ژن‌های bla TEM, bla CTX-M و bla SHV در نمونه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور به روش Multiplex-PCR و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این سویه‌ها می‌باشد. در مجموع تعداد ۶۰ جدایه *اشریشیا کلی* از نمونه‌های مدفوعی طیور بدست آمد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر طبق دستورالعمل CLSI و براساس روش انتشار در ژل تعیین شد. DNA سلولی با استفاده از کیت DNA-سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج و PCR چندگانه به منظور شناسایی ژنهای CTX-M, SHV و TEM انجام شد. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که، کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به ایمی پنم (۰٪) و آزترونام (۷۷٪) بود. ۴۱ (۶۸,۳ ٪) سویه دارای ژن CTX-M، ۲۸ (۴۶,۶ ٪) سویه دارای ژن TEM بودند. هیچ کدام از نمونه‌ها دارای ژن SHV نبودند. ۱۶ سویه (۲۶ ٪) به طور همزمان دارای ژن‌های TEM و CTX-M بودند. روش دیسک دیفیوژن برای تشخیص آزمایشگاهی حضور ESBLs، روشی بسیار کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشدکه می‌تواند با توجه به اهمیت ارگانیسم‌های تولیدکننده ESBLs به آزمون‌های روتین اضافه گردد. در ضمن، برای تعیین ژنوتیپ می‌توان از آزمون PCR استفاده کرد.

کلمات کلیدی: ژن‌های مقاومتی، *اشریشیا کلی*، Multiplex-PCR، حساسیت آنتی بیوتیکی

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 25-30

Detection of bla TEM, bla CTX-M and blaSHV in *Escherichia coli* isolated from poultry by multiplex-PCR and determination of the strains susceptibility profile in Kerman province

By: Hasannejad, R., MSc, Department of Biology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. Ghanbarpour, R., (Corresponding Author) Professor, Department of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran. Amini, K., Assistant Professor, Department of microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. Nasr J., Department of Animal Sciene, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh I. R. Iran.

Received: September 2015 Accepted: December 2015
E-mail:ghanbar@uk.ac.ir

Colibacillosisis one of the common illness in the Broiler chicken farms that increase resistance and overuse of drugs in recent years has brought a lot of losses. The aim of the current study was the detection of bla TEM, bla CTX-M and bla SHV in *Escherichia coli* isolated from poultry by multiplex-PCR and their antibiotic susceptibility profile. A total of 60 isolates of *E. coli* were collected from the poultry. The antibiotic susceptibility test was determined using the disk diffusion method agreeing with CLSI guideline. Cellular DNA was extracted by CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) and MPCR was performed for the identification of the CTX-M, SHV and TEM genes. The antibiotic susceptibility test results showed that, the lowest and highest resistance rate were related to imipenem (0%) and aztronam (77%) , respectively. 41(68.3%) , 28(46.6%) and 0(0.0%) strains were positive for CTX-M, TEM and SHV, respectively. 16(26%) isolates carry out both TEM and CTX-M. Disk diffusion method for laboratory diagnosis of ESBLs is highly functional and cost-effective method that can be given to the importance of ESBLs-producing organisms to test routine is added. In addition, PCR assay for genotyping can be used.

Key words: Resistancegenes, *Escherichia coli*, multiplex-PCR, antibiotic susceptibility

مقدمه

اشریشیا کلی مهم‌ترین عضو خانواده انتروباکتریاسه و باسیلی گرم منفی، متحرک با داشتن تار لرزان (فلاژل) پیرامونی (پریتریکوس)، بیهوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد که بخشی از میکروبیوتای طبیعی روده انسان، پرندگان، ماکیان و پستانداران را تشکیل می‌دهد. سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زا سبب بروز عفونت‌های روده‌ایی یا خارج روده‌ای در تعدادی از میزبان‌های اختصاصی می‌شوند (۱). بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری شامل اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک، ترومبوتیک ترومبوستیوپنی پورپورا، سندرم اورمی همولیتیک و در موارد شدید مرگ می‌باشد. طیف وسیعی از عفونت‌های خارج روده‌ای در انسان و حیوانات به وسیله سویه‌های *اشریشیا کلی* خارج روده‌ای (ExPEC-Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*) ایجاد می‌شوند. از آن جمله می‌توان به سویه‌های Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) عامل بیماری‌زای طیور) و Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) عامل عفونت دستگاه ادراری در انسان) اشاره نمود (۳ و ۲). کلی باسیلوز یک بیماری شایع در واحدهای پرورش مرغ‌های گوشتی بوده که بواسطه مقاومت باکتریائی واستفاده بی‌رویه از داروها طی سالیان متمادی تلفات و خسارات زیادی را به بار آورده است. افزودن آنتی‌بیوتیک به جیره غذایی دام‌ها، استفاده نادرست، بیش از حد و خودسرانه از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب بروز سویه‌های مقاوم از میکروب‌ها شده که امروزه مشکلات اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها وجود دارد. مقاومت در این ارگانیسم می‌تواند با منشا کروموزوم (ذاتی) و یا پلاسمید (اکتسابی) باشد که در این حالت به سهولت در بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف حتی بین جنس‌های مختلف باکتریایی به صورت افقی منتقل می‌شود که اصطلاحا"Horizontal (HGT) Gene Transfer گویند (۴). مشکل اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ظهور سویه‌هایی با مقاومت چند گانه (MDR) می‌باشد. عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به طور چشم‌گیری منجر به طولانی‌شدن زمان بستری، افزایش میزان مرگ و میر، بالا رفتن هزینه درمانی در مقایسه با میکروب‌های حساس به آنتی‌بیوتیک می‌گردد (۵). بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز هسته مرکزی حلقه بتالاکتام سبب غیرفعال شدن این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. سیستم‌های طبقه‌بندی مختلفی برای طبقه بندی بتالاکتامازها وجود دارد که بوسیله آمبلر، بوش، جاکوبی و مدیروس ابداع شدند و اساس آن‌ها نوع سوبسترا، ممانعت‌کنندگی و خصوصیات فیزیکی مانند وزن مولکولی، و تقطه ایزوالکتریک می‌باشد. آمبلر این آنزیم‌ها را بر اساس ساختمان اولیه‌شان به ۴ گروه (A-D) تقسیم بندی نمود که نوع B متالوبتالاکتاماز (MBLs)، نوع C همان سفالوسپورینز و نوع A همان بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) می‌باشند. TEM و SHV در گروه A بتالاکتامازی آمبلر و و کلاس be۲ و b۲ از طبقه‌بندی بوش قرار دارند و سردسته آنزیم‌های ESBLs می‌باشند و از تغییر در سکانسیکیا چند اسید آمینه در دو آنزیم مذکور، دیگر آنزیم‌ها حاصل می‌شوند. فراوانترین نوع ESBLs در نمونه‌های بالینی تایپ SHV می‌باشد. ژن کدکننده آن پلاسمیدی بوده و بنابراین به

راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر می‌شود. بتالاکتامازهای SHV توسط کلاولانیک اسید مهار اما توسط EDTA مهار نمی‌شود. اولین ESBL شناسایی شده TEM می‌باشد و انواع مختلفی از بتالاکتاماز نوع TEM با جابجایی در توالی اسیدهای آمینه از TEM-۱ بوجود آمده‌اند. TEM-۱به عنوان اولین بتالاکتاماز کد شده بوسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه‌ها بود که سایر باکتری‌ها از قبیل *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز قادر به تولید آن هستند. گروهی از آنزیم‌های ESBLs که به خانواده TEM و یا SHV متعلق نبوده تحت عنوان CTX-M-۱ شناسایی می‌شوند. CTX-M، معمولاً توسط پلاسمید کد می‌شود و بر روی سفوتاکسیم موثرند. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها را داشته و توسط کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. ۵ گروه اصلی از این آنزیم‌ها که شامل؛ CTX-M۱/۲/۸/۹/۲۵شناسایی شده اند. مصرف مواد غذایی حیوانات آلوده به باکتری‌های مولد آنزیم‌های مقاومتی سهم عمده‌ای در به خطر انداختن سلامت عمومی دارد (۱۱-۴). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بویژه ظهور سویه‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک (MDR)، مشکلات بسیاری را برای درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم هم در عرصه پزشکی و هم دامپزشکی ایجاد کرده است، لذا شناسایی پروفایل مقاومتی سویه‌های مولد عفونت در دام‌ها و انسان‌ها و اطلاع از ارتباط این بروز مقاومت به منظور قطع زنجیره انتقال ژن‌های مقاومتی لازم به نظر می‌رسد. در نتیجه مطالعه حاضر، به منظور شناسایی ژن‌های مقاومت بتالاکتامازی SHV, TEM, CTX-M با استفاده از روش MPCR در اشرشیاکلی جدا شده از طیور(APEC) و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این سویه‌های بدست آمده در استان کرمان می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی و cross-sectional که به مدت ۱ سال از فروردین ۹۳ لغایت فروردین ۹۴ در استان کرمان انجام شد، تعداد ۶۰ نمونه‌مدفوعی طیور با علایم اسهال و مشکوک به کلی باسیلوز از دانشکده دامپزشکی کرمان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مدفوعی با محلول فسفات بافرسالین(PBS) هموژن شدند. پس از جداسازی ذارات جامد و مواد خشک موجود در مدفوع، با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰× دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده و مایع فوقانی در ظروف استریل دیگری در ۴ درجه سلسیوس جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌ها روی محیط مک کانگی آگارو ائوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت یک شبانه‌روز در ۳۷ °C گرم‌خانه‌گذاری شدند. به منظور جداسازی کلنی‌های رشد یافته و مشکوک به *اشریشیا کلی*، از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی مانند TSI،SIM،MR-VP، سیمونسیترات، فنیل آلانینند آمیناز، اوره آز، تولید H۲S، تست تخمیر قندها و احیای نیترات استفاده شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها با استفاده از روش انتشار از دیسک (Kirby–Bauer antibiotic testing) بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) (مرک، آلمان) و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) (۱۲) و برای دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ µg) ، آزترونام (۳۰ µg) ، ایمی پنم (۱۰ µg) ، سفوتاکسیم (۳۰ µg) و سفپیم (۳۰ µg) (تهیه شده از شرکت‌های مدیای هند) انجام شد. برای غربالگری سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) از روش دیسک ترکیبی (Combined disk test-DDS) و بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) صورت گرفت. به طور خلاصه، پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار(مرک، آلمان) ، و سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند، کشت میکروبی به صورت چمنی انجام گردید. سپس دیسک‌های سفتازیدیم(۳۰ µg) ، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید(۳۰/۱۰ µg) ، سفوتاکسیم (۳۰ µg) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید(۳۰/۱۰ µg) (Mast, UK) را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتیمتر از هم بر روی محیط قرار داده و گرمخانه‌گذاری به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سلسیوس

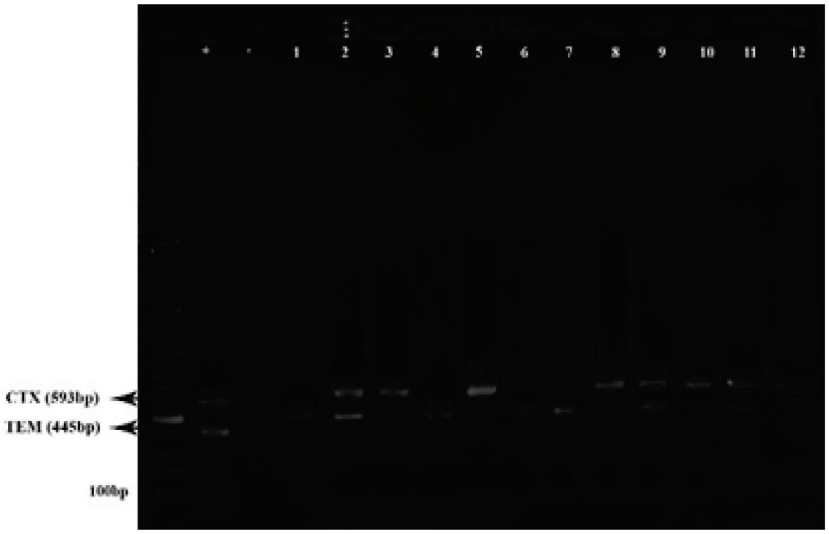
جدول ۱- توالی اولیگو نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده

توالی پرایمرها	توالی اولیگونوکلئوتیدی (5′→3′)	دمای اتصال(°C)	طول قطعه (bp)
blaSHV	F=5′-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3′	۴۵	۷۴۷
	R=5′-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3′	۴۵	
blaTEM	F=5′-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3′	۵۳	۴۴۵
	R=5′-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT-3′	۵۲	
blaCTX-M	F=5′-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3′	۵۴	۵۹۳
	R=5′-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGGG-3′	۵۸	

انجام گردید. با در نظر گرفتن اصول CLSI، هرگاه هاله عدم رشد اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاولانات mm5 ≤ نسبت به سفتازیدیم به تنهایی باشد و یا اینکه هاله عدم رشد سفوتاکسیم- کلاولانات mm3 ≤ نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد، آن جدایه مولد ESBLs در نظر گرفته خواهد شد. برای استخراج v از کیت DNA-سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استفاده گردید. تست مالتی پلکس PCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی blaSHV (۱۴) ، blaTEM (۱۵) و blaCTX-M (۱۵) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول-۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومولdNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCl۲، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می‌باشد. واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۴۰ ثانیه در ۶۱ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۵ و ۱۴). محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC ۲۵۹۲۳ به عنوان کنترل کیفی استفاده شد.

یافته ها

در مجموع ۶۰ نمونه‌ی مدفوعی طیوربا علایم اسهال و مشکوک به کلی باسیلوز جمع‌آوری گردید. بررسی میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار دیسک نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب به ایمی‌پنم (۰٪) و آزترونام



شکل ۱- نتایج آزمون M-PCR از چپ به راست: Ladder 100bp، (+) کنترل مثبت، (-) کنترل منفی، نمونه‌های شماره 1،2،4،6،7،9،10،11bla TEM مثبت، نمونه‌های شماره 2،3،5،8،9،10،11،12 blaCTX مثبت

جدول۲ - تعداد (درصد) حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های *اشریشیا کلای* جدا شده از نمونه‌ی مدفوعی طیور

نام آنتی بیوتیک	حساس(S)	نیمه حساس(I)	مقاوم(R)
سفتازیدیم	۱۲ (۲۰٪)	۴ (۷٪)	۴۴ (۷۳٪)
آزترونام	۸ (۱۳٪)	۶ (۱۰٪)	۴۶ (۷۷٪)
ایمی پنم	۶۰ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
سفوتاکسیم	۱۲ (۲۰٪)	۷ (۱۱٪)	۴۱ (۶۹٪)
سفپیم	۱۵ (۲۵٪)	۲ (۳٪)	۴۳ (۷۲٪)

(٪۷۷) بود. میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک‌ها نیز به شرح زیر بود. سفتازیدیم (٪۷۳) ، سفوتاکسیم (٪۶۹) و سفپیم (٪۷۲) (جدول-۲). ۴۱ سویه (٪۶۸/۳) و ۲۸ ایزوله (٪۴۶/۶) به ترتیب دارای ژن‌های CTX-M و TEM بودند، در حالی‌که هیچ کدام از نمونه‌ها حامل ژنSHV نبودند. ۱۶ نمونه (٪۲۶) دارای ژن‌های TEM و CTX-M بودند (شکل-۱). یافته‌های حاصل از پژوهش نشان داد که فراوانی این ژن‌ها در فنوتیپ‌های با مقاومت آنتی بیوتیکی بیشتر بود.

بحث

اشریشیا کلی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در طیور به شمار می‌رود. میزان مرگ و میر ناشی از بیماری ۵٪ تا ۵۰٪ است. بیماری در جوجه‌ها، اردک و بوقلمون دیده شده است.در جوجه، جوجه‌های مبتلا بی حال بوده و دور یکدیگر جمع می‌شوند و تمایلی به خوردن غذا و آب ندارند. در طیور *اشریشیا کلی* سبب تورم مجرای تخم و پرده قلب می‌شوند(۱۶).جدیدترین مطالعات، بتالاکتامازها را به چهار گروه تقسیم می‌کنند: ۱-بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف (ژن bla) ۲-مشتقات بتالاکتامازهای کلاس A مقاوم به مهار کننده‌ها ۳- بتالاکتامازهای AmpC مرتبط با پلاسمید۴- بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کارباپنم‌ها. ژن‌های بتالاکتامازی در باکتری به ویژه ژن‌های ESBLs، یکی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف است. ارگانیسم‌هایی که این ژن‌ها را در خود حمل می‌کنند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ و میر در بین افراد می‌شوند، چه بسا ادامه روند رو به رشد در ایجاد مقاومت‌هایی از این دسته، جامعه را با خطر جدی مواجه خواهد کرد (۱۸ و ۱۷). در این تحقیق۶۰ نمونه‌ی مدفوعی طیوربا علایم اسهال و مشکوک به کلی باسیلوز از دانشکده دامپزشکی استان کرمان انتخاب گردید و در ظرف استریل و درپوش‌دار مخصوص در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل گردید و پس از انجام کشت و آزمایشات بیوشیمیایی توسط پرایمرهای اختصاصی به روشMPCR مورد بررسی قرار گرفتند. از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده ۴۱ نمونه دارای بتالاکتاماز CTX (٪۶۸.۳) و ۲۸ نمونه دارای بتالاکتاماز (٪۴۶.۶) TEM بودندو بتالاکتاماز SHV هیچ نمونه مثبتی نداشت. در مطالعاتی که توسط علیرضا مباشر کار جدی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ در تبریز صورت گرفت از میان ۴۱ ایزوله اشرشیای کلی (۶۴ درصد) ۱۲۸ ایزوله ESBL مثبت بودند که از این تعداد ۷۴ (۵۷/۸ درصد) حاوی ژن TEM بودند (۱۹). Meyer و همکارانش در سال (۲۰۰۸) نشان دادند که فراوانی باسیلهای اکلای مولد ESBL در ICUهای کشور آلمان از ۱۴ درصد در سال ۲۰۰۱ به۵۲/۱ درصد در سال ۲۰۰۷ رسید. میرصالحیان و همکارانشان در سال ۲۰۰۸ فراوانی ژن‌های TEM و SHV را در ایزوله‌های انتروباکتر بررسی کردند که ۳۰٪ ایزوله‌ها از نظر ژن TEM مثبت گزارش شدند اما از هیچ ایزوله‌ای ژن SHV جداسازی نگردید (۲۰). در مطالعه‌ی دیگری توسط قنبرپور و همکارانش در سال ۱۳۹۰، ۱۰۰ باکتری *اشریشیا کلی* از پریکارد جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز در استان ایلام جداسازی شد و با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیائی مورد تائید قرار گرفت. جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاکتاماز (blaTEM و blaSHV) به روش PCR بررسی شدند. از ۱۰۰ جدایه مورد بررسی ده جدایه (۱۰ درصد) واجد ژن blaTEM بود که از ۶۸٪ نتیجه حاصل شده در مطالعه ما بسیار پایینتر است و دو جدایه (۲ درصد) واجد ژن blaSHV بود که در مطالعه ما این بتالاکتاماز شناسایی نشد و دو جدایه (۲ درصد) هم از نظر هر دو ژن blaTEM و blaSHV مثبت بودند. از ۱۰۰ جدایه مورد بررسی ده جدایه (۱۰ درصد) واجد ژن blaTEM و دو جدایه (۲ درصد) واجد ژن blaSHV و دو جدایه (۲ درصد) هم از نظر هر دو ژن blaTEM و blaSHV مثبت بودند (۲۱). هانگ فانگدر طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ در سوئد نشان داد که از میان ۸۷ ایزوله اشرشیاکلی از طیور که از لحاظ فنوتیپی به عنوان مولدین ESBLs شناخته شده بودند، ٪۶۳ ژنوتیپ TEM بتالاکتاماز را دارا بودندکه در مقابل نتایج مطالعه حاضر که ٪۶۸ بتالاکتاماز TEM بود مشابهت بسیار بالایی دارد (۲۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که همچون سایر مطالعات انجام شده در داخل و خارج کشور فراوانی ژن مقاومت SHV بسیار در ایران کم می‌باشد و فراوانی ژن‌های مقاومت CTX وTEM بیشتر می‌باشد. مقایسه بین نتایج تست‌های فنوتیپی نظیر کشت و PCR نشان می‌دهد که حساسیت، دقت اختصاصیت روش PCRبسیار بیشتر از روش‌های سنتی نظیر کشت است. در کشور ما مطالعات جامع بسیار کمی درخصوص فاکتورهای مهم مقاومت دارویی در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور وجود دارد. با بررسی که انجام شد گونه‌های *اشریشیا کلی* مقاومت نسبتاً بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند که اغلب در نتیجه حضور آنزیم‌های بتالاکتاماز بود.

نتیجه‌گیری

روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن برای تشخیص آزمایشگاهی حضور ESBLs، روشی بسیار کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشد که می‌تواند با توجه به اهمیت ارگانیسم‌های تولید کننده ESBLs به آزمون‌های روتین اضافه گردد. در ضمن، برای تعیین ژنوتیپ می‌توان از آزمون PCR استفاده کرد. اما در مجموع و بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه بنظر می‌رسد تغییر استراتژی درمانی و بکارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت در طیور امری ضروری است.

تشکر و قدردانی

از شورای مرکزی دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه جهت تامین هزینه این طرح تحقیقاتی تقدیر می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Baron EJ. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. Mosby Company 2001; 10(1) :171-86.

2. Janben T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001; 291(5) :371-8.

3. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pa-

thotypes. *FEMS microbiology letters*. 2005; 252(2) :183-90.
4. Bozorgmehr MH, Shojadoust B, Akbari E, Kelidari Y, Shaykhi N.Poultry disease guideline. 2014, Kusareconomics organization publication, 1th, Tehran.
5. Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-Resistant Urinary Tract Isolates of *Escherichia coli*: Prevalence and Patient Demographics in the United States in 2000. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(5) :1402-6.
6. Canton R, Valverde A, Machado E, Peixe L. Prevalence and spread of extended spectrum b-lactamases producing Entrobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1) : 144-56.
7. Colom K, Perez J, Alonso R, Fernandez-Aranguiz A, Larino E, Cisterna R. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Letters* 2003; 223(2) : 147-51.
8. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48(1) : 45-8.
9. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherchia coli. Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48(1) : 45-8.
10. Eisner A, Feierl G, Kessler H, Marth E, Livermore D, Woodford N. Emergence of Enterobacteriaceae Isolates Producing CTX-M Extended-Spectrum ß-Lactamase in Austria. *Antimicrob Agents CH* 2006; 50(2) : 785-7.
11. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1996; 40(2) :349-53.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, 15In information supplement (M100- 315). National committee for Clinical-laboratory standards, Wayne, Pa. 2013.
13. Marra A, Pereira C, Castelo A, do Carmo Filho J, Cal R, Sader H, et al. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum β-lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. *International journal of infectious diseases.* 2006; 10(1) :56-60.
14. Hindi AK, Addos SA, Ahmed EE. Molecular study on multidrug resistant of *Salmonella enterica* isolated from patient with enteric fever in Najaf-Province/Iraq.
15. Monstein HJ, Östholm-BalkhedÅ, Nilsson M, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson L. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*. 2007; 115(12) :1400-8.
16. Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001; 47(6) :763-71.
17. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1989; 33(3) :264.
18. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas J. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996; 40(2) :509-13.
19. Mobasher Karjedi E., Nahaii MR, Mobin H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular evaluation of extended-spectrum beta-lactamase SHV gene in *E. coli* and *K. pneumonia* isolated from clinical samples from 4 hospital teaching in Tabriz. *Iranian journal of microbiology.* 2008; 2(3,4) ;9-17.[in Persian]
20. Meyer E, Gastmeier P, Schwab F. The burden of multiresistant bacteria in German intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008; 62(6) :1474-6.
21. Ghanbarpour R., Banavand R., Hemati Z. Detection of beta-lactamase genes and patterns of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Colibacillosisin Ilam province. *Journal of Veterinary Research Laboratory*. 2012; 4(1) ;90.[in Persian]
22. Ho PL, Chun-Wai Wong R, Chow KH, Yip K, Sai-Yin Wong S, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2008; 41(5) :428-32.