شناسایی ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaOXA* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جمع‌آوری شده از کلی‌باسیلوز طیور با استفاده از روش Multiplex-PCR

زهره مهرانی فر[۱]، میترا صالحی[۲]*، کیومرث امینی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
۲- استادیار گروه میکروب‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۴/۹/۱ پذیرش نهایی: ۹۵/۳/۵)

چکیده

مقاومت ضدمیکروبی ایجاد شده به‌واسطه تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) در *اشریشیا کلی* یک تهدید اساسی در کلی‌باسیلوزیس ماکیان محسوب می‌شود. مطالعه حاضر به شناسایی ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaOXA* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از کلی‌باسیلوزیس طیور با استفاده از روش MPCR می‌پردازد. در مجموع، ٦٠ جدایه *اشریشیا کلی* از طیور استان کرمان به‌دست آمد. DNA سلولی با استفاده از کیت DNA-سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج و PCR چندگانه به منظور شناسایی ژن‌های *OXA*، *SHV* و *TEM* انجام شد. نتایج تست CDT نشان داد که ٤٥ جدایه (٧٥ درصد) مولد ESBLs بودند. تعداد ١٩ و ١٣ جدایه (٣١/٦ درصد و ٢١/٦ درصد) به‌ترتیب برای ژن‌های *bla OXA* و *bla aada* مثبت بودند. تعداد ٧ جدایه (١١/٦ درصد) به‌طور هم‌زمان ژن‌های *OXA* و *aada* را حمل می‌کردند. تمام ایزوله‌ها برای ژن‌های *TEM* و *SHV* منفی بودند. نتایج نشان داد، با اینکه روش دیسک دیفیوژن برای شناسایی ESBLs روشی بسیار کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشد، ولی روش جدید طراحی‌شده Multiplex-PCR در این مطالعه می‌تواند به صورت روزمره در آزمایشگاه تشخیصی دامپزشکی برای شناسایی انتروباکتریاسه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) به‌کار رود.

کلید واژه‌ها: ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، *اشریشیا کلی*، Multiplex-PCR، کلی‌باسیلوزیس.

مقدمه

اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) یکی از اعضای فلور میکروبی در قسمت‌های انتهایی روده پستانداران و پرندگان محسوب می‌شود. اکثر جدایه‌های این باکتری بیماری‌زا نیستند، اما برخی از سروتیپ‌های آن در پرندگان بیماری‌هایی نظیر سپتی‌سمی، عفونت کیسه

زرده، تورم صفاق، تورم مجرای تخم، التهاب غشای مفاصل، تورم ناف، آبسه کف پا و تورم کیسه‌های هوایی را ایجاد می‌کنند. این بیماری‌ها را در مجموع کلی-باسیلوزیس می‌نامند (Lutful Kabir, 2010). این بیماری بیشتر در جوجه‌های گوشتی بروز می‌کند، اما ماکیان و بوقلمون‌ها ممکن است دچار سپتی‌سمی شوند. سپتی‌سمی شدیدترین حالت کلی‌باسیلوزیس در پرندگان به‌شمار می‌آید (Haider *et al*., 2004). این بیماری به طروق مختلف ازجمله مدفوع، استنشاق، انتقال عمودی (تخمدان یا همان مادر به جوجه) و گوارش منتقل می‌شود. این بیماری تلفات زیادی را در صنعت دامپروری ایجاد می‌کند و در نتیجه سبب خسارات فراوان اقتصادی می‌گردد (Caudry and Stanisich, 1979). برای جلوگیری از بروز چنین بیماری به‌کارگیری بهترین شرایط پرورش و رعایت معیارهای بهداشتی به منظور به حداقل رساندن آلودگی تخم‌مرغ ضروری می باشد. در اغلب حالات درمان علائم با استفاده از مایعات و پادزهرها صورت می‌گیرد. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی نظیر تتراسایکلین، کلرامفنیکل و بتالاکتام‌ها جهت جلوگیری از کاهش تلفات ناشی از کلی‌باسیلوزیس استفاده می‌شود (Linton *et al*., 1977). در سال های اخیر افزودن آنتی‌بیوتیک به زنجیره غذایی دام‌ها، استفاده غیر اصولی، بیش از حد و خودسرانه از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب بروز جدایه‌های مقاوم از میکروب‌ها شده که مشکلات اساسی را در دامپزشکی و همچنین پزشکی ایجاد کرده‌اند، به‌طوری‌که معضل اصلی در این خصوص ظهور جدایه‌هایی با مقاومت چند گانه (MDR) می‌باشد (Al-Jasser, 2006). بتالاکتام‌ها به‌دلیل قدرت سمیت پایین برای سلول‌های یوکاریوتی، طیف اثر گسترده و اثر ضد میکروبی قوی، از پرمصرف‌ترین گروه آنتی‌بیوتیکی محسوب می‌شوند. بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز هسته مرکزی حلقه بتالاکتام سبب غیرفعال شدن این آنتی-بیوتیک‌ها می‌شوند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها تولید آنزیم‌هایی تحت عنوان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) می‌باشد که این عوامل به طور عمده روی پلاسمیدها قرار دارند و این امر سبب تسهیل در گسترش این عوامل می‌گردد (Schwaber *et al*., 2005). در سال ۱۹۸۰ آمبلر این آنزیم‌ها را بر اساس توالی آمینواسیدی به ٤ گروه (A-D) تقسیم‌بندی نمود که نوع B دارای جایگاه فعال روی (Zn^{2+}) بوده و یک متالوبتالاکتاماز (MBLs) می‌باشد (مهاجری و همکاران، ۱۳۹۰). نوع A همان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) با جایگاه فعال سِرین و نوع C همان سفالوسپورینار (*AmpC*) با جایگاه فعال سِرینی هستند. *TEM* و *SHV* سردسته آنزیم‌های ESBLs (Extended spectrum beta-lactamase)، می-باشند که در گروه A از طبقه‌بندی بتالاکتامازی آمبلر و کلاس be2 و b2 از طبقه‌بندی بوش قرار دارند و از تغییر در سکانس یک یا چند اسیدآمینه در دو آنزیم فوق، دیگر آنزیم‌ها حاصل می‌شوند به گونه‌ای که تا کنون ۱۷٤ تحت‌گونه از TEM و ۱۱۹ تحت‌گونه از SHV از سراسر جهان گزارش شده اند. این تغییرات سبب گرایش این دسته آنزیم‌ها به سوبستراهای اختصاصی نظیر سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم به‌ویژه سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم می‌گردند (مهاجری و همکاران، ۱۳۹۰). شایع‌ترین نوع ESBLs در نمونه‌های کلینیکی، نوع *SHV* می‌باشد که ژن

کدکننده آن پلاسمیدی بوده و بنابراین به راحتی در میان سویه جدایه‌های باکتریایی منتشر می‌شود (Al-Tawfiq, 2006). اولین SHV-1 در سال ۱۹۷۲ توسط پیتون کشف و تحت عنوان PIT-2 نام‌گذاری شد که طبق تقسیم‌بندی بوش در کلاس A قرار گرفت (Pitton, 1972). بتالاکتامازهای *SHV* توسط کلاولانیک اسید مهار، اما توسط EDTA مهار نمی‌شوند. اولین ESBL شناسایی شده، *TEM* می‌باشد و انواع مختلفی از بتالاکتاماز نوع *TEM* با جابه‌جایی در توالی اسیدهای آمینه از *TEM-1* به‌وجود آمده‌اند. *TEM-1* به عنوان اولین بتالاکتاماز کد شده به‌وسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه‌ها بود که سایر باکتری‌ها از قبیل *پسودوموناس آئروژینوزا* نیز قادر به تولید آن هستند. بتالاکتامازهای نوع *OXA* در کلاس D مولکولی قرار می‌گیرند و قادر به غیرفعال کردن اگزازولیل پنی‌سیلین‌ها مانند دی‌کلوگزاسیلین، کلوگزاسیلین و اگزاسیلین هستند (Duttaroy and Mehta, 2005). به طور خلاصه مطالعات و گزارش‌های متعدد حاکی از شیوع پراکنش این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و موید یک مشکل جهانی است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های *TEM*، *SHV* و *OXA* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از کلی‌باسیلوزیس طیور با استفاده از روش MPCR می‌باشد.

موارد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و ایزولاسیون باکتری

در این مطالعه تجربی، به مدت ۱۲ ماه و در طول سال ۱۳۹۳ تعداد ٦٠ نمونه از مدفوع طیور (ماکیان) با علایم مشکوک به کلی‌باسیلوزیس از دانشکده دامپزشکی استان کرمان گردآوری شد. پس از هموژن کردن نمونه‌های مدفوعی با محلول فسفات بافر (PBS)، جداسازی ذرات جامد و مواد خشک موجود در مدفوع، با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده و فاز رویی (Supernatant) در ظروف استریل دیگری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری گردید. سپس نمونه ها روی محیط معمول از قبیل مک‌کانگی آگار، گزیلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD)، سالمونلا شیگلا آگار (SSA) و تیوسولفات سیترات نمک صفرا سوکروز (TCBS) (مرک، آلمان) کشت و به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور شناسایی کلنی‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و استاندارد نظیر MCA، EMB، ECC، Chrome Agar *E. coli*، کاتالاز، اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی مانند TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات، اوره آگار، نیترات آگار و تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها مورد استفاده قرار گرفت. بعد از تعیین گونه‌های باکتری *E.coli*، با آزمونهای بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) استفاده گردید. تعدادی از کلونی باکتری را بوسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک-فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده ودیسک های آنتی‌بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه

انکوبه گردیده و بعد از ٢٤ ساعت نتایج قرائت گردید (Cockerill, 2011).

Multiplex-PCR

به منظور شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی، DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از کیت DNA-سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج گردید. MPCR برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی *SHV*، *TEM* و *OXA* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ١) (Maynard *et al.*, 2003). در نهایت، واکنش M-PCR به حجم نهایی٢٥ میکرولیتر شامل ٦/٣ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، $MgCl_2$ (3 mM) و dNTPs (0.4 mM)، ٠/٩ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ٠/٨ میکرومولار، ٠/٨ میکرولیتر از DNA الگو (١٠ نانوگرم) و ١٢/٥ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ٣٥ سیکل به‌صورت زیر انجام گرفت:

یک سیکل ١٥ دقیقه در ٩٥ درجه سانتی‌گراد (دناتوراسیون اولیه)، سپس ٣٠ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ٣٠ ثانیه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ٢٥ ثانیه در ٥٩ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن ٦٠ ثانیه در ٧٢ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً یک سیکل ١٠ دقیقه در ٧٢ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر روی ژل آگارز ١ درصد الکتروفورز شده و در نهایت با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه UV لومیناتور با اشعه ماوراء بنفش بررسی، عکس‌برداری و ضبط گردیدند. برای تمامی موارد، از سویه *اشریشیا کلی* استاندارد ATCC 25922 استفاده شد.

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ١٩ و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تحلیل قرار گرفت.

جدول ١- توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده Multiplex-PCR

جدول پرایمرهای مورد استفاده			
پرایمر	توالی پرایمر (٣ ← ٥)	ژن هدف	اندازه باند (bp)
blaTEM-F	GAGTATTCAACATTTTCGT ACCAATGCTTAATCAGTGA	*TEM*	٨٥٧
blaTEM-R			
blaSHV-F	TCGCCTGTGTATTATCTCCC	*SHV*	٧٦٨
blaSHV-R	CGCAGATAAATCACCACAATG		
blaOXA-F	GCAGCGCCAGTGCATCAAC	*OXA*	١٩٨
blaOXA-R	CCGCATCAAATGCCATAAGTG		
aadA-F	TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	*aadA*	٢٨٤
aadA-R	CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG		

یافته‌ها

جدایه‌های باکتریایی و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

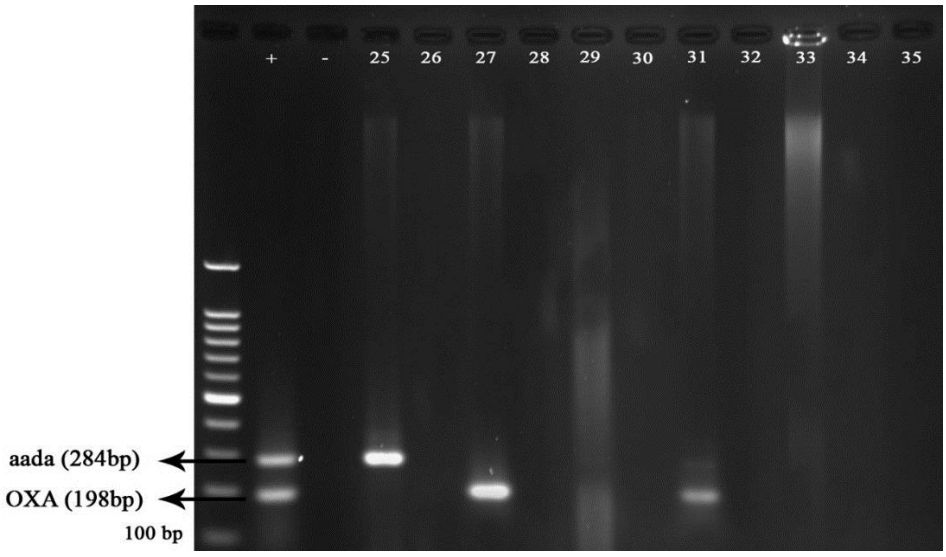
بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی استاندارد، در مجموع تعداد ۶۰ سویه *اشریشیا کلی* از طیور دارای علایم اسهال و مشکوک به کلی باسیلوزیس جمع‌آوری گردید. به منظور شناسایی جدایه‌های مولد ESBLs از روش CDT استفاده شد که ۴۵ ایزوله (۷۵٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت بودند (جدول ۲). همچنین در تعدادی از جدایه‌های تحت بررسی فنوتیپ مقاومت به چند آنتی بیوتیک (MDR) مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد (درصد) فراوانی جدایه‌های اشریشیا کلی مقاوم به چند دارو (MDR)

سویه های با مقاومت چند داروئی							
مقاوم به ۹ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۸ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۷ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۶ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۵ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۴ آنتی‌بیوتیک	مقاوم به ۳ آنتی‌بیوتیک
۴ (٪۶)	۷ (٪۱۱)	۱۰ (٪۱۶)	۱۳ (٪۲۱)	۱۵ (٪۲۵)	۱۹ (٪۳۱)	۲۷ (٪۴۵)

شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی

از میان ۶۰ جدایه *E. coli*، ۳۲ جدایه از لحاظ تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف مثبت بودند، که ۱۹ سویه (٪۳۱/۶) حامل ژن *bla OXA*، ۱۳ جدایه (٪۲۱/۶) دارای ژن بتالاکتاماز *bla aada* بودند. در این مطالعه ژن‌های *bal TEM* و *bla SHV* در هیچ‌کدام از نمونه ها (٪۰/۰) شناسایی نشد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج آزمون M-PCR از چپ به راست: Ladder 100bp – +C؛ کنترل مثبت- -C؛ کنترل منفی- باند ۱۹۸ bp بتالاکتاماز OXA، باند ۲۸۴ bp بتالاکتاماز aada.

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع بالای بیماری‌های تنفسی پرندگان همه ساله خسارات قابل توجهی را به صنعت پرورش طیور کشور وارد می‌کند که بیماری‌های باکتریایی و در رأس آنها عفونت‌های ناشی از باکتری *اشریشیا کلی* سهم عمده‌ای در بروز این مشکل دارند (Turtura *et al.*, 1990). عبدالهی خیرآبادی و همکاران در سال ۱۳۹۱ نشان دادند که ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین از جمله داروهای شاخص در درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* هستند (عبدالهی خیرآبادی و همکاران، ۱۳۹۱). بنابراین، این آنتی‌بیوتیک را می‌توان به عنوان آنتی‌بیوتیک انتخابی (Therapeutic Choices) معرفی نمود، اما تفاوت در نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند به علت تفاوت در نوع نمونه (نمونه انسانی در مقایسه با نمونه دامی و اندیکاسیون دارو در این نمونه‌ها) باشد (امیری و همکاران، ۱۳۹٤؛ بابایی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین به منظور شناسایی جدایه‌های مولد ESBLs از روش CDT استفاده شد که ٤٥ ایزوله (۷۵٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت بودند. این یافته با نتایج مطالعه اسلامی و نجار پیراهه هم‌خوانی دارد (اسلامی و نجارپیرایه، ۱۳۹۱). آنالیز مولکولی ژن‌های بتالاکتامازی نشان داد که ۳۲ سویه (۵۳/۳٪) دارای ژن بتالاکتاماز بودند. بیشترین و کمترین فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی تحت مطالعه به ترتیب مربوط به bla_{OXA} (۱۹ جدایه، ۳۱/٦٪) و bla_{aada} (۱۳ جدایه، ۲۱/٦٪) می‌باشد. همچنین در ۷ جدایه (۱۱/٦٪) حضور هم‌زمان دو ژن bla_{OXA} و bla_{aada} به اثبات رسید. در این مطالعه ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در هیچ‌کدام از نمونه‌ها ردیابی نشد. مطالعات فراوانی روی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام شده که به‌عنوان مثال می‌توان به فراوانی ژن *TEM* در ترکیه (۷۲٪) و هند (۳۰٪) اشاره کرد (Rawat and Nair, 2010; Baig *et al.*, 2014). مسجدیان جزی و همکاران در سال ۱۳۸٦ در اصفهان، فراوانی ژن *TEM* را ٦/٨٤٪ گزارش کردند (مسجدیان جزی و همکاران، ۱۳۸٦)، که در مطالعه حاضر این ژن در جدایه‌های *اشرشیا کلی* شناسایی نشد. برادفورد و همکاران نشان دادند که بیشترین فراوانی آنزیم‌های ESBLs در ایالات متحده، مربوط به خانواده *TEM* بتالاکتاماز می‌باشد (Bradford, 2001). قنبرپور و همکاران، ۱۰۰ سویه *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از پریکارد جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوزیس در استان ایلام را جهت حضور ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} مورد بررسی قرار دادند. ایشان نشان دادند که ۱۰ جدایه (۱۰٪) واجد ژن bla_{TEM} و ۲ جدایه (۲٪) واجد ژن bla_{SHV} بود (قنبرپور و همتی، ۱۳۹۱). در مطالعه ما این ژن‌های مقاومت شناسایی نشد. هو و همکاران طی مطالعه‌ای در سوئد از میان ۸۷ جدایه *اشرشیا کلی* به‌دست آمده از طیور، ٦۳٪ ژنوتیپ *TEM* بتالاکتاماز را نشان دادند (Ho *et al.*, 2008)، که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در خارج از کشور بیشتر از داخل می‌باشد. تفاوت در آمار نوع بیماری، تنوع تغذیه طیور، تفاوت در سن، ژنتیک طیور، تفاوت در سطح بهداشت و شرایط نگه‌داری ماکیان و همچنین شرایط جغرافیایی و اقلیمی گوناگون کشورمان می‌تواند از دلایل اختلاف سطح مقاومت و در نتیجه توزیع ژن‌های مقاومتی باشد. در مطالعه شاهی و همکاران تعداد ۱۵ سویه از ۱٦ جدایه *اشریشیا کلی* به‌دست آمده از زخم پای

دیابتیک‌های دارای فنوتیپ ESBLs مثبت بودند و فراوانی ژن‌های *TEM-1* و *OXA-1* در ۹ سویه و SHV-1 در ۸ سویه مثبت بود (Shahi *et al*., 2013). صرف‌نظر از نتایج شیوع *TEM* و *SHV*، نتایج شیوع *OXA* در مطالعه ایشان با یافته‌های مطالعه پیش‌رو هم‌خوانی دارد. به‌طورکلی، در این تحقیقات کمتر به یک خانواده بتالاکتامازی توجه شده و اغلب، روی کلاس‌های محدودی از هر خانواده مطالعه صورت گرفته است. بنابراین، شناسایی سریع جدایه‌های تولیدکننده ESBLs در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بسیار مهم و ضروری است. استفاده از MPCR باعث صرفه‌جویی در مواد لازم PCR می‌شود. این روش دارای ویژگی و حساسیت بالا با کاهش زمان بررسی-های ژنتیکی و الگوهای مورد نیاز با چند جفت آغازگر به صورت عمومی و اختصاصی بوده و دارای قابلیت اعتماد و سرعت بالا در شناسایی ژن‌ها می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از مدیریت و پرسنل محترم آزمایشگاه پاسارگاد تقدیر نمایند.

منابع

- اسلامی، م. و نجار پیراهه، ش. (۱۳۹۱). شناسایی مولکولی و فنوتیپی بتالاکتامازهای TEM، PER و VEB در سویه-های بالینی *اشریشیا کلی*. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک، دوره ۱۵، شماره ۱، صفحات: ۹-۱.
- امیری، پ.، پورنجف، ا.، شاولی پور، ا.، طیبی، ز.، گودرزی، ه. و اسلامی، گ. (۱۳۹٤). بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* تولید-کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری. مجله طب پیشگیری طبری، دوره ۱، شماره ۲، صفحات: ۹-۱.
- بابایی کسمایی، ز.، امیرمظفری، ن.، فروهش تهرانی، ه.، آرش کیا، ا. و مهدوی، س. و بهرامی، س. (۱۳۹۱). تعیین حساسیت دارویی در *اشریشیا کلی* مقاوم به چند دارو در بیماران سرپایی با عفونت ادراری در تهران. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، دوره ٦، شماره ۹، صفحات: ٤٤-۳۷.
- عبدالهی خیرآبادی، س.، نجفی پور، س.، کفیل زاده، ف.، عبدالهی، ع.، جعفریف، س. و مروج، ع. (۱۳۹۱). بررسی الگوی مقاومت دارویی در سویه های *اشریشیا کلی* جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان ولی‌عصر شهرستان فسا. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، دوره ٤، شماره ۸، صفحات: ۲۷۸-۲۷۳.
- قنبرپور، ر. و همتی، ز. (۱۳۹۱). شناسایی ژن‌های بتالاکتامازها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از کلی باسیلوز در گوشت ماکیان در استان ایلام. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، دوره ٤، شماره ۱، صفحه: ۹۰.

- مسجدیان جزی، ف.، طالبی، م. و رستگار لاری، ا. (۱۳۸٦). ارزیابی مولکولی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های وسیع-الطیف در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه*. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، دوره ۱، شماره ۲، صفحات: ۳٤-۲۷.
- مهاجری، پ.، ایزدی، ب.، رضایی، م.، فلاح، ب.، خادمی، ه. و ابراهیمی، ر. (۱۳۹۰). ارزیابی فراوانی *اشریشیا کلی* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف جدا شده از عفونت‌های ادراری و تعیین الگوی مقاومتی آنها در کرمانشاه. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحات: ۹٤-۸٦.
- Al-Jasser, A.M. (2006). Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A global problem. Kuwait Medical Journal, 38(3):171-185.
- Al-Tawfiq, J.A. (2006). Increasing antibiotic resistance among isolates of *Escherichia coli* recovered from inpatients and outpatients in a Saudi Arabian hospital. Infection Control and Hospital Epidemiology, 27(7): 748-753.
- Baig, M.H., Sudhakar, D.R., Kalaiarasan, P., Subbarao, N., Wadhawa, G., Lohani, M., *et al*. (2014). Insight into the Effect of Inhibitor Resistant S130G Mutant on Physico-Chemical Properties of SHV Type Beta- Lactamase: A Molecular Dynamics Study. PLoS One, 9(12): 1-19.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clinical Microbiology Reviews, 14(4): 933-951.
- Caudry, S.D. and Stanisich, V.A. (1979). Incidence of antibiotic resistant Escherichia coli associated with frozen chicken carcasses and characterization of conjugative R-plasmids derived from such strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16: 701-709.
- Cockerill, F. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 31(1): 42-46.
- Duttaroy, B. and Mehta, S. (2005). Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Indian Journal of Pathology and Microbiology, 48(1): 45-48.
- Haider, M.G., Hossain, M.G., Hossain, M.S., Chowdhury, E.H., Das, P.M. and Hossain, M.M. (2004). Isolation and characterization of Enterobacteria associated with health and disease in sonali chickens. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 2: 15-21.
- Ho, P.L., Chun-Wai Wong, R., Chow, K.H., Yip, K., Sai-Yin Wong, S. and Que T.L. (2008). 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, 41(5): 428-432.
- Linton, A.H., Howe, K., Hartley, C.L., Clements, H.M., Richmond, M.H. and Osborne, A.D. (1977). Antibiotic resistance among *Escherichia coli* O-serotypes from the gut and carcasses of commercially slaughtered broiler chickens: a potential public health hazard. Journal of Applied Bacteriology, 42: 365-378.
- Lutful Kabir, S.M. (2010). Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. International journal of environmental. Research and Public Health, 7(1): 89-114.
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., *et al*. (2003). Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(10): 3214-3221.
- Pitton, J.S. (1972). Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. Review of Physiology, 65: 15-93.
- Rawat, D. and Nair, D. (2010). Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. Journal of Global Infectious Disease, 2(3): 263-274.

- Schwaber, M.J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D. and Carmeli, Y. (2005). High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 49: 2137-2139.
- Shahi, S.K., Singh, V.K. and Kumar, A. (2013). Detection of *Escherichia coli* and associated β-lactamases genes from diabetic foot ulcers by multiplex PCR and molecular modeling and docking of *SHV-1*, *TEM-1*, and *OXA-1* β-lactamases with clindamycin and piperacillin-tazobactam. PLoS One, 8(7): e68234.
- Turtura, G.C., Massa, S. and Chazvinizadeh, H. (1990). Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from carcasses of commercially slaughtered chickens. International Journal of Food Microbiology, 11: 351-354.

Detection of *bla TEM*, *bla OXA* and *bla SHV* genes in *Escherichia coli* isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR

Mehrani Far, Z.[1], Salehi, M.[2*], Amini, K. [3]

1- MSc, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
*Corresponding author's email: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com
(Received: //Accepted: //)

Abstract

Antimicrobial resistance exhibited by extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) production by *E. coli* is considered to be a major threat for colibacillosis in poultry. The present study deals with the detection of *bla TEM*, *bla OXA* and *bla SHV* genes in *E. coli* isolated from colibacillosis by MPCR. A total of 60 strains of *E. coli* were recovered from the poultry in Kerman, Iran. Cellular DNA was extracted by CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) and MPCR was performed for the identification of the *OXA*, *SHV* and *TEM* genes. CDT test results showed that 45 strains (75%) were noted for ESBL production. A total of 19 and 13 strains (31.6% and 21.6%) were positive for *bla OXA* and *bla aada*, respectively and 7 isolates (11.6%) carried both *OXA* and *aada* genes. All isolates were negative for *TEM* and *SHV* genes. The results showed, although disk diffusion is a highly practical and cost effective method for identification of ESBLs, but the novel multiplex PCR assay designed in this study may be routinely used in veterinary diagnostic laboratory for identification of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae.

Key words: ESBLs genes, *E. coli*, Multiplex-PCR, Colibacillosis.