مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۳، ۲۱۲- ۲۰۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,3:203-212, 2014

شناسایی مولکولی ژن‌های کدکننده بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف bla_{CTX-M} (ESBL)، bla_{TEM} و bla_{SHV} در اشریشیاکولای‌های جدا شده از مدفوع گاومیش آبی (*Bubalus bubalis*) در استان آذربایجان غربی، ایران

سیدشهرام حسینی[۱] حبیب دستمالچی ساعی[۲*] عبدالغفار اونق[۲]
۱) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه-ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه-ایران

(دریافت مقاله: ۳۰ اردیبهشت ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲ مرداد ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: آنزیم‌های بتا-لاکتاماز به عنوان مهمترین عامل مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتا-لاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی در نظر گرفته می‌شوند. در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف در میان باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های با منشأ دامی شیوع فراوانی یافته و این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی حایز اهمیت می‌باشد. **هدف:** هدف از این مطالعه ارزیابی حضور ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف bla_{TEM}، bla_{CTX-M} و bla_{SHV} در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست‌آمده از نمونه‌های مدفوع گاومیش‌های آبی (*Bubalus bubalis*) به ظاهر سالم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه، ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای، که از ۱۳۵ نمونه مدفوع گاومیش‌های آبی از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (۳۳ جدایه از ارومیه، ۳۳ جدایه از خوی، ۲۴ جدایه از پیرانشهر و ۱۵ جدایه از میاندوآب) به‌دست‌آمده بودند، با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و نیز تکثیر ژن 23S rRNA شناسایی شدند. سپس، حضور ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف مربوط به گروه‌های CTX-M، TEM و SHV در بین جدایه‌های اشریشیاکولای مورد مطالعه با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** در جدایه‌های مورد مطالعه، ۴۷ جدایه از ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای (۴۴/۸٪) حاوی ژن bla_{CTX-M} بوده و ۳۷ جدایه (۳۵/۲٪) حامل ژن bla_{TEM} بودند. همچنین ۱۷ جدایه (۱۶/۲٪) به طور همزمان هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} را داشتند. بر اساس نتایج، ژن bla_{SHV} در بین جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی نگردید. همچنین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در توزیع ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف در بین مناطق مورد مطالعه مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جدایه‌های اشریشیاکولای مقیم دستگاه گوارش گاومیش آبی مخزنی برای بتا-لاکتامازهای وسیع‌الطیف، به ویژه انواع CTX-M و TEM، بوده و این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی و نیز انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های بیماریزا باید مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گاومیش، اشریشیاکولای، بتا-لاکتامازهای وسیع‌الطیف

مقدمه

اشریشیاکولای از معمول‌ترین ریزگان مقیم دستگاه گوارش انسان و حیوانات بوده (۴۵،۴۷) و به سهولت از طریق زنجیره غذایی و آب در اکوسیستم‌های مختلف انتشار می‌یابد (۴۴). به‌علاوه، اشریشیاکولای به عنوان جرم بیماریزا در انسان، به‌ویژه در بیماران با نقص ایمنی، مطرح بوده و بتا-لاکتام‌ها به وفور جهت درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر، شیوع بتا-لاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) در بین جدایه‌های بالینی اشریشیاکولای به‌دست آمده از انسان مورد توجه قرار گرفته است، و این مکانیسم مقاومت موجب نارسایی در درمان بیماریهای عفونی گردیده است (۶،۲۴،۳۲). اکثر ESBLها را می‌توان بر اساس مشابهت توالی آمینو اسید به سه گروه TEM، CTX-M و SHV تقسیم نمود (۳۳) که به ترتیب توسط ژن‌های bla_{TEM}، bla_{CTX-M} و bla_{SHV} کد می‌گردند. سویه‌های اشریشیاکولای مولد بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL)، که ممکن است مقاومت دارویی چندگانه (MDR) داشته و موجب مشکلات درمانی گردند، در پزشکی و دامپزشکی گزارش شده‌اند (۲۳،۳۲). در این ارتباط اشریشیاکولای مولد ESBL به وفور در حیوانات مورد مصرف غذای انسان گزارش شده است و شواهد فزاینده‌ای مبنی بر نقش مخازن دامی در گسترش اخیر این باکتری‌ها به انسان وجود دارد (۷،۲۱،۳۰).

از آن جایی که گاومیش در کشور ایران نقش مهمی در تولید گوشت و فرآورده‌های لبنی دارد و نیز با در نظر گرفتن اثرات زیان‌باری که باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتا-لاکتام می‌توانند بر روی بهداشت عمومی و سلامت حیوانات داشته باشند، لذا در مطالعه حاضر حضور ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در بین جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از نمونه‌های مدفوع گاومیش در مناطق مختلف استان آذربایجان غربی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۴۴۱-۲۹۷۲۶۶۱ نمابر: ۰۴۴۱-۲۷۷۱۹۲۶ Email: HDSaei561@gmail.com

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۸۸ در مجموع تعداد ۱۳۵ نمونه مدفوع از گاومیش‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ارومیه مرکز استان ۴۲ نمونه، خوی شمال استان ۴۲ نمونه، پیرانشهر جنوب استان ۲۹ نمونه و میاندوآب جنوب استان ۲۲ نمونه) جمع‌آوری شد (حیوانات به صورت اتفاقی انتخاب شدند). نمونه‌های مدفوع در لوله‌های پلاستیکی استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. نمونه‌ها در عرض ۴۸-۲۴ ساعت مورد آزمایش قرار گرفته، درغیراین صورت تازمان جداسازی باکتری اشریشیاکولای در فریز $-20^{o}C$ نگهداری شدند.

جداسازی اشریشیاکولای از نمونه‌های مدفوع: یک گرم از مدفوع در ۱۰mL، NaCl ۰/۸۵٪ معلق گردید و پلیت‌های مکانکی آگار (Merck, Germany) با استفاده از سواب استریل جهت جداسازی تلقیح شدند. بعد از یک شب انکوباسیون در $37^{o}C$، پرگنه‌های لاکتوز مثبت (صورتی قرمز) به‌عنوان اشریشیاکولای درنظر گرفته شده و برروی محیط ائوزین متیلن بلو (EMB; Merk, Germany) کشت داده شدند و مجدداً به مدت یک شب در $37^{o}C$ انکوبه گردیدند. پرگنه‌های با درخشش سبز متالیکِ مشخصه اشریشیاکولای انتخاب گردید و بر روی پلیت‌های آگار خون‌دار (Merck, Germany) کشت داده شدند. یک پرگنه از هر کشت مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. همه جدایه‌ها تحت روش‌های میکروب‌شناسی استاندارد شامل اندول، متیل رد، ووژس پروسکوئر و سیمون سیترات قرار گرفتند (۳۵) و در محیط BHI حاوی گلیسرول تا زمان انجام تست‌های مولکولی در دمای $-20^{o}C$ قرار گرفتند.

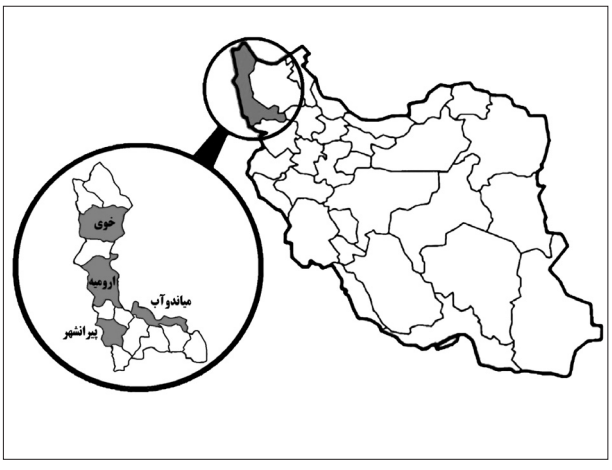
تهیه DNA باکتریایی جهت PCR: DNA از پرگنه‌هایی که به عنوان اشریشیاکولای شناسایی شدند و نیز از سویه کنترل مثبت (ATCC 43895 *E. coli*) به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین منظور، یک لوپ پُر از کشت شبانه پرگنه باکتریایی و سویه کنترل مثبت در ۱۵۰µL آب دیونیزه استریل عاری از DNase (CinnaGen, Iran) معلق گردید و سلول‌ها با استفاده از روش جوشاندن در $100^{o}C$ به مدت ۱۵ دقیقه لیز شدند. بقایای سلولی از طریق سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه با استفاده از میکروسانتریفوژ حذف شدند. سپس مایع رویی که حاوی DNA بود در آزمایشات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی مولکولی اشریشیاکولای با بکارگیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): نتایج بیوشیمیایی از طریق تکثیر به روش PCR تائید شدند. برای این منظور، جدایه‌های اشریشیاکولای موجود بر روی پلیت‌های آگار خون‌دار مورد استخراج DNA و تائید تشخیص قرار گرفتند. پرایمرهای Eco2083 (TGA CAC TGA ACATTG AG GCT) و Eco2745 (GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT) اختصاصی گونه اشریشیاکولای جهت تعیین حضور DNA باکتریایی دست نخورده مورد استفاده قرار گرفتند (۴۰). جهت کنترل منفی DNA الگو با آب استریل جایگزین گردید. واکنش در حجم ۲۵µL حاوی ۲µL DNA الگو، ۱۲/۵µL از مخلوط اصلی PCR با غلظت ۲X (CinnaGen, Iran)، ۰/۴µM از هریک از پرایمرها انجام گردید. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر CORBETT (مدل CP2-003، استرالیا) انجام گرفت. عمل تکثیر در $94^{o}C$ برای ۴ دقیقه؛ ۳۵ چرخه متشکل از $94^{o}C$ برای ۴۵ ثانیه؛ $57^{o}C$ برای ۱ دقیقه؛ $72^{o}C$ برای ۲ دقیقه و مرحله توسعه نهایی در $72^{o}C$ برای ۱۰ دقیقه انجام گرفت. کنترل منفی و مثبت در هر آزمایش تکثیر PCR مورد استفاده قرار گرفتند. سپس نمونه‌های باکتریایی مثبت از نظر داشتن محصول PCR با اندازه ۶۶۲ جفت باز از نظر حضور ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

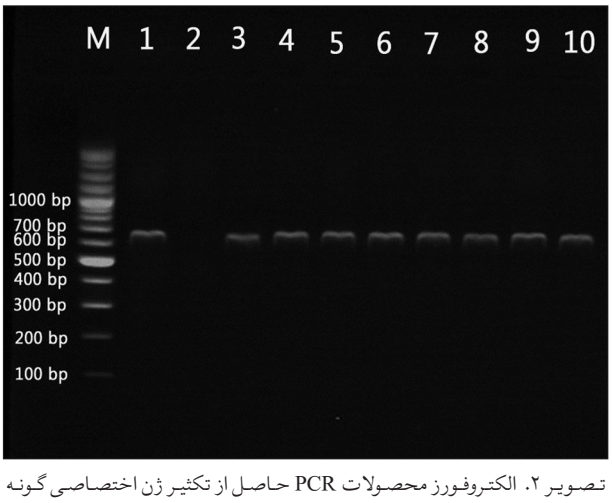
شناسایی ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف با بکارگیری PCR: حضور ژن‌های کد کننده CTX-M، TEM و SHV در همه جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده توسط PCR و با استفاده از پرایمرها و چرخه‌های دمایی که قبلاً گزارش شده‌اند، مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱).

واکنش PCR جهت شناسایی حضور ژن bla_{TEM} با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن در حجم نهایی ۲۵µL شامل ۱۲/۵µL از مستر میکس، پرایمرهای TEM-F و TEM-R هر کدام با غلظت ۰/۴µmol، ۸/۵µL از آب دیونیزه استریل و ۲µL از نمونه DNA استخراج شده از باکتری انجام گرفت. در این واکنش از اشریشیاکولای PTCC1533 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و از آب مقطر استریل به جای DNA برای کنترل منفی استفاده شد. روند تکثیر با الگوی دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای $94^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۲ چرخه دمایی هر کدام شامل دناتوراسیون در دمای $94^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای $54^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله امتداد در دمای $72^{o}C$ به مدت ۱ دقیقه؛ و مرحله نهایی جهت کامل شدن واکنش در دمای $72^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

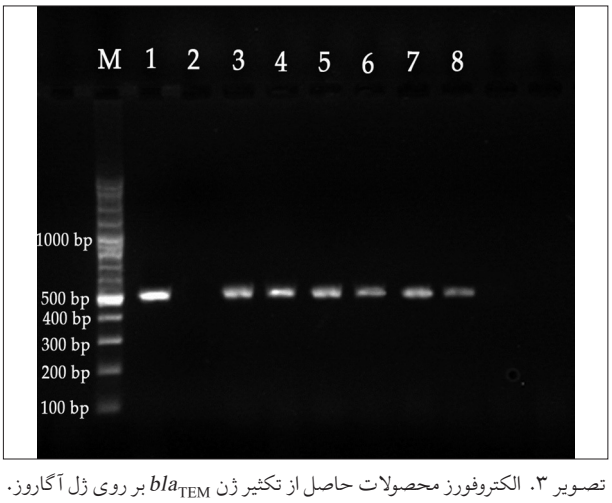
حضور ژن bla_{CTX-M} در جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از جفت پرایمرها و چرخه دمایی گزارش شده توسط Edelstein و همکاران در سال ۲۰۰۳ مورد بررسی قرار گرفت (۱۴). برای این منظور مخلوط واکنش همچون روش مورد استفاده برای شناسایی ژن bla_{TEM} تهیه گردید با این تفاوت که از پرایمرهای مربوطه (CTX-M-F و CTX-M-R) در مخلوط واکنش استفاده گردید. واکنش تکثیر با برنامه زمانی: دناتوراسیون اولیه در دمای $94^{o}C$ به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل $94^{o}C$ به مدت ۲۰ ثانیه، $51^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً مرحله نهایی واکنش در دمای $72^{o}C$ به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. در این واکنش نیز از اشریشیاکولای *PTCC1533* به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد.



تصویر۱- مناطق نمونه‌برداری شده واقع در استان آذربایجان غربی.



تصویر ۲. الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن اختصاصی گونه اشریشیاکولای. چاهک M: نشانگر GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus. چاهک ۱: کنترل مثبت. چاهک ۲: کنترل منفی. چاهک‌های ۱۰-۳: فرآورده‌های PCR با اندازه مورد انتظار حدود ۶۶۲ جفت باز.



تصویر ۳. الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن bla_{TEM} بر روی ژل آگاروز. چاهک M: مارکر 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany) GeneRulerTM؛ چاهک ۱: کنترل مثبت (اشریشیاکولای *PTCC1533*)؛ چاهک۲: کنترل منفی (استفاده از آب مقطر استریل به جای DNA)؛ چاهک‌های ۸-۳: جدایه‌های منتخب اشریشیاکولای با واکنش مثبت.

جهت شناسایی ژن bla_{SHV}، مخلوط واکنش با استفاده از جفت پرایمر مربوطه (SHV-F و SHV-R) و براساس پروتوکل بکاررفته در مورد ژن bla_{TEM} تهیه گردیده و روند تکثیر در دستگاه ترمال سایکلر با چرخه‌های دمایی مشابه انجام گرفت. در این واکنش از اشریشیاکولای PTCC1533 (Persian Type Culture Collection) و نیز کلبسیلا پنومونیه RTCC1248 (Razi Type Culture Collection) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR: فرآورده‌های PCR حاصل از تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ و مشاهده در زیر دستگاه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه محصولات PCR با استفاده از نشانگر 100 bp DNA ladder plus GeneRulerTM ساخت شرکت فرمنتاز کشور آلمان مشخص گردیدند.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۵ انجام گردید. اختلاف میزان شیوع bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در بین نواحی مورد مطالعه با آزمون (Stat > Basic Stat > 2- proportions) 2-proportions آنالیز گردید. ارزش $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

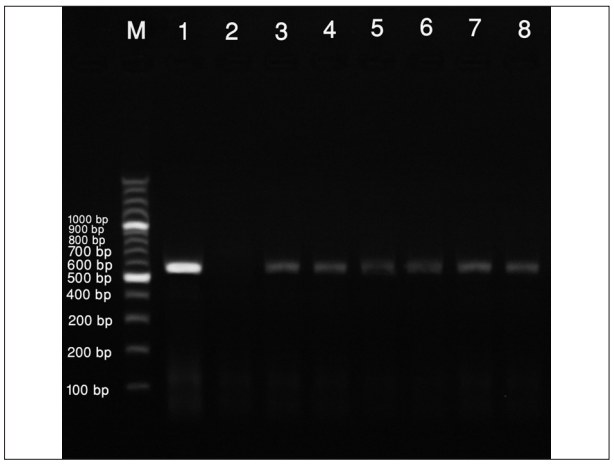
نتایج

در کل ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای از گاومیش‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ارومیه ۳۳ جدایه، خوی ۳۳ جدایه، پیرانشهر ۲۴ جدایه و میاندوآب ۱۵ جدایه) از طریق روش‌های معمول و نیز آزمایش مولکولی با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه Eco2083 و Eco2745 مورد شناسایی قرار گرفتند. تکثیر به روش PCR باندی با اندازه تقریبی ۶۶۲ جفت باز تولید نمود که نشان از حضور DNA باکتریایی است (تصویر۲).

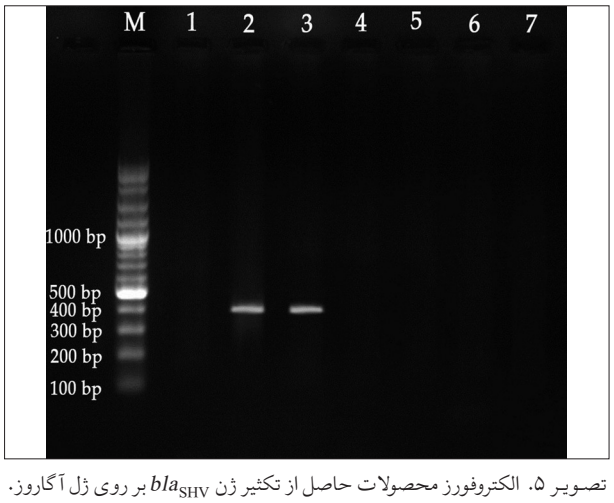
نتایج تکثیر ژن bla_{TEM} به روش PCR: از تعداد ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای مورد مطالعه، ۳۷ جدایه (۳۵/۲٪) دارای ژن bla_{TEM} بودند که به تفکیک نواحی مورد مطالعه ۱۱ جدایه (۳۳٪) از ناحیه ارومیه، ۱۴ جدایه (۴۲٪) از ناحیه خوی، ۷ جدایه (۲۹٪) از ناحیه پیرانشهر و ۵ جدایه (۳۳٪) از ناحیه میاندوآب به‌دست آمد (نمودار۱).

در تصویر ۳ تصویر مربوط به الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن bla_{TEM} بر روی ژل آگاروز نشان داده شده است.

نتایج تکثیر ژن bla_{CTX-M} به روش PCR: حضور ژن bla_{CTX-M} در ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۴۷ جدایه (۴۴/۸٪) دارای ژن bla_{CTX-M} بودند که به تفکیک نواحی مورد مطالعه ۱۴ جدایه (۴۲/۴٪) از ناحیه ارومیه، ۲۱ جدایه (۶۳/۶٪) از ناحیه خوی، ۶ جدایه (۲۵٪) از ناحیه پیرانشهر و ۶ جدایه (۴۰٪) از ناحیه میاندوآب به‌دست آمد (نمودار۱).



تصویر ۴. الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن bla_{CTX-M} بر روی ژل آگاروز. چاهک M: مارکر 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany) GeneRulerTM؛ چاهک ۱: کنترل مثبت (اشریشیاکولای PTCC1533 ؛ چاهک۲: کنترل منفی (استفاده از آب مقطر استریل به جای DNA)؛ چاهک‌های ۸-۳: جدایه‌های منتخب اشریشیاکولای با واکنش مثبت.



تصویر ۵. الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن bla_{SHV} بر روی ژل آگاروز. چاهک M: مارکر 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany) GeneRulerTM؛ چاهک۱: کنترل منفی (استفاده از آب مقطر استریل به جای DNA)؛ چاهک ۲: کنترل مثبت (اشریشیاکولای PTCC1533)؛ چاهک ۳: کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه RTCC1248)؛ چاهک ۷-۴: جدایه‌های منتخب اشریشیاکولای با واکنش منفی.

درتصویر ۴ تصویر مربوط به الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیرژن bla_{CTX-M} برروی ژل آگاروز نشان داده شده است.

نتایج تکثیر ژن bla_{SHV} به روش PCR: حضورژن bla_{SHV} در تمامی ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای به‌دست آمده در این مطالعه به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که هیچ یک از نمونه‌ها دارای ژن bla_{SHV} نبودند و محصول ۳۹۲ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن bla_{SHV} فقط در اشریشیاکولای PTCC1533 و کلبسیلا پنومونیه RTCC1248 که به عنوان سوش کنترل مثبت در این واکنش مورد استفاده قرار گرفته بودند، مشاهده شد. تصویر ۵ تصویر الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن bla_{SHV} برروی ژل آگاروز را نشان می‌دهد.

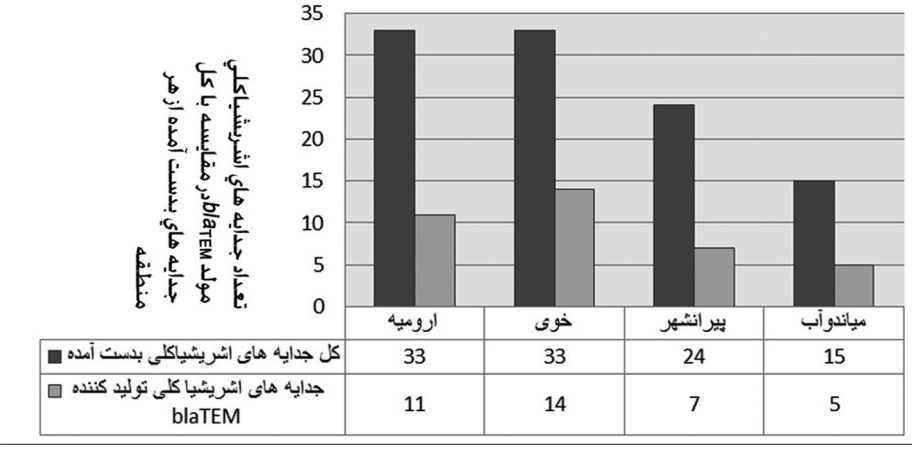
به طور خلاصه در آزمایش PCR از مجموع ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای مورد مطالعه، ۴۷ جدایه (۴۴/۸٪) و ۳۷ جدایه (۳۵/۲٪) به ترتیب حاوی ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} بودند. در حالی‌که ژن bla_{SHV} در هیچ‌کدام از جدایه‌ها شناسایی نگردید. همچنین ۱۷ جدایه (۱۶/۲٪) به طور هم‌زمان دارای هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} بودند. در ضمن ۳۰ جدایه (۲۸/۵٪) تنها حاوی ژن bla_{CTX-M} و ۲۰ جدایه (۱۹٪) تنها حاوی ژن bla_{TEM} بودند.

همچنین در این تحقیق آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۵ (Stat > Basic Stat > 2- proportions) نشان داد که در بین مناطق مورد مطالعه واقع در استان آذربایجان غربی، از نظر میزان شیوع ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{TEM} اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

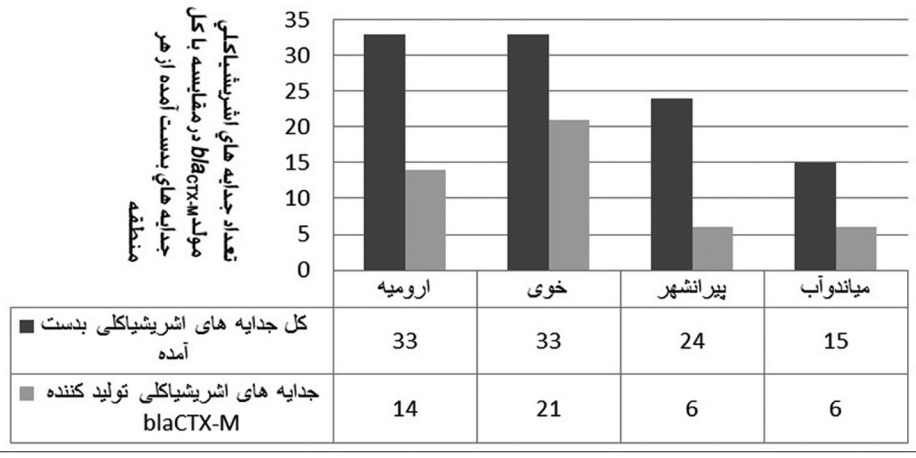
بحث

انتروباکتریاسه‌های مولد بتا-لاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) یک موضوع جدی در پزشکی بوده و به عنوان مسئله‌ای نوظهور در زمینه دامپزشکی مطرح می‌باشند (۳۹). در این ارتباط حضور باکتری‌های گرم منفی مقاوم در برابر سفالوسپورین‌های وسیع الطیف بواسطه تولید ESBL در دام‌های مورد مصرف غذای انسان و تأثیر آن بر روی سلامت انسان توسط Seiffert و همکاران در سال ۲۰۱۳ مورد مطالعه قرار گرفته است (۴۱). مطالعات متعدد در مناطق مختلف کشور ایران نیز نشان دهنده حضور بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف در جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده از افراد بیمار از جمله کلبسیلا پنومونیه (۱۷،۲۸)، گونه‌های آسینتوباکتر (۴۳)، گونه‌های سالمونلا (۳۸)، جدایه‌های شیگلا (۳۷) و جدایه‌های اشریشیاکولای (۱،۲۷) می‌باشند. این موضوع لزوم انجام تحقیقات جامع به منظور مشخص نمودن مخازن، به ویژه مخازن دامی، را آشکار می‌سازد. از این رو در این مطالعه ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای به‌دست آمده از مدفوع گاومیش‌های چهار منطقه واقع در استان آذربایجان غربی پس از شناسایی بر اساس ویژگی‌های کشت، خصوصیات بیوشیمیایی و تکثیر ژن 23S rRNA اختصاصی گونه اشریشیاکولای، از نظر حضور ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} مورد بررسی قرار گرفتند. همچون مطالعه Riffon و همکاران در سال ۲۰۰۱ بدنبال تکثیر ژن 23S rRNA قطعه‌ای با اندازه ۶۶۲ جفت بازی از همه جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده حضور ژن بتا-لاکتاماز وسیع الطیف bla_{CTX-M} در ۴۴/۸٪ از جدایه‌های اشریشیاکولای مورد مطالعه بود. مطالعه انجام گرفته توسط Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز نشان داد که اشریشیاکولای مقیم دام‌های سالم مورد مصرف غذای انسان می‌توانند مخازن مهم ژن‌های bla_{CTX-M} باشند (۵۱). این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی اهمیت خاصی دارد، زیرا جدایه‌های اشریشیاکولای تولید کننده بتا-لاکتاماز CTX-M در سراسر جهان به



نمودار ۱. حضور ژن bla_{TEM} در نمونه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از هر منطقه مورد مطالعه. کل جدایه‌های اشرشیاکلی به‌دست آمده.



نمودار ۲. حضور ژن bla_{CTX-M} در نمونه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از هر منطقه. کل جدایه‌های اشرشیاکلی به‌دست آمده .

جدول ۱. توالی پرایمر و اندازه مورد انتظار محصولات بدنبال تکثیر ژن‌های کدکننده bla_{TEM}، bla_{CTX-M} و bla_{SHV}.

نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	منبع
TEM-F	bla_{TEM}	5′-ATCAGCAATAAACCAGC-3′	۵۱۶	(۲۳)
TEM-R		5′-CCCCGAAGAACGTTTTC-3′		
CTX-M-F	bla_{CTX-M}	5′-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3′	۵۴۴	(۱۴)
CTX-M-F		5′-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA--3′		
SHV-F	bla_{SHV}	5′-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3′	۳۹۲	(۱۱)
SHV-R		5′-ATTTGCTGATTTCGCTCG-3′		

عنوان عامل مهم عفونت‌های دستگاه ادراری در انسان مطرح می‌باشند (۶،۳۳). در مطالعه‌ای هم که توسط Moghadam و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از نمونه ادرار افراد بیمار در مشهد انجام گرفت، ژن bla_{CTX} در مقایسه با بقیه ژن‌های کد کننده ESBL از انتشار وسیع‌تری برخوردار بود (۳۱). انتشار وسیع این نوع از بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف می‌تواند ناشی از تحرک ژن‌های مذکور بواسطه اجزاء ژنتیکی قابل انتقال باشد. مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های bla_{CTX-M} عمدتاً بر روی پلاسمیدهای الحاق پذیر حمل شده (۸،۹،۵۰) و در اغلب موارد در ارتباط با توالی‌های تداخلی مثل ISEcp1 یا IScr1 می‌باشند که می‌توانند قطعات DNA کناری را با خود انتقال دهند (۳۴،۴۸). همچنین باید توجه داشت که امکان جداسازی اشریشیاکولای‌های مولد CTX-M از خاک وجود داشته به‌طوری‌که این اجرام می‌توانند حداقل برای یک سال در محیط خاک بقا یابند (۱۹). از این رو می‌توان این موضوع را به عنوان یک فاکتور خطر در محیط پرورش گاومیش‌ها مدنظر قرار داده و مطالعات بیشتری را در این ارتباط انجام داد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه ژن bla_{TEM} در ۳۷ جدایه از ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای مورد مطالعه (۳۵/۲٪) شناسایی گردید، در حالی که ژن bla_{SHV} در هیچ کدام از جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی نشد. تاکنون

bla_{SHV} بندرت در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از دام‌های مزرعه‌ای شناسایی شده است. تنها تعداد کمی گزارش در ارتباط با حضور bla_{SHV-12} در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از طیور (۲۲) و bla_{SHV-5} در انتروباکتریاسه‌های به‌دست آمده از خوک (۲۹) منتشر شده است. برخی از مطالعات انجام شده در ایران در زمینه پزشکی نیز نشان دهنده وفور بالای ژن کد کننده TEM در مقایسه با SHV است (۴۲،۴۹). این موضوع اهمیت انجام مطالعات جامع در ارتباط با شناسایی منشأ مقاومت‌های دارویی در انسان با تاکید بر نقش مخازن دامی و زنجیره غذایی را نشان می‌دهد.

به طور کلی در این مطالعه بیشترین و کمترین میزان حضور ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف به ترتیب در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از مناطق خوی (۶۳/۶٪ برای ژن bla_{CTX-M} و ۴۲٪ برای ژن bla_{TEM}) و پیرانشهر (۲۵٪ برای ژن bla_{CTX-M} و ۲۹٪ برای ژن bla_{TEM}) گزارش گردید. در حالی که میزان حضور ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از منطقه ارومیه به ترتیب ۴۲/۴٪ و ۳۳٪ و در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از منطقه میاندوآب به ترتیب ۴۰٪ و ۳۳٪ بود. با این حال بررسی‌های آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر میزان شیوع ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف در بین مناطق مورد مطالعه وجود ندارد که این امر ممکن است ناشی از روش درمانی یکسان، شرایط پرورشی و شرایط محیطی مشابه در این مناطق باشد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند ژن‌های کد کننده ESBL معمولاً بر روی اینتگرون‌ها، ترانسپوزون‌ها و یا پلاسمیدهایی قرار دارند که حاوی ژن‌های مقاومت نسبت به سایر عوامل ضد میکروبی غیر مرتبط بوده (۱۳) و تولید ESBL در اعضای انتروباکتریاسه معمولاً با بیان مقاومت نسبت به داروهای دیگری غیر از بتا-لاکتام‌ها همراه است (۱۲،۲۰). از این رو استفاده از داروهای بتا-لاکتام و نیز اثر هم‌انتخابی به‌واسطه تجویز سایر آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتا-لاکتام، می‌توانند دلیل احتمالی جهت حضور باکتری‌های مولد بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف در دستگاه گوارش گاومیش باشد. از آنجایی که گاومیش علاقه زیادی به آب تنی در استخر، رودخانه و گودال‌های آب دارد، لذا امکان اخذ اشریشیاکولای مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها از طریق آب و یا برعکس وجود دارد. به طوری که باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک که حامل ژن‌های متنوع شامل bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} بر روی اجزای ژنتیکی قابل انتقال بودند قبلاً از محیط‌های آبی کشورهای مختلف جدا شده‌اند (۲،۱۰،۱۸). همچنین عنوان شده است که آب‌های سطحی و فاضلاب‌ها، دریافت کننده میکروبیوتای دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات، حاملین مهم در انتشار اشریشیاکولای در محیط هستند (۱۵). از این رو لازم است مطالعات جامعی در ارتباط با حضور باکتری‌های مولد بتا-لاکتاماز وسیع الطیف در محیط‌های پرورشی گاومیش از جمله حوضچه‌های آب انجام گیرد.

به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های کد کننده بتا-لاکتاماز وسیع الطیف، به ویژه انواع bla_{CTX-M} و bla_{TEM}، به وفور در بین جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از مدفوع گاومیش حضور دارند. با این حال در مطالعه‌ای که اخیراً در کشور هند بر روی جدایه‌های اشریشیاکولای مولد توکسین شیگا (STEC) به‌دست آمده از مدفوع گاومیش‌های سالم انجام گرفت، هیچکدام از ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی نگردید (۲۶). این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی، سیستم مدیریتی و نیز تفاوت در توزیع ژن‌های کد کننده آنزیم‌های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف در بین جدایه‌های اشریشیاکولای مقیم و بیماریزا باشد که لازم است مطالعات جامع‌تری در این ارتباط صورت گیرد. با این وجود اهمیت انتشار وسیع ژن‌های کد کننده bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در جدایه‌های اشریشیاکولای مورد مطالعه با در نظر گرفتن شیوع ESBL در جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده از افراد بیمار در مناطق مختلف کشور مشخص می‌گردد (۳،۳۶). اگرچه نمی‌توان مشخص نمود که جدایه‌های مولد ESBL در این بیماران ژن‌های مقاومت را از دام‌های مورد مصرف غذای انسان از طریق زنجیره غذایی کسب نموده‌اند، با این حال شیوع بالای بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف نوع CTX-M و TEM در بین جدایه‌های اشریشیاکولای مقیم دستگاه گوارش گاومیش نشان دهنده نقش مهم آنها به عنوان مخازن ژن‌های ESBL می‌باشد. انجام تحقیقات بیشتر در ارتباط با تعیین واریانت ESBLهای مربوط به جدایه‌های باکتریایی با منشأ انسان و دام و نیز تعیین کلون جدایه‌ها در روشن‌تر شدن این موضوع می‌تواند مؤثر باشد.

مطالعه حاضر نیز از مجموع ۱۰۵ جدایه اشریشیاکولای به‌دست آمده از مدفوع گاومیش ۱۷ جدایه (۱۶/۲٪) واجد هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} بودند که با نتایج حاصل از مطالعات دیگر مبنی بر حضور هم زمان ژن‌های bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در جدایه‌های اشریشیاکولای به‌دست آمده از دام‌های مختلف هم‌خوانی دارد (۱۶،۴۶). این موضوع به لحاظ ایجاد مقاومت چندگانه در جدایه‌های مذکور و بروز مشکلات درمانی می‌تواند مهم باشد (۴،۵).

به طور خلاصه یافته‌های این مطالعه نشان داد که جدایه‌های اشریشیاکولای مقیم دستگاه گوارش گاومیش‌های سالم می‌توانند به عنوان مخازن ژن‌های کد کننده بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف بویژه از نوع bla_{CTX-M} و bla_{TEM} مطرح باشند که این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی و انتقال ژن‌های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف از طریق زنجیره غذایی حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است، لذا از مسوولین دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Aminzadeh, Z., Sadat Kashi, M., Sha'bani, M. (2008) Bacteriuria by extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran. Iran J Kidney Dis. 2: 197-200.
2. Aubron, C., Poirel, L., Ash, R.J., Nordmann, P. (2005) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. Emerg Infect Dis. 11: 260-4.
3. Bazzaz, B.S., Naderinasab, M., Mohamadpoor, A.H., Farshadzadeh, Z., Ahmadi, S., Yousefi, F. (2009) The prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among clinical isolates from a general hospital in Iran. Acta Microbiol Immunol Hung. 56: 89-99.
4. Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 48: 1-14.
5. Boyd, D.A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M.P., Willey, B.M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., Mulvey, M.R. (2004) Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. Antimicrob Agents Chemother. 48: 3758-64.
6. Canton, R., Coque, T.M. (2006) The CTX-M β-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 9: 466-75.
7. Carattoli, A. (2008) Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers. Clin Microbiol Infect. 14 Suppl 1: 117-23.
8. Carattoli, A. (2009) Resistance plasmid families in enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 53: 2227-38.
9. Carattoli, A. (2011) Plasmids in gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. Int J Med Microbiol. 301: 654-8.
10. Chen, H., Shu, W., Chang, X., Chen, J. A., Guo, Y., Tan, Y. (2010) The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum β-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze river basin in Chongqing. Environ Pollut. 158: 2459-64.
11. Colom, K., Perez, J., Alonso, R., Fernandez-Aranguiz, A., Larino, E., Cisterna, R. (2003) Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{OXA-1} genes in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol Lett. 223: 147-51.
12. Damborg, P., Marskar, P., Baptiste, K.E., Guardabassi, L. (2012) Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. Vet Microbiol. 154: 298-304.
13. Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A. (2012) Plasmids carrying $bla_{CTX-M-1}$ and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. J Antimicrob Chemother. 66: 757-64.
14. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. (2003) Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 47: 3724-32.
15. Figueira, V., Serra, E., Manaia, C.M. (2011) Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. Sci Total Environ. 409: 1017-23.
16. Geser, N., Stephan, R., Hachler, H. (2012) Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. 8: 21.
17. Ghasemi, Y., Archin, T., Kargar, M., Mohkam, M. (2013) A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β-lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in intensive care units of a referral hospital in Shiraz, Iran. Asian Pac J Trop Med. 6: 703-8.

18. Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. (2010) First isolation of the *bla*$_{OXA-23}$ carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. Antimicrob Agents Chemother. 54: 578-9.
19. Hartmann, A., Locatelli, A., Amoureux, L., Depret, G., Jolivet, C., Gueneau, E., Neuwirth, C. (2012) Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy Region). Front Microbiol. 3: 83.
20. Johns, I., Verheyen, K., Good, L., Rycroft, A. (2012) Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: a longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. Vet Microbiol. 159: 381-9.
21. Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J., Mevius, D.J. (2011) Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect. 17: 873-80.
22. Li, L., Jiang, Z.G., Xia, L.N., Shen, J.Z., Dai, L., Wang, Y., Huang, S.Y., Wu, C.M. (2010) Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of β-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970-2007. Vet Microbiol. 144: 505-10.
23. Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L. (2007) β-Lactam resistance and β-lactamases in bacteria of animal origin. Vet Microbiol. 121: 197-214.
24. Livermore, D.M. (2008) Defining an extended-spectrum β-lactamase. Clin Microbiol Infect. 14 Suppl 1: 3-10.
25. Mabilat, C., Courvalin, P. (1990) Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 34: 2210-6.
26. Mahanti, A., Samanta, I., Bandopaddhay, S., Joardar, S.N., Dutta, T.K., Batabyal, S., Sar, T.K., Isore, D.P. (2013) Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from buffalo in India. Lett Appl Microbiol. 56: 291-298.
27. Mehrgan, H., Rahbar, M. (2008) Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 31: 147-51.
28. Mehrgan, H., Rahbar, M., Arab-Halvaii, Z. (2010) High prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries. 4: 132-8.
29. Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F. (2006) Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother. 58: 211-5.
30. Moodley, A., Guardabassi, L. (2009) Transmission of IncN plasmids carrying *bla*$_{CTX-M-1}$ between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. Antimicrob Agents Chemother. 53: 1709-11.
31. Nakhaei Moghaddam, M., Forghanifard, M.M., Moshrefi, S. (2011) Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase genes (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX}$ and *bla*$_{SHV}$) among urinary *Escherichia coli* clinical isolates in Mashhad, Iran. Iran J Basic Med Sci. 15: 833-9.
32. Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 18: 657-86.
33. Pitout, J.D., Laupland, K.B. (2008) Extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 8: 159-66.
34. Poirel, L., Lartigue, M.F., Decousser, J.W., Nordmann, P. (2005) ISEcp1B-mediated transposition of *bla*$_{CTX-M}$ in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 49: 447-50.
35. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E. (2002)

Clinical Veterinary Microbiology. (3rd ed.) Mosby, London, UK.

36. Ramazanzadeh, R., Chitsaz, M., Bahmani, N. (2009) Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β-lactamase-producing bacteria in intensive care units of Sanandaj general hospitals (Kurdistan, Iran). Chemotherapy. 55: 287-92.

37. Ranjbar, R., Ghazi, F.M., Farshad, S., Giammanco, G.M., Aleo, A., Owlia, P., Jonaidi, N., Sadeghifard, N., Mammina, C. (2013) The occurrence of extended-spectrum β-lactamase producing *Shigella* spp. in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 5: 108-12.

38. Ranjbar, R., Giammanco, G.M., Aleo, A., Plano, M. R., Naghoni, A., Owlia, P., Mammina, C. (2010) Characterization of the first extended-spectrum β-lactamase-producing nontyphoidal *Salmonella* strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis. 7: 91-5.

39. Rayamajhi, N., Kang, S.G., Lee, D.Y., Kang, M.L., Lee, S.I., Park, K.Y., Lee, H.S., Yoo, H.S. (2008) Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β-lactamases from cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. Int J Food Microbiol. 124: 183-7.

40. Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagace, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol. 39: 2584-9.

41. Seiffert, S.N., Hilty, M., Perreten, V., Endimiani, A. (2013) Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? Drug Resist Updat. 16: 22-45.

42. Shahcheraghi, F., Nasiri, S., Noveiri, H. (2009) Detection of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli*. Iran J Clin Inf Dis. 4: 65-70.

43. Shakibaie, M.R., Adeli, S., Salehi, M.H. (2012) Antibiotic resistance patterns and extended-spectrum β-lactamase production among *Acinetobacter* spp. isolated from an intensive care Unit of a hospital in Kerman, Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 1: 1.

44. Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E. (2006) Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 57: 1215-9.

45. Sorum, H., Sunde, M. (2001) Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet Res. 32: 227-41.

46. Tamang, M.D., Nam, H.M., Kim, S.R., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., Jung, S.C., Lim, S.K. (2013) Prevalence and molecular characterization of CTX-M β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle. Foodborne Pathog Dis. 10: 13-20.

47. Tannock, G.W. (1995) Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. (1st ed.) Chapman and Hall. London, UK.

48. Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R. (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol Mol Biol Rev. 70: 296-316.

49. Zaniani, F.R., Meshkat, Z., Naderi Nasab, M., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M.S., Darban Hoseini, M. (2012) The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum β-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. Iran J Basic Med Sci. 15: 654-60.

50. Zhao, W.H., Hu, Z.Q. (2013) Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol. 39: 79-101.

51. Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., Chen, X., Lv, L., Zhuo, C., Chen, Z., Liu, J.H. (2012) Prevalence and characterisation of CTX-M β-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. Int J Antimicrob Agents. 39: 305-10.

Molecular detection of extended spectrum β-lactamase (ESBL) genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$ and *bla*$_{SHV}$ in *Escherichia coli* isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) feces in West Azerbaijan province, Iran

Hoseini, S.Sh.[1], Dastmalchi Saei, H.[2*], Ownagh, A.[2]

[1]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran*

(Received 20 May 2014, Accepted 24 July 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Beta-lactamase enzymes are considered the most important factor of resistance against β-lactam antibiotics among gram-negative bacteria. In recent years, the production of extended-spectrum β-lactamases has been prevailed among bacteria, especially bacteria of animal origin, and this is important in terms of public health. **OBJECTIVE:** The prupose of this study is to evaluate the presence of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$ and *bla*$_{SHV}$ in *E. coli* isolates recovered from fecal samples of apparently healthy water buffaloes (Bubalus bubalis) using polymerase chain reaction. **METHODS:** In this study, 105 isolates of *E. coli*, which were obtained from 135 fecal samples of water buffaloes from different areas of West Azerbaijan province (33 isolates from Urmia, 33 isolates from Khoy, 24 isolates from Piranshahr and 15 isolates from Miandoab), were identified using biochemical characteristics as well as 23S rRNA gene amplification. Then, the presence of CTX-M, TEM, and SHV groups of ESBL genes were evaluated among the studied *E. coli* isolates by the PCR method. **RESULTS:** In the studied isolates, 47 out of 105 *E. coli* isolates (44.8%) contained *bla*$_{CTX-M}$ gene and 37 isolates (35.2%) harbored *bla*$_{TEM}$ gene. Also, 17 isolates (16.2%) contained both *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{TEM}$ genes simultaneously. According to the results, *bla*$_{SHV}$ gene was not detected among the studied isolates. Also, no significant difference was seen in distribution of ESBL genes among the studied regions. **CONCLUSIONS:** The results of this study indicate that water Buffalo gastrointestinal *E. coli* is reservoir for ESBLs, especially CTX-M and TEM types, and this should be considered in terms of public health and the transfer of resistance genes to pathogenic bacteria.

Key words: buffalo, *Escherichia coli*, extended spectrum β-lactamases

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Sampled regions located in West Azerbaijan province

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from amplification of *E. coli* species specific gene. Lane M, GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany). Lane 1, positive control (*E. coli* ATCC 43895). Lane 2, negative control (reaction mixture without DNA). Lanes 3-10: PCR products with the expected size of approximately 662 bp.

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of products obtained from amplification of the *bla*$_{TEM}$ gene. Lane M: GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany); Lane 1: Positive control (*E. coli* PTCC1533); Lane 2: Negative control (use of distilled water instead of DNA); Lanes 3-8: chosen *E. coli* isolates with positive reaction.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of products obtained from amplification of the *bla*$_{CTX-M}$ gene. Lane M: GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany); Lane 1: Positive control (*E. coli* PTCC1533); Lane 2: Negative control (use of distilled water instead of DNA); Lanes 3-8: chosen *E. coli* isolates with positive reaction.

Figure 5. Agarose gel electrophoresis of products obtained from amplification of the *bla*$_{SHV}$ gene. Lane M: GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany); Lane 1: Negative control (use of distilled water instead of DNA); Lane 2: Positive control (*E. coli* PTCC1533); Lanes 3: Positive control (Klebsiella pneumoniae RTCC1248); Lanes 4-7: chosen *E. coli* isolates with negative reaction.

Graph 1. Presence of *bla*$_{TEM}$ gene in *E. coli* isolates obtained from each studied region

Graph 2. Presence of *bla*$_{CTX-M}$ gene in *E. coli* isolates obtained from each studied region.

Table 1. Primer sequences and predicted size of products following amplification of *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$, and *bla*$_{SHV}$ genes.

***Corresponding author's email: HDSaei561@gamil.com, Tel: 0441-2972661, Fax: 0441-2771926**