# ردیابی فنوتیپی و مولکولی ژن‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف *CTX-M* در جدایه‌های اشریشیاکلی از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان خرم‌آباد

احسان رشیدیان[*1]، سکینه نادعلی[2]، سید محمد نایب آقایی[3]، حسن نوروزیان[4]

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۳- دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۵ / زمستان ۹۵ / مسلسل ۷۴

## چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۸/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۳۰

**مقدمه:** اکثر سویه‌های *اشریشیاکلی* دارای مقاومت چندگانه دارویی بوده و این باکتری عامل اصلی بیماری کلی‌باسیلوز طیور است، صدمات اقتصادی عفونت‌های حاصل از *E.coli* خصوصاً در صنعت طیور بسیار بالا بوده و سالانه هزینه‌های زیادی صرف درمان بیماری‌های ناشی از آن با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، لذا هدف از این مطالعه ارزیابی حضور ژن *bla-CTX-M* در جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از نمونه‌های مرضی طیور می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ۱۰۰ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* از اندام‌های مختلف طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز جداسازی گردید و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت، جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های *CTX-M* به روش PCR بررسی شدند.

**یافته‌ها:** از ۱۰۰ جدایه مورد بررسی ۴ جدایه (۴٪) به صورت ESBL مثبت بودند، از این تعداد نیز ۲۵٪ دارای ژن *CTX-M* بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به اهمیت *اشریشیاکلی* در عفونت‌های طیور و همچنین شیوع بالای سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف باید از روش‌های تشخیصی سریع در تعیین این سویه‌ها در آزمایشگاه‌ها به صورت روتین استفاده گردد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که *اشریشیاکلی* کومنسال دستگاه گوارش طیور به عنوان مخزنی برای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بوده که این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی و انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به انسان دارای اهمیت می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کلی‌باسیلوز، بتالاکتاماز، *اشریشیاکلی*.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی.

پست الکترونیک: Er117kh@yahoo.co.uk

## مقدمه

از زمان شناخته شدن موجوداتی تحت عنوان باکتری‌ها، بشر همواره در چالش برای یافتن داروی مؤثر بر علیه عفونت‌های ناشی از آن بوده است، با این وجود باکتری‌ها نیز به مکانیسم‌های مؤثری جهت از بین بردن خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها مسلح شده‌اند. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، حتی پیش از کشف و گسترش کاربرد آن‌ها آغاز گردیده بود (۱). مهمترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (Extended Spectrum Beta Lactamase) می‌باشند. آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام و همچنین بروز مشکلات جدی در زمان عفونت‌های مختلف به شمار می‌روند (۲،۳). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف عمدتاً توسط دو جنس *Escherichia* و *Klebsiella* تولید می‌شوند ولی سایر جنس‌های باکتری‌های روده‌ای نیز این آنزیم‌ها را تولید می‌کنند (۴). این آنزیم‌ها بر اساس ویژگی‌های ساختاری به چهار گروه A، B، C و D تقسیم شده که گروه‌های A، C و D بر اساس مکانیسم سرین عمل کرده در حالی‌که گروه B برای انجام عملکرد خود نیازمند عنصر روی می‌باشند و متالوبتالاکتاماز محسوب می‌شوند. از مهمترین ESBL هایی که مورد بررسی قرار گرفته‌اند می‌توان به *GES, PER, CTX-M, TEM, SHV* اشاره کرد (۵،۶). اولین بتالاکتاماز موجود در باکتری‌های گرم منفی یعنی *TEM -1* (ابتدای نام بیمار Temoniera) در اوایل سال ۱۹۶۰ مشخص گردید. بتالاکتاماز رایج دیگری که در *کلبسیلا پنومونیه* یافت می‌شود، *SHV -1* (Solphydryl Variable) است، بتالاکتاماز *SHV -1* در اکثر ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به صورت کروموزومی کد می‌شود (۷،۸).

*آنزیم CTX-M* از جمله بتالاکتامازهایی است که به گروه *TEM* یا *SHV* تعلق ندارد (۹). منشأ بعضی از این آنزیم‌ها برخلاف *TEM, SHV* که از طریق جهش نقطه‌ای به وجود آمده‌اند، از ژن‌های کروموزومی Kluyvera Spp (از باکتری‌های محیطی) می‌باشد که ژن‌های مربوطه درون پلاسمید وارد شده و سپس به باکتری‌های پاتوژن منتقل شده‌اند (۱۰). از بررسی‌های سنتتیکی مشخص می‌شود که بتالاکتامازهای نوع *CTX-M*، سفالوتین یا سفالوریدین را بهتر از بنزیل پنی‌سیلین هیدرولیز می‌کنند و ترجیحاً سفوتاکسیم را بیشتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌کنند. آنزیم‌های *CTX-M* به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شود. گروه ۱ شامل انواع ۲۸، ۲۳، ۲۲، ۱۵، ۱۳،۱۲، ۱۰ و ۱- *CTX-M*؛ گروه ۲ شامل انواع ۲۰، ۷، ۶، ۵، ۴، ۲- *CTX-M*؛ گروه ۸ شامل ۸- *CTX-M*؛ و گروه ۹ شامل انواع ۲۷، ۴، ۲۱، ۱۹، ۱۷، ۱۶، ۱۴،۱۳ و ۹- *CTX-M* و گروه ۲۵ شامل ۲۵- *CTX-M* می‌باشد (۱۳-۱۱). به علت استفاده گسترده از عوامل ضد باکتریایی وسیع‌الطیف، مشکل ظهور مقاومت دارویی در چند دهه‌ی اخیر، به شدت رو به وخامت است و تا زمانی‌که تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها ادامه داشته باشد، این موضوع یعنی شیوع ژنوتیپ ESBL در میان سویه‌ها امری عادی تلقی می‌شود (۱۴). اکثر سویه‌های *اشریشیاکلی* دارای مقاومت چندگانه دارویی بوده و این باکتری عامل اصلی بیماری کلی‌باسیلوز طیور است، صدمات اقتصادی عفونت‌های حاصل از *E.coli* خصوصاً در صنعت طیور بسیار بالا بوده و سالانه هزینه‌های زیادی صرف درمان بیماری‌های ناشی از آن با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود؛ با این وجود امروزه افزایش مقاومت نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال، درمان این بیماری را با مشکل مواجه نموده است (۱۵،۱۶). لذا بر آن شدیم که در این مطالعه به بررسی حضور ژن مقاومت *CTX-M* مولد آنزیم بتالاکتاماز در جدایه‌های *اشریشیاکلی* در نمونه‌های مرضی طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز در شهرستان خرم‌آباد بپردازیم.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه طی نمونه‌گیری که در بازه زمانی ۶ ماهه انجام شده، ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* از آزمایشگاه‌های دامپزشکی در سطح شهرستان خرم‌آباد در سال ۱۳۹۴

جمع‌آوری گردید، پس از نمونه‌گیری از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ازجمله پریکارد، کیسه زرده، کبد، کیسه‌های هوایی و ریه و احشاء و مفاصل روی محیط مک‌کانکی کشت داده شدند. تک کلنی‌ها به منظور ایجاد کشت خالص دوباره روی محیط EMB که دارای جلای فلزی بودند، کشت داده شدند. برای تأیید نهایی جدایه‌های *اشریشیاکلی* تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی با استفاده از فرمول IMVIC، انجام گرفت. برای نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌های *اشریشیاکلی* از محیط TSB (Trypticase Soy Broth)، با ۱۵ درصد گلیسرول استفاده شد. برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند از تمام جدایه‌ها تهیه و در محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و سپس از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت (Rosco Diagnostica, Denmark) شامل: سفتازیدیم ۳۰µm جهت آنتی‌بیوگرام روی محیط مذکور قرار داده و نتایج بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستورالعمل CLSI مورد بررسی قرار گرفت.

کلیه جدایه‌های مقاوم به سفتازیدیم به منظور تأیید تولید ESBL با آزمون CDT (Combined Disk Test) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این زمان، سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند از جدایه‌ها تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم- کلاولانیک (۳۰µg/۱۰µg)، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید (۳۰µg/۱۰µg) به فاصله حداقل (۲۰mm) از یکدیگر بر روی محیط قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اگر قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی اسیدکلاونیک پنج یا بیشتر از پنج میلی‌متر از دیسک‌های بدون مهارکننده بزرگتر باشد، سویه مورد نظر را با در نظر گرفتن ضوابط (CLSI) می‌توان ESBL مثبت گزارش کرد (۱۴).

استخراج DNA ایزوله‌های مقاوم از طریق پروسه جوشاندن Boiling انجام گرفت. برای بررسی وجود ژن *blaCTX-M* در جدایه‌ها از پروسه PCR بهره گرفته شد.

برای این منظور واکنش PCR را در حجم نهایی ۲۵µl شامل: ۲µl DNA استخراج شده، ۱۲/۵ µl از Master mix و ۸/۵µl آب مقطر، ۹µl پرایمر ۵۰p mol/µl از هر کدام (Bioneer, German) انجام داده شد.

برنامه زمانی ترموسایکلر در طی ۳۵ سیکل برای تولید محصول (۵۴۴ bp) شامل موارد ذیل:

First Deneturation – ۹۴ درجه سانتی‌گراد- ۲ دقیقه،

Last Deneturation- ۹۵ درجه سانتی‌گراد- ۲ دقیقه،

Anneling- ۵۱ درجه سانتی‌گراد-۳۰ ثانیه،

Extension- ۷۲ درجه سانتی‌گراد- ۳۰ ثانیه و

Last Extension- ۷۲ درجه سانتی‌گراد- ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

الکتروفورز محصول PCR در آگارز ۱ درصد با مارکر ۱۰۰bp انجام شد.

در این آزمایش از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (*K. penumoniae* ATCC 1881) به عنوان کنترل مثبت و سویه‌ی *اشریشیاکلی* (*E. coli* ATCC 25922) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (جدول ۱).

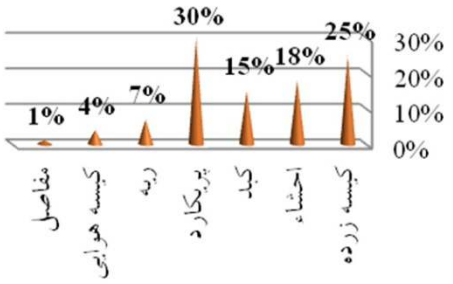
**جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR**

| ژن | توالی پرایمر | اندازه محصول | رفرنس |
|---|---|---|---|
| *CTX-M* | 5-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3<br>5′-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3′ | ۵۴۴pb | ۱۹ |

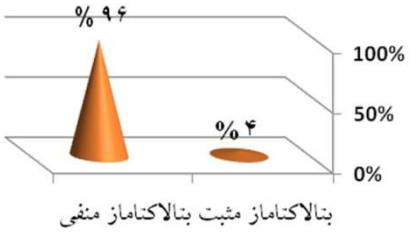
## یافته‌ها

از ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی*، ۳۰ جدایه (۳۰ درصد) از پریکارد، ۲۵ جدایه (۲۵ درصد) از کیسه زرده، ۱۸ جدایه (۱۸ درصد) از احشاء، ۱۵ جدایه (۱۵ درصد) از کبد، ۷ جدایه (۷ درصد) از ریه، ۴ جدایه (۴ درصد) از کیسه‌های هوایی و ۱ جدایه (۱ درصد) از مفاصل جداسازی گردید

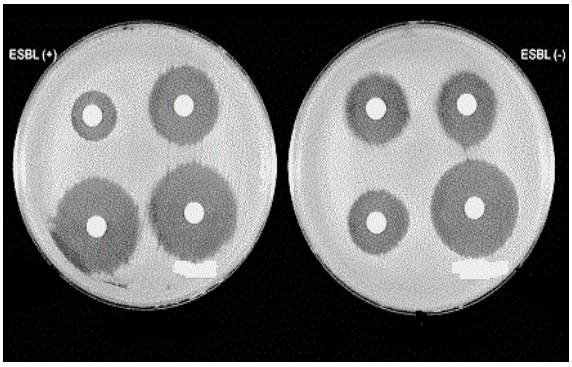
(نمودار ۱). از مجموع ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* عامل کلی‌باسیلوز، ۷ جدایه (۷ درصد) به سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاوم بودند. برای این ۷ جدایه مقاوم، تست تأیید فنوتیپی با روش آزمون ترکیب دو دیسک بر اساس دستورالعمل شماره $M_{100}$- $S_{24}$ مؤسسه استاندارد استفاده گردید. از جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتازیدیم ۴ جدایه (۵۷/۱۴ درصد) ESBL مثبت بودند (نمودار ۲). از ۴ جدایه مذکور، ۳ جدایه از کیسه زرده و ۱ جدایه از پریکارد جداسازی گردید.




**نمودار ۱. درصد جدایه‌ها از نظر تفکیک اندام‌های مبتلا به کلی‌باسیلوز**

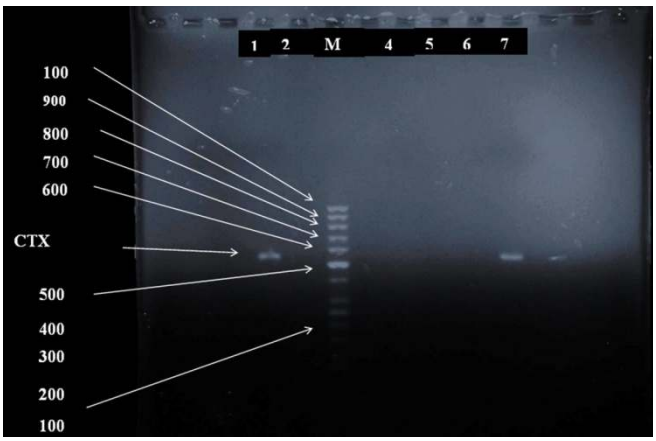



**نمودار ۲. نتایج تست تأیید فنوتیپی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون ترکیب دو دیسک**




**شکل ۱. تشخیص فنوتیپی تولیدکننده‌های ESBL (CDT).**

قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی مهارکننده اسیدکلاولانیک (CV)5≥ بزرگتر از دیسک‌های حاوی سفتازیدیم (CAZ) و سفوتاکسیم (CTX) بدون مهارکننده است.




**شکل۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های *CTX-M***

چاهک ۱. کنترل مثبت ژن *CTX-M* (544 bp) (*k. pneumonia* ATCC 7881)
چاهک ۲. کنترل منفی ژن *CTX-M* (*E.coli* ATCC 25922)
چاهک ۳. M مارکر 100bp
چاهک ۴و ۵و ۶. نمونه‌های منفی ژن *CTX-M*
چاهک ۷. نمونه مثبت ژن *CTX-M*

نتایج واکنش PCR بر روی ایزوله‌های تولیدکننده ESBL حاکی از آن بود که تنها ۱ جدایه (۲۵ درصد) حاوی ژن *blaCTX-M* بودند.

## بحث و نتیجه‌گیری

در طی چند دهه گذشته آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام به دلیل قدرت اثر، طیف گسترده و سمیت انتخابی علیه سلول‌های پروکاریوتی، در درمان عفونت‌ها مورد استفاده قرار گرفته و همین امر باعث افزایش مقاومت نسبت به داروهای مذکور شده است (۱۷). مصرف بی‌رویه و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها سبب نابودی برخی از ارگانیسم‌های حساس شده و شرایط زیستی را برای بقای باکتری‌های مقاوم مساعد نموده است، به نحوی که از کارایی بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها کاسته شده است. بروز مقاومت در اکثر باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ناشی از تغییرات ژنتیکی است که این تغییرات می‌توانند از طریق پلاسمید انتقال پیدا کنند که در این صورت بیمارانی که از داروی خاصی استفاده نکرده‌اند مقاومت دارویی نشان خواهند داد (۱۸). با توجه به اینکه اعضای خانواده انتروباکتریاسه‌ها از عوامل عمده بروز عفونت در انسان و طیور می‌باشند، لذا شناسایی عوامل مزبور و تعیین الگوی دقیق مقاومت

آنتی‌بیوتیکی در راستای کنترل شیوع و نیز کاهش هزینه‌های درمانی مربوطه در شهرستان خرم‌آباد لازم به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر از ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* اخذ شده از طیور مبتلا به کلی‌باسیلوز ۴ جدایه (۴ درصد) ESBL مثبت تشخیص داده شد. نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد که ژن *CTX-M* در تنها ۱ جدایه (۲۵ درصد) وجود دارد و جدایه‌های دارای ژن *blaCTX-M* نسبت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف از خود مقاومت زیادی را نشان دادند. مطالعات گسترده‌ای در نقاط مختلف جهان از جمله ایران جهت تعیین میزان شیوع بتالاکتامازها در عفونت‌های کلی‌باسیلوز طیور صورت گرفته است. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های بهداشتی و درمانی صنعت طیور در خرم‌آباد مفید باشد. الگوی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت و حتی در یک ناحیه ممکن است متفاوت باشد. این تفاوت، احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف ترکیبات آنتی‌باکتریال خصوصاً بتالاکتام‌ها می‌باشد.

طی سال‌های گذشته مطالعاتی در سراسر دنیا و از جمله ایران در این زمینه صورت گرفته است که درصد و شیوع سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBLs و ژن‌های دخیل در این مقاومت را گزارش کرده‌اند. این آمار در شهرهای ایران به ندرت انجام شده است. به عنوان مثال می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

در تحقیقی که توسط حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۱ روی ۵۶ جدایه *اشریشیاکلی* از مدفوع طیور در شهر ارومیه انجام گرفت. ۲۶ جدایه (۴۶/۴ درصد) دارای ژن *blaCTX-M* و ۹ جدایه (۱۲ درصد) به طور همزمان دارای هر دو ژن *blaCTX-M* و *blaTEM* بودند (۱۹).

طی بررسی دیگری که توسط قنبرپور و همکاران در سال ۱۳۹۱ روی ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* از پریکارد جوجه‌های گوشتی در ایلام انجام شد، ۱۰ جدایه (۱۰درصد) و ۱ جدایه *blaTEM* و ۲ جدایه (۲ درصد) واجد ژن *blaSHV* و ۲ جدایه (۲ درصد) هم از نظر هر دو ژن *blaTEM* و *blaSHV* مثبت بودند (۲۰). لذا با توجه به بالا بودن فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز خصوصاً *CTX-M* در ارومیه بایستی با رعایت اصول مناسب تغذیه و بهداشت نظیر استفاده از شیوه‌های مدیریتی مناسب مانند: انتخاب جوجه‌های سالم، تغذیه مناسب، بهسازی بستر، معدوم‌سازی جوجه‌های مبتلا و جلوگیری از ورود بیماری به فارم‌ها و همچنین واکسیناسیون به‌موقع بتوان از ابتلا به بیماری کلی‌باسیلوز تا حد زیادی جلوگیری کرد تا از مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف خصوصاً بتالاکتام‌ها کاسته شود. طبق مطالعه حاضر اصولاً فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز *CTX-M* در خرم‌آباد نسبت به دیگر شهرهای ایران کمتر است، احتمالاً مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در این شهر می‌تواند یکی از دلایل پایین بودن فراوانی این ژن‌ها باشد.

میزان شیوع ژن *CTX-M* در کشورهای مختلف از شهری به شهر دیگر متفاوت است. در طی تحقیقی که توسط گیلریچ و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یک دوره ۷ ماهه در ۷ ناحیه در فرانسه انجام شده از ۱۲ جدایه *اشریشیاکلی*، ۱۱ جدایه (۹۱/۶۶ درصد) دارای ژن *blaCTX-M*-۱ بودند (۲۱).

بلانک و همکاران در سال ۲۰۰۶ در کاتالونیا (اسپانیا) روی ۳۶۰ جدایه که شامل ۱۹۲ جدایه از پرندگان، ۱۳۱ جدایه از خوک و ۳۷ جدایه از خرگوش بودند به این نتیجه رسیدند که ۵۹/۸۶ درصد از این جدایه‌ها دارای ژن ۹-*CTX-M* و ۱۴-*CTX-M* بودند (۲۲).

در بررسی‌هایی که توسط یووان و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام دادند، از مجموع ۵۱ جدایه *اشریشیاکلی* ۳۱ جدایه از لحاظ فنوتیپی ESBL مثبت (۶۰/۷۸ درصد) بودند و ۱۵ جدایه ژن *blaCTX-M* (۴۸/۳۸ درصد) را حمل

می‌کردند (یک جدایه *CTX-M* -۱۴، ۳ جدایه *CTX-M* و ۱۱ جدایه *CTX-M* -۶۵) (۲۳).

در تحقیق دیگری که توسط بادرول و همکاران در سال ۲۰۱۲ در منطقه پادماچار از توابع راجشاهی در بنگلادش انجام شد، از مجموع ۹۶ پرنده از ۲۲/۷ درصد از جدایه‌های *اشریشیاکلی* از نمونه پرندگان، ۳۰ درصد آنها ESBL مثبت بودند که بیشتر ژن‌های *CTX-M* در پرندگان اصلی وحشی دیده شدند (۲۴).

در طی مطالعه‌ای که توسط کلار و همکاران در سال ۲۰۱۰ در چک‌اسلواکی انجام شد، از ۱۵۰ جدایه *اشریشیاکلی*، تنها ۷ جدایه ESBL مثبت بودند (۲/۷۵ درصد) که بیشتر تیپ‌های ESBL از نوع *CTX-M*-۱ و ۱۲-*SHV* بودند (۲۵).

در مطالعات انجام شده توسط کوستا و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پرتغال از مجموع ۷۶ جدایه مدفوعی بوقلمون‌ها، ۳۴ جدایه *اشریشیاکلی* مثبت بودند. که طیف بتالاکتامازهای ESBL برای گروه‌های *TEM* و *CTX-M* در ۳۱ جدایه *E.coli* جدا شده (۹۱/۱۷ درصد) مثبت بودند (۲۶).

در بررسی‌هایی که توسط سامانتا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در هندوستان انجام شد از مجموع ۳۶۰ جدایه از پرندگان و محیط زندگی آن‌ها ۲۷۲ جدایه *اشریشیاکلی* بود که بر طبق بررسی‌های مولکولی آن‌ها نشان داده شد که هیچ کدام از جدایه‌ها ESBL (*blaCTX-M, TEM, SHV*) نبودند (۲۷).

با توجه به اینکه الگوی مقاومت در کشورهای مختلف از جمله ایران در شهرهای مختلف متفاوت است بهتر است برنامه‌هایی اتخاذ شود که با جلوگیری از مصرف بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط طیور و رعایت بهداشت در مرغداری‌ها به یک الگوی مقاومتی یکسان برسیم که دامپزشکان بتوانند تجویز درستی داشته باشند. لذا شناسایی کامل ESBL ها توسط آزمایشگاه‌ها، محدود کردن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های ممانعت کننده از عملکرد بتالاکتامازها، می‌تواند کارایی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را تا حد امکان حفظ کند.

با توجه به اهمیت *اشریشیاکلی* در عفونت‌های طیور و همچنین شیوع بالای سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف باید از روش‌های تشخیصی سریع در تعیین این سویه‌ها در آزمایشگاه‌ها به صورت روتین استفاده گردد. همچنین سازمان‌های دخیل در امر بهداشت صنعت طیور در هر کشور باید هر ساله بررسی‌های گسترده‌ای را در مورد ژن‌های دخیل در مقاومت صورت دهند تا روند گسترش این ژن‌ها در نواحی جغرافیایی آشکار گردیده و با استفاده از یافته‌های مذکور، راهبردهای پیشگیرانه‌ی مناسبی جهت کاهش روند شیوع مقاومت‌های دارویی طراحی و اجرا گردد. زیرا این نتایج می‌تواند به عنوان یک راه‌کار برای دامپزشکان جهت استفاده از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در درمان عفونت‌ها باشد.

## تشکر و قدردانی

از زحمات و همکاری صمیمانه ریاست محترم دانشکده دامپزشکی، اساتید و کارشناسان آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه لرستان تشکر می‌گردد.

## References


1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy Penicillin. Nature. 1940; 146: 837.
2. Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. Characterization of CTX-M ESBLs in Enterobacter cloacae, Escherichia coli and Klebsiella pneumonia clinical isolates from Cario, Egypt. BMC Infect Dis. 2009; 9: 84.
3. Cullik A, Pferifer Y, Prager R, Von Baum H, Witte W. A novel $IS_{26}$ structure, surrounds bla CTX-M genes in different plasmids from German clinical Escherichia coli isolates. J Med Microbial. 2010; 59(5): 580-587.
4. Bush KA, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structures. Antimicrob Agents chemother. 1995; 39: 1211-1233.
5. AL-Zahrani AJ, Aktar N. Susceptibility patterns of Extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia isolated in teaching hospital. Pakistan J Med Res. 2005; 44(2): 64-67.
6. Howard C, van-Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β-lactamases in nosocomial infection-associated Klebsiella pneumoniae in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(3): 659-664.
7. Chanawong A, Zali FHM, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterization of extended-spectrum β-lactamases of the *SHV* family using a combination of PCR- single strand conformational Polymorphism (PCR-SSCP) and PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). FEMS Microbial Lett. 2000; 184: 85-89.
8. Shaokat S, Ouellette M, Sirot D, Joly B, Cluzel R. Spread of SHV-1 β-lactamase in *Escherichia coli* isolated from fecal samples in Africa. Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31: 943-945.
9. Jacoby GA, MunozPrice LS. The new β-lactamases. New England J Med. 2005; 352: 380-391.
10. Bonnet R, Sampaio ILM, Labia R, Champs CD, Sirot D, Chanel C, et al. A novel *CTX-M* beta-lactamase (*CTX-M-8*) in cefotaxim resistat *s* isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 1936-1942.
11. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases. The *CTX-M* enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 130-140.
12. Bradford A, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. *CTX-M*-5 a novel cefotaxime hydrolyzing beta - lactamase from an Outbreak of Salmonella typhimurium in Latvia. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 44: 1936-1942.
13. Bradford PA. Extended-spectrum-β-lactamases in the 21st century. Characterization, Epidemiology, and Detection of this important resistance threat. Clin Microb Rev. 2001; 14(4): 933-951.
14. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for

antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement (M 100- S24). 2014; 32: 3.
15. Shane SM. Coliform infections are responsible for heavy loses, part one. World poult. 2001; 17: 58-59.
16. Van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughters. J Antimicrob Chemother. 2001; 747-763.
17. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, aclass A beta-lactamase from Pseudomonase aeruginosa with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(9): 598-603.
18. Brock TD, Madigan MT. Biology of Microorganisms. 5th, prentice Hall Englewood cliffs, New Jersey. 1992; 93-131.
19. Hosseini SS, Dastmalchi H, Onagh A, Kazemnia A. Identification of broad-spectrum beta-lactamase genes (ESBLS) belonging to b-laCTX-M, blaTEM and blaSHV groups in E.coli derived from poultry faecal specimens in Urmia region. J Vet Lab Res, Semnan Univ. 2012; 4(1): 205. (In Persian)
20. Ghanbarpour R, Banavand R, Hemmati Z. Identification of broad-spectrum beta-lactamase genes (ESBLS) belonging to b-laCTX-M, blaTEM and blaSHV groups in E.coli derived from poultry faecal specimens in Urmia region. J Vet Lab Res, Semnan Univ. 2012; 4(1): 90-91. (In Persian)
21. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, et al. Extended-spectrum β- lactamase *CTX-M* in Escherichia coli isolates from Healthy poultry in France. Am Soc Microb. 2007; 73(14): 4681-4685.
22. Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, et al. ESBL- and Plasmidic class C β-lactamase are producing E.coli strains isolated from poultry. Vet Microb. 2006; 118: 299-304.
23. Yuan L, Liu JH, Hu GZ. Molecular characterization of extended- spectrum-β-lactamases producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan province, China. Am Soc Microb. 2009; 1449-1453.
24. Hasan B, Sandegren L, Melhus Å, Drobni M, Hernandez J, Waldenström J, et al. Antimicrobial Drug- Resistant Escherichia coli in wild birds and Free- rang poultry. Bangladesh Emerging Infect Dis. 2012; 18(12): 55-58.
25. Kolar M, Bardon J, Chroma M, Hricova K, Stosova T, Sauer P, et al. ESBL and AmpC beta-lactamase producing Entero bacteriaceae in poultry in the Czech Republic. Vet Med. 2010; 55(3): 119-124.
26. Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, et al. Prevalence of extended- spectrum-β-lactamase producing Escherichia coli isolates in faecal samples of broilers. Vet Microb. 2009; 138: 339-344.
27. Samanta I, Joardar SN, Das PK, Das P, Sar TK, Dutta TK, et al. Virulence Repertoire, Characterization, and Antibiotic Resistance Pattern Analysis of Escherichia coli

isolated from Backyard layers and their Environment in India. Avian Diseases. 2014; 58: 39-45.

# Phenotypic and molecular detection of ESBL producing CTX-M genes in isolated from Escherichia coli poultry with colibacillosis in Khorramabad city

***Rashidian E*[*1], *Nadali S*[2], *Nayeb Aghaee SM*[3], *Noruzian H*[4]**

*1. Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University,Khorramabad, Iran. Er117kh@yahoo.co.uk*

*2. MSc in Veterinary Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran*

*3 . PhD Student of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine Urima University, Urima, Iran.*

*4. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University,Khorramabad, Iran*

**Received:** *20 Nov 2017* **Accepted:** *20 Dec 2017*

## Abstract

***Background:*** Most strains of *E.coli* with multi drug resistance are major cause of colibacillosis in poultry. The economic damages caused by *E.coli* infections, especially in the poultry industry and also the costs of the disease treatment with antibiotics are very high annually. Therefore, the aim of this study was to investigate the prevalence of *bla CTX-M* genes in *E.coli* isolates obtained from poultry disease in Khorramabad city.

***Materials and Methods:*** In this present study, 100 *E.coli* isolates were collected in variable organs of birds with colibacillosis and then confirmed with biochemical tests. All the positive samples were there after investigated for the presence of *CTX-M* genes by PCR.

***Results:*** 4 (%4) out of 100 *E.coli* isolates were ESBL positive based on the results of combined disk tests. PCR analysis using the specific primers revealed that %25 contained β-lactamases genes encoding *CTX-M.*

***Conclusion:*** Giving the importance of *E.coli* infections in poultry and high prevalence of ESBL-producing strains of rapid diagnostics should used routinely to determine the strains in the laboratories. The results of this study show that the *E.coli* is saprophytic gastrointestinal reservoir for ESBL. This issue is very important in terms of public health and the transfer of antibiotic resistance to humans.

***Keywords:*** Colibacillosis, *E.coli*, ESBL, *CTX-M*

***Citation:*** Rashidian E, Nadali S, Nayeb Aghaee SM, Noruzian H. Phenotypic and molecular detection of ESBL producing *CTX-M* genes in isolated *Escherichia coli* from poultry with colibacillosis in Khorramabad city . Y Yafte. 2018; 19(5): 61-70.