DOI: 10.22092/vj.2018.121259.1447
شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع برخی از ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در اشریشیا کلی جداسازی شده از بوقلمون

• پریسا شهبازی
دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
• محمد جهانتیغ (نویسنده مسئول)
دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
• سعید سالاری
استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۱-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۲-۲۳
Email: mjahantig@yahoo.com

چکیده

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها به‌ویژه در اشریشیا کلی که به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب محسوب می‌شود، باعث ایجاد مشکلات زیادی در درمان بیماری‌ها گردیده است. این آنزیم‌ها باعث ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین و تعداد زیادی از سفالوسپورین‌ها می‌شوند. در این تحقیق میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن‌های *balCTX-M* و *blaTEM* در اشریشیا کلی جداسازی شده از بوقلمون مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور 60 نمونه اشریشیا کلی از طریق تهیه سواب کلواکی از بوقلمون‌هایی که بطور تصادفی انتخاب شده بودند جداسازی گردید. به‌منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن بر روی آگار مولرهینتون با نه دیسک آنتی‌بیوتیکی شامل: جنتامایسین، تتراسیکلین، کلستین، کوتریموکسازول، نورفلوکساین، سفروکسیم، آمپی‌سیلین، نئومایسین و آموکسی‌سیلین استفاده گردید. ژنوم باکتری‌ها به روش جوشانیدن استخراج گردید و برای بررسی حضور ژن‌های *blaCTX-M* و *blaTEM* از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برعلیه آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برعلیه جنتامایسین و نورفلوکساسین (۵ درصد) وجود دارد. میزان شیوع ژن‌های *blaCTX-M* و *blaTEM* در بین جدایه‌های اشریشیا کلی به‌ترتیب ۲۳/۳ درصد و ۱۶/۶ درصد تشخیص داده شد. براساس نتایج این تحقیق مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*ESBLs*) در بین اشریشیا کلی‌های جداسازی شده از بوقلمون به‌مقدار زیادی وجود دارد. بنابراین، حیواناتی مانند بوقلمون که به عنوان غذا برای انسان استفاده می‌شوند، می‌توانند مخزن باکتری‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند و در انتقال ژنهای مقاومت مانند *ESBLs* از طیور به انسان نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: مقاومت‌های ضد میکروبی، اشریشیا کلی، ژن‌های *ESBLs*

Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 2-8

Antibiotial resistance pattern and prevalence of some extende-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from turkey

By: Shahbazi, P., Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran. Jahantigh, M., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran. and Salari, S., Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Email: mjahantig@yahoo.com

Received: 2018-04-04 Accepted: 2018-05-13

Production of beta-lactamase enzyme in bacteria, especially in *Escherichia coli*, which is considered a common opportunistic pathogen, has caused so many problems for the treatment of diseases. This enzyme will cause the resistance to penicillin and a wide range of cephalosporins. The present research aimed to study resistance to antibacterial compounds and the frequency of *blaCTX-M* and *blaTEM* genes in *E. coli* isolated from randomly selected turkeys. Cloacal swab samples were provided and then they were cultured and 60 isolates of *E. coli* were prepared. To assess the resistance of isolated bacteria to antimicrobials, the disc diffusion method was used with nine antimicrobial paper discs, including: gentamycin, tetracycline, colistin, co-trimoxazole, norfloxacin, cefuroxime, ampicillin, neomycin, and amoxicillin. To determine the frequency of *blaCTX-M* and *blaTEM* genes, the genome of isolated bacteria was extracted using a boiling method and then it was amplified using the polymerase chain reaction (PCR). The results of this study showed that *E. coli* isolated from turkeys present the highest drug resistance to ampicillin (100%). The lowest drug resistance was related to gentamycin and norfloxacin (5%). The findings also indicated that the frequency of *blaCTX-M* and *blaTEM* genes among *E. coli* isolated from turkeys was equal to 23.3% and 16.6%, respectively. This study revealed the high incidence of drug resistance patterns and extended spectrum beta-lactamases (*ESBLs*) among *E. coli* strains isolated from turkeys. Therefore, food animals, like turkeys, can serve as a reservoir of antibiotic-resistant bacteria and may play a role to *ESBLs* transmission from poultry to human.

Key words: Drug resistance, *Escherichia coli, ESBLs* genes

مقدمه

مقاومت‌های ضدمیکروبی یکی از بزرگترین و مهم‌ترین مشکلات سازمان‌های مرتبط با سلامت انسان و دام در سطح جهان است و این موضوع تا حدی اهمیت پیدا کرده است که امروزه بسیاری از تحقیقات و انتشارات علمی در زمینه مقاومت به ترکیبات ضد باکتریایی است. در مکانیسم مقاومت، ارگانیسم‌های مقاوم تغییراتی را درخود بوجود آورده‌اند که دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به مبارزه با آنها نمی‌باشند. امروزه از ترکیبات ضدباکتریایی برای اهداف مختلفی در تولید و پرورش دام، طیور و آبزیان استفاده می‌شود که این اهداف می‌تواند شامل افزایش رشد، پیش‌گیری و درمان بیماری‌ها باشد (۳). مصرف بی‌رویه و بلند مدت آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها و افزایش رشد در حیوانات باعث شده‌است که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها بویژه در اشریشیا کلی افزایش پیدا کند (۳, ۶, ۱۱).

اشریشیا کلی یک باکتری میله‌ای گرم منفی و عضو اصلی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. کلی باسیلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پرندگان می‌باشد که به‌وسیله باکتری اشریشیا کلی ایجاد می‌شود (۱۸). کلی‌باسیلوز به عفونت موضعی یا عمومی‌گفته می‌شود که عامل، یا یکی از عاملین اصلی آن، اشریشیا کلی بیماریزای طیور (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) است. بیماری کلی‌باسیلوز می‌تواند به‌صورت ثانویه متعاقب عفونت‌های تنفسی، اقدامات نامناسب پرورشی یا فاکتورهای مستعد کنندهٔ محیطی ایجاد شود (۱۲).

به‌دلیل روند روبه‌افزایش مصرف این ترکیبات شیمیایی، درحال‌حاضر سویه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها تولید شده‌اند که با مکانیسم‌های مختلف نسبت به آن‌ها از خود مقاومت نشان می‌دهند (۱, ۲۰, ۲۱, ۲۴). یکی از روش‌های ایجاد مقاومت به داروهای ضدباکتریایی تولید آنزیم‌های تخریب کننده آنتی‌بیوتیک‌ها مانند تولید آنزیم‌های بتا-لاکتاماز می‌باشد

(۱۳, ۲۲). آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام باعث تخریب دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها شده و درنهایت باعث از بین رفتن و یا مرگ آنها می‌شوند. آنزیم‌های بتا-لاکتاماز توسط دسته‌ی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*ESBLs*) مانند *CTX-M* و *TEM* کد می‌شوند (۱۳).

به‌دلیل شیوع بالای باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتا-لاکتاماز، امروزه راه‌های مقابله با این باکتری‌ها مهم و مورد نیاز است (۱۳, ۱۶). میزان شیوع *ESBLs* در مناطق جغرافیایی مختلف متغیر بوده و به‌نظر می‌رسد که رابطه نزدیکی با میزان و نوع آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آن مناطق را داشته باشد. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد ژن‌های بتا-لاکتاماز در باکتری‌های جداشده از انسان و دام انجام شده‌است (۴, ۷-۱۰, ۱۵) ولی در مورد میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های جداسازی شده از بوقلمون گزارشی وجود ندارد. لذا، این تحقیق به منظور مطالعه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی برخی از ژن‌های بتالاکتامازی در اشریشیا کلی‌های جداسازی شده از بوقلمون در منطقه زابل انجام گردید.

مواد و روش کار

نمونه گیری از تعداد ۸۵ قطعه بوقلمون به‌ظاهر سالم با استفاده از سوآب کلواکی صورت گرفت. پس از نمونه‌گیری، هر سوآب در پنج میلی‌لیتر محیط کشت Tryptic soy broth (TSB) قرار گرفت و سپس به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸-۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت و سپس بر روی محیط آگار مک‌کانکی کشت داده شد و جدایه‌های باکتری به کمک روش‌های استاندارد میکروب شناسی مورد شناسایی قرار گرفت. بطور خلاصه، از کلنی‌های تخمیر کننده قند لاکتوز مشکوک به باکتری اشریشیا کلی برروی محیط آگار مک‌کانکی گسترش تهیه و به‌روش گرم رنگ‌آمیزی گردید. باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی که همچنین دارای واکنش اسید/اسید در محیط Triple suger (TSI iron agar)، اکسیداز منفی، ایندول مثبت، H_2S منفی، اوره‌آز منفی و سیترات منفی بودند به‌عنوان اشریشیا کلی شناسایی گردید. از تعداد ۸۵ سوآب کلواکی تهیه شده از بوقلمون‌ها در مجموع ۶۰ نمونه اشریشیا کلی جداسازی و شناسایی شدند که برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن بر روی آگار مولرهینتون با نه دیسک آنتی‌بیوتیکی شامل: جنتامایسین (۱۰µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، کلستین (۱۰ µg)، کوتریموکسازول (1.25/23.75 µg)، نورفلوکساین (۱۰ µg)، سفروکسیم (۳۰ µg)، آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، نئومایسین (۳۰ µg) و آموکسی‌سیلین (۲۵ µg) استفاده گردید. بطور خلاصه، ابتدا از کلونی‌های خالص اشریشیا کلی در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی حل گردید تا کدورت آن برابر کدورت لوله استاندارد نیم مک‌فارلند شود. نمونه باکتری از این لوله بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار تلقیح گردید و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی برروی محیط کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت به گرم‌خانه منتقل و نتیجه آزمایش پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرائت و براساس دستورالعمل Clinical and (CLSI Laboratory Standards Institute) تفسیر گردید.

برای استخراج DNA باکتری از یک روش جوشانیدن استفاد شد. ابتدا باکتری در پنج میلی‌لیتر محیط Luria Bertani broth انکوبه شد و برای مدت پنج دقیقه در g۳۶۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی (supernatant) را دور ریخته و قسمت رسوب شده (pellet) در ۲/. میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید و در دستگاه Thermomixer در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. درنهایت این محلول در g ۱۵۰۰۰ برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جداسازی و به‌عنوان DNA در میکروتیوب‌هایی در دمای ۲۰- نگهداری

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *CTX* و *TEM* نشان داده شده است.

ژن هدف	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی		رفرانس
blaTEM	TEM-F TEM-R	´5-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3´ ´5-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3´	۸۵۸ bp	(۵)
blaCTX-M	CTX-F CTX-R	´۳-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-´۵ ´۳-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-´۵	۵۹۳ bp	(۱۷)

گردید.

برای تکثیر ژن‌های *blaCTX-M* و *blaTEM* از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد. پرایمرها پس از بررسی منابع معتبر موجود و تطابق توالی نوکلئوتیدی (BLAST) انتخاب گردید. توالی اولیگونوکلئوتیدهایی که برای واکنش PCR استفاده شدند در جدول ۱ نشان داده شده است (۵, ۱۷).

تمام پرایمرها و محلول‌ها از شرکت پیشگام، تهران، ایران تهیه گردید. واکنش PCR در ۳۵ سیکل و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. از درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه برای تکثیر ژن CTX-M و از ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۵۰ ثانیه برای تکثیر ژن TEM در مرحله اتصال پرایمرها در دستگاه ترموسایکلر استفاده گردید. الکتروفورز محصول PCRبر روی آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. با توجه به عدم دسترسی به سویه کنترل مثبت ثبت شده، یکی از جدایه‌های باکتری که پس از آنالیز محصول PCR توسط دستگاه الکتروفورز در اندازه باند مورد نظر قرار داشت به‌عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد و به‌عنوان کنترل منفی، در واکنش PCR، به‌جای DNA از آب دو بار تقطیر استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در جدایه‌های اشریشیا کلی در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین و نورفلوکساسین (۵ درصد) وجود داشت.

فراوانی مقاومت در اشریشیا کلی‌های جداسازی شده برای تتراسیکلین، کلستین، آموکسی‌سیلین، نئومایسین، کوتریموکسازول و سفروکسیم به‌ترتیب ۵۱/۷ درصد، ۸۰ درصد، ۶۳/۳ درصد، ۱۵ درصد، ۲۳/۳ درصد و ۴۸/۳ درصد بود.

فراوانی ژن‌های *CTX* و *TEM* در جدایه‌های اشریشیا کلی به‌ترتیب ۲۳/۳ درصد و ۱۶/۶ درصد شناسایی گردید (شکل ۱).

بحث

در این مطالعه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز حضور ژن‌های بتالاکتاماز نوع *blaCTX-M* و *blaTEM* در اشریشیا کلی جداسازی شده از روده بوقلمون‌های به ظاهر سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به میزان زیادی در بین اشریشیا کلی‌های جداسازی‌شده از بوقلمون‌های منطقه‌ی مورد مطالعه وجود دارد. تعداد زیادی از باکتری‌های جداسازی شده دارای الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بودند به‌طوری که این مقاومت نسبت به بعضی از ترکیبات ۱۰۰ درصد بود. این وضعیت می‌تواند به‌دلیل استفاده‌های زیاد یا بی‌رویه از این ترکیبات در تولید و پرورش طیور باشد. گاهی ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به‌دلیل استفاده از دوزهای پایین‌تر از دوز درمان و همچنین تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها بدون استفاده از یافته‌های آزمایشگاهی در خصوص حساس یا مقاوم بودن باکتری‌ها باشد. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه سفالوسپورین‌ها موجب بروز سویه‌های تولید کننده *ESBLs* به‌خصوص در اشریشیا کلی گردیده است. از آنجایی‌که ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها در خانواده انتروباکتریاسه برروی پلاسمید قرار دارند از این‌رو قابلیت انتقال آنها در بین جنس‌های مختلف باکتری‌ها وجود دارد.

امروزه، سویه‌هایی از اشریشیا کلی که تولید کننده‌ی *ESBLs* هستند در سرتاسر دنیا به‌شدت گسترش یافته است. بنابراین، سیستم‌های کنترلی موثری مانند انتخاب درمان مناسب برای سویه‌های تولید کننده *ESBLs* مورد نیاز است.

در ایران مطالعات متعددی در مورد حضور ژن‌های *ESBLs* در بین باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مانند اشریشیا کلی در حیوانات و طیور

جدول ۲- فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین ۶۰ نمونه اشریشیا کلی جداسازی شده از بوقلمون نشان داده شده است.

ترکیب ضدباکتریایی									
نتیجه	GM	TE	CL	AMX	N	SXT	NOR	AM	XM
حساس (درصد)	۸۸/۳	۳۰	۲۰	۵	۳۸/۳	۷۳/۴	۸۶/۷	۰	۲۵
نیمه حساس (درصد)	۶/۷	۱۸/۳	۰	۳۱/۷	۴۶/۷	۳/۳	۸/۳	۰	۲۶/۷
مقاوم (درصد)	۵	۵۱/۷	۸۰	۶۳/۳	۱۵	۲۳/۳	۵	۱۰۰	۴۸/۳

جنتامایسین (GM)، تتراسیکلین (TE)، کلستین (CL)، آموکسی‌سیلین (AMX)، نئومایسین (N)، کوتریموکسازول (SXT)، نورفلوکساین (NOR)، آمپی‌سیلین (AM) سفروکسیم (XM).

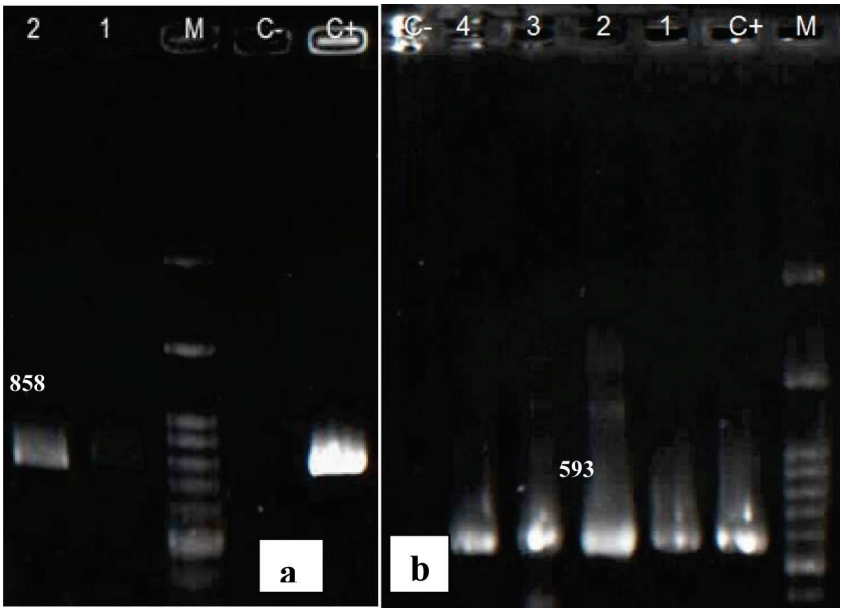
صورت گرفته است. علی اسعدی و دستمالچی در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ برروی ۵۶ جدایه اشریشیا کلی به‌دست آمده از نمونه‌های مدفوع طیور در ارومیه انجام دادند دریافتند که ۲۶ جدایه (۴۶/۴ درصد) دارای ژن *blaCTX-M* و ۱۵ جدایه (۲۶/۷ درصد) دارای ژن *blaTEM* بودند (۴). در مطالعات مهرانی فر و همکاران در سال ۲۰۱۶ در استان کرمان هیچ یک از جدایه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور واجد ژن *TEM* نبودند (۱۵). در یک بررسی دیگر در استان کرمان، حسن نژاد و همکاران (۲۰۱۷) فراوانی ژن‌های *CTX* و *TEM* در اشریشیا کلی‌های جداسازی شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور را به‌ترتیب ۶۸/۳ درصد و ۴۶/۶ درصد گزارش نمودند (۱۰).

براساس مطالعه‌ای که در کشور هند صورت گرفته است ۲۹/۴ درصد اشریشیا کلی که از طیور صنعتی جداسازی شده بودند و این پرندگان مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند دارای ژنهای *ESBLs* بودند. درحالی که اشریشیا کلی که از پرندگان خانگی جداسازی شده بودند و برای آنها آنتی‌بیوتیک مصرف نشده بود فاقد ژن‌های *ESBLs* بودند (۱۹).

مطالعات نشان می‌دهد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کاهش اثربخشی ترکیبات ضدباکتریایی در درمان عفونت‌ها می‌گردد و این مسئله به‌عنوان یک نگرانی مهم برای سلامتی عمومی محسوب می‌شود (۱۴). مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جوجه‌های گوشتی و بوقلمون‌هایی که مصرف آنتی‌بیوتیک بالاتری داشتند بیشتر از تخم‌گذارهایی بود که مصرف آنتی‌بیوتیک کمتری داشتند (۲۳). بعلاوه، وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشابه در اشریشیا کلی‌های جداسازی شده از افرادی که با این پرندگان کار می‌کردند، این مطلب را تایید می‌کند که ارگانیسم‌های دارای مقاومت می‌توانند از پرندگان به انسان منتقل شوند (۲).

نتیجه‌گیری کلی

میزان بالایی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز حضور بیش از یک ژن مقاومت در بین اشریشیا کلی‌های بوقلمون می‌تواند در اثر مصرف بی‌رویه ترکیبات ضدباکتریایی در صنعت تولید و پرورش طیور باشد. اشریشیا کلی موجود در مدفوع بوقلمون‌های سالم می‌تواند مخزن مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باشند که می‌توانند این مقاومت را از طریق غذا یا تماس به انسان منتقل کنند. بنابراین باید گفت که نظارت بر درمان یا تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با پایش دائمی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها ضروری بوده و می‌تواند از بروز سویه‌های مقاوم در جامعه میکروبی جلوگیری به‌عمل آورد. همچنین با تعیین الگوی ژنی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌توان راهکار لازم جهت هدفمندسازی تجویزهای آنتی‌بیوتیکی را به‌منظور جلوگیری از بروز این سویه‌های مقاوم ارائه داد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR در تصویر نشان داده شده‌است.

(a): ژن TEM: چاهک‌های ۱ و ۲ نمونه‌های مثبت.

(b): ژن CTX-M: چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت.

M: مارکر bp۱۰۰.

C+: نمونه کنترل مثبت.

C-: نمونه کنترل منفی

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از همکاری کارشناسان آزمایشگاه میکروب شناسی و کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر نمایند.

منابع مورد استفاده

1- Aarestrup F.M., H. Hasman, Y. Agerso, L.B. Jensen, S. Harksen and B. Svensmark. 2006. First description of *blaCTX-M-1*-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. *J Antimicrob Chemothr* 57,1258–1259.

2- Al-Ghamdi M.S., F. El-Morsy, Z.H. Al-Mustafa, M. Al-Ramadhan and M. Hanif. 1999. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry workers, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia. *Trop Med Int Health* 4,278-283.

3- Alexander T.W., L.J. Yanke, E. Topp, M.E. Olson, R.R. Read, D.W. Morck and T.A. McAllister. 2008. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *App Environ Microbio* 74,4405-4416.

4- Aliasadi S. and H. Dastmalchi Saei. 2015. Fecal carriage of *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamase (*ESBL*) genes by sheep and broilers in Urmia region, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 9,93-101.

5- Arlet G., G. Brami, D. Decre, A. Flippo, O. Gaillot, P.H. Lagrange and A. Philippon. 1995. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of *TEM* β-lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 134,203-208.

6- Costa D., L. Vinué, P. Poeta, A.C. Coelho, M. Matos, Y. Sáenz, S. Somalo, M. Zarazaga, J. Rodrigues and C. Torres. 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol* 138,339–344.

7- Dierikx C., A. Van Essen-Zandbergen, K. Veldman, H. Smith and D. Mevius. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 145,273-278.

8- Gniadkowski M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum b-lactamases (*ESBLs*) and *ESBL*-producing microorganisms. *Clinl Microbiol Infec* 7,597-608.

9- Hammerum A.M. and O.E. Heuer. 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin Infect Dis* 48,916-921.

10- Hasannejad R., R. Ghanbarpour, K. Amini and J. Nasr. 2017. 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. *Veterinary Researches Biological Products (Pajouhesh-va-Sazandegi)* 4,25-30.

11- Jouini A., L. Vinue, K.B. Slama, Y. Saenz, N. Klibi, S. Hammami, A. Boudabous and C. Torres. 2007. Characterization of *CTX-M* and *SHV* extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemothr* 60,1137–1141.

12- Kaper J.B., J.P. Nataro and H.L.T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli. Nat Rev Microbiol* 2,123-140.

13- Manouchehri M. and M. Ahanjan. 2015. Detection of CTX beta-lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection using polymerase chain reaction. *J Mazandaran Univ Med Sci* 25,36-45.

14- Martínez J.L. and F. Baquero. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15,647-679.

15- Mehrani far Z., M. Salehi and K. Amini. 2016. Detection of bla *TEM*, *bla OXA* and bla *SHV* genes in *Escherichia coli* isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR. *Veterinary Clinical Pathology (Veterinary Journal Tabriz)*, 10,81-89.

16- Mirzaee M., M.R. Pourmand, M. Chitsaz and S. Mansouri. 2009. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to *CTX-M*-type extended-spectrum β-bactamases in clinical isolates of *Escherichia coli. Iran J Public Health* 38,10-17

17- Pagani L., E. Dell'Amico, R. Migliavacca, M.M. D'Andrea, E. Giacobone, G. Amicosante, E. Romero and G.M. Rossolini. 2003. Multiple *CTX-M*-type extended-spectrum betalactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northerm Italy. *J Clin Microbiol* 41,4264-4269.

18- Paterson D.L. and R.A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18,657-686.

19- Samanta I., S.N. Joardar, P.K. Das and T.K. Sar. 2015. Comparative possession of Shiga toxin, intimin, enterohaemolysin and major extended spectrum beta lactamase (*ESBL*) genes in *Escherichia coli* isolated from backyard and farmed poultry. *Iran J Vet Res* 16,90-93.

20- Skurnik D., R. Ruimy, A. Andremont, C. Amorin, P. Rouquet, B. Picard and E. Denamur. 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli. J Antimicrob Chemothr* 57,1215-1219.

21- Tadesse D.A., S. Zhao, E. Tong, S. Ayers, A. Singh, M.J. Bartholomew and P.F. McDermott. 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerg Infect Dis* 18,741-749.

22- Tenover F.C., P.M. Raney, P.P. Williams, J.K. Rasheed, J.W.

Biddle, A. Oliver and e. al. 2003. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* 41,3142-3146.

23- Van den Bogaard A.E., N. London, C. Driessen and E.E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemothr* 47,763-771.

24- Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279,996-997.