



Phenotypic and Genotypic Study on the Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Ostrich Chicks in the Northeast of Iran

Majid Nikyar¹, Taghi Zahraei Salehi², Mahdi Askari Badouei³, Bahar Nayeri Fasaee²,
Ramak Yahyaraeyat²

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

Received: 11 Jan 2025, Reciver in revised from: 10 Mar 2025, Accepted: 15 Mar 2025, Available online: 10 Jun 2025

doi: [10.22059/jvr.2024.374537.3426](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.374537.3426)

J Vet Res, Volume 80, Number 2, 2025, 121-134

Abstract

BACKGROUND: *Escherichia coli* is part of the natural flora of the gastrointestinal system in birds, such as ostrich, and causes intestinal infections. Antibacterial drugs, such as beta-lactam drugs, are widely used to reduce the damage caused by *E. coli* infections in birds; however, the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) by some strains has rendered these infections difficult to treat.

OBJECTIVES: The present study was conducted to perform a phenotypic and genotypic investigation of broad-spectrum beta-lactamases in fecal *E. coli* isolates from healthy ostrich chicks and those exhibiting digestive symptoms in the northeast of Iran.

METHODS: This descriptive cross-sectional study was performed on 121 fecal *Escherichia coli* isolates from ostrich chicks in 2022. For this purpose, 121 cloacal swabs were collected from 53 apparently healthy chicks and 68 chicks with gastrointestinal disorders located in the farms of South Khorasan and Razavi provinces. The swabs were cultured on selective media and confirmed as *E. coli* using biochemical tests. The antibiotic susceptibility of the isolates was determined using the Kirby-Bauer disk diffusion method. All isolates were screened for the presence of ESBLs using the combination disk method. PCR assays were performed to detect the presence of ESBL genes belonging to the SHV, TEM, CTX-M, and OXA families. Gene distribution data were analyzed using SPSS software version 21 and the Chi-square test.

RESULTS: In the antibiotic susceptibility test, the isolates showed the highest resistance and sensitivity to lincomycin (100%) and ceftiofur (88.42%), respectively. Out of the total of 121 *E. coli* isolates, 42 (34.7%) isolates (21 out of 53 healthy isolates and 21 out of 68 sick isolates) were positive for at least one of the genes. The *bla*TEM gene, present in 37 (30.5%) isolates, had the highest frequency, which included 17 healthy isolates and 20 sick isolates, while the *bla*CTX-M gene was observed in only five (4.1%) isolates, including 3 healthy isolates and two sick isolates. In the phenotypic examination, a total of 13 isolates (10.74%) were identified as producing ESBL isolates; however, no ESBL genes were detected in five isolates. Two isolates had the TEM β -lactamase gene, 5 five isolates had all four β -lactamase genes (SHV, TEM, CTX-M, and OXA) simultaneously, and one isolate had three β -lactamase genes (SHV, TEM, and OXA). No statistical correlation was observed between the distribution of genes in healthy and diseased ostrich chicks.

CONCLUSIONS: In the phenotypic and genotypic studies, 13 and 42 isolates were identified as positive for the presence of ESBLs, respectively. No ESBL gene was isolated from the five phenotypic-positive isolates. Out of 42 genotypic positive isolates, 34 isolates had no phenotypic manifestation. The *bla*TEM gene had the highest frequency in fecal *E. coli* isolates from ostrich chicks.

Keywords: Antibiotic sensitivity, *Escherichia coli*, Extended-spectrum beta-lactamases, Ostrich chicken, Polymerase chain reaction

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Taghi Zahraei Salehi, Tel/Fax: +9821-61117052 / +9821-66431105



How to cite this article:

Nikyar M, Zahraei Salehi T, Askari Badouei M, Nayeri Fasaee B, Yahyaraeyat R. Phenotypic and Genotypic Study on the Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Ostrich Chicks in the Northeast of Iran. Journal of Veterinary Research, 2025; 80(2): 121-134. doi: 10.22059/jvr.2024.374537.3426

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used to identify ESBL genes.

Table 2. Frequency of ESBL-producing isolates.

Table 3. Comparison of ESBL genotype and antibiotic resistance profile. CTX: Cefotaxime, CAZ: Cefazidime, E: Erythromycin, AMX: Amoxicillin, T: Oxytetracycline, SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazole, L: Lincomycin, CZ: Cefazolin, GM: Gentamicin, N: Neomycin, CEF: Ceftiofur, FF: Florfenicol, CL: Colistin, NFX: Enrofloxacin.

Table 4. Frequency of sensitivity, relative sensitivity, and resistance of isolates to 14 antibiotics.

Figure 1. Result of the antibiotic sensitivity test in *Escherichia coli* isolates.

Figure 2. Result of the confirmation test for the ESBL phenotype in *Escherichia coli* isolates.

Figure 3. Electrophoresis image to identify the OXA β -lactamase gene. Lane 1= Negative control, Lane 2= Positive control, Lanes 3-5= positive samples, Lane 6= Marker.

Figure 4. Electrophoresis image to identify the TEM β -lactamase gene. Lane 1= Negative control, Lane 2= Positive control, Lanes 3-6= positive samples, Lane 7= Marker.

Figure 5. Electrophoresis image to identify the CTX-M β -lactamase gene. Lanes 1-5= positive samples, Lane 6= Positive control, Lane 7= Marker, Lane 8= Negative control.

Figure 6. Electrophoresis image to identify the SHV β -lactamase gene. Lane 1= Marker, Lane 2= Positive control, Lane 3= positive sample, Lane 4= Marker.



بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در جدایه‌های شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ در شمال شرق ایران

مجید نیکباز^۱، تقی زهرائی صالحی^۲، مهدی عسکری بدوئی^۳، بهار نیری فسایی^۲، رامک یحیی رعیت^۲

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲ دی ۱۴۰۳، تاریخ بازنگری: ۲۰ اسفند ۱۴۰۳، تاریخ پذیرش: ۲۵ اسفند ۱۴۰۳، تاریخ انتشار: ۲۰ خرداد ۱۴۰۴

doi: 10.22059/jvr.2024.374537.3426

دوره ۸۰، شماره ۲، ۱۴۰۴، ۱۳۴-۱۲۱

چکیده

زمینه مطالعه: /شریشیا کلی بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش در پرندگان، از جمله شترمرغ بوده و باعث عفونت‌های روده‌ای می‌شود. داروهای ضدباکتریایی، همانند داروهای بتالاکتام به‌طور گسترده برای کاهش خسارات ناشی از عفونت با /شریشیا کلی در پرندگان استفاده می‌شوند، اما تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط برخی سویه‌ها، درمان عفونت‌های مرتبط با این ارگانیسم را ناموفق ساخته است.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در جدایه‌های /شریشیا کلی مدفوعی در جوجه شترمرغ‌های سالم و دارای علائم گوارشی در شمال شرق ایران انجام شد.

روش کار: مطالعه حاضر به‌صورت توصیفی مقطعی بر روی ۱۲۱ جدایه /شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ‌ها در سال ۱۴۰۱ انجام شد. بدین منظور ۱۲۱ سواب کلواک از ۵۳ جوجه به‌ظاهر سالم و ۶۸ جوجه با عوارض گوارشی واقع در مزارع استان‌های خراسان جنوبی و رضوی گرفته شد. سواب‌ها از نظر حضور باکتری /شریشیا کلی روی محیط‌های انتخابی کشت داده شدند و پس از رشد، آزمایشات بیوشیمیایی آن را تأیید کرد. حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از دیسک دیفیوژن به روش کربی - بوئر انجام شد. تمام جدایه‌ها جهت حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش دیسک ترکیبی بررسی شدند. برای جست‌وجو و شناسایی ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف مربوط به خانواده‌های SHV، TEM، CTX-M و OXA از آزمون PCR استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های توزیع ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون مربع کای (Chi-squared test) صورت گرفت.

نتایج: در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، بیشترین مقاومت و حساسیت را به ترتیب نسبت به لینکومایسین (۱۰۰ درصد) و سفتیوفور (۸۸/۴۲ درصد) نشان دادند. از مجموع ۱۲۱ جدایه /شریشیا کلی مورد مطالعه ۴۲ (۳۴/۷ درصد) جدایه (۲۱ جدایه از ۵۳ جدایه سالم و ۲۱ جدایه از ۶۸ جدایه بیمار) حداقل از نظر حضور یکی از ژن‌ها مثبت بودند. ژن blaTEM با حضور در ۳۷ (۳۰/۵ درصد) جدایه بیشترین فراوانی را داشت که شامل ۱۷ جدایه سالم و ۲۰ جدایه بیمار و در مقابل ژن blaCTX-M تنها در ۵ (۴/۱ درصد) جدایه مشاهده گردید که شامل ۳ جدایه سالم و ۲ جدایه بیمار بود. در بررسی فنوتیپی در مجموع ۱۳ (۱۰/۷۴ درصد) جدایه به‌عنوان ایزوله‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف شناسایی شدند که در ۵ جدایه هیچ ژن بتالاکتامازی از وسیع الطیف شناسایی نشد. ۲ جدایه دارای ژن بتالاکتامازی TEM، ۵ جدایه به‌طور هم‌زمان دارای هر ۴ ژن بتالاکتامازی SHV، TEM، CTX-M، OXA و ۱ جدایه دارای ۳ ژن بتالاکتامازی SHV، TEM، OXA بود. ارتباطی از لحاظ آماری بین توزیع ژن‌ها در جوجه شترمرغ‌های سالم و بیمار مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نهایی: در بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف، به ترتیب ۱۳ و ۴۲ جدایه مثبت شناخته شدند. در ۵ جدایه مثبت فنوتیپی، هیچ‌یک از ژن‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف مورد بررسی شناسایی نگردید. از ۴۲ جدایه مثبت ژنوتیپی، ۳۴ جدایه تظاهر فنوتیپی نداشتند. ژن blaTEM در جدایه‌های /شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ‌ها دارای بالاترین فراوانی بود.

کلمات کلیدی: /شریشیا کلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، جوجه شترمرغ، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: تقی زهرائی صالحی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه فزاینده‌ای به پرورش شترمرغ در ایران شده است. این علاقه بر استفاده از شترمرغ به عنوان منبع تولیدی گوشت متمرکز است. پرورش شترمرغ در ایران علاوه بر تولید گوشت، نقش مهمی در کشاورزی و اقتصاد نیز ایفا می‌کند. شترمرغ به تعدادی از عوامل عفونی حساس است. بیماری‌های گوارشی، همانند آنتریت عفونی نگرانی مهمی در پرورش شترمرغ می‌باشند، زیرا با کاهش بهره‌وری، افزایش تلفات و خطرات مرتبط با محصولات طیور مورد استفاده انسان، ارتباط مستقیم دارند. *شریشیا کلی* یکی از غالب‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی است که در آنتریت عفونی شترمرغ دخالت دارد (۱-۴).

گونه‌های جنس *شریشیا* که در خانواده انتروباکتریاسه شامل باکتری‌هایی است که هوازی یا بی‌هوازی اختیاری بوده، گلوکز و لاکتوز را با تولید اسید تخمیر کرده و نیترات را احیاء می‌کنند. *شریشیا کلی* رایج‌ترین و مهم‌ترین گونه بیماری‌زای این جنس است (۵) که از جوجه شترمرغ‌های بیمار جدا شده است. این باکتری بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهد و باعث عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای هم در انسان و هم در حیوانات می‌شود. پری‌کاردیت، سپتی‌سمی و آنتریت بخشی از بیماری‌های ایجاد شده توسط *شریشیا کلی* در طیور و شترمرغ است (۶). این باکتری می‌تواند از محیط وارد بدن شترمرغ شود و در روده‌ای که توسط فلور طبیعی محافظت نشده است، کلونیزه و بسته به دیگر فاکتورها باعث التهاب روده شود. علاوه بر این *شریشیا کلی* می‌تواند به گردش خون نفوذ کند و به دو دلیل باعث سپتی‌سمی شود. اول اینکه پرندگان فاقد غدد لنفاوی برای فیلتر کردن باکتری‌ها از لنف می‌باشند. ثانیاً، تحت استرس شدید *شریشیا کلی* می‌تواند به‌طور مستقیم از مخاط روده وارد جریان خون شده و باعث سپتی‌سمی شود (۷). شترمرغ‌های بالغ نسبت به اختلالات سلامتی مقاوم می‌باشند، درحالی‌که پرندگان جوان می‌توانند توسط باکتری‌هایی همانند *شریشیا کلی* خون‌ریزی‌دهنده، کمپیلوباکتر، *سالمونلا* و یا انگل‌ها تهدید شوند (۸). بیشتر مشکلات سلامتی شترمرغ در سه ماه اول زندگی رخ می‌دهند (۶) و مرگ‌ومیر بالای جوجه شترمرغ به‌ویژه در ماه‌های اول زندگی یک معضل است (۹).

داروهای ضدباکتریایی، همانند داروهای بتالاکتام به‌طور گسترده برای کاهش خسارات ناشی از کلی‌باسیلوز در ماکیان استفاده شده که این امر موجب افزایش ایجاد مقاومت به این دسته از داروها گردیده است (۱۰، ۱۱). مکانیسم اصلی مقاومت باسیل‌های گرم منفی به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. انواع مختلفی از این آنزیم‌ها گزارش شده‌اند (۱۲). به‌طور کلی امروزه دو نوع طبقه‌بندی در مورد بتالاکتامازها تقریباً مورد توافق میکروبی‌شناسان و بیوشیمی‌دانان قرار گرفته است:

۱. طبقه‌بندی آمبلر که در این طبقه‌بندی توالی‌های اسیدهای آمینه‌ای بتالاکتامازها، مدنظر قرار می‌گیرد. این طبقه‌بندی براساس جایگاه‌های فعال آنزیمی است که خود می‌تواند دارای بخش سرینی یا اتم روی باشد. به این ترتیب بتالاکتامازها به چهار کلاس A تا D تقسیم می‌شوند. کلاس‌های A، C و D بتالاکتامازهای سرینی می‌باشند که دارای یک زنجیر فعال سرین در جایگاه فعال آنزیمی خود می‌باشند، اما کلاس B دارای عنصر روی در این جایگاه می‌باشد (۱۳، ۱۴).

۲. در طبقه‌بندی بوش - جاکوبی - مدیروس بتالاکتامازها براساس نوع سوبسترا و مهارکننده به سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه ۱ (معادل کلاس C آمبلر) سفالوسپورینازهایی می‌باشند که با اسید کلاوولانیک مهار نمی‌شوند. بتالاکتامازهای گروه ۲ (معادل کلاس‌های A و D آمبلر)، شایع‌ترین نوع بتالاکتامازها، به‌ویژه در خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند که شامل سفالوسپورینازها و هم‌پنی‌سیلینازها می‌باشند که همگی توسط اسید کلاوولانیک مهار می‌شوند. بتالاکتامازهای گروه ۳ (متالوبتالاکتامازها)، کاربامپنازهایی می‌باشند که توسط اسید کلاوولانیک مهار نمی‌شوند، اما EDTA آن‌ها را مهار می‌کند. آن‌ها معادل کلاس B آمبلر می‌باشند (۱۵). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف که در کلاس A آمبلر قرار می‌گیرند، آنزیم‌هایی می‌باشند که ممکن است به‌واسطه موتاسیون در ژن‌های وابسته به پلاسمیدهای مولد بتالاکتامازهای شایع، مانند TEM-1، SHV-1 و OXA-10 یا به‌واسطه آنزیم‌های طبیعی، مانند CTX-M به وجود آیند (۱۲). این آنزیم‌ها حلقه بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز کرده و مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها (مانند آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین)، نسل اول (مانند سفالکسین)، نسل دوم (مانند سفوروکسیم)، نسل سوم (مانند سفتریاکسون و سفوتاکسیم) چون نسل‌های ذکر شده به سفالوسپورین‌ها برمی‌گردد سفالوسپورین‌ها و منوباکتام‌ها (همانند آزرئونام) ایجاد می‌کنند. تولید ESBLs توسط عوامل بازدارنده بتالاکتاماز، همانند کلاوولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شود. این

خصوصیت جهت تشخیص فنوتیپی تولید ESBLs بین انتروباکتریاسه کاربرد دارد. روش‌های مولکولی، همانند پی‌سی‌آر چندگانه جهت مقایسه اپیدمیولوژی یا اهداف کنترل عفونت، مفیدتر می‌باشند (۱۶).

/شریشیا کلی به‌صورت معمول از جوجه شترمرغ‌های بیمار جدا می‌شود، اما مطالعات بسیار کمی درمورد این بیماری‌زای روده‌ای صورت گرفته است (۱۷). دانش علمی کنونی درمورد بیماری‌های شترمرغ ناقص، پراکنده و در اغلب موارد سطحی یا محدود به گزارش‌های محلی است (۵). لاشه‌های شترمرغ ممکن است به فضولات آن‌ها آلوده شده و به‌عنوان یک منبع بالقوه جهت انتقال باکتری‌های مقاوم به دیگر حیوانات، به‌خصوص در کشتارگاه‌های مشترک با دیگر طیور صنعتی، در نظر گرفته شود (۱۸). درنتیجه این باکتری‌ها ممکن است در اثر مصرف گوشت جوجه آلوده و یا تماس مستقیم با مدفوع لاشه‌های آلوده به انسان انتقال یابند. بدین ترتیب این امر به افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم و کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌درمانی در انسان و یا طیور منتج خواهد شد (۱۹). به همین دلایل (داشتن اطلاعات کافی از حضور ژن‌های بتالاکتامازی در پاتوژن‌های روده‌ای) تعیین مقاومت ضد میکروبی در حیوانات مولد گوشت، در اپیدمیولوژی مقاومت دارویی و جایگزینی و تکثیر باکتری‌های مقاوم در انسان (۲۰)، درمان مناسب بیماری، کاهش خسارات ناشی از مصرف دارو و باقیمانده‌های دارویی کمک‌کننده است. باتوجه‌به ناشناخته بودن بحث مقاومت در شترمرغ، هدف مطالعه حاضر بررسی حضور ژن‌های بتالاکتامازی در پاتوژن‌های روده‌ای /شریشیا کلی جداشده از جوجه شترمرغ‌های سالم و جوجه‌های مبتلا به عوارض گوارشی و نیز تعیین مقاومت ضد میکروبی در بین آن‌ها بود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: در مطالعه حاضر از ۱۲۱ قطعه جوجه شترمرغ در بازه زمانی آبان تا دی سال ۱۴۰۱ نمونه‌گیری شد. از تعداد ذکرشده ۵۳ سواب از جوجه‌های به‌ظاهر سالم و ۶۸ سواب از جوجه‌های با عوارض گوارشی (دارای علائم کاهش وزن و اسهال) گرفته شد. ۸۱ نمونه از چهار مزرعه استان خراسان جنوبی (سه مزرعه در شهرستان قاینات و یک مزرعه در شهرستان زیرکوه شامل ۳۰ نمونه از جوجه‌های به‌ظاهر سالم و ۵۱ نمونه از جوجه‌های بیمار) و ۴۰ نمونه از سه مزرعه استان خراسان رضوی (۲۳ نمونه از جوجه‌های به‌ظاهر سالم و ۱۷ نمونه از جوجه‌های بیمار) جمع‌آوری گردید.

در ابتدای ورود، اطلاعات مربوط به مزرعه و جوجه‌ها ثبت و نمونه‌گیری از جوجه‌های ۱ تا ۴ ماهه انجام شد. نمونه‌ها توسط سواب استریل به‌طور مستقیم از کلوآک گرفته شده و در لوله‌های درپیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شدند. بعد از اتمام نمونه‌گیری، لوله‌ها توسط آکاستیو حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

کشت و خالص‌سازی: بلافاصله بعد از نمونه‌گیری، در آزمایشگاه سواب‌ها روی محیط مک‌کانکی آگار (Merck, Germany) و EMB آگار (Merck, Germany) کشت خطی داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. از هر محیط مک‌کانکی، یک جدایه لاکتوز مثبت جهت خالص‌سازی، دوباره در مک‌کانکی کشت داده شد. جدایه‌ها پس از رشد توسط آزمایشات بیوشیمیایی، همانند آزمون تولید اندول (Merck, Germany)، مصرف سیترات (Merck, Germany)، متیل رد (Merck, Germany)، و گس پروسکوئر (Merck, Germany) و کشت در محیط آگار سه قندی آهن‌دار (Merck, Germany) تأیید شدند (۲۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های ESBL

نام ژن	ژن‌های بتالاکتاماز هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر (۵' به ۳')	اندازه محصول (جفت‌باز)	منابع
<i>blaTEM</i>	TEM variants including TEM-1 and TEM-2	TEM-F TEM-R	CATTTCGTCGCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	۸۰۰	(۲۶)
<i>blaSHV</i>	SHV variants including SHV-1	SHV-F SHV-R	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	۷۱۳	(۲۶)
<i>blaOXA</i>	OXA-1, OXA-4 and OXA-30	OXA-F OXA-R	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG	۵۶۴	(۲۶)
<i>blaCTX-M</i>	CTX-M	CTX-M F CTX-M R	GAGTTTCCCCATTCCGTTTC CAGAATAAGGAATCCCATGTTT	۸۸۰	(۲۷)

جدول ۲. فراوانی حساسیت، حساسیت نسبی و مقاومت جدایه‌ها نسبت به ۱۴ آنتی‌بیوتیک.

آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)						۵۳ جدایه سالم			۶۸ جدایه بیمار			۱۲۱ جدایه (تعداد کل)		
	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم	حساس	نسبتاً حساس	مقاوم
سفتاکسیم	۳۹(۷۳/۶)	-	۱۴(۲۶/۴)	۴۳(۶۳/۲)	-	۲۵(۳۶/۸)	۸۲(۶۷/۷۶)	-	۳۹(۳۲/۲۳)	-	-	۱۸(۱۴/۸۷)	-	-	۱۱۶(۹۵/۸۶)
سفتازیدیم	۴۴(۸۳)	-	۹(۱۷)	۵۹(۸۶/۸)	-	۹(۱۳/۲)	۱۰۳(۸۵/۱۲)	-	۱۸(۱۴/۸۷)	-	-	۱۱۶(۹۵/۸۶)	-	-	۱۱۶(۹۵/۸۶)
اریترومايسين	-	۲(۳/۸)	۵۱(۹۶/۲۲)	-	۳(۴/۴)	۶۵(۹۵/۶)	-	۵(۴/۱۳)	۱۱۶(۹۵/۸۶)	-	-	۱۱۶(۹۵/۸۶)	-	-	۱۱۶(۹۵/۸۶)
آموکسی‌سیلین	۱۳(۲۴/۵)	۱۳(۲۴/۵)	۲۷(۵۱)	۱۸(۲۶/۵)	۲۲(۳۲/۳)	۲۸(۴۱/۲)	۳۱(۲۵/۶۱)	۳۵(۲۸/۹۲)	۵۵(۴۵/۴۵)	۲۸(۴۱/۲)	۲۲(۳۲/۳)	۲۸(۴۱/۲)	۳۵(۲۸/۹۲)	۳۵(۲۸/۹۲)	۵۵(۴۵/۴۵)
اکسی‌تتراسایکلین	۲۴(۴۵/۲)	۲(۳/۸)	۲۷(۵۱)	۲۷(۵۱)	۲(۳)	۴۳(۶۳/۲)	۴۷(۳۸/۸۴)	۴(۳/۳۰)	۷۰(۵۷/۸۵)	۴۳(۶۳/۲)	۲(۳)	۴۳(۶۳/۲)	۴(۳/۳۰)	۴(۳/۳۰)	۷۰(۵۷/۸۵)
تری‌متوپریم	۲۶(۴۹)	-	۲۷(۵۱)	۲۵(۳۶/۵)	۱(۱/۵)	۴۲(۶۲)	۵۱(۴۲/۱۴)	۱(۱/۵)	۶۹(۵۷/۰۲)	۴۲(۶۲)	۱(۱/۵)	۴۲(۶۲)	۱(۱/۵)	۱(۱/۵)	۶۹(۵۷/۰۲)
سولفامتوکسازول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لینکومایسین	-	-	۵۳(۱۰۰)	-	-	۶۸(۱۰۰)	-	-	۱۲۱(۱۰۰)	-	-	۶۸(۱۰۰)	-	-	۱۲۱(۱۰۰)
سفازولین	۱(۱/۹)	۳۰(۵۶/۶)	۲۲(۴۱/۵)	۷(۱۰/۳)	۳۵(۵۱/۵)	۲۶(۳۸/۲۳)	۸(۶/۶۱)	۶۵(۵۳/۷۱)	۴۸(۳۹/۶۶)	۲۶(۳۸/۲۳)	۷(۱۰/۳)	۲۶(۳۸/۲۳)	۸(۶/۶۱)	۶۵(۵۳/۷۱)	۴۸(۳۹/۶۶)
جنتامایسین	۲۱(۳۹/۶)	۲۶(۴۹)	۶(۱۱/۴)	۳۲(۴۷)	۲۳(۳۴)	۱۳(۱۹)	۵۳(۴۳/۸۰)	۴۹(۴۰/۴۹)	۱۹(۱۵/۷۰)	۱۳(۱۹)	۲۳(۳۴)	۱۳(۱۹)	۵۳(۴۳/۸۰)	۴۹(۴۰/۴۹)	۱۹(۱۵/۷۰)
نئومايسين	۴(۷/۶)	۲۶(۴۹)	۲۳(۴۳/۴)	۹(۱۳/۲)	۳۳(۴۸/۵)	۲۶(۳۸/۳)	۱۳(۱۰/۷۴)	۵۹(۴۸/۷۶)	۴۹(۴۰/۴۹)	۲۶(۳۸/۳)	۹(۱۳/۲)	۲۶(۳۸/۳)	۱۳(۱۰/۷۴)	۵۹(۴۸/۷۶)	۴۹(۴۰/۴۹)
سفتیوفور	۴۴(۸۳)	۴(۷/۶)	۵(۹/۴)	۶۳(۹۲/۶)	۱(۱/۵)	۴(۵/۹)	۱۰۷(۸۸/۴۲)	۵(۴/۱۳)	۹(۷/۴۳)	۴(۵/۹)	۱(۱/۵)	۴(۵/۹)	۱۰۷(۸۸/۴۲)	۵(۴/۱۳)	۹(۷/۴۳)
فلورفنیکول	۲۷(۵۱)	۳(۵/۷)	۲۳(۴۳/۳)	۲۸(۴۲)	۹(۱۳)	۳۱(۴۵)	۵۵(۴۵/۴۵)	۱۲(۹/۹۱)	۵۴(۴۴/۶۲)	۳۱(۴۵)	۹(۱۳)	۳۱(۴۵)	۵۵(۴۵/۴۵)	۱۲(۹/۹۱)	۵۴(۴۴/۶۲)
کلیستین	۳۶(۶۸)	۱۶(۳۰/۱)	۱(۱/۹)	۵۴(۷۹/۵)	۱۳(۱۹)	۱(۱/۵)	۹۰(۷۴/۳۸)	۲۹(۲۳/۹۶)	۲(۱/۶۲)	۱۳(۱۹)	۱(۱/۵)	۹۰(۷۴/۳۸)	۲۹(۲۳/۹۶)	۲(۱/۶۲)	۲(۱/۶۲)
انروفلوکساسین	۲۲(۴۱/۵)	۱۵(۲۸/۳)	۱۶(۳۰/۱)	۱۰(۱۵)	۴۰(۵۹)	۱۸(۲۶)	۳۲(۲۶/۴۴)	۵۵(۴۵/۴۵)	۳۴(۲۸/۰۹)	۱۸(۲۶)	۴۰(۵۹)	۱۸(۲۶)	۳۲(۲۶/۴۴)	۵۵(۴۵/۴۵)	۳۴(۲۸/۰۹)

حساسیت آنتی‌بیوتیکی: بررسی مقاومت جدایه‌ها به داروهای مختلف مطابق با روش کربی - بائر انجام شد. بدین منظور پس از تهیه رقتی معادل نیم مک‌فارلند از جدایه‌ها و کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany)، ۱۲ دیسک آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)، اکسی‌تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵+۱/۲۵۱) میکروگرم، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، سفتیوفور (۳۰ میکروگرم)، فلورفنیکول (۳۰ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم)، لینکومایسین (۲ میکروگرم) و نئومايسين (۳۰ میکروگرم) (پادتن طب ایران) با فاصله ۲۴ میلی‌متر از یکدیگر گذاشته شدند. پلیت‌ها پس از دیسک‌گذاری، ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۱۸ ساعت قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و طبق جداول CLSI مقاومت و یا حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف گزارش گردید (تصویر ۱). همچنین جهت بررسی فنوتیپی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، در سطح یک پلیت، چهار دیسک آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم کلاولانیک اسید (۱۰+۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید (۱۰+۳۰ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) با پنس استریل با فاصله ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر قرار داده شدند. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک می‌بود، به‌عنوان سویه ESBL تلقی می‌گردید (تصویر ۲) (۲۲-۲۴).

استخراج DNA: جدایه‌های خالص از هر نمونه پس از کشت روی محیط آگار لوریا برتانی (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب تا صبح گرمخانه‌گذاری شدند. در کنار شعله، ۳۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی ریخته شد. با لوپ استریل از باکتری رشد کرده روی آگار لوریا برتانی، بدون اینکه از محیط برداشته شود، داخل میکروتیوب‌ها ریخته شد. میکروتیوب‌ها بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوشانده شده و بلافاصله ۱۵ دقیقه داخل فریزر -۲۰ درجه قرار داده شدند. بعد از خروج از فریزر با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در کنار شعله به‌آرامی ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشیده و در میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی جدید ریخته شد. میکروتیوب‌ها تا زمان انجام پی‌سی‌آر در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد داخل رک قرار داده شدند. تغییرات جزئی در روش استخراج صورت گرفت (۲۵).

جدول ۳. فراوانی جدایه‌های مولد ESBLs.

تعداد (درصد)			متغیر
تعداد کل	جدایه‌های بیمار	جدایه‌های سالم	
۱۲۱	۶۸	۵۳	
۱۳ (۱۰/۷۴)	۶ (۸/۸۲)	۷ (۱۳/۲۰)	جدایه مثبت فنوتیپی ESBLs
۵ (۴/۱۳)	۲ (۲/۹۴)	۳ (۵/۶۶)	CTX-M
۱۱ (۹/۰۹)	۳ (۴/۴)	۸ (۱۵/۰۹)	SHV
۳۷ (۳۰/۵۷)	۲۰ (۲۹/۴۱)	۱۷ (۳۲/۰۷)	TEM
۶ (۴/۹۵)	۲ (۲/۹۴)	۴ (۷/۵۴)	OXA

جدول ۴. مقایسه ژنوتیپ ESBLs و پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

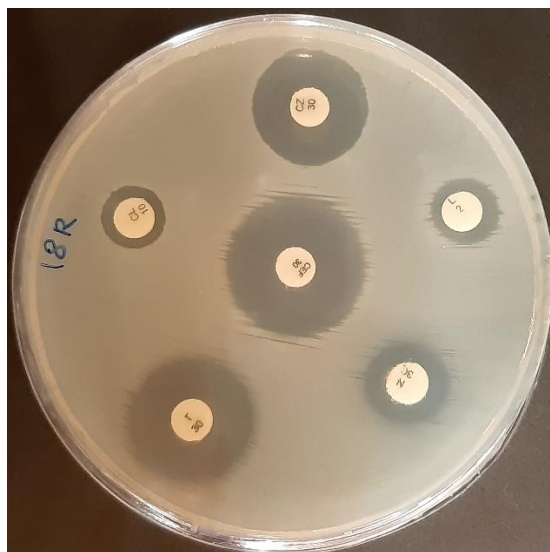
پروفایل مقاومت (تعداد)															تعداد	ژنوتیپ
NFX	CL	FF	CEF	N	GM	CZ	L	SXT	T	AMX	E	CAZ	CTX			
۸	۱	۱۳	۱	۷	۱	۲۸	۳۱	۲۶	۲۰	۳۰	۲۶	۳	۱۰	۳۱	۵	TEM
۵	-	۵	-	۵	۲	۲	۵	۵	۵	۵	۵	۱	۱	۵	۵	SHV
۱	-	-	۱	۱	-	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	TEM, OXA, SHV
۵	-	۱	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۴	۵	۵	۵	۵	۵	۵	TEM, OXA, SHV, CTX-M

CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفنازیدیم، E: اریترومایسین، AMX: آموکسی‌سیلین، T: اکسی‌تراسایکلین، SXT: تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، L: لینکومایسین، CZ: سفازولین، GM: جنتامایسین، N: نتومایسین، CEF: سفتیوفور، FF: فلورفنیکول، CL: کلیستین، NFX: انروفلوکساسین.

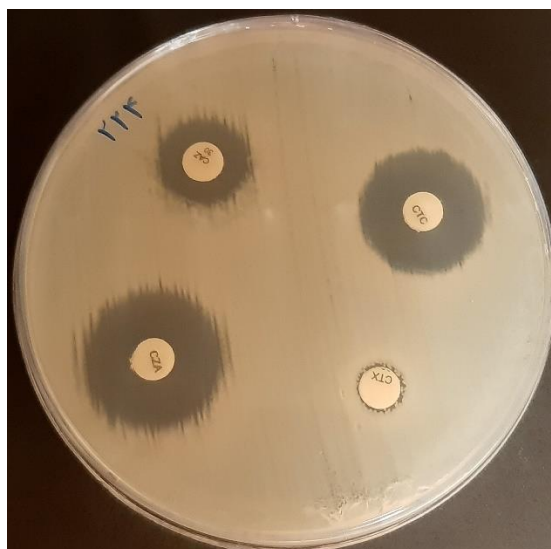
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت بررسی ژنوتیپی ESBLs: به‌منظور بررسی حضور ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در کلیه نمونه‌های /شریشیا کلی، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۱) و نیز DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو استفاده شد. مواد لازم جهت انجام پی‌سی‌آر از شرکت سیناکلون تهیه گردید. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

حضور دو ژن *bla*CTX-M و *bla*SHV به‌صورت تکی و دو ژن *bla*TEM و *bla*OXA ابتدا به‌صورت مالتی‌پلکس و سپس نمونه‌هایی که توسط آغازگرهای این دو ژن تشکیل باند دادند، به‌صورت جداگانه توسط پی‌سی‌آر بررسی شدند. توالی آغازگرهای اختصاصی هر ژن و اندازه هر قطعه محصول پی‌سی‌آر از ژن موردنظر در جدول ۱ ذکر شده است. جهت تکثیر ژن‌های *bla*TEM، *bla*SHV و *bla*OXA ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب زیر در دستگاه ترموسایکلر (SensoQuest, Germany) وارد شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه. به همین منظور ۳۰ چرخه با دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) جهت تکثیر ژن *bla*CTX-M در نظر گرفته شد. ضمناً دو چرخه ۹۴ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به‌مدت ۵ دقیقه) به‌ترتیب در ابتدا و انتهای چرخه‌ها وارد گردید (۲۶، ۲۷).

به‌منظور بارگذاری محصولات پی‌سی‌آر پس از تهیه ژل آگاروز (۱/۵ درصد با بافر TAE1x و رنگ‌گرفته با DNA Green viewer)، ۱۰ میکرولیتر از محتوای محصولات پی‌سی‌آر، درون چاهک‌های ژل آگاروز انتقال داده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی به یکی از چاهک‌ها به‌عنوان یک نشانگر استاندارد جهت بررسی طول قطعات تکثیریافته اضافه گردید. جهت صحت انجام پی‌سی‌آر در هر الکتروفورز در چاهک‌های جداگانه، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی بارگذاری شد. در ادامه ژل آگاروز به‌مدت ۶۰ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز (Biorad, USA) شد و در خاتمه درون دستگاه عکس‌برداری از ژل (Nanochem, China) مشاهده گردید. با تابش نور U.V بر روی ژل، محصولات تکثیریافته از نظر اندازه باند موردانتظار در مقایسه با مارکر و کنترل مثبت و منفی بررسی شدند. از جدایه‌های کلکسیون باکتریایی با کدهای EC.224 و EC.149 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (تصاویر ۳، ۴، ۵، ۶).



تصویر ۱. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *شریشیا* کلی.



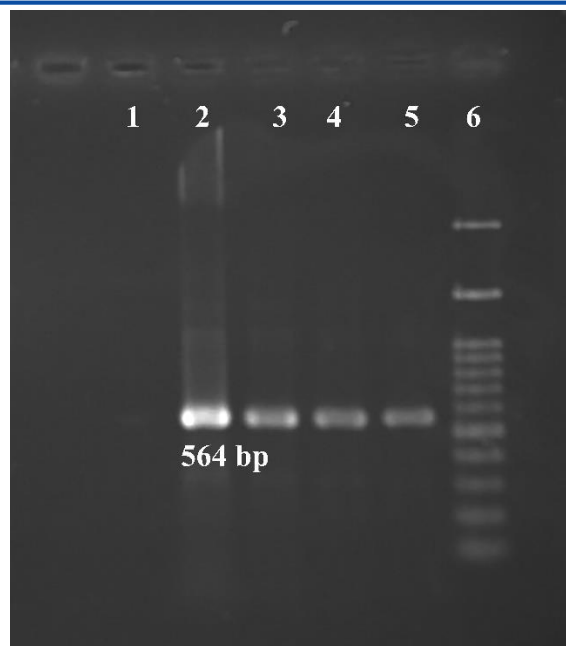
تصویر ۲. آزمون تأیید فنوتیپی ESBLs جدایه‌های *شریشیا* کلی.

نتایج

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی: کلنی‌ها بر روی محیط EMB آگار دارای جلای فلزی متمایل به سبز بودند. در آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها در محیط آگار سه قندی آهن‌دار به صورت اسید/اسید و از نظر آزمون‌های اندول، متیل رد، و گس پروسکوئر و سیترات به ترتیب، مثبت مثبت و منفی منفی بودند.

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: در مطالعه حاضر جدایه‌های *شریشیا* کلی مدفوعی بیشترین مقاومت و حساسیت را به ترتیب نسبت به لینکومایسین (۱۰۰ درصد) و سفتیوفور (۸۸/۴۲ درصد) نشان دادند. فراوانی حساسیت، حساسیت نسبی و مقاومت تمام جدایه‌ها در **جدول ۲** ارائه شده است.

نتایج بررسی فنوتیپی جدایه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف: در بررسی فنوتیپی، از ۱۲۱ جدایه مورد مطالعه، ۱۳ (۱۰/۷۴ درصد) جدایه به عنوان جدایه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف شناسایی شدند که شامل ۷ جدایه از شترمرغ‌های سالم و ۶ جدایه از شترمرغ‌های بیمار بود. بدین منظور از دیسک‌های ترکیبی سفنازیدیم - کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید استفاده گردید که ۱۳ و ۱۰ جدایه به ترتیب تظاهر فنوتیپی ESBLs داشتند.

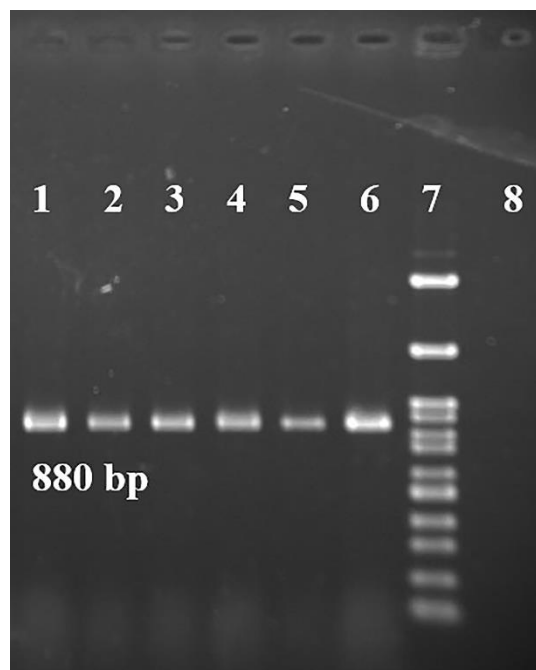


تصویر ۳. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن بتالاکتامازی OXA. لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین‌های ۳ تا ۵ نمونه‌های مثبت، لاین ۶: مارکر.

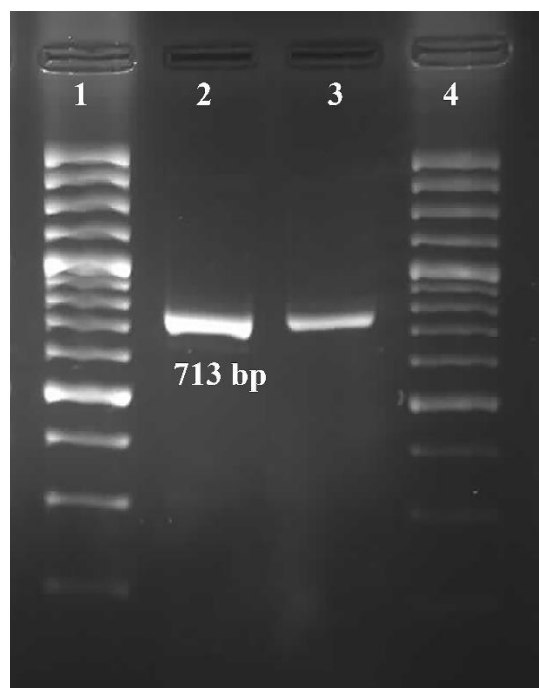


تصویر ۴. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن بتالاکتامازی TEM. لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین‌های ۳ تا ۶ نمونه‌های مثبت، لاین ۷: مارکر.

نتایج ردیابی ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف: براساس نتایج آزمایش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تعیین حضور ژن‌های رمزکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف مربوط به خانواده‌های SHV، TEM، CTX-M و OXA از مجموع ۱۲۱ جدایه/شریشیا کلی مورد مطالعه ۴۲ (۳۴/۷ درصد) جدایه (۲۱ جدایه از ۵۳ جدایه سالم و ۲۱ جدایه از ۶۸ جدایه بیمار) حداقل از نظر حضور یکی از ژن‌ها مثبت بودند. ژن blaTEM با حضور در ۳۷ (۳۰/۵ درصد) جدایه بیشترین فراوانی را داشت که شامل ۱۷ جدایه سالم و ۲۰ جدایه بیمار و در مقابل ژن blaCTX-M تنها در ۵ (۴/۱ درصد) جدایه مشاهده گردید که شامل ۳ جدایه سالم و ۲ جدایه بیمار بود. ۵ (۴/۱ درصد) جدایه (۳ جدایه سالم و ۲ جدایه بیمار) به طور هم‌زمان دارای هر ۴ ژن بتالاکتامازی SHV، TEM، CTX-M و OXA و ۱ (۰/۸ درصد) جدایه (سالم) دارای ۳ ژن بتالاکتامازی SHV، TEM و OXA بودند. نتایج توزیع ژن‌ها در جوجه شترمرغ‌های سالم و بیمار توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون مربع کای (Chi-squared test) آنالیز گردید. براساس آنالیز نتایج، ارتباط توزیع ژن‌ها بین جوجه شترمرغ‌های سالم و بیمار معنی‌دار نبود. فراوانی ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و رابطه آن‌ها با مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در **جدول ۳** و **۴** نشان داده شده است.



تصویر ۵. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن بتالاکتامازی CTX-M. لاین‌های ۱ تا ۵ نمونه‌های مثبت، لاین ۶: کنترل مثبت، لاین ۷: مارکر، لاین ۸: کنترل منفی.



تصویر ۶. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن بتالاکتامازی SHV. لاین ۱: مارکر، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین ۳: نمونه مثبت، لاین ۴: مارکر.

بحث

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌طور گسترده در انسان و دام جهت درمان عفونت‌ها استفاده می‌شوند، به‌طوری‌که بیش از ۵۰ درصد از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی را تشکیل می‌دهند. همین امر موجب ظهور و شیوع سویه‌های مقاوم شده است (۱۱، ۲۸، ۲۹). مؤثرترین استراتژی باکتری‌ها جهت در امان ماندن از اثرات آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌هایی است که قادر به شکستن حلقه بتالاکتام می‌باشند. در گروه آنزیم‌های بتالاکتاماز، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و AmpC قرار دارند که ژن‌های این دو دسته قابلیت انتقال افقی را

دارا می‌باشند. متأسفانه افزایش شیوع عفونت‌ها توسط جدایه‌های /شریشیا کلی مولد ESBLs و بالطبع استفاده بیشتر از سفالوسپورین‌های نسل سوم موجب بی‌اثر شدن فزاینده این آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی /شریشیا کلی شده است. تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام جدید و از آن سو ظهور سریع بتالاکتامازهای جدید موجب تهدید جدی سلامت همگانی شده است (۲۹-۳۴).

مزارع پرورش شترمرغ نقش مهمی در کشاورزی، اقتصاد و تولید گوشت در ایران دارند (۱۸). محصولات تجاری شترمرغ به‌عنوان یک فعالیت نوین کشاورزی بالقوه توسعه پیدا کرده است که این توسعه نه‌تنها به‌دلیل ارزش تغذیه‌ای گوشت شترمرغ، بلکه به‌دلیل بازار سایر محصولات، مانند چرم، پر و روغن این پرنده است. باین‌حال نگرانی‌هایی درباره وضعیت سلامت پرندگان وارداتی وجود دارد (۳۵). /شریشیا کلی جزء فلور نرمال روده‌ای پرندگان، از جمله شترمرغ‌هاست. باین‌حال برخی سویه‌ها برای این پرنده بیماری‌زا می‌باشند (۲۱). اطلاعات محدودی درمورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شریشیا کلی به‌عنوان فلور باکتریایی سیستم گوارشی شترمرغ در دنیا و ایران وجود دارد (۱۷، ۲۱). الگوی مقاومت دارویی در مناطق مختلف و مقاطع زمانی متفاوت است که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع، میزان و تداوم مصرف ترکیبات ضدباکتریایی باشد. باوجوداین الگوی مقاومت دارویی یک نشانگر مفید برای جدایه‌های باکتریایی یک منطقه به شمار می‌رود. گزارش‌ها در رابطه با افزایش مقاومت سویه‌های پاتوژن /شریشیا کلی نسبت به ترکیبات ضدباکتریایی در حال افزایش است و الگوی مقاومت دارویی نواحی مختلف جغرافیایی نیز متنوع و در حال تغییر می‌باشد (۳۶). مجامع علمی بر لزوم ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های شاخص با منشأهای متفاوت تأکید دارند، چون این امر می‌تواند معیاری جهت تعیین چرخه تکامل مکانیسم مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد (۱۹). روند استفاده بی‌رویه و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها در واحدهای پرورش طیور باعث بروز تنوع در الگوی مقاومت دارویی در آن منطقه می‌گردد و احتمالاً این امر به افزایش ژن‌های مقاوم نسبت به ترکیبات آنتی‌باکتریال در بین /شریشیا کلی‌های پاتوژن منجر می‌شود و بالطبع پدیده فشار انتخاب مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به دنبال خواهد داشت (۳۶).

در مطالعه حاضر ابتدا حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۱۲۱ جدایه /شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ‌ها بررسی شد. جدایه‌های جوجه شترمرغ‌های سالم و بیمار به طرز مشابهی بیشترین و کمترین مقاومت را به‌ترتیب نسبت به لینکومایسین (۱۰۰ درصد) و کلیستین (۲ درصد) نشان دادند. در ادامه حضور فنوتیپی و ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌ها بررسی شد که نتایج این دو آزمون با هم منطبق نبود. در بررسی فنوتیپی ۱۳ جدایه (۷ جدایه سالم و ۶ جدایه بیمار) مثبت بودند که از ۵ جدایه هیچ ژن بتالاکتامازی وسیع‌الطیف جدا نشد. در ارزیابی ژنوتیپی ۴۲ جدایه (به‌طور کامل یکسان ۲۱ جدایه سالم و ۲۱ جدایه بیمار) به‌عنوان مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف شناخته شدند. از ۴۲ جدایه مثبت ژنوتیپی، ۳۴ جدایه تظاهر فنوتیپی نداشتند. از ۸ جدایه‌ای که تظاهر فنوتیپی داشتند ۲ جدایه دارای ژن بتالاکتامازی blaTEM و ۶ جدایه حامل بیش از ۱ ژن بتالاکتامازی وسیع‌الطیف بودند.

از دلایل عدم انطباق فنوتیپ و ژنوتیپ در جدایه‌های /شریشیا کلی مولد ESBLs می‌توان به مکانیسم‌های تنظیمی و تداخل با سایر مکانیسم‌های مقاومت اشاره کرد. بیان ژن‌های بتالاکتاماز می‌تواند تحت تأثیر مکانیسم‌های تنظیمی مختلفی، مانند قدرت پروموتور، پروتئین‌های سرکوبگر/فعال‌کننده و عوامل محیطی قرار گیرد. این فرایندهای تنظیمی می‌تواند به عدم تطابق بین ژنوتیپ و فنوتیپ منجر شود. همچنین بیان بتالاکتامازها می‌تواند تحت تأثیر وجود مکانیسم‌های مقاومتی دیگر، مانند تغییرات نفوذپذیری و پمپ‌های جریان مواد قرار گیرد. این مکانیسم‌های مقاومت اضافی می‌توانند به فنوتیپ مقاومت کلی کمک کنند و نسبت دادن منحصراً مقاومت به ژنوتیپ بتالاکتاماز را چالش‌برانگیز می‌کنند (۳۷، ۳۸). به‌دلیل اینکه پرایمرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر، خانواده ژن‌های بتالاکتامازی را شناسایی می‌کنند، استفاده از تکنیک توالی‌یابی جهت اطمینان از حضور ژن‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف مود نیاز می‌باشد.

در مطالعه Laukova و Scerbova در سال ۲۰۱۶ در اسلواکی، ۵۴/۹ درصد جدایه‌های /شریشیا کلی شترمرغ‌ها به تتراسایکلین، ۹۷/۲ درصد به اریترومایسین و ۵۰/۷ درصد به جنتامایسین مقاوم بودند (۸). Mohamadi و همکاران در سال ۲۰۱۵، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۲۶ جدایه /شریشیا کلی به‌دست‌آمده از شترمرغ‌های کرمان را بررسی کردند که بیشترین و کمترین مقاومت جدایه‌ها به‌ترتیب به تتراسایکلین (۲۱/۴۲ درصد) و آموکسی‌سیلین (۲ درصد) بود. همچنین مقاومت جدایه‌ها به سفازولین ۸/۷۳ درصد، جنتامایسین ۷/۹۳ درصد، اریترومایسین ۲/۳۸ درصد، سفالکسین ۴/۷۶ درصد، سفوتوکسین ۱۵/۸۷ درصد و سولتریم ۵/۵۵ درصد بود (۳۹). مطالعات بسیار اندکی در دنیا راجع به مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در شترمرغ صورت گرفته است.

Amani و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۱۲۹ جدایه/شریشیا کلی شترمرغ‌های شمال شرقی ایران را در بازه زمانی یک ساله بررسی کردند که نتایج مقاومت بدین شرح بود: انروفلوکساسین ۲۸/۹ درصد، اکسی‌تتراسایکلین ۱۷/۸ درصد، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول ۱۳/۳ درصد، آموکسی‌سیلین ۸/۹ درصد، فلورفنیکول و جنتامایسین ۴/۴ درصد، از مجموع ۱۲۹ جدایه، ۲۲ جدایه حامل ژن *blaTEM* بودند (۲۱).

در مطالعه salari و Hoseini در سال ۲۰۲۱ جدایه‌های/شریشیا کلی شترمرغ‌ها ۱۰۰ درصد به آموکسی‌سیلین و جنتامایسین و ۲۷/۹ درصد به اکسی‌تتراسایکلین مقاوم بودند (۱۸). Carneiro و همکاران در سال ۲۰۱۰ مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را در ۵۴ جدایه/شریشیا کلی شترمرغ‌ها مطالعه کردند. مقاومت جدایه‌ها به تتراسایکلین، ۱۲/۹۶ درصد و جنتامایسین ۱/۸۵ درصد گزارش گردید. تمام جدایه‌ها به سفوتاکسیم، سفتازیدیم و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول حساس بودند. در بررسی فنوتیپی، ۳ جدایه (۵/۶ درصد) ESBL مثبت بودند که توسط پی‌سی‌آر ۲ جدایه (۳/۷ درصد) حاوی ژن‌های *blaTEM-1b* و *blaCTX-M-14a* و ۱ جدایه (۱/۸۵ درصد) حاوی ژن *blaTEM-52c* بود (۱۱). در مطالعه حاضر جدایه‌های/شریشیا کلی مدفوعی شترمرغ‌های سالم و بیمار به طرز مشابهی بیشترین مقاومت را به لینکومایسین و اریترومایسین نشان دادند و بیشترین حساسیت مربوط به ۴ آنتی‌بیوتیک سفتیوفور، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و کلیستین بود.

در مطالعه حاضر نیز فراوانی ژن *blaTEM* از بقیه بیشتر بود. به دلیل مطالعات بسیار اندک بر روی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در جدایه‌های/شریشیا کلی مدفوعی در شترمرغ، امکان مقایسه بیش از این فراهم نبود. Doregiraee و همکاران در سال ۲۰۱۳، جدایه‌های/شریشیا کلی مدفوعی جوجه‌های گوشتی مرغداری‌های اطراف تهران را جهت حضور فنوتیپی و ژنوتیپی ESBL غربالگری کردند. از مجموع ۴۴۵ جدایه، فنوتیپ مقاومت ESBL در ۲۶ جدایه (۵/۵ درصد) تعیین شد که از این تعداد ۱۲ جدایه در آزمون ژنوتیپ ESBL مثبت بودند. ۵ جدایه حامل ژن *blaTEM*، ۱ جدایه واجد ژن *blaCTX-M* و ۶ جدایه هر دو ژن را دارا بودند (۴۰). Khoshkhoo و Peighambari در سال ۲۰۰۵، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۵۰ جدایه/شریشیا کلی از ۳۰ واحد صنعتی پرورش جوجه گوشتی استان تهران را مطالعه کردند. در این بررسی همه جدایه‌ها به سفتیوفور و جنتامایسین حساس بوده و بیشترین مقاومت را به نالیدیکسیکاسید و اریترومایسین نشان دادند (۴۱). در مطالعه Rajaian و همکاران در سال ۲۰۰۳، جدایه‌های/شریشیا کلی جوجه‌های گوشتی مرغداری‌های اطراف شیراز بیشترین و کمترین مقاومت را به ترتیب به آموکسی‌سیلین و لینکواسپکتین نشان دادند (۴۲). Asadi و همکاران در سال ۲۰۱۷، ۱۰۰ نمونه مدفوع شترمرغ را جهت جداسازی و تعیین شیوع/شریشیا کلی *0157:H7* با استفاده از کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه در استان لرستان بررسی کردند که در مطالعه حاضر تنها ۴ جدایه (۴ درصد) به عنوان/شریشیا کلی *0157:H7* شناسایی شدند (۴۳).

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر جزء نادرترین مطالعاتی است که مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور فنوتیپی و ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را در جدایه‌های/شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ‌ها بررسی کرده است. در بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، به ترتیب ۱۳ و ۴۲ جدایه مثبت شناخته شدند. از ۵ جدایه مثبت فنوتیپی هیچ ژن بتالاکتامازی وسیع‌الطیف جدا نگردید. از ۴۲ جدایه مثبت ژنوتیپی، ۳۴ جدایه تظاهر فنوتیپی نداشتند. ژن *blaTEM* در جدایه‌های/شریشیا کلی مدفوعی جوجه شترمرغ‌ها دارای بالاترین فراوانی بود که با اندک مطالعات انجام‌شده دیگر مطابقت داشت. تعدادی از جدایه‌ها نیز حامل چندین ژن مقاومت بودند. توجه به دو نکته اخیر احتمال بالای ابتلای جوامع انسانی و پیامد آن را گوشزد می‌کند. بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، شناسایی جدایه‌های مولد ESBL را در دستورکار روزانه خود ندارند. بنابراین باتوجه به اهمیت بالینی این نوع مقاومت که می‌تواند تهدید سلامت عمومی را در پی داشته باشد، ارزیابی آن بسیار ارزشمند است. همچنین این بررسی درمان آنتی‌بیوتیکی جوجه شترمرغ‌های دارای عوارض گوارشی را در نواحی مورد مطالعه بهبود خواهد بخشید.

سپاسگزاری

نویسندگان از مدیرکل و مسئول آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی خراسان جنوبی و همچنین از مسئول آزمایشگاه گروه میکروپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

- Choboghlo HG, Zare P, Nikaein D, Aghaee EM, Azar HB. Identification of ostriches (*struthio camelus*) gastrointestinal bacterial flora and characterization of the antibiotic resistance profile of *salmonella* serovars isolated from north-west of Iran. *Vet Med Open J*. 2016;1(1):6-11. doi: 10.17140/VMOJ-1-102
- BorumAE. Isolation of agents of diarrhea in ostriches. *Kocatepe Vet J*. 2017;10(3):152-7. doi: 10.1590/S0102-09352010000500033
- Mendonça JF, Lopes SQ, Aichinger A, Horta AC, Siqueira AM, Carvalho LB, et al. Ostrich (*struthio camelus*) gastric diseases in Minas Gerais, Brazil, from 1997 to 2009. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62:1263-6.
- Asmaa.M.A, Shima A.E.Nasr, Ali.M.M, Elshater M.A.H. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* species in ostrich farms in egypt. *IOSR JESTFT*. 2016;06-11. doi: 10.9790/2402-1004020611
- David E. Swayne. *Diseases of Poultry*. 14th ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, United States; 2020.
- Cloete SW, Lambrechts H, Punt K, Brand Z. Factors related to high levels of ostrich chick mortality from hatching to 90 days of age in an intensive rearing system. *J S Afr Vet Assoc*. 2001;72(4):197-202. doi: 10.4102/jsava.v72i4.652 PMID: 12219914
- Deeming DC. *The Ostrich: Biology, Production and Health*. 1st ed. CAB International. New York, USA. 1999.
- Scerbova J, Lauková A. *Escherichia coli* strains from ostriches and their sensitivity to antimicrobial substances. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(2):415-23. doi: 10.1515/pjvs-2016-0052 PMID: 27487518
- Marimwe MC, Fosgate GT, Roberts LC, Tavornpanich S, Olivier AJ, Abolnik C. The spatiotemporal epidemiology of high pathogenicity avian influenza outbreaks in key ostrich producing areas of South Africa. *Prev Vet Med*. 2021;196:105474. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105474 PMID: 34564052
- Younis G, Awad A, Mohamed N. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Vet World*. 2017;10(10):1167-1172. doi: 10.14202/vetworld.2017.1167-1172 PMID: 29184361
- Carneiro C, Araújo C, Gonçalves A, Vinué L, Somalo S, Ruiz E, et al. Detection of CTX-M-14 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases in fecal *Escherichia coli* isolates of captive ostrich in Portugal. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(8):991-4. doi: 10.1089/fpd.2009.0494 PMID: 20367084
- Silva ON, Franco OL, Porto WF. β -Lactamase inhibitor peptides as the new strategies to overcome bacterial resistance. *Drugs Today (Barc)*. 2018;54(12):737-746. doi: 10.1358/dot.2018.54.12.2895652 PMID: 30596392
- Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31. doi: 10.1098/rstb.1980.0049 PMID: 6109327
- Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1050-1. doi: 10.1093/jac/dki130 PMID: 15872044
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09 PMID: 19995920
- Silago V, Kovacs D, Samson H, Seni J, Matthews L, Oravcová K, et al. Existence of multiple ESBL genes among phenotypically confirmed ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* concurrently isolated from clinical, colonization and contamination samples from neonatal units at Bugando Medical Center, Mwanza, Tanzania. *Antibiotics*. 2021;10(5):476. doi: 10.3390/antibiotics10050476 PMID: 33919117
- Nardi AR, Salvadori MR, Coswig LT, Gatti MS, Leite DS, Valadares GF, et al. Type 2 heat-labile enterotoxin (LT-II)-producing *Escherichia coli* isolated from ostriches with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2005;105(3-4):245-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.005 PMID: 15708822
- Salari S, Hoseini A. The antibiogram profile of commensal *Escherichia coli* of the gastrointestinal tract of apparently healthy ostriches and diseased chickens with colibacillosis. *Poult Sci J*. 2021;9(1):121-129. doi: 10.22069/psj.2021.18892.1672

19. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Front Vet Sci*. 2017;4:126. [doi: 10.3389/fvets.2017.00126](https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126) PMID: 28848739
20. Namkung H, Li J, Gong M, Yu H, Cottrill M, De Lange CF. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Can J Anim Sci*. 2004;84(4):697-704.
21. Amani F, Hashemitabar G, Ghaniei A, Farzin H. Antimicrobial resistance and virulence genes in the *Escherichia coli* isolates obtained from ostrich. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52:3501-8. [doi: 10.1007/s11250-020-02384-6](https://doi.org/10.1007/s11250-020-02384-6) PMID: 32929588
22. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100. 33rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 2023.
23. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. CLSI Supplement VET08. 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 2018.
24. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 2008.
25. Askari Badouei M, Jajarmi M, Mirsalehian A. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015;38:15-20. [doi: 10.1016/j.cimid.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.11.005) PMID: 25534186
26. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):490-5. [doi: 10.1093/jac/dkp498](https://doi.org/10.1093/jac/dkp498) PMID: 20071363
27. Hamidian M, Tajbakhsh M, Walther-Rasmussen J, Zali MR. Emergence of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Salmonella enterica* in Tehran, Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(5):368-71. PMID: 19762986
28. Ding Y, Li Z, Xu C, Qin W, Wu Q, Wang X, Cheng X, Li L, Huang W. Fluorogenic probes/inhibitors of β -lactamase and their applications in drug-resistant bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021;133(1):24-40. [doi: 10.1002/anie.202006635](https://doi.org/10.1002/anie.202006635) PMID: 32592283
29. Pestana-Nobles R, Aranguren-Díaz Y, Machado-Sierra E, Yosa J, Galan-Freyre NJ, Sepulveda-Montaña LX, et al. Docking and molecular dynamic of microalgae compounds as potential inhibitors of beta-lactamase. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1630. [doi: 10.3390/ijms23031630](https://doi.org/10.3390/ijms23031630) PMID: 35163569
30. Ibekwe A, Durso L, Ducey TF, Oladeinde A, Jackson CR, Frye JG, et al. Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended-spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* from different animal sources. *Microorganisms*. 2021;9(5):1057. [doi: 10.3390/microorganisms9051057](https://doi.org/10.3390/microorganisms9051057) PMID: 34068339
31. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VH, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. 2019;431(18):3472-500. [doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002) PMID: 30959050
32. Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019;10:953. [doi: 10.3389/fmicb.2019.00953](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00953) PMID: 31114568
33. Ceccarelli D, Kant A, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Hordijk J, Wit B, et al. Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended spectrum cephalosporins in commensal *Escherichia coli* from Dutch livestock in 2007–2017. *Front Microbiol*. 2019;76. [doi: 10.3389/fmicb.2019.00076](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00076) PMID: 30778339
34. Spyarakis F, Santucci M, Maso L, Cross S, Gianquinto E, Sannio F, et al. Virtual screening identifies broad-spectrum β -lactamase inhibitors with activity on clinically relevant serine-and metallo-carbapenemases. *Sci Rep*. 2020;10(1):12763. [doi: 10.1038/s41598-020-69431-y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69431-y) PMID: 32728062
35. Knöbl T, Baccaro MR, Moreno AM, Gomes TA, Vieira MA, Ferreira CS, et al. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet Microbiol*. 2001;83(1):71-80. [doi: 10.1016/s0378-1135\(01\)00403-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00403-5) PMID: 11524167
36. Haghighi khoshkhoo P, Alinejad I. Antibacterial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from broilers colibacillosis of broilers chicks in Golestan province. *J Vet Clin Res*. 2010;1(1):39-47. (In Persian)
37. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:2200-23. [doi: 10.1007/s00018-004-4060-9](https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9) PMID: 15338052
38. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791. [doi: 10.3201/eid1710.110655](https://doi.org/10.3201/eid1710.110655) PMID: 22000347

39. Mohamadi E, Alizade H, Askari N, Salehi M, Porjafarian M, Ghanbarpour R. Antibiotic resistance profile in relation to phylogenetic background in *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy ostrich. Int J Enteric Pathog. 2015;3:e25366.
40. Doregiraee, F, Nayeri Fasaei B, Alebouyeh M. Surveillance study of faecal *E. coli* isolates producing AmpC and extended spectrum β -lactamases (ESBLs) enzymes in poultry and workers from aviculture around Tehran. J Vet Res. 2015;70(4):363-70. (In Persian).
41. Khoshkhoo P, Peighambari M. Drug resistance patterns and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. J Vet Res. 2005;60(2):97-105. (In Persian).
42. Rajaian H, Firouzi R, Jalaee J, Heidari Dezfooli F. Antibiotic resistance of several common bacterial species isolated from chickens in shiraz area. J Vet Res. 2003;58(3):223-226. (In Persian).
43. Asadi S, Shams N, Nayeabaghaee, S M. Isolation and Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of Lorestan Ostrich farms using culture and multiplex PCR. J Vet Microbiol. 2018;13(2):97-105. (In Persian).