DOI: 10.22055/ivj.2019.190457.2154

بررسی حضور ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} در میان سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از گوسفند در کرمان

مازیار جاجرمی[۱]، امیر اسدآبادی‌صفات[۲*]، احسان‌اله سخائی[۳] و رضا قنبرپور[۴]

[۱] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
[۲] دانش‌آموخته‌ی دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
[۴] استاد گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

دریافت: ۹۸/۳/۲۷ پذیرش: ۹۸/۹/۱۲

چکیده

این مطالعه با هدف، تعیین فراوانی سویه‌های *اشرشیاکلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف متعلق به دسته‌ی بتالاکتام‌ها و همچنین تعیین فراوانی برخی ژن‌های مهم کدکننده‌ی مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها در گوسفند انجام پذیرفته است. به منظور انجام این مطالعه، با کمک سوآپ استریل از ۶۷ راس گوسفند به ظاهر سالم نمونه‌ی مدفوعی از مقعد اخذ شد و از تمامی نمونه‌ها با کمک روش‌های کشت، باکتری *اشرشیاکلی* جداسازی شد. سپس با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن، حساسیت جدایه‌ها نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک از دسته‌ی بتالاکتام سنجیده شد. همچنین به کمک PCR حضور ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها نسبت به حداقل یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم بودند. بیشترین درصد فراوانی مقاومت مربوط به مقاومت علیه سفالکسین و سفوتاکسیم به میزان ۹۸/۵ درصد و سفتازیدیم به میزان ۹۷ درصد بود. همچنین ۵ عدد (۷/۴ درصد) از نمونه‌ها دارای *اشرشیاکلی* تولید کننده‌ی ESBLs (Extended Spectrum Beta-lactamases یا بتالاکتامازهای وسیع الطیف) بودند. در این میان، هر ۵ سویه‌ی تولید کننده‌ی ESBLs دارای ژن مقاومت bla_{TEM} و یکی از آن‌ها واجد bla_{SHV} بودند. نتایج این مطالعه بیان‌گر افزایش روز افزون مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف بتالاکتام در گوسفندان منطقه‌ی تحت بررسی می‌باشد که این موضوع گوسفند را به عنوان مخزن مهمی برای سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها مطرح می‌کند. بنابراین بروز رسانی روش‌های تجویز آنتی‌بیوتیک، استفاده‌ی چرخشی از آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از روش‌های پیش‌گیری از بروز عفونت‌های باکتریای می‌تواند از مهم‌ترین استراتژی‌های کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیک در حیوانات تولیدکننده‌ی محصولات غذایی باشد.

کلمات کلیدی: بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اشرشیاکلی*، ESBLs

مقدمه

طی چند دهه گذشته از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان، پیش‌گیری و بهبود رشد حیوانات استفاده شده است. استفاده‌ی بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب بروز مقاومت نسبت به آن‌ها شده است، به طوری که گسترش باکتری‌های

*نویسنده مسئول : امیر اسدآبادی‌صفات، دانش‌آموخته‌ی دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
E-mail: amir_asadabadi@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقاوم به عنوان یکی از چالش‌های اساسی پیش رو در قرن ۲۱ مطرح بوده و به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است (Organization, 2014).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یا ESBLs آنزیم‌هایی هستند که توسط برخی باکتری‌ها تولید می‌شوند. تولید این آنزیم‌ها مهم‌ترین مکانیسم برای غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های دسته‌ی بتالاکتام شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشد که این عمل را با تخریب حلقه بتالاکتام موجود در این آنتی‌بیوتیک انجام می‌دهند. معمولا ژن‌های بتالاکتامازی بر روی عناصر قابل انتقال ژنتیکی مانند پلاسمید قرار دارند. اکثر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، مشتقات خانواده‌های TEM، SHV و CTX-M می‌باشند که توسط ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و $bla_{CTX-M-15}$ کد می‌شوند (Carattoli, 2008). ژن‌های bla_{TEM} از مهم‌ترین ژن‌های بتالاکتامازی پلاسمیدی هستند که عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه‌های *اشرشیاکلی* به داروهای بتالاکتام و از علل مهم بروز مقاومت‌های چندگانه دارویی می‌باشند (Pitout, 2012).

اشرشیاکلی یک باکتری کامنسال در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است (Marshall, 2011 & Levy). این باکتری به عنوان یک شاخص مهم برای بیان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از مدفوع مطرح است، زیرا در طیف وسیعی از میزبانان وجود دارد (Erb et al, 2007). حیوانات تولید کننده محصولات غذایی به عنوان مخزنی برای *اشرشیاکلی*‌های تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف شناخته شده‌اند (Carattoli, 2008).

استفاده‌ی بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث از بین رفتن باکتری‌های حساس و عضو فلور نرمال در بدن حیوان می‌شود و فضا را برای رشد و تکثیر باکتری‌های مقاوم فراهم می‌کند (Tenover, 2006). بنابراین مصرف یک آنتی‌بیوتیک، علاوه بر افزایش سطح مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا، باعث افزایش سطح مقاومت باکتری‌های کمنسال (همزیست) نیز می‌شود. باکتری‌های کمنسال مقاوم می‌توانند منبعی از ژن‌های مقاومت را برای باکتری‌های بالقوه بیماری‌زا تشکیل دهند. باکتری‌های کمنسال مقاوم در حیوانات تولید کننده‌ی غذا ممکن است آلوده کننده‌ی زنجیره‌های غذایی نیز باشند و مانند باکتری‌های ایجاد کننده‌ی بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در فرآورده‌های غذایی با منشا دامی، حضور یابند و به انسان منتقل شوند (Kapoor, 2017; Tacconelli, 2019 and Pezzani).

در مطالعه‌ی Molbak و همکاران در سال ۲۰۰۴، بیان شده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای حیوانات با اهمیت غذایی همراه با پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا برای انسان می‌باشد. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی از حیوانات با منشا غذایی به انسان انتقال می‌یابد. علاوه بر انتقال از طریق زنجیره‌ی غذایی، تبادل عناصر ژنتیکی متحرک در بین باکتری‌های کمنسال و بیماری‌زا در پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشارکت دارند. این نتایج عواقب قابل توجه گسترش مقاومت بر سلامت عمومی را گوشزد می‌کند. یکی دیگر از نتایج آن‌ها، افزایش احتمال انتقال عوامل مقاومت به انسان‌ها می‌باشد. با کاهش قدرت اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان شاهد افزایش دوره‌های درمانی و محدودیت در انتخاب‌های درمانی بود (Molbak, 2004).

بررسی فراوانی مقاومت در باکتری‌های شاخصی چون *اشریشیاکلی* مدفوعی در جمعیت‌های مختلف حیوانی، امکان مقایسه فراوانی مقاومت و همچنین شناسایی مکانیسم‌های انتقال باکتری‌های مقاوم و عوامل ژنتیکی مقاومت از حیوانات به انسان و بر عکس را فراهم می‌سازد (Tenover, 2006). گوسفند به عنوان یک حیوان مهم تولید کننده‌ی گوشت مصرفی در کرمان است، بنابراین بررسی وجود سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های قابل انتقال به انسان حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی سویه‌های *اشرشیاکلی* مقاوم به بتالاکتام‌ها و همچنین تعیین فراوانی برخی ژن‌های مهم کدکننده‌ی مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها در گوسفند، جهت افزایش آگاهی به منظور اتخاذ سیاست‌های درست مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای دستیابی به نتایج درمانی بهتر و جلوگیری

از گسترس مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و دستیابی به درک بهتری از اپیدمیولوژی آن می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه، از ۶۷ رأس گوسفند به ظاهر سالم در منطقه‌ی کرمان با کمک سوآپ استریل نمونه‌ی مدفوع از مقعد اخذ گردید و برای ارزیابی‌های اولیه به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان ارسال گردید. نمونه‌ها طی پنج بار مراجعه به کشتارگاه صنعتی کرمان اخذ شد و با پرسش از افراد ارجاع دهنده‌ی گوسفندان، از حیواناتی نمونه‌گیری شد که از مناطق نزدیک به شهرستان کرمان منشاء گرفته بودند. به منظور جداسازی و شناسایی فنوتیپی باکتری *اشرشیاکلی*، سوآب‌ها مستقیماً در محیط مک کانکی (مرک[1]، آلمان) به صورت خطی کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C نگهداری گردیدند. پس از ۲۴ ساعت محیط‌ها از انکوباتور خارج شده و مورد بررسی قرار گرفتند. از هر محیط ۲ پرگنه‌ی تک، گرد، صورتی تا قرمز، متوسط و محدب برای انجام آزمایشات تأییدی بعدی انتخاب گردید. برای آزمایشات بیوشیمیایی، جدایه‌های انتخاب شده پس از رنگ‌آمیزی گرم، در محیط‌های TSI[2]، SIM[3]، MRVP[4] و سیترات کشت داده شدند. در نهایت جدایه‌های گرم منفی که تست‌های بیوشیمیایی آن‌ها عبارت بودند از اسید/اسید در TSI، تولید کننده‌ی ایندول، بدون ایجاد هیدروژن سولفید، دارا یا فاقد حرکت در SIM، MR–مثبت، VP–منفی و فاقد سیتراتاز، به عنوان باکتری *اشرشیاکلی* مورد تأیید قرار گرفتند.

در این بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک دسته‌ی بتالاکتام شامل آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالکسین، سفکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا باکتری مورد نظر در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد. بعد از رشد باکتری و ایجاد کدورت معادل کدورت سوسپانسیون نیم مک فارلند، به وسیله‌ی سوآب استریل از محیط نوترینت براث برداشت شد و به روش چمنی در محیط مولرهینتون آگار[5] کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب، ایران)، به وسیله‌ی یک پنس استریل و در مجاورت شعله، به فاصله‌ی تقریبی ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر و دیواره‌ی پلیت، روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از طی این مدت، قطر ناحیه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی فوق با کمک کولیس اندازه‌گیری شد. نتایج با استانداردهای ارائه شده در CLSI[6] (۲۰۱۸) مورد مقایسه قرار گرفت (CLSI, 2018). که می‌توان در Table 2 مشاهده نمود.

جهت انجام آزمایشات مولکولی، ابتدا استخراج DNA به کمک روش جوشاندن صورت پذیرفت. کلنی تازه به دست آمده از کشت، با کمک سر سمپلر استریل از سطح محیط جامد لوریا برتانی آگار برداشت شد و در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر تعبیه شده در میکروتیوب‌های یک و نیم میلی‌لیتری حل گردید. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه هیتینگ بلاک (اپندورف، آلمان) به مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، قرار داده شد. سپس میکروتیوب‌ها در فریزر ۲۰– درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سرد گردید. میکروتیوب‌ها به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و در نهایت میزان ۲۰۰ میکرولیتر از روی مایع (سوپرناتانت) برداشت و به میکروتیوب یک و نیم میلی‌لیتری استریل جدید منتقل گردید و برای انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰°C– (فریزر) و نگهداری شد.

1- Merck
2- Triple sugar iron agar
3- Sulfide indole motility
4- Methyl red voges-proskauer test
5- Mueller hinton agar
6- Cclincal laboratory standard institute

Table 1: standards for antimicrobial susceptibility testing for the antibiotics of this study (CLSI 2018)

Antimicrobial agent	Abbreviation	Susceptible (mm)	Intermediate (mm)	Resistant (mm)
Ampicillin	AM	17≤	14-16	≤13
Amoxicillin-clavulanate	AMC	18≤	14-17	≤13
Cephalexin	CL	15≤	–	≤14
Cefixime	CFM	19≤	16-18	≤15
Ceftriaxone	CRO	23≤	20-22	≤19
Cefotaxime	CTX	26≤	23-25	≤22
Cefotaxime-clavulanate	CTC	A ≥ 5-mm increase in zone diameter for cefotaxime-clavulanate vs the zone diameter of cefotaxime = ESBL		
Ceftazidime	CAZ	21≤	18-20	≤17
Ceftazidime-clavulanate	CZA	A ≥ 5-mm increase in zone diameter for ceftazidime-clavulanate vs the zone diameter of ceftazidime = ESBL		

جهت شناسایی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} از روش سیمپلکس PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Table 2 استفاده گردید. حجم واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۰/۲ میکرومولار پرایمر، ۳ میکرولیتر DNA، مسترمیکس آماده (با غلظت نهایی ۱x) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. از DNA استخراج شده‌ی سویه‌ی استاندارد *کلبسیلا* ۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت ژن bla_{SHV} و bla_{CTX-M} و سویه‌ی استاندارد *اشرشیاکلی* ۳۵۲۱۸ به عنوان کنترل مثبت ژن bla_{TEM} استفاده گردید. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

Table 2: The primers used to identify bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{CTX-M} genes (Roschanski et al. 2014)

Target	Primer	Sequence	Size (bp)
bla_{TEM}	*TEM-F*	5′-GCGGAACCCCTATTTG-3′	963
	TEM-R	5′-ACCAATGCTTAATCAGTGAG-3′	
bla_{SHV}	*SHV-F*	5′-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3′	795
	SHV-R	5′-GATTTGCTGATTTCGCTCGG-3′	
bla_{CTX-M}	*CTX-M-F*	5′-CGATGTGCAGTACCAGTAA-3′	585
	CTX-M-R	5′-TTAGTGACCAGAATCAGCGG-3′	

برنامه‌ی دمایی عبارت بود از ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه (که این دما بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به منظور فعال‌سازی آنزیم تگ DNA پلی‌مراز هات استارت ضروری می‌باشد)، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) برای bla_{SHV} و bla_{TEM} و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) برای bla_{CTX-M} در نهایت ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، پس از اتمام سیکل‌ها ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه به عنوان مرحله‌ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد. در نهایت محصولات PCR الکتروفورز گردیدند. آمپلیکون[1]ها (فرآورده‌های حاصل از واکنش PCR)، در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و توسط دستگاه ژل داک ۱۰۰۰ نمایان شد و از ژل آگاروز عکس‌برداری به عمل آمد.

نتایج

در این مطالعه حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۶۷ رأس گوسفند به ظاهر سالم در منطقه‌ی کرمان نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالکسین، سفکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید،

1- Amplicone

سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید تعیین گردید. بر اساس یافته‌های مطالعه بیش از ۹۰ درصد نمونه‌ها به حداقل سه آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (Table 3 and Fig 1). فراوان‌ترین الگوی مقاومت علیه آنتی‌بیوتیک‌ها، CAZ، CTX، CRO، AMC، AM، CFM و CL با فراوانی ۱۵ عدد بود (Table 4).

Table 3: Number and percentage of susceptible, intermediate and resistant isolates to studied antibiotics among 67 sheep

Antimicrobial agent	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)
Ampicillin	8 (12)	19 (28.3)	40 (59.7)
Amoxicillin-clavulanate	6 (9)	13 (19.4)	48 (71.6)
Cephalexin	1 (1.5)	0 (0)	66 (98.5)
Cefixime	27 (40.3)	5 (7.5)	35 (52.2)
Ceftriaxone	20 (29.8)	19 (28.2)	28 (42)
Cefotaxime	0 (0)	1 (1.5)	66 (98.5)
Ceftazidime	2 (3)	0 (0)	65 (97)
ESBL	5 (7.4)		

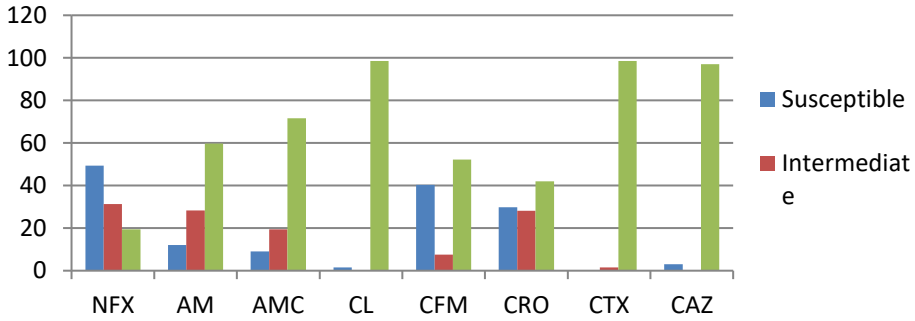

Figure 1: Prevalence of susceptible, intermediate and resistant isolates to studied antibiotics among 67 sheep

Table 4: antibiotic resistance patterns of ovine isolates

Order	Resistance pattern	No.
1	CAZ, CTX, CRO, AMC, AM, CFM, CL, NFX	6
2	CAZ, CTX, CRO, AMC, AM, CFM, CL	15
3	CAZ, CTX, CRO, AMC, AM, CL, NFX	1
4	CAZ, CTX, CRO, AMC, CFM, CL	1
5	CTX, CRO, AMC, AM, CFM, CL	1
6	CAZ, CTX, AMC, AM, CFM, CL	7
7	CAZ, CTX, AMC, AM, CL, NFX	3
8	CAZ, CTX, AMC, CFM, CL	2
9	CAZ, CTX, CRO, AMC, CL	1
10	CAZ, CTX, AMC, AM, CL	3
11	CAZ, CTX, CRO, CL, NFX	1
12	CAZ, CTX, AMC, CL	5
13	CAZ, CTX, CFM, CL	1
14	CAZ, CTX, CRO, CL	1
15	CRO, AMC, AM, CL	1
16	CAZ, CTX, AM, CL	1
17	CAZ, CTX, CL	14
18	Without resistance pattern	3
Total		67

در میان سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در نمونه‌های به دست آمده از گوسفند، فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} به ترتیب برابر پنج نمونه (۷/۴ درصد)، یک نمونه (۱/۵ درصد) و صفر بود (Fig 3 and 4).

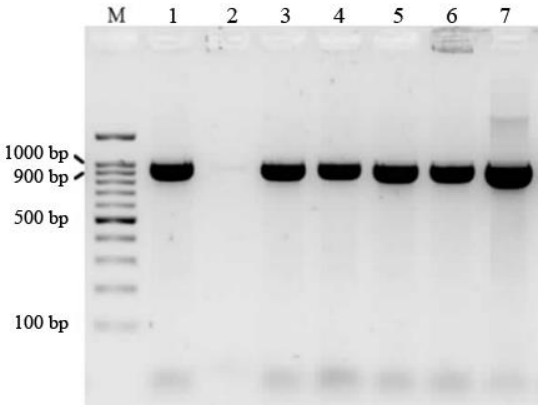

Figure 2: Deection of bla_{TEM} gene; M: Marker (100 bp), 1: Positive control (963 bp), 2: Negative control, 3-7: Positive samples.

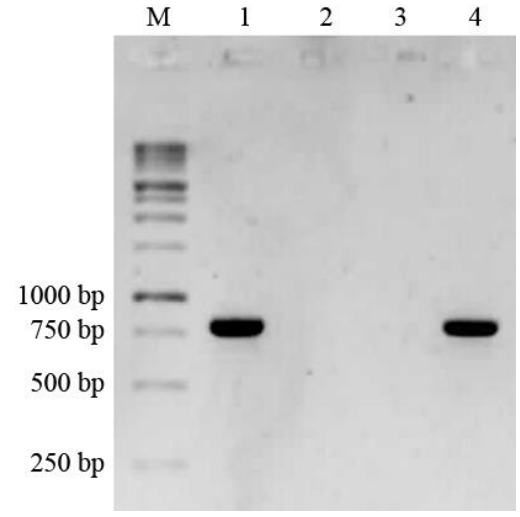

Figure 3: Deection of bla_{SHV} gene; M: Marker (1 Kbp), 1: Positive control (795 bp), 2: Negative control, 3: Negative sample, 4: Positive sample

بحث

در مطالعه‌ی حاضر طبق نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن، بیش‌ترین درصد فراوانی مقاومت مربوط به مقاومت علیه سفالکسین و سفوتاکسیم به میزان ۹۸/۵ درصد و سفتازیدیم به میزان ۹۷ درصد و کم‌ترین درصد فراوانی مقاومت به سفتریاکسون به میزان ۴۲ درصد بود. این در حالی است که بیش‌ترین درصد فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه‌ی Pehlivanoglu و همکاران، مربوط به سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آمپی‌سیلین و سفتریاکسون به میزان ۱۰۰ درصد (Pehlivanoglu et al, 2016) و در مطالعه‌ی Balami و همکاران، مربوط به سفتریاکسون به میزان ۹۳/۳ درصد و آموکسی‌سیلین به میزان ۹۷/۷ درصد در گوسفند بود (Balami et al, 2018).

طبق یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، میزان ۷/۶ درصد نمونه‌های *اشرشیاکلی* تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در گوسفند شناخته شد. این فراوانی در مطالعه‌ی Ramos و همکاران، ۵/۵ درصد (Ramos et al, 2013) و در مطالعه‌ی Geser و همکاران، ۸/۶ درصد (Geser et al, 2012) گزارش شد. در مطالعه‌ی Aliasadi و Dastmalchi میزان فراوانی نمونه‌های تولید کننده ESBLs، ۶۰ درصد گزارش شد (Aliasadi, 2015 & Dastmalchi) که بسیار بالاتر از نتایج یافته‌های ما است که ممکن است این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به دلایلی چون نوع نمونه‌برداری و نوع پراکنش نمونه‌ها در مطالعات مختلف باشد. طبق مطالعات گذشته، استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان خوراک دام و داروهای دامپزشکی می‌تواند عامل احتمالی افزایش فراوان سویه‌های تولید کننده‌ی ESBLs باشد (Adefarakan et al, 2014)، بنابراین شاید دلیل احتمالی تناقض مطالعه‌ی Aliasadi و Dastmalchi با مطالعه‌ی ما، استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در منطقه‌ی تحت بررسی باشد.

در مطالعه‌ی حاضر در پنج نمونه (۷/۴ درصد) از نمونه‌های به دست آمده از مدفوع گوسفند ژن bla_{TEM} و در یک نمونه (۱/۵ درصد) ژن bla_{SHV} وجود داشت. در مطالعه Geser و همکاران در سال ۲۰۱۲، پنج نمونه (۸/۶ درصد) دارای ژن مقاومت bla_{TEM}، چهار نمونه دارای ژن مقاومت bla_{CTX-M} و یک نمونه دارای ژن مقاومت bla_{SHV} گزارش شد (Geser et al, 2012) که با یافته‌های ما از نظر حضور

ژن‌های مقاومت bla_{TEM} و bla_{SHV} کاملاً منطبق است. Adefarakan و همکاران، میزان ۳/۱ درصد حضور ژن bla_{CTX} (Adefarakan et al. 2014)، Aliasadi و Dastmalchi در سال ۲۰۱۵ در ایران ، ۲۷/۲ درصد ژن مقاومت bla_{CTX-M} و ۱۸/۲ درصد ژن مقاومت bla_{TEM} و ۱۴/۵ درصد پروفایل مقاومت bla_{TEM} /bla_{CTX-M} (Aliasadi & Dastmalchi, 2015) و Pehlivanoglu و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ترکیه، ۱۰۰ درصد حضور ژن مقاومت bla_{CTX-M} و ۶۶/۷ درصد حضور ژن مقاومت bla_{TEM} (Pehlivanoglu et al. 2016) را در میان نمونه‌های به دست آمده از گوسفند در مطالعات خود گزارش کردند. مطالعات فوق با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی ندارد و دلیل احتمالی این تناقض عدم گسترش این ژن‌های مقاومت و گسترش ژن‌های مقاومت دیگری است که متناسب با مصرف نوع آنتی‌بیوتیک در منطقه است.

نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی سطح بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به بتالاکتام‌ها می‌باشد و گوسفند به طور بالقوه مخزن بسیار مهمی از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی می‌باشد، به ویژه این میزبان از جمله حیوانات تولیدکننده‌ی غذا برای انسان هستند. با توجه به اهمیت بالای مقاومت آنتی‌بیوتیک، باید سویه‌های مقاوم را همانند باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین میزبانان مختلف از جمله انسان در نظر گرفت. بنابراین همواره باید به دنبال راه‌هایی برای جلوگیری از گسترش این سویه‌های باکتریایی مخصوصاً در مراکز تهیه و توزیع محصولات دامی به خصوص کشتارگاه بود. همچنین پیشنهاد می‌شود که مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی از گروه‌های دیگر و دیگر ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها مانند $ampC$، bla_{OXA} و غیره بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دکترای عمومی، آقای امیر اسدآبادی‌صفات می‌باشد که با حمایت دانشگاه شهید باهنر کرمان است، که در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر انجام شده است. بدین وسیله از همکاری دانشگاه شهید باهنر کرمان و پرسنل آزمایشگاه میکروب‌شناسی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش بر اساس هزینه‌های شخصی انجام پذیرفته است و هیچ گونه کمک مالی از سایر منابع تأمین کننده، دریافت ننموده است.

منابع

Adefarakan, T. A., Oluduro, A. O., David, O. M., Ajayi, A. O., Ariyo, A. B., & Fashina, C. D. (2014). Prevalence of antibiotic resistance and molecular characterization of Escherichia coli from faeces of apparently healthy rams and goats in Ile-Ife, Southwest, Nigeria. *Ife Journal of Science*, *16*(3), 447-460.

Aliasadi, S., & Dastmalchi Saei, H. (2015). Fecal carriage of Escherichia coli harboring extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes by sheep and broilers in Urmia region, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, *9*(2), 93-101.

Balami, E. Y., Abdulrahman, H. I., Gashua, M. M., Galadima, H. B., & Gulani, I. A. (2018). Occurrence of Multi Drug Resistant Commensal Escherichia coli in Apparently Healthy Lambs and Kids from Maiduguri, Northeastern Nigeria. *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*, 1-10.

Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*, 117-123.

Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., & Brenner, H. (2007). Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *26*(2), 83-90.

Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, *8*(1), 1-9.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300.

Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(4), 718-733.

Mølbak, K. (2004). Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans–the public health consequences. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *51*(8-9), 364-369.

WHO. (2014). *Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary* (No. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2). World Health Organization.

Pehlivanoglu, F., Turutoglu, H., Ozturk, D., & Yardimci, H. (2016). Molecular characterization of ESBL-producing Escherichia coli isolated from healthy cattle and sheep. *Acta Veterinaria*, *66*(4), 520-533.

Pitout, J. (2012). Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 9.

Ramos, S., Igrejas, G., Silva, N., Jones-Dias, D., Capelo-Martinez, J. L., Caniça, M., & Poeta, P. (2013). First report of CTX-M producing Escherichia coli, including the new ST2526, isolated from beef cattle and sheep in Portugal. *Food Control*, *31*(1), 208-210.

Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., & Roesler, U. (2014). Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PloS One*, *9*(7), e100956.

Tacconelli, E., Pezzani, M. (2019). Public health burden of antimicrobial resistance in Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(1):4-6.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, *119*(6), 3-10.

CLSI. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute supplement M100*.

Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**

DOI: 10.22055/ivj.2019.190457.2154

Study of the presence of *bla$_{TEM}$*, *bla$_{SHV}$* and *bla$_{CTX-M}$* genes in *Escherichia coli* strains isolated from sheep in Kerman province

Maziar Jajarmi[1], Amir Asadabadi Safat[2*], Ehsanollah Sakhaee[3] and Reza Ghanbarpour[4]

[1] Assisstant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[2] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[3] Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

[4] Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 17.06.2019 Accepted: 03.12.2019

Abstract

The aim of this study was to the determination of prevalence of resistant Escherichia coli isolates to commonly used β-lactam antibiotics and some related resistance genes in sheep. Totally, 67 E. coli isolates from 67 healthy sheep were considered to determine resistance against 9 antibiotics belonging to commonly used beta-lactam antibiotics by disc diffusion method. Also, the presence of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes was investigated by PCR. The results showed all isolates were resistant to at least one of the tested antibiotics. The high prevalence of resistant strains to cephalexin, cefotaxime and ceftazidime was 98.5%, 98.5% and 97%, respectively. Also, 5 samples (7.4%) were positive for ESBLs producing E. coli. The results of this study indicated an increasing rate of resistance to commonly used β-lactam antibiotics among sheep. Therefore, antibiotic prescription methods should be limited and prevention strategies should be considered against infections to avoid dissemination of antibiotic resistance in food-producing animals.

Key word: β-lactam, antibiotic resistance, *Escherichia coli,* ESBLs

[*] **Corresponding Author**: Amir Asadabadi Safat, DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, E-mail: amir_asadabadi@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).