مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره دوم، پیاپی سی و چهارم، پاییز ۱۳۹۹ (۲۱-۱۱)

مقاله پژوهشی:

شناسایی ژن‌های فیمبریایی و ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها و بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) در *اشریشیا کلی‌های* جدا شده از مدفوع گاومیش در استان آذربایجان‌غربی

خالیده آذری[۱]، عبدالغفار اونق[۲*]، کریم مردانی[۳]
۱. دکترای تخصصی باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان‌غربی
۲. دانشیار میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان‌غربی
۳. استاد اپیدمیولوژی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان‌غربی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۱۳)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن‌های فیمبریایی، ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف انجام شد. از تعداد ۳۸٤ گاومیش از مناطق مختلف استان آذربایجان‌غربی و در فصول مختلف به‌صورت تصادفی نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری گردید. شناسایی باکتری *اشریشیا کلی* در نمونه های مدفوع با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیایی انجام گرفت. روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی، حضور ژن‌های فیمبریایی (*fim*A، *crl*، *csg*A)، ژن *tsh*، ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها (*qnr*A، *qnr*B، *qnr*S) و ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (*bla*SHV، *bla*TEM، *bla*CTX-M-9) مشخص گردید. از ۳۸٤ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده از تعداد ۱۱۵ (۲۹/۹ ٪) نمونه باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی و جداسازی گردید. آلودگی به *اشریشیا کلی* در شمال استان به‌طور معنی‌داری کمتر از جنوب و مرکز استان بود و اختلاف معنی‌داری از نظر الودگی گاومیش‌ها به *اشریشیا کلی* در فصول مختلف وجود نداشت (P<۰/۰۵). فراوانی ژن‌های فیمبریایی *fim*A، *crl* و *csgA* به‌ترتیب ۷۹/۱٪، ۷۲/۱٪، ۷٤/۷٪ بود و ژن *tsh* دارای کمترین فراوانی (۱۸/۲٪) در جدایه‌های *اشریشیا کلی* بودند. در بین ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها و بتالاکتامازهای وسیع الطیف ژن *qnr*S دارای کمترین فراوانی (٦/۰٪) و ژن bla_{TEM} دارای بیشترین فراوانی (۱۳/۹٪) بود. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه حضور باکتری *اشریشیا کلی* را در نمونه‌های مدفوع کمتر از یک سوم گاومیش‌های نمونه‌برداری شده نشان داد. ژن‌های فیمبریایی تقریباً دارای فراوانی مشابهی بودند و ژن‌های مقامت آنتی‌بیوتیکی در کمتر از ۱٤٪ جدایه‌های *اشریشیا کلی* در گاومیش حضور داشتند. ارزیابی حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های باکتریایی با منشأ حیوانی می‌تواند از نظر اپیدمیولوژیک و بهداشت عمومی اهمیت زیادی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی*، ژن‌های فیمبریایی، ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها، ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، گاومیش.

Identification of Fimbrial genes and floroquinolons and extended spectrum *beta* lactamase resistant gene in *Escherichia coli* isolated from buffalo in west Azerbaijan

Khalideh Azari[1], Abdolghafar Ownagh[2*], Karim Mardani[3]
1. Ph. D., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Professor, Department of Food control , Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: May 12, 2019- Accepted: Oct. 05, 2019)

Abstract

The present study aimed to identify fimbria, fluroquinolone and extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) resistant genes in Escherichia coli isolated from buffalo feces. In this study, a number of 384 buffalo feces from different regions of west Azerbaijan and in different seasons were randomly collected. Fecal samples were cultured and *E. coli* were investigated using biochemical method. Polymerase chain reaction was employed to identify fimbria genes (*fim*A, *crl* and *csg*A), tsh gene, floroqinulone (*qnr*A, *qnr*B, *qnr*S) and extended-spectrum beta-lactamase (bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M}) resistance genes. A number of 115 (29.9%) fecal samples were positive for *E. coli*. The frequency of the positive fecal for *E. coli* from northern region were significantly lower than central and southern regions (P<0.05). The frequency of positive fecal samples for *E. coli* did not differ between seasons. The frequency of fimbria genes *fim*A, *crl* and *csg*A were 79.1%, 72.1% and 74.7% respectively. *tsh* gene had the lowest frequency in *E. coil* isolates. Among fluroquinolone and extended-spectrum beta-lactamase resistance genes, *qnr*S gene had the lowest (6.0%) and bla_{TEM} had the highest (13.9%) frequencies. The results revealed that *E. coli* was isolated from less than one third of fecal samples. Fimbria genes had almost similar frequencies among *E. coli* isolates and antibiotic resistance genes were exist in less than 14% of *E. coli* isolates from buffalo feces. The investigation of antibiotic resistance genes in *E. coli* originated from animals is of great epidemiological and public health importance.

Keywords: Buffalo, *E. coli*, Extended-spectrum beta-lactamase, fimbria genes, fluroquinolone resistance genes.

* نویسنده مسئول: عبدالغفار اونق
Email: a.ownagh@urmia.ac.ir; ownagh@yahoo.com

مقدمه

اشریشیا کلی[1] یک باکتری با جایگاه ویژه در دنیای میکروبیولوژی است چون می‌تواند عفونت‌های شدید در انسان و حیوانات ایجاد کند و نیز بخشی مهم از میکروفلور بدن در میزبان‌های مختلف باشد. نگرانی اصلی انتقال سویه‌های دارای حدت و یا مقاوم این باکتری در بین حیوانات و انسان از راه‌های مختلف مانند تماس مستقیم، تماس با ترشحات حیوانی و یا زنجیره غذایی است (Poirel *et al*., 2018). این باکتری که به‌طور طبیعی در روده‌های پایینی اکثر پستانداران خونگرم زندگی می‌کند بیماری کلی‌باسیلوزیس[2] را ایجاد می‌نماید. جدایه‌های بیماری-زای *اشریشیا کلی* را می‌توان به پاتوتایپ‌ها[3] و یا پاتوارهای[4] مختلف، که هر پاتوتایپ باعث ایجاد یک بیماری مختلف می‌شود تقسیم نمود (Kaper *et al*., 2004). پاتوتایپ‌های بیماری‌زای روده‌ای *اشریشیا کلی* باعث اختلال روده‌ای از اسهال خفیف تا التهاب شدید کولون می‌گردند، درحالی‌که پاتووارهای بیماری‌زای خارج–روده‌ای اغلب ساکنان بدون علائم مجرای روده‌ای هستند که بعد از مهاجرت به سایر قسمت‌های بدن مانند مجرای ادراری یا خون باعث بیماری‌های خارج روده‌ای می‌شوند (Köhler & Dobrindt, 2011). بیماری‌های دامی به‌علت *اشریشیاکلی* همچنین می‌توانند به‌وسیله *اشریشیاکلی‌های* با منشأ مخازن محیطی یا سایر افراد آلوده ایجاد شوند. *اشریشیاکلی*‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا به‌وسیله به‌دست آوردن و یا از دست‌دادن ویژگی‌های مرتبط با حدت و بیماری‌زایی متفاوت می‌باشند. تعداد ژن‌های موجود در ژنوم *اشریشیا کلی* از ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ ژن که از این تعداد تقریباً ۳۰۰۰ ژن در جدایه‌های مختلف یکسان بوده، درحالی‌که سایر ژن‌ها مسئول کلونیزاسیون و عوامل تعیین‌کننده حدت باکتری هستند (Johnson & Russo, 2005).

در حیوانات، *اشریشیا کلی* همراه با سایر عوامل بیماری‌زا مانند روتاویروس، کروناویروس و *کریپتوسپوریدیوم پاروم* و یا ترکیبی از این باکتری‌ها از عوامل اصلی اسهال می‌باشند (Izzo *et al*., 2011). نشخوارکنندگان مخزن مهمی برای باکتری *اشریشیا کلی* بیماری‌زا می‌باشند که از طریق زنجیره غذایی به جوامع انسانی دسترسی پیدا می‌کنند (Pradel *et al*., 2001). تشخیص *اشریشیا کلی* عامل اسهال در انسان، غذا و محیط نشان داده است که سروتیپ‌های غیر O157:H7 *اشریشیا کلی* بیشتر در عفونت‌های انسانی نقش دارند و چون در کشورهای مختلف در انسان ایجاد بیماری می‌کنند بایستی به آنها اهمیت بالینی بیشتری در مقایسه با سویه‌های O157 داده شود (Majalija *et al*., 2008).

سویه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی*[5] (ETEC) با استفاده از عوامل اتصال که توسط ژن‌های فیمبریایی بیان می‌گردند به اپی‌تلیوم روده‌ای چسبیده و کلونیزه می‌شوند (Kolenda *et al*., 2015). فیمبریاهای نوع ۱ به‌وسیله خوشه ژنی *fim* شامل نه ژن مرتبط که برای سنتز فیمبریاها لازمند کد می‌شوند (Pusz *et al*., 2014). پروتئین‌های curli، پروتئین‌های فیبروزی سطحی می‌باشند که بر روی سطح بعضی از انواع بالینی گونه‌های *اشریشیاکلی* و سالمونلا بیان می‌گردند. فیبرهای curli در چسبیدن باکتری به سطوح، تجمع سلولی، حمله و چسبیدن به سلول میزبان و تشکیل بیوفیلم نقش دارند (Barnhart & Chapman, 2006).

امروزه افزایش مقاومت ضدمیکروبی به‌دلیل استفاده زیاد و نادرست از داروهای ضدمیکروبی بویژه

1. *Escherichia coli*
2. *Colibacillosis*
3. Pathptype
4. Pathovar
5. *Enterotoxigenic E. coli*

در حیوانات بعنوان عوامل درمان و محرک رشد یک نگرانی جدی در بهداشت عمومی می‌باشد. عامل اصلی در ظهور سویه‌های مقاوم به عوامل ضدمیکروب، توانایی باکتری‌ها در دریافت و انتشار ژن‌های خارجی از طریق عناصر ژنتیکی قابل‌مبادله بین باکتری‌ها می‌باشد (Poirel *et al*., 2018; Wolny-Koladka & Lenart-Boron, 2018; Yasir *et al*., 2018; Zhao *et al*., 2018). مقاومت چند دارویی در *اشریشیاکلی* که به‌طور افزاینده‌ای نه تنها در انسان بلکه در دامپزشکی نیز دیده می‌شود به یک مشکل نگران‌کننده تبدیل شده است. *اشریشیا کلی* به‌طور طبیعی تقریباً به تمام عوامل ضدمیکروبی مناسب از نظر بالینی حساس است، اما این گونه باکتریایی دارای ظرفیت بزرگی برای دریافت ژن‌های مقاومت، بیشتر از طریق انتقال افقی ژن می‌باشد. مشکل‌سازترین مکانیسم‌ها در *اشریشیا کلی*، کسب ژن‌های کدکننده مقاومت در برابر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف[1] و ژن‌های مقاومت در برابر کینولون‌های با واسطه پلاسمیدی می‌باشند (Poirel *et al*., 2018).

اگرچه مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها عموماً در اثر جهش در ژن‌های کروموزومی ایجاد می‌شود، اما مقاومت با واسطه ژن‌های پلاسمیدی نیز گزارش شده است و حداقل سه دسته از این نوع ژن‌ها شناسایی شده اند که عبارتند از ژن‌های *qnr*، ژن *aac(6)-Ib-cr* و ژن *qep*A (Robicsek *et al*., 2006a). پلاسمیدهای حاوی ژن‌های *qnr* مقاومت نسبت به فلوئوروکینولون‌ها را منتقل می‌کنند. این ژن‌ها پروتئین‌هایی با توالی پنتاپپتیدی تولید می‌کنند که از اثر فلوروکینولون‌ها روی آنزیم‌های DNA *gyrase* و *topoisomerase* IV جلوگیری می‌کند. ژن‌های عامل مقاومت نسبت به کوئینولون‌ها با واسطه پلاسمید (PMQR)، می‌توانند به‌صورت افقی در بین باکتری‌های انتروباکتریاسه گسترش یابند و روند ایجاد باکتری‌های مقاوم جهش‌یافته در برابر سیپروفلوکساسین را تسهیل کنند (Robicsek *et al*., 2006a).

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه فراوانی ژن‌های حدت و مقاومت در برابر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و کینولون‌ها در *اشریشیا کلی*‌های جداشده از انسان و حیوانات مانند گاو و طیور انجام شده است ولی در رابطه با *اشریشیا کلی*‌های جداشده از گاومیش کارهای زیادی انجام نشده است. گاومیش از دام‌های مورد توجه در تولید شیر باکیفیت و گوشت می‌باشد. استان آذربایجان‌غربی یکی از قطب‌های اصلی پرورش گاومیش در ایران می‌باشد. در این مطالعه *اشریشیا کلی*‌های جداشده از نمونه‌های مدفوع گاومیش‌ها از نظر فراوانی ژن‌های حدت و مقاومت به بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و فلوروکینولون‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

تعداد ۳۸۴ نمونه مدفوع از گاومیش‌های به ظاهر سالم دامداری‌های سنتی در نواحی شمال (خوی)، مرکز (ارومیه) و جنوب (مهاباد) استان آذربایجان‌غربی جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی منتقل‌گردیدند. نمونه‌گیری در چهار فصل سال انجام گرفت.

کشت و جداسازی *اشریشیا کلی*

به‌منظور کشت و جداسازی *اشریشیا کلی*، مقدار ۳-۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به یک گرم نمونه مدفوع گاومیش اضافه گردید تا سوسپانسیونی جهت استفاده در کشت میکروبی تهیه‌گردد. سوسپانسیون ورتکس شده و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی آن در محیط کشت مکانکی آگار کشت خطی داده شد و در دمای ۳۷°C درجه و در شرایط هوازی به‌مدت

1. Extended-spectrum beta-lactamase

۲۴ ساعت انکوبه گردید. جهت شناسایی *اشریشیاکلی* از کلنی‌های تخمیرکننده لاکتوز رشد یافته در سطح محیط کشت مک‌کانکی آگار از تست‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های اکسیداز، اندول، متیل‌رد، سیترات، اوره و حرکت و کشت در محیط‌های TSI و MR-VP و رنگ‌آمیزی گرم، استفاده گردید (Jorgensen *et al*., 2015) جدایه‌ها تا زمان انجام تست‌های مولکولی در محیط BHI حاوی گلیسرول و در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شدند

استخراج DNA ژنومی و پلاسمیدی

جهت استخراج DNA ژنومی و پلاسمیدی از روش توصیف شده توسط Ooka *et al*. (2009) استفاده شد. بدین منظور یک تک کلونی از هر جدایه (به قطر دو میلی متر) در ۵-۳ میلی‌لیتر از محیط براث لوریا برتانی تلقیح شد و محیط‌های تلقیح شده در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریا برتانی تلقیح‌شده به یک میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل‌شده و به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از دور ریختن مایع رویی، به هر میکروتیوب مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و پلیت باکتریایی ته میکروتیوب در آب مقطر حل و در دمای ۱۰۰°C به‌مدت پنج دقیقه جوشانده شد. سپس نمونه‌ها برای بار دوم به مدت پنج دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی DNA باکتریایی بود به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل گردید و تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد. این روش جداسازی DNA ژنومی و پلاسمیدی روشی اصلاح‌شده از آنچه که در کتاب Molecular cloning a laboratory manual آمده است می‌باشد (Sambrook & Russell, 2001).

جستجوی ژن‌های *crl*، *tsh*، *csg* و *fimA* در جدایه‌های *اشریشیا کلی*

در این مطالعه برای شناسایی و تکثیر ژن‌های فیمبریایی ***و*** *tsh* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* از روش PCR چندگانه استفاده گردید. بدین منظور ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ در واکنش PCR چندگانه تکثیر گردید.

واکنش PCR در حجم ۲۵µL حاوی ۵۰ میکرومول از هر کدام از نوکلئوتیدهای dATP، dTTP، dGTP و dCTP، نیم میکرومول از هر پرایمر، ۲/۵µL بافر PCR با غلظت ده برابر، دو میلی‌مول کلراید منیزیم، ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلی‌مراز Taq و ۲/۵µL از هر کدام از DNAهای استخراج‌شده به‌عنوان DNA الگو صورت‌گرفت. در یکی از میکروتیوب‌ها به‌عنوان کنترل منفی به‌جای DNA استخراج‌شده، ۲/۵µL آب مقطر استریل افزوده شد.

جدول ۱. اسامی و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *crl*، *tsh*، *csg* و *fim*

پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
*fim*A	GTTGATCAAACCGTTCAG AATAACGCGCCTGGAACG	۳۳۱	(Marc & Dho-Moulin, 1996)
crl	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	۲۵۰	(Maurer *et al*., 1998)
*csg*A	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	۲۰۰	
tsh	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	۴۲۰	

واکنش PCR با برنامه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، و تعداد ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر در دمای ۵۵°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه نهایی گسترش DNA در دمای ۷۲°C به‌مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر QB-96 (Quantx Biotech, UK) انجام گرفت.

جستجوی ژن‌های مقاومت به *فلورکینولون‌ها* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* باروش PCR چندگانه

برای شناسایی و تکثیر ژن‌های *qnr*A، *qnr*B و *qnr*S از سه جفت پرایمر مطابق جدول ۲ استفاده گردید. اجزای واکنش PCR در حجم ۲۵µL همانند واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های فیمبریایی تهیه گردید. برنامه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، و تعداد ۳۲ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر در دمای ۵۳°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه نهایی گسترش DNA در دمای ۷۲°C به‌مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر QB-96 انجام گرفت.

جستجوی ژن‌های مقاومت به *بتالاکتامازهای* وسیع‌الطیف در جدایه‌های *اشریشیا کلی*

برای تکثیر ژن‌های bla_{SHV}، bla_{TEM}، $bla_{CTX-M-9}$ از جفت پرایمرها به شرح جدول ۳ استفاده گردید.

واکنش PCR برای تکثیر هر کدام از ژن‌ها به‌صورت جداگانه انجام گرفت. اجزاء واکنش PCR در حجم ۲۵µL همانند واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های قبلی تهیه گردید. برنامه حرارتی شامل یک چرخه‌ی واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، و تعداد ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر برای ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و $bla_{CTX-M-9}$ *به‌ترتیب در دمای* ۶۰°C، ۵۰°C و ۶۲°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه نهایی گسترش DNA در دمای ۷۲°C به‌مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر QB-96 انجام گرفت.

جدول ۲. اسامی، توالی و منبع پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *qnr*A، *qnr*B و *qnr*S

نام پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه ژن (bp)	منبع
qnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	۵۱۶	(Robicsek *et al*., 2006b)
qnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
qnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	۴۶۹	
qnrB-R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
qnrS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	۴۱۷	
qnrS-R	TAAATTGGCACCCTGTAGGC		

جدول۳. اسامی، توالی و اندازه قطعه تکثیری پرایمرهای مورد استفاده این برای تکثیر ژن‌های bla_{SHV}، bla_{TEM} و bla_{CTX-M}

نام پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه (bp)	منبع
bla_{TEM}-*F*	ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC	1150	(Belaaouaj *et al*., 1994)
bla_{TEM}-*R*	ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC		
bla_{SHV}-*F*	CAC TCA AGG ATG TAT TGT G	885	(Pitout *et al*., 1998)
bla_{SHV}-*R*	TTA GCG TTG CCA GTG CTC G		
$bla_{CTX-M-9}$-*F*	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG	857	(Coque *et al*., 2002)
$bla_{CTX-M-9}$-*R*	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC		

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه با روش آماری مربع کای با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (IBM, USA) آنالیز شدند.

نتایج

نمونه‌های مدفوع گاومیش آلوده به اشریشیا کلی

با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی از تعداد ۳۸۴ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده تعداد ۱۱۵ (۲۹/۹٪) نمونه باکتری *اشریشیا کلی* شناسایی و جداسازی گردید. فراوانی و درصد موارد جداشده از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در مناطق مختلف در جدول ۴ آمده است. فراوانی آلودگی گاومیش‌ها در جنوب و مرکز استان اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی فراوانی آلودگی به *اشریشیا کلی* در شمال استان به‌طور معنی‌داری کمتر از جنوب و مرکز استان بود (P<۰/۰۵). از نظر از نظر آلودگی گاومیش‌ها به *اشریشیاکلی*، اختلاف معنی‌داری بین فصل‌های مختلف وجود نداشت (جدول ۵).

فراوانی ژن‌های فیمبریایی و *tsh* در جدایه‌های *اشریشیا کلی*

با استفاده از روش PCR چندگانه همه جدایه‌های *اشریشیا کلی* برای جستجوی ژن‌های فیمبریایی شامل ژن‌های *fim*A، *crl*، *csg*A و ژن *tsh* مورد آزمایش قرار گرفتند. در اکثر جدایه‌ها (۷۹/۱–۷۴/۷ ٪) قطعات مورد نظر از سه ژن *fim*A، *crl* و *csg*A تکثیر گردید اما قطعه مورد نظر از ژن *tsh* تنها در ۱۸/۲٪ جدایه‌های *اشریشیا کلی* تکثیر گردید (شکل ۱ و جدول ۵). فراوانی ژن‌های فیمبریایی و *tsh* در فصول مختلف اختلاف معنی‌داری نداشتند.

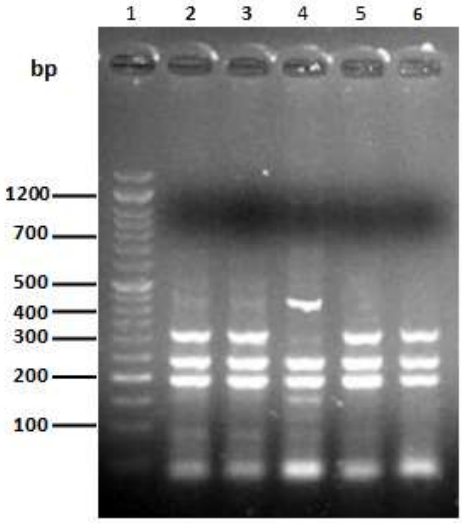
جدول ٤. تعداد نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری‌شده و فراوانی و درصد نمونه‌های مدفوع آلوده به *اشریشیا کلی* در مناطق مختلف آذربایجان‌غربی

	مناطق استان			تعداد کل
	جنوب (مهاباد)	مرکز (ارومیه)	شمال (خوی)	
تعداد نمونه مدفوع اخذشده	۱۳۳	۱۳۰	۱۲۱	۳۸۴
تعداد و درصد نمونه‌های مدفوع آلوده به *اشریشیا کلی*	۵۱ (۳۸/۳)	۴۶ (۳۵/۳)	۱۸ (۱۴/۸)	۱۱۵ (۲۹/۹)

جدول ۵. تعداد نمونه‌های مدفوع گاومیش جمع‌آوری‌شده در فصول مختلف، تعداد و درصد جدایه‌های آلوده به *اشریشیا کلی* و فراوانی ژن‌های حدت، ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها و بتالاکتامازها در جدایه‌ها

فصل		بهار	تابستان	پاییز	زمستان	تعداد کل
تعداد نمونه مدفوع جمع‌آوری شده		۹۸	۸۹	۱۰۱	۹۶	۳۸۴
تعداد نمونه‌های مدفوع آلوده به *اشریشیا کلی*		۲۶(۲۶/۵)*	۲۸(۳۱/۴)	۲۹(۲۸/۷)	۳۲(۳۳/۳)	۱۱۵(۲۹/۹)
تعداد و درصد جدایه‌های دارای ژن‌های حدت	*fim*A	۲۲ (۸۴/۶)	۲۰ (۷۱/۴)	۲۵ (۸۶/۲)	۲۴(۷۵/۰)	۹۱ (۷۹/۱)
	crl	۱۹ (۷۳/۰)	۱۸ (۶۴/۲)	۲۰ (۶۸/۹)	۶ (۷۴/۲)	۸۳ (۷۲/۱)
	csg	۱۷(۶۵/۳)	۲۳ (۸۲/۱)	۲۲ (۷۵/۸)	۲۴(۷۵/۰)	۸۶(۷۴/۷)
	tsh	۴ (۱۵/۳)	۵ (۱۷/۸)	۷ (۲۴/۱)	۵ (۱۵/۶)	۱ (۱۸/۲)
تعداد و درصد جدایه‌های دارای ژن‌های مقاومت به فلورکینولون	*qnr*A	۲ (۷/۷)	۰ (۰/۰)	۳ (۱۰/۳)	۱۰(۳۱/۲)	۵ (۱۳/۰)
	*qnr*B	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۳ (۱۰/۳)	۷ (۲۱/۸)	۱۰ (۸/۶)
	*qnr*S	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۳ (۱۰/۳)	۴ (۱۲/۵)	۷ (۶/۰)
تعداد و درصد جدایه‌های دارای ژن‌های مقاومت به بتالاکتاماز	*bla*TEM	۲ (۷/۷)	۲ (۷/۱)	۳ (۱۰/۳)	۹ (۲۸/۱)	۶ (۱۳/۹)
	*bla*SHV	۱ (۳/۸)	۳ (۱۰/۷)	۱ (۳/۴)	۸ (۲۵/۰)	۳ (۱۱/۳)
	*bla*CTX-M-9	۱ (۳/۸)	۲ (۷/۱)	۲ (۶/۸)	۳ (۹/۳)	۸ (۶/۹)

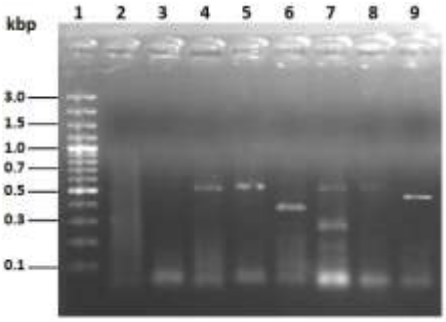
* عدد داخل پرانتز درصد را نشان می‌دهد.



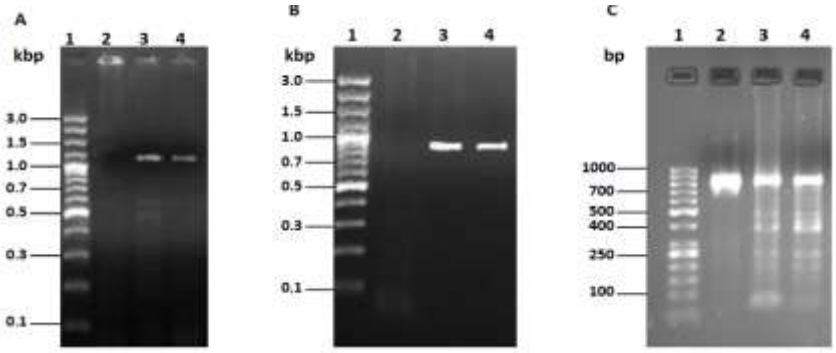
شکل ۱. تصویر محصول PCR ژن‌های فیمبریایی و ژن *tsh* با استفاده از ژل ۱/۵ آگاروز. چاهک ۱: وزن مولکولی ۵۰ bp (سیناکلون، ایران) چاهک‌های ۶-۲ محصولات PCR تکثیر شده از جدایه های مختلف *اشریشیا کلی*

فراوانی ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها و بتالاکتامازها در جدایه‌های اشریشیا کلی

ژن‌های مقاومت به فلورکینولون‌ها شامل ژن‌های *qnr*A، *qnr*B و *qnr*S به‌ترتیب در ۱۳/۰، ۸/۶ و ۶/۰ درصد از جدایه های *اشریشیا کلی* شناسایی شدند (شکل ۲ و جدول ۴). فراوانی هر سه ژن در *اشریشیا کلی*‌های جدا شده در فصول پاییز و زمستان بیشتر دو فصل دیگر بود. فراوانی ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازها در جدایه‌های *اشریشیا کلی* شامل ژن‌های bla_{SHV}، bla_{TEM}، $bla_{CTX-M-9}$ به‌ترتیب ۱۳/۹، ۱۱/۳ و ۶/۹ درصد تعیین گردید (شکل ۳ و جدول ۵). فراوانی ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازها نیز مانند ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها در فصل زمستان بیشتر از سایر فصول بود.



شکل ۲. تصویر محصول PCR ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها (*qnr*A، *qnr*B، و *qnr*S) با استفاده از ژل ۱/۵ آگاروز. چاهک ۱: وزن مولکولی ۱۰۰ bp (سیناکلون، ایران) چاهک‌های ۳-۲ جدایه‌های *اشریشیا کلی* فاقد ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها، چاهک‌های ۹-۴: جدایه‌های *اشریشیا کلی* دارای یک یا دو ژن مقاومت به فلوروکینولون‌ها



شکل ۳. تصویر محصولات PCR ژن‌های مقاومت به بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف A: چاهک ۱، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (سینا کلون)، چاهک ۲، جدایه *اشریشیا کلی* فاقد ژن bla_{TEM}، چاهک‌های ۳ و ۴، قطعه ۱۱۵۰ جفت بازی تکثیر شده ژن bla_{TEM}، B: چاهک ۱، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (سینا کلون)، چاهک ۲، جدایه *اشریشیا کلی* فاقد ژن bla_{SHV}، چاهک‌های ۳ و ۴، قطعه ۸۸۵ جفت بازی ژن bla_{SHV} C: چاهک ۱، مارکر مولکولی ۵۰ جفت بازی (سینا کلون)، چاهک‌های ۴-۲، قطعه ۸۵۷ جفت بازی ژن bla_{CTX-M}

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر فراوانی حضور باکتری *اشریشیا کلی* در نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده از گاومیش در مناطق مختلف آذربایجان‌غربی ارزیابی گردید و حضور ژن‌های حدت و مقاومت به فلوروکینولون‌ها و بتالاکتامازها در جدایه‌های به‌دست‌آمده تعیین گردید. نتایج به‌دست‌آمده آلودگی نزدیک به یک‌سوم (۲۹/۹٪) نمونه‌های مدفوع به *اشریشیاکلی* را نشان داد. بیش از ۷۰ درصد جدایه‌های *اشریشیا کلی* دارای سه ژن فیمبریایی *fimA*، *crl* و *csg* بودند و کمتر از ۱۵ درصد جدایه‌ها ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها و بتالاکتامازها را داشتند.

در مطالعه Srivani *et al.* (2017) شیوع آلودگی مدفوع گوساله‌های گاومیش مبتلا به اسهال به *اشریشیا کلی* در ۸۵/۰۴ گوساله‌ها گاومیش در سنین مختلف گزارش گردید که نشان می‌دهد یکی از عوامل اصلی در ابتلای گوساله گاومیش به اسهال باکتری *اشریشیا کلی* می‌باشد. همچنین در گزارشی دیگر از تعداد ۵۸ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از گوساله‌های گاومیش در مصر تعداد ۱۴ نمونه (۲۴/۱٪) به باکتری *اشریشیا کلی* آلوده بودند (Hakim *et al*., 2017). در نیجریه از تعداد ۳۵۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از گاو و خوک از تعداد ۱۱۴ نمونه (۳۲/۵٪) باکتری *اشریشیا کلی* جداسازی شد (Olowe *et al*., 2015). در آزمایش نمونه‌های گوشت مرغ، آلودگی به باکتری *اشریشیا کلی* در ۱۱/۶۶٪ نمونه‌های مورد آزمایش با روش‌های کشت و بیوشیمیایی گزارش گردید (Younis *et al*., 2017).

در مطالعه فراوانی ژن *fim*A در جدایه‌های *اشریشیا کلی* روده ای، این ژن در ۹۴/۵۹٪ جدایه‌های با منشأ انسانی و ۹۳/۸۷٪ جدایه‌های با منشأ حیوانی شناسایی گردید (Rawool *et al*., 2015). در مطالعه حاضر فراوانی این ژن در جدایه‌های *اشریشیا کلی* ۷۹/۱٪ بود. در جدایه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* از طیور فراوانی ژن‌های *fim*A، *csg*A، *crl* و *tsh* به‌ترتیب ۳۴/۷٪، ۷۷/۶٪، ۳۰/۶٪ و ۲۶/۵٪ گزارش گردید که تا حدود زیادی با فراوانی‌های گزارش‌شده در مطالعه حاضر برای این ژن‌ها در جدایه‌های گاومیش اختلاف داشتند (Amabile de Campos *et al*., 2005). دلیل اختلاف در فراونی ژن‌های مورد بررسی در طیور و گامیش را می‌توان به ارزیابی به نوع سویه‌های جداشده در طیور که بیماری‌زا می‌باشند و نیز سیستم و مدیریت پرورشی متفاوت در گاومیش و طیور مرتبط دانست.

در سال ۲۰۰۸ از بین ۳۰ جدایه مختلف باکتری‌های انتروباکتریاسه جداشده از کبد طیور، که ۲۰ نمونه از آن‌ها *اشریشیا کلی* بودند، فراوانی ژن‌های *qnr*A، *qnr*B و *qnr*S به‌ترتیب ۶/۶٪، ۲۳/۳٪ و ۶/۶٪ گزارش شد (Wu *et al*., 2009). همچنین در بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به فلورورکینولون‌ها در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در مراکش فراوانی ژن‌های *qnr*A، *qnr*B و *qnr*S به‌ترتیب ۶/۲٪، ۷/۱٪ و ۶/۲٪ گزارش گردید (Bouchakour *et al*., 2010). در مطالعه دیگری که توسط Karah و همکارانش در نروژ و سوئد انجام دادند ژن‌های aac(6´)-Ib-cr, *qnr* در میان جدایه‌های *اشریشیا کلی* فراوانی بالایی داشتند (Karah *et al*., 2010).

در مطالعه Olowe *et al.* (2015) در نیجریه از تعداد ۱۱۴ جدایه *اشریشیا کلی* به‌دست‌آمده از مدفوع گاو و خوک، ۷۱٪ جدایه‌ها به بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مقاومت داشتند و فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{CTX-M} در جدایه‌های آزمایش‌شده به‌ترتیب ۴۲/۱٪ و ۴۴/۷٪ گزارش گردید. ژن bla_{SHV} در هیچکدام از جدایه‌ها جداسازی نگردید (Olowe *et al*., 2015). مقامت به بتالاکتامازها در جدایه های اشریشیا کلی به‌دست‌آمده در مطالعه Olowe *et al.* (2015)، بسیار بالاتر از جدایه‌های *اشریشیا کلی* به‌دست‌آمده نمونه‌های مدفوع گاومیش در آذربایجان‌غربی بود. علت بالا بودن مقاومت به سه ژن مذکور تا حدودی سیستم مدیریت متفاوت در دامداری‌های ایران و نیجریه، بهداشت دامپروری، جغرافیا، گونه حیوان و غیره باشد. مطالعه انجام‌شده

توسط Zheng *et al*. (2012) نشان داد که *اشریشیاکلی* جداشده از دام‌های سالم مورد مصرف غذای انسان می‌توانند مخازن مهم ژن‌های bla_{CTX} باشند (Zheng *et al*., 2012). Younis *et al*. (2017)، فراوانی ژن bla_{TEM} را در سروتیپ‌های مختلف باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از گوشت مرغ ۳۷/۵٪ گزارش نمودند.

در مطالعه‌ای که توسط Moghadam *et al*. (2011) بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از نمونه ادرار افراد بیمار در مشهد انجام گرفت ژن bla_{CTX} در مقایسه با سایر ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} از انتشار بیشتری برخوردار بود (Nakhaei Moghaddam *et al*., 2012). در مطالعه حاضر فراوانی ژن $bla_{CTX-M-9}$ از فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و blaSHV کمتر بود که دلیل آن وجود انواع مختلف ژن bla_{CTX} در جدایه‌های *اشریشیا کلی* است که در مطالعه حاضر فقط فراوانی ژن $bla_{CTX-M-9}$ تعیین گردید. همچنین ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX} در ۳۰/۴٪ از جدایه‌های *اشریشیاکلی* در گاوهای شیری مبتلا به اندومتریت در چین شناسایی گردید (Zhao *et al*., 2014).

گاومیش می‌تواند منبع باکتری *اشریشیاکلی* بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌دلیل بهداشت ضعیف دامداری بویژه در دامداری‌های سنتی برای انسان باشد. بنابراین رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌ها برای ارتقای سلامت اهمیت زیادی دارد. نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر حضور باکتری *اشریشیا کلی* را در نمونه‌های مدفوع گاومیش‌های نشان داد. ژن‌های فیمبریایی تقریباً دارای فراوانی مشابهی بودند و ژن‌های مقامت آنتی‌بیوتیکی در کمتر از ۱۴٪ جدایه‌های *اشریشیا کلی* در گاومیش حضور داشتند. ارزیابی حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های باکتریایی با منشأ حیوانی می‌تواند از نظر اپیدمیولوژیک و بهداشت عمومی اهمیت زیادی داشته‌باشد.

سپاسگزاری

از کمک‌های آقای علی کاظم‌نیا در روش‌های آزمایشگاهی و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه جهت حمایت مالی از پایان‌نامه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Amabile de Campos, T.; Stehling, E.G.; Ferreira, A.; Pestana de Castro, A.F.; Brocchi, M.; Dias da Silveira, W. (2005). Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian Escherichia coli strains. Veterinary Microbiology; 106(3-4):275-85.

Barnhart, M.M.; Chapman, M.R. (2006). Curli biogenesis and function. Annual Review of Microbiology; 60: 131-47.

Belaaouaj, A.; Lapoumeroulie, C.; Canica, M.M.; Vedel, G.; Nevot, P.; Krishnamoorthy, R.; Paul, G. (1994). Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiology Letters; 120(1-2):75-80.

Bouchakour, M.; Zerouali, K.; Gros Claude, J.D.; Amarouch, H.; El Mdaghri, N.; Courvalin, P.; Timinouni, M. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. Journal of Infection in Developing Countries; 4(12):779-803.

Coque, T.M.; Oliver, A.; Perez-Diaz, J.C.; Baquero, F.; Canton, R. (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 46(2):500-10.

Hakim, A.S.; Omara, S.T.; Syame, S.M.; Fouad, E.A. (2017). Serotyping, antibiotic susceptibility, and virulence genes screening of Escherichia coli isolates obtained from diarrheic buffalo calves in Egyptian farms. Veterinary World; 10(7): 769-773.

Izzo, M.; Kirkland, P.; Mohler, V.; Perkins, N.; Gunn, A.; House J. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. Australian Veterinary Journal; 89(5):167-173.

Johnson, J.R.; Russo, T.A. (2005). Molecular epidemiology of extra intestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. International Journal of Medical Microbiology; 295(6): 383-404.

Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; Carroll, K.C. (2015). Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC; ASM Press; 2: 137-166

Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology (2):123.

Karah, N.; Poirel, L.; Bengtsson, S.; Sundqvist, M.; Kahlmeter, G.; Nordmann, P.; Sundsfjord, A.; Samuelsen, O. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6')-Ib-cr in Escherichia coli and Klebsiella spp. from Norway and Sweden. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 66(4): 425-31.

Köhler, C-D.; Dobrindt, U. (2011). What defines extra intestinal pathogenic Escherichia coli? International Journal of Medical Microbiology; 301(8): 642-647.

Kolenda, R.; Burdukiewicz, M.; Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic Escherichia coli of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic E. coli. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology; 23: 1-6

Majalija, S.; Segal, H.; Ejobi, F.; Elisha, B.G. (2008). Shiga toxin gene-containing Escherichia coli from cattle and diarrheic children in the pastoral systems of southwestern Uganda. Journal of Clinical Microbiology; 46(1): 352-4.

Marc, D.; Dho-Moulin, M. (1996). Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of Escherichia coli: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI. Journal of Medical Microbiology; 44(6): 444-452.

Maurer, J.J.; Brown, T.P.; Steffens, W.L.; Thayer, S.G. (1998). The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian Escherichia coli. Avian Diseases; 42(1):106-18.

Nakhaei Moghaddam, M.; Forghanifard, M.M.; Moshrefi, S. (2012). Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes (balaTEM, blaCTX and blASHV) Among Urinary Escherichia coli Clinical Isolates in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences; 15(3):833-839.

Olowe, O.A.; Adewumi, O.; Odewale, G.; Ojurongbe, O.; Adefioye, O.J. (2015). Phenotypic and Molecular Characterisation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia coli Obtained from Animal Fecal Samples in Ado Ekiti, Nigeria. Journal of Environmental and Public Health; 2: 1-7

Ooka, T.; Terajima, J.; Kusumoto, M.; Iguchi, A.; Kurokawa, K.; Ogura, Y.; Asadulghani, M.; Nakayama, K.; Murase, K.; Ohnishi, M.; et al. (2009). Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains. Journal of Clinical Microbiology; 47(9):2888-94.

Pitout, J.D.; Thomson, K.S.; Hanson, N.D.; Ehrhardt, A.F.; Moland, E.S.; Sanders, C.C. (1998). Beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, and Proteus mirabilis isolates recovered in South Africa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 42(6):1350-4.

Poirel, L.; Madec, J.Y.; Lupo, A.; Schink, A.K.; Kieffer, N.; Nordmann, P.; Schwarz, S. (2018). Antimicrobial

Resistance in Escherichia coli. Microbiology Spectrum; 6(4): 1-6

Pradel, N.; Boukhors, K.; Bertin, Y.; Forestier, C.; Martin, C.; Livrelli, V. (2001). Heterogeneity of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. Applied and Environmental Microbiology; 67(6): 2460-8.

Pusz, P.; Bok, E.; Mazurek, J.; Stosik, M.; Baldy-Chudzik, K. (2014). Type 1 fimbriae in commensal Escherichia coli derived from healthy humans. Acta Biochimica Polonica; 61(2):389-92.

Rawool, D.B.; Vergis, J.; Vijay, D.; Dhaka, P.; Negi, M.; Kumar, M.; Nair, A.; Poharkar, K.V.; Kurkure, N.V.; Kumar, A.; et al. (2015). Evaluation of a PCR targeting fimbrial subunit gene (fimA) for rapid and reliable detection of Enteroaggregative Escherichia coli recovered from human and animal diarrhoeal cases. Journal of Microbiological Methods; 110:45-8.

Robicsek, A.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. (2006a). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. The Lancet. Infectious Diseases (10):629-40.

Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Sahm, D.F.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. (2006b). qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 50(8):2872-4.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1:198-250.

Srivani, M.; Reddy, Y.N.; Subramanyam, K.V.; Reddy, M.R.; Rao, T.S. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of Shiga toxigenic Escherichia coli in diarrheic buffalo calves. Veterinary World; 10(7):774-778.

Wolny-Koladka, K.; Lenart-Boron, A. (2018). Antimicrobial resistance and the presence of extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolated from the environment of horse riding centers. Environmental Science and Pollution Research International; 25(22):21789-21800.

Wu, C.M.; Wang, Y.; Cao, X.Y.; Lin, J.C.; Qin, S.S.; Mi, T.J.; Huang, S.Y.; Shen, J.Z. (2009). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from chickens in China. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 63(2):408-11.

Yasir, M.; Ajlan, A.M.; Shakil, S.; Jiman-Fatani, A.A.; Almasaudi, S.B.; Farman, M.; Baazeem, Z.M.; Baabdullah, R.; Alawi M, Al-Abdullah N and others. (2018). Molecular characterization, antimicrobial resistance and clinico-bioinformatics approaches to address the problem of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in western Saudi Arabia. Scientific Reports; 8(1):14847.

Younis, G.A.; Elkenany, R.M.; Fouda, M.A.; Mostafa, N.F. (2017). Virulence and extended-spectrum beta-lactamase encoding genes in Escherichia coli recovered from chicken meat intended for hospitalized human consumption. Veterinary World; 10(10):1281-1285.

Zhao, H.X.; Zhao, J.L.; Shen, J.Z.; Fan, H.L.; Guan, H.; An, X.P.; Li, P.F. (2014). Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolates from dairy cattle with endometritis in China. Microbial Drug Resistance; 20(2):162-9.

Zhao, X.; Yang, J.; Ju, Z.; Chang, W.; Sun, S. (2018). Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli from Rabbit Farms in Tai'an, China. BioMed Research international: 8607647.

Zheng, H.; Zeng, Z.; Chen, S.; Liu, Y.; Yao, Q.; Deng, Y.; Chen, X.; Lv, L.; Zhuo, C.; Chen, Z.; et al. (2012). Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst Escherichia coli isolates from healthy food animals in China. International Journal of Antimicrobial Agents; 39(4):305-10.