DOI: 10.22092/vj.2018.114536.1333
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

جداسازی، شناسائی و ارزیابی مولکولی فاکتورهای ژنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اشریشیا کلی‌های بیماریزا

• مریم کهن‌سال
گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران و گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۲-۰۴-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش:۱۶-۱۲-۱۳۹۶

Email: k_kohansal@yahoo.com

چکیده

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در دامپزشکی باعث ظهور، شیوع و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از حیوانات تولید کننده مواد غذایی می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های باکتریایی در گاو ضروری است. کلاس یک اینتگرون می‌تواند ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در باکتری اشریشیا کلی جدا شده از حیوانات گسترش دهد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک و تعیین میزان فراوانی کلاس یک اینتگرون درمیان سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال در استان فارس بود. حضور عوامل بیماری‌زا مرتبط با اسهال در یک صد و بیست نمونه از ۱۲۰ گوساله متفاوت مبتلا به اسهال در نقاط مختلف استان فارس ارزیابی شد. پس از جداسازی، اشریشیا کلی براساس خصوصیات کشت، مورفولوژی و بیوشیمیایی شناسایی شد، شیوع ژن‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک *(Sta, F41, K99)* اشریشیا کلی انتروهموراژیک *(eae, Stx1, Stx2)* با استفاده از تکنیک **Multiplex PCR** بررسی شد. آزمون PCR و روش انتشار دیسک توسط ۸ آنتی‌بیوتیک برای تشخیص ژن‌های بیماریزا، کلاس یک اینتگرون و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شد. از ۱۲۰ مورد، ۵۷ نمونه کشت مثبت برای اشریشیا کلی بدست آمد و ۳۵ نمونه به عنوان اشریشیا کلی پاتوژن شناسایی شد که شامل (۳۶/۸ درصد) ۲۱ مورد اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک و (۲۴/۵ درصد) ۱۴نمونه اشریشیا کلی انتروهموراژیک بودند. بیشترین میزان مقاومت در اریترومایسین (۱۰۰ درصد)، پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، کوتریموکسازول (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۹۱/۵ درصد)، آمپی‌سیلین (۸۸/۵ درصد)، کلرامفنیکل (۸۳ درصد) دیده شد، همه جدایه‌ها دارای مقاومت چندگانه دارویی بودند. بر اساس نتایج مطالعه مولکولی، کلاس یک اینتگرون در ۴۸/۷۵ درصد از نمونه‌ها یافت شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مقاومت چندگانه دارویی و کلاس یک اینتگرون در اشریشیا کلی جدا شده از گوساله‌ها در استان فارس رایج هستند.

کلمات کلیدي: اشریشیا کلی بیماری‌زا، اینتگرون، مقاومت چندگانه دارویی

● Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 10-19

Isolation, characterization and molecular evaluation of genetic factors of antibiotic resistance in pathogenic *Escherichia coli*

By: Kohansal , M., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran & Deprtment of Biology, Payame Noor Unvierstiy (PNU), Tehran, Iran.

Received: 2017-07-03 Accepted: 2018-03-07

Email: k_kohansal@yahoo.com

The usage of antimicrobial drugs in the veterinary field can cause the emergence, prevalence, and dissemination of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food-producing animals. Antimicrobial drugs are essential for the treatment of bacterial infections in cattle. Class 1 integrons can extend antibiotic resistance genes among bacteria *Escherichia coli* from animal.The objective of this study was to investigate the antimicrobial resistance pattern and the frequency class 1 integrons *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves in Fars province. A one hundred and twenty samples from 120 different diarrheic calves from Fars province in Iran were screened for the presence of virulence factors associated with diarrhea. Following isolation and identification of *Escherichia coli* strains on the basis of cultural, morphological and biochemical properties, the presence of various virulence genes of ETEC *(k99, F41* fimbria and *Sta*), EHEC (*Stx1, Stx2* and *eae*) was investigated by multiplex PCR. The isolates were examined for susceptibility to antimicrobial agent and class 1 integrons using PCR and agar disk-diffusion method for 8 antimicrobial agents. Out of 120 samples, 57 (47/5%) were found to be positive for *Escherichia coli* and 35 of them identified as pathogenic *Escherichia coli* including 21(36/8%) and 14 (24/5%) ETEC and EHEC strains respectively. The most antibiotic resistance level was seen against erythromycin (100%), penicillin (100%) co-trimoxazole (100%), tetracycline (91/5%), ampicillin (88/5%) and chloramphenicol (83%). All isolates shown MDR . The study of molecular results showed that class 1 integron was detected in (48/75%) of isolates. Our data demonstrate the presence of MDR and class 1 integrons were common in *Escherichia coli* from calves in Fars province experiencing problems with neonatal diarrhea.

Key words: Integron, Multi-drug resistance, Pathogenic *Escherichia coli*

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی می‌باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری‌های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱۷) استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در حیوانات همانند انسان افزایش چشمگیری داشته و منجر به درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی در دام شده است (۷). شیوع بالای بیماری‌های باکتریایی همه ساله خسارات قابل توجهی را به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند که از آن جمله عفونت‌های ناشی از باکتری اشریشیاکلی می‌باشد (۹). اشریشیا کلی بیماری‌زا اغلب با اسهال گوساله‌های دو سه روزه ارتباط دارد (۱۰). اسهال نوزادی گوساله‌ها (NCD) در روزهای نخستین پس از تولد یکی از بیماری‌های شایع در گوساله است. اهمیت این بیماری به علت مرگ و میر گوساله و هزینه درمان، هزینه نیروی کار و سرمایه، کاهش رشد دام پس از بیماری و خسارت‌های وارده بر ارزش گوساله می‌باشد. اصطلاح NCD به بیماری پیچیده، حاد و همراه با اسهال در گوساله‌های جوان اشاره دارد که به واسطهٔ شدت متفاوتی از اسهال و از دست دادن آب بدن می‌تواند کشنده باشد (۲۱). برای درمان آنتریت اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک یا عفونت‌های باکتریایی ثانویه با منشاء اشریشیا کلی در گوساله‌های مبتلا به اسهال نوزادی توصیه به مصرف خوراکی عوامل آنتی میکروبی می‌شود (۵). مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند در بین جمعیت‌های باکتریایی منتقل شوند. ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی معمولاً در عناصر ژنتیکی به نام اینتگرون‌ها وجود دارند (۱). اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که قادرند ژن‌های خارجی را در ساختار خود وارد کنند که اغلب این ژن‌های خارجی، کدکننده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشند (۹). هنگامی که ژن‌های مقاومت بخشی از کاست‌های متحرک ژنی بوده و به‌وسیله انتقال افقی و با مکانیسم‌های متعددی قابل انتقال باشند، آنها به سرعت منتشر خواهند شد. این مکانیسم‌ها عبارتند از تحرک کاست‌ها به تنهایی توسط اینتگراز کدکننده اینتگرون (۱۲)، تحرک اینتگرون‌های حاوی کاست ژنی به وسیله مکانیسم ترانسپوزیشن با جایگاه ویژه (۸)، انتشار اینتگرون‌های حمل شده توسط ترانسپوزن‌های بزرگتر مانند Tn۲۱ (۲۴) و انتشار اینتگرون‌ها در میان گونه‌های مختلف باکتری‌ها توسط پلاسمیدهای کانجوگیتیو. این عناصر از جمله عوامل دخیل در مقاومت‌های دارویی

چندگانه بوده و همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها، جزء مؤلفه‌های ژنتیکی سیار، در کسب و انتشار عوامل مقاومت هستند (۱۸). تاکنون بیش از نه کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتریهای گرم منفی شناسایی شده است اما تنها چهار کلاس اصلی در ارتباط با جدایه‌های کلینیکی مطرح می‌باشد که اینتگرون‌های کلاس یک و متعاقب آن اینتگرون‌های کلاس دو به عنوان شایع‌ترین کلاس‌ها در بین جدایه‌های کلینیکی مطرح می‌باشند (۲۲). ازآنجائی که بروز همزمان مقاومت به چند دارو در باکتری‌ها با اینتگرون‌ها در ارتباط است (۹) و همچنین بسیاری از اینتگرون‌ها دارای بیش از یک کاست ژنی مقاومتی هستند که اغلب توسط عناصر ژنتیکی متحرک حمل و جابه جا می‌شوند، این امر به انتشار گسترده عوامل مقاومت از یک سویه به سویه دیگر منجر می‌شود. لذا شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیک در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۲۲). هدف از این مطالعه، بررسی مولکولی اینتگرون‌های کلاس یک در باکتری اشریشیا کلی بیماری زای جدا شده از گوساله‌های تازه متولد شده تا سن یک ماه مبتلا به اسهال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری وشناسایی نمونه‌ها

تعداد۱۲۰نمونه سواب رکتوم گوساله‌های کمتر از یک ماه مبتلا به اسهال مربوط به هر دو جنس نر و ماده درمناطق مختلف استان فارس در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها درون لوله در پیچ‌دار حاوی محیط محیط سه قندی آهن‌دار (TSB)(های مدیا-هند) و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید. سوآب‌ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (EMB) (مرک-آلمان) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (جال-ایران) با دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. برای مشاهده شکل باکتری از رنگ‌آمیزی گرم و برای تشخیص نهایی اشریشیا کلی از تست‌های بیوشمیایی سیترات، اوره، SIM VP-MR و TSI استفاده گردید.

شناسائی باکتری‌های اشریشیا کلی بیماریزا

جهت شناسائی باکتری‌های اشریشیا کلی بیماری‌زا از عوامل اسهال در گوساله‌ها شامل باکتری ETEC، از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) *Sta*، *K99*، F41 و باکتری EHEC از پرایمرهای (جدول۱) *Stx1*، *Stx2* و *eae* بـه منظور ازدیـاد قطعه‌های بـه ترتیـب ۳۱۴، ۳۸۰، ۱۹۰، ۵۵۵، ۸۴۰، جفـت‌بازی ژن‌هـای *eae*، *Stx2*، *Sta*، *Stx1*، *F41*، *K99* با اسـتفاده از تکنیک PCR و توسط دستگاه اپندورف ساخت کشور آلمان استفاده گردید (۴).

برنامه دمایی PCR در دستگاه ترموسیکلر شامل ۲۵ سـیکل و دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۰ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای نهایی ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود.

تعیین مقاومت دارویی

برای تعیین حساسیت جدایه اشریشیا کلی نسبت به داروهای آنتی‌بیوتیکی، از تست دیسک دیفیوژن به روش استاندارد کربی-بائر[14] (NCCLS 2003) [15] استفاده شد. اساس این روش را انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها از داخل آگاری که باکتری به آن تلقیح شده تشکیل می‌دهد (۳) که تکرارپذیری برای تمام دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در این باکتری ۳ بود. نمونه‌های اشریشیا کلی در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) برای ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به غلظت ۰/۵ مک فارلند برسند. نیم میلی‌لیتر از باکتری روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) ریخته و به طور کامل پخش شد. پس از چند دقیقه زمانی‌که که کشت باکتری جذب آگار شد و سطح پلیت‌ها خشک گردید، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل کوتریموکسازول (۱/۲۵ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، انروفلوکساسین (۱۵ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg) آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، سفیکسیم (۵ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، بر روی سطح آگار تلقیح شده قرار داده شد. پلیت‌ها برای ۱۸ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید. نتایج بر مبنای معیارهای توصیه شده NCCLSI به صورت حساس، مقاوم و نیمه حساس گزارش گردید (۱۵ و ۱۴). جدایه‌های مقاوم و با حساسیت متوسط به عنوان جدایه‌های غیرحساس در نظر گرفته شد. جدایه‌هایی که به سه و یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند، به عنوان نمونه‌های با مقاومت چندگانه دارویی در نظر گرفته شدند. از باکتری اشریشیا کلی *ATCC 25192* به عنوان سویه رفرانس در آنتی‌بیوگرام استفـــاده شد.

شناسایی مولکولی ژن اینتگراز اینتگرون کلاس یک

در استخراج DNA کشت ۲۴ ساعته از اشریشیا کلی جدا شده در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) برداشته و سانتریفیوژ گردید و رسوب آن با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (DNP ™) ساخت شرکت سیناژن-ایران مطابق پروتکل کیت استخراج گردید. کشت ۲۴ ساعته باکتری با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتیرفیوژ شد. سپس بافر لیزکننده به رسوب اضافه و برای ۱۰ دقیقه در آب در حال جوشش قرار گرفت. پس از سرد شدن، دو دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ، و سپس از محلول روئی به عنوان DNA الگو استفاده شد. برای انجام PCR، مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافرX۱۰،۳ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مول dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر (جدول۱) (۲۲) تهیه شده توسط شرکت سینا ژن مکمل منطقه حفاظت شده ’۵ اینتگرون کدکننده اینتگراز جهت تشخیص اینتگرون کلاس یک استفاده شد (۱۶)، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq تهیه و با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (تمام مواد از شرکت فرمنتاز تهیه شده بود). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف با شرایط ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (فرمنتاز-آلمان) الکتروفورز (کلیور-انگلستان) و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل کداک (اسکن-آمریکا)، عکس‌برداری شد.

آنالیز آماری

بررسی آماری ارتباط جدایه‌های با مقاومت چندگانه دارویی و وجود

اینتگرون توسط نرم‌افزار آماری گراف پد و آزمون مربع کای و فیشرز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر در سطح ۰/۰۵ درصد به عنوان شاخص معنی‌دار بودن در نظر گرفته شدند.

نتایج

از ۱۲۰ نمونه گرفته شده، در (۴۷/۵ درصد) ۵۷ جدایه باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوز شناسایی شد. همه‌ی کلنی‌های تخمیرکننده لاکتوز در تست‌های بیوشیمیایی شامل ، اوره، MR و ایندل مثبت، سیترات و VP منفی و TSI بصورت اسید/اسید همراه با تولید گاز که تاییدکننده باکتری اشریشیا کلی بود. به منظور شناسایی باکتری‌های اشریشیا کلی بیماریزا شامل سویه‌های ETEC و EHEC با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده برای تمامی نمونه‌ها تست PCR انجام گرفت. نتایج PCR برای سویه ETEC نشان داد که از تعداد ۵۷ اشریشیا کلی جدا شده ۱۶ (۲۸ درصد) جدایه دارای فاکتور F۴۱، ۱۲ جدایه (۲۱ درصد) دارای فاکتور STa، نه جدایه (۱۵/۷ درصد) K۹۹ و نه جدایه (۱۵/۷ درصد) دارای این سه ژن با هم بودند (شکل ۱). نتایج PCR برای سویه EHEC نشان داد که از ۱۳۳

جدول ۱ -توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در PCR

عامل بیماریزا	توالی پرایمر(۵'-۳') -	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
F5(K99)	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	۳۱۴	(۴)
F41	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	۴۳۱	(۴)
STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	۳۸۰	(۴)
Stx2	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC AGGGGTCGATATCTCTGTCC	۴۷۸	(۴)
Stx1	TTCGCTCTGCAATAGGTA TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	۱۹۰	(۴)
EaeA	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC	۵۵۵	(۴)
Intg	TGCGGGTYAARGATBTKGATTT* CARCACATGCGTRTARAT	۴۹۱	(۱۶)

B=C or G or T , K=G or T, R=A or G , Y = C or T *

جدول۲- فراوانی سویه های EHEC-ETEC

سویه	فاکتور حدت	تعداد باکتری جدا شده(درصد)	کل(درصد)
ETEC	*STa*	۱۲(۲۱)	۲۱(۳۶/۸)
	99K	۹(۱۵/۷)	
	F 41	۱۶(۲۸)	
	STa99K-41 F-	۹(۱۵/۷)	
EHEC	*Stx1*	۵(۸/۷)	۱۴(۲۴/۵)
	Stx2	۶(۱۰/۵)	
	eae	۹(۱۵/۷)	
	Stx1- Stx2	۱(۱/۷)	
	eae - Stx1- Stx2	۱(۱/۷)	
*Others (%)	-	-	۲۲(۳۸/۶)

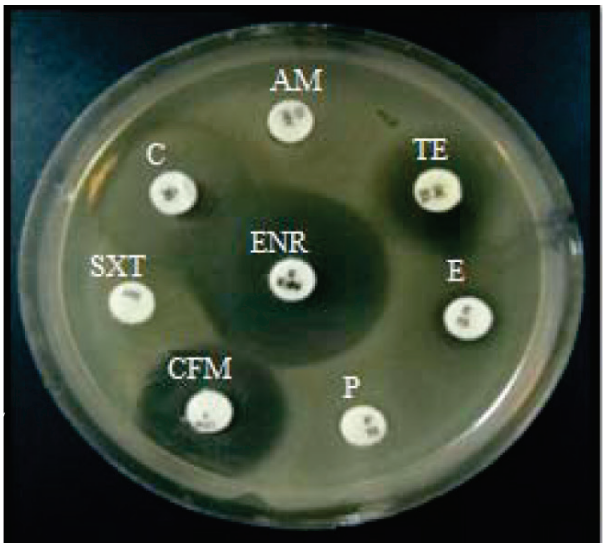
Others (درصد)*: منظور سایر باکتری ها به غیر از دو گروه ذکر شده در جدول می باشد.

جدول۳- مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های واجد اینتگرون کلاس یک و جدایه‌های فاقد اینتگرون

دیسک آنتی بیوتیک	جدایه های واجد اینتگرون کلاس ۱	جدایه های فاقد اینتگرون	کل مقاومت	مقدار p
	تعداد (درصد) نمونه های مقاوم	تعداد (درصد) نمونه های مقاوم		
پنی سیلین	۱۷(٪۴۸/۵۷)	۱۸(٪/۳۴)	۳۵(۱۰۰)	≤۰/۰۱۸۲*
آمپی سیلین	۱۳(۳۷/۱۱)	۱۸(۵۱/۳۸)	۳۱(۸۸/۵)	≤۰/۱۰۱۸
تتراسیکلین	۱۶(۴۵/۷۵)	۱۶(۴۵/۷۵)	۳۲(۹۱/۵)	≤۰۵۸
اریترومایسین	۱۷(٪۴۸/۵۷)	۱۸(٪۵۱/۳۴)	۳۵(۱۰۰)	≤۰/۰۱۸۲*
انروفلوکساسین	۶(۱۷/۲)	۹(۲۵/۸)	۱۵(۴۳)	≤۰/۱۲۵۷
سفیکسیم	۲(۵/۷۵)	۲(۵/۷۵)	۴(۱۱/۵)	≤۰/۰۷۲
کلرامفنیکل	۱۳(۳۷/۲۰)	۱۶(۴۵/۷۹)	۲۹(۸۳)	≤۰/۰۵۵۶*
کوتریموکسازول	۱۷(٪۴۸/۵۷)	۱۸(٪۵۱/۳۴)	۳۵(۱۰۰)	≤۰/۰۱۸۲*

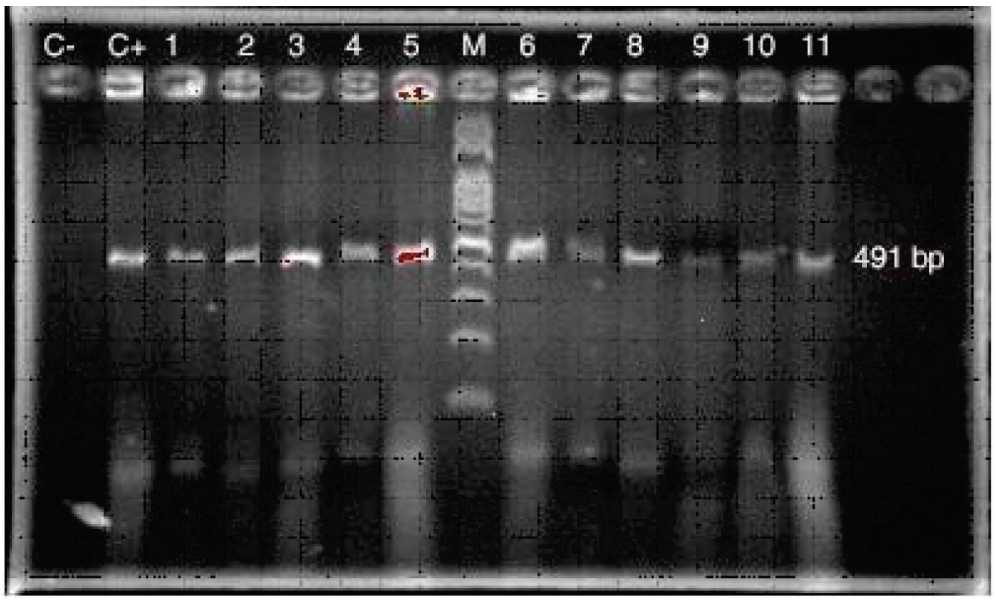
*رابطه بین دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و اینتگرون کلاس۱ از لحاظ آماری معنی‌دار است.

مقادیر در سطح p≤۰/۰۵ به عنوان شاخص معنی‌دار بودن در نظر گرفته شدند



AM: آمپی سیلین، TE : تتراسایکلین، E: اریترومایسین، P: پنی سیلین، CFM: سفیکسیم،SXT :
کوتریموکسازول، C: کلرامفنیکل، ENR: انروفلوکساسین.

شکل ۲- جدایه مقاوم به ۴ آنتی‌بیوتیک در تست آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن.



شکل ۳- نتایج PCR ژن اینتگراز کلاس یک. ستون M : مارکر به قدرت تفکیک ۱۰۰ bp؛ ستون C- :کنترل منفی آزمون PCR (واکنش بدون DNA الگو)؛ ستون C+: نمونه کنترل مثبت از نظر حضور ژن *int1*؛ ستون ۱ تا۱۱ یازده نمونه مثبت برای ژن اینتگراز کلاس یک

اشریشیا کلی جدا شده نه جدایه (۱۵/۷ درصد) دارای فاکتور *eae*، پنج جدایه (۸/۷ درصد) دارای فاکتور، Stx۱ شش جدایه (۱۰/۵ درصد) دارای فاکتور *Stx2*، یک جدایه (۱/۷ درصد) دارای هر دو فاکتور *Stx2* و *Stx1* به طور همزمان، یک جدایه (۱/۷ درصد) دارای هر سه فاکتور به طور همزمان با هم بودند. در نهایت از ۵۷ نمونه بدست آمده ۲۱ جدایه (۳۶/۸ درصد) مربوط به گروه ETEC و ۱۴جدایه (۲۴/۵ درصد) مربوط به گروه EHEC بودند. ضمنادر ۲۲ نمونه (۶۱/۴ درصد) هیچ باکتری مربوط به دو گروه فوق یافت نشد (جدول۲).

یافته‌های حاصل از تست آنتي‌بیوگرام نشان داد تمامی جدایه‌ها الگوی مقاومت چندگانه دارند (شکل ۲) به نحوی که ۱۰۰ درصد اشریشیا کلی‌های جداشده به اریترومایسین، پنی‌سیلین، کوتریموکسازول، ۹۱/۵ درصد به تتراسیکلین، ۸۸/۵ درصد به آمپي‌سیلین، ۸۳ درصد کلرامفنیکل، ۴۳ درصد انروفلوکساسین و ۱۱/۵ درصد به سفیکسیم مقاوم بودند (نمودار ۱). بین تعداد آنتی‌بیوتیک‌ها و تعداد جدایه‌های مقاوم ارتباط آماری معنی‌داری به دست آمد ($P \leq ۰/۰۰۳۳$) به این طریق که با افزایش تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم تعداد باکتری‌ها نیز افزایش یافت. با انجام آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن اینتگراز کلاس یک بر روی ۳۵ جدایه اشریشیا کلی دارای مقاومت چندگانه، در مجموع، ۱۷ جدایه (۴۸/۷۵ درصد) از لحاظ وجود ژن اینتگراز مثبت و ۱۸ جدایه (۵۱/۴۳ درصد) فاقد این ژن بود (شکل ۳). براساس نتایج آزمون آماری مربع کای، بین نمونه‌های دارای مقاومت چندگانه و ژن اینتگرون کلاس یک ارتباط آماری معنی‌داری به دست آمد ($P \leq ۰/۰۰۱۱$) .

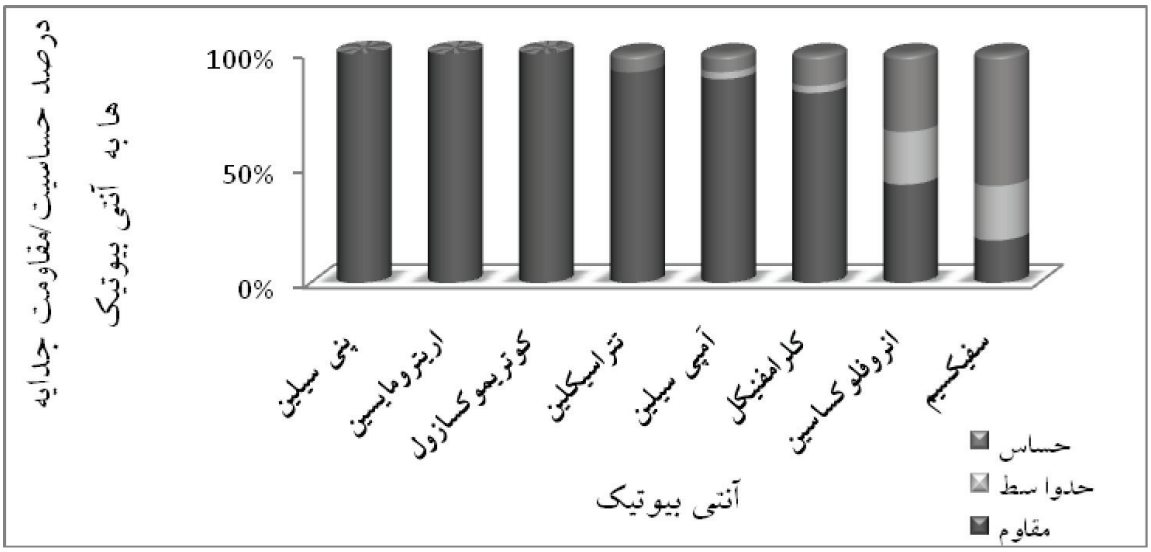
اختلاف آماری مقاومت به پنی‌سیلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول در جدایه‌های واجد اینتگرون کلاس یک و فاقد اینتگرون معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$)، در حالیکه این تفاوت نسبت به آمپی‌سیلین و انروفلوکساسین مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$). مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ در جدول ۳ محاسبه شده است (جدول۳).

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت دارویی در عوامل ایجادکننده عفونی درگیر در اسهال گوساله‌ها معضل بزرگی است و علت اصلی پیدایش مقاومت، استفاده نامناسب و بی رویه آنتي‌بیوتیك‌ها می‌باشد. بر اساس آمار موجود، لزوم استفاده از آنتي‌بیوتیك‌ها در انسان در ۲۰ تا ۵۰ درصد موارد مورد تردید و ۴۰ تا ۸۰ درصد موارد استفاده از آنتي‌بیوتیك‌ها در دام غیرضروری می‌باشد. هرگونه استفاده از آنتي‌بیوتیك‌ها در انسان و حیوانات می‌تواند با افزایش مقاومت میکروبی همراه باشد (۷).

امروزه گسترش ژن‌های مقاومت آنتي‌بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی با ایجاد مقاومت‌های آنتي‌بیوتیکی چندگانه، به مشکل مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از انواع باکتری‌ها تبدیل شده است. این عناصر ژنتیکی نقش بسیار مهمی در انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی و گسترش جدایه‌هایی با مقاومت چند گانه دارویی در میان نمونه‌های مورد مطالعه دارد و احتمالاً می‌تواند این مقاومت را به باکتری‌های گرم منفی دیگر نیز انتقال دهد و درمان بیماری‌های عفونی را با شکست مواجه کند (۱۹). این مطالعه که بر روی اشریشیا کلی جدا شده از گوساله‌های

نمودار۱- میزان حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در جدایه‌های MDR.



حساس: نمونه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک؛حدواسط: نمونه‌های با حساسیت متوسط به آنتی‌بیوتیک؛ مقاوم: نمونه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک

مبتلا به اسهال صورت گرفته، تمامی جدایه‌ها (۱۰۰ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی به ۴ و یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها بودند. این نتایج با مطالعات یعقوب‌زاده و همکاران در سال ۱۳۹۰، که از ۱۹۰ نمونه اشریشیاکلی جداشده از مدفوع گاو میش در آذربایجان غربی، ۱۰۰ درصد آن‌ها دارای مقاومت چند گانه دارویی بودند، مطابقت دارد (۲۳).

هدف از این مطالعه بررسی نقش اینتگرون‌ها در نمونه‌های با مقاومت چندگانه آنتي‌بیوتیکی بود. حدود یک دوم از جدایه‌های اشریشیا کلی دارای اینتگرون کلاس یک بودند. سینگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز گزارش کردند غالب گونه‌های جداشده از بیماران با ویژگی مقاومت چندگانه متعلق به کلاس یک هستند که بر روی پلاسمید و یا ترانسپوزون قرار دارند (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر دو در سال ۲۰۰۵ به بررسی مولکولی فراوانی اینتگرون کلاس یک در بین نمونه‌های اشریشیا کلی جمع‌آوری شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال در چین پرداخت پرداخت که ۵۹ درصد دارای ژن اینتگرون بودند. (۶). نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات انجام شده نشان‌گر این واقعیت نگران‌کننده است که اینتگرون‌ها به طورگسترده‌ای در بین اشریشیا کلی‌های جداشده از نمونه‌های پزشکی و دامپزشکی یافت می‌شود و روز به روز در حال افزایش هستند، پراکندگی آنها به خصوص در نمونه‌های دامی به دلیل سوء مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک وسیع‌تر می‌باشد (۱۵ و ۱۳ و ۱۱ و ۲).

از آنجا که مقاومت به اریترومایسین، پنی‌سیلین، کوتریموکسازول و کلرامفنیکل در جدایه‌های اینتگرون کلاس یک و جدایه‌های فاقد اینتگرون در تحقیق حاضر با هم متفاوت و دارای اختلاف معنی‌داری بودند، می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً همراه بودن اینتگرون‌های کلاس یک و مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های جداسازی شده در ارتباط است. در بین کلاس‌های اینتگرونی شناخته شده در اشریشیا کلی، اینتگرون کلاس یک بیشترین میزان مقاومت را حمل می‌کند، که یکی از مهم‌ترین عوامل رخداد و انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۲). این کلاس مسئول مقاومت‌های ایجاد شده در جدایه‌های اشریشیا کلی جمع‌آوری شده از حیوانات با منشاء غذایی است (۱۹). کلاس یک بهترین نمونه مشخص شده در اینتگرون‌ها است که تا به حال در نمونه‌های کلینیکی و محیطی باسیل‌های گرم منفی گزارش شده است (۲). شیوع اینتگرون کلاس یک در جدایه‌های اشریشیا کلی در اروپا، آمریکا، آفریقا، آسیا وهمچنین چین، سودان و ایران گزارش شده است (۷).

در مجموع ۴۸/۷۵ درصد جدایه‌ها از لحاظ وجود ژن اینتگراز مثبت بود که جدایه‌های مقاوم به هفت آنتی‌بیوتیک بیشترین (۴۵ درصد) میزان مقاومت چندگانه را به خود اختصاص داده‌اند. فراوانی ژن اینتگرون در این جدایه‌ها ۴۳/۸ درصد بود. به عبارتی کمتر از نیمی از نمونه‌های مقاوم به هفت آنتی‌بیوتیک دارای این ژن بودند. از طرفی ۵۱/۴۳ درصد همین جدایه‌ها که فاقد این ژن بودند نیز مقاومت نشان دادند. با توجه به این که هشت آنتی‌بیوتیک به کار رفته در این تحقیق جزء پادزیست‌های رایج در دامپزشکی هستند، می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی دیگر عناصر ژنتیکی قدیمی‌تر از جمله ترانسپوزون و یا پلاسمیدهای با مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی وجود دارد (۲۴، ۲۰ و ۱۵).

بطور کلی نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد طیف و میزان مقاومت به ترکیبات آنتی‌بیوتیک بسیار گسترده است بطوری‌که اینتگرون‌های کلاس یک به طور وسیعی در بین باکتری اشریشیا کلی بیماری‌زای جداشده از گوساله‌ها در استان فارس گسترش دارد و حضور این اینتگرون‌ها در اشریشیا کلی با مقاومت چندگانه پادزیستی در آن باکتری ارتباط دارد.

مقاوم شدن باکتری‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌ها، با نقص در پاسخ به درمان همراه است که می‌تواند باعث افزایش خطر مرگ و میر، طولانی شدن دوره بیماری‌ها و افزایش هزینه‌های درمانی شود. استفاده از آنتي‌بیوتیک‌ها در دامپزشکي، به خصوص در موارد درمان، مهم است، با توجه به عوارض ناشی از استفاده زیاد از آنتي‌بیوتیک‌ها، این داروها باید به طرز صحیحی مورد استفاده قرار بگیرند که کمترین خطر را برای سلامت حیوان و سلامت عموم ایجاد کند. به دلیل اهمیت موضوع پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های مولکولی بیشتری برای شناسایی دقیق کاست‌های ژنی مقاومت بر روی اینتگرون کلاس یک انجام شود. بررسی کلاس‌های دیگراینتگرون و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی برای انواع اینتگرون‌ها تعیین شود.

پاورقی‌ها

1 - Enterotoxigenic
2 - Enterohemorrhagic
3 - Multi drag resistance
4 - Neonatal calf diarrhea
5 - Tryptic soy broth
6 - Hi media- India
7 - Mecrk, Germany
8 - Jall Company, Iran
9 - Sulfor-Indol_ Motility
10 - Metyle Red- Voges Proskauer
11 - Triple Sugar Iron Agar
12 - Germany –Ependrof
13 - Disc diffusion method
14 - Kirby- Bauey
15 - National Committee for Clinical Laboratory Standards
16 - Mac, Farland
17 - Muller-Hinton agar
18 - Sensitive
19 - Resistance
20 - Intermediate
21 - Germany- Fermentas
22 - Cleaver, UK
23 - Kodak gel
24 - Scan-USA
25 - GraphPad
26 - Sing

منابع مورد استفاده

1. Aarestrup, F. M. 1999. Association between the consumption

of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 12 (4):279–285.

2. Abdelhaleem, A. A., Homeda, H. E., Hershan, A. A., Makeen, A. M., Alsanosy, R. M. 2014. Class 1 Integrons Gene in Drug Resistant *E. coli* and Isolated from Different Clinical Specimens in Jazan Area K.S.A. *International Journal of Current Research.* 6(1): 9283-9286.

3. Afshar Mazndaran, N., Rajab, A. 2011. Correct prescription of antibiotics in the treatment of diseases of poultry. 2nd ed. Tehran: Press Noorbakhsh.P.184-185. (Book In Farsi)

4. Arjmandpour, P., Tahamtan, Y. 2017. Molecular Identification of Virulence Factors of *E. coli* in Three Strains of ETEC, EHEC and EPEC in Calves and Lambs with Diarrhea in Shiraz. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 115:27-34. (In Persian)

5. Constable, P. D., 2004. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *Journal of veterinary internal medicine,* 18(1), 8-17.

6. Du, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., & Shen, J. (2005). Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 245(2), 295-298.

7. El-Sokkary, M. A., Abdelmegeed, E. S. 2015. Characterisation of Class 1 Integron among *Escherichia coli* Isolated from Mansoura University Hospitals in Egypt. *Advances in Microbiology.* (1): 269-277.

8. Grape, M., Farra. A., Kronvall. G., Sundstrom. L. 2005. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*.11(1):185-92.

9. Harada, K., Asai, T. 2010. Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 10(1):1-12.

10. Hasani Tabatabai. A., Firozi. R. 2011. University of Tehran Press (UTP). (Book in Persian)

11. Islami, G., Seyedjavadi, S., Goudarzi, H., Fallah, F., Goudarzi, M .2010. The prevalence integrons of in *Escherichia coli* Klebsiella in children with urinary tract infection with multi-drugresistant. *Research Journal of Medical Sciences Faculty and Health Services of Shahid Beheshti Tehran.*34(1):61-65. (In Farsi)

12. Jones, L. A., McIver, C. J., Kim, M. J., Rawlinson, W. D., White, P.A. 2005. The *aadB* gene cassette is associated with blaSHV genes in Klebsiella species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2): 794-797.

13. Kadlec, K., Schwarz, S .2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 62(3):469-473.

14. Kang, H.Y., Jeong, J.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, C. H., Moon, D.C. Lee, W.K., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Lee, J.C. 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55(1): 639–644.

15. Levin, B.R., Lipsitch, M., Perrot, V., Schrag, S., Antia, R., Simonsen, L., Moore Walker, N., Stewart, F. M. 1997. The population genetics of antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases.* (Suppl 1):S9-16.

16. Rao, A. N., M. Barlow, L. A. Clark, J. R. Boring, F. C. Tenover and J. J. E. McGowan, 2006. Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and Klebsiella spp., US Hospitals. Emerging Infectious Diseases. 12: 1011-1014.

17. Sarshar, M., Tavoffi, H., Ghorbani Dalin, S., Saudi,N., Kargar, M., Shahrokh, N.2012. Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* strains producing diarrhea isolated from children. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 57(17):131-136. (In Persian)

18. Severino, P., Magalhaes, V.D. 2004. Integrons as tools for epidemiological studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 10(2): 156-162.

19. Singh, R., Schroeder, C. M., Meng, J., White, D. G., McDermott, R. F., Wagner, B. D.D., Yang, H., Simjee, S., Debroy, C., Walker, R.D., Zhao, S. 2005. Identification of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from humans and food animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(1):216-219.

20. Tzipori, S. 1985. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 29(1): 103-206.

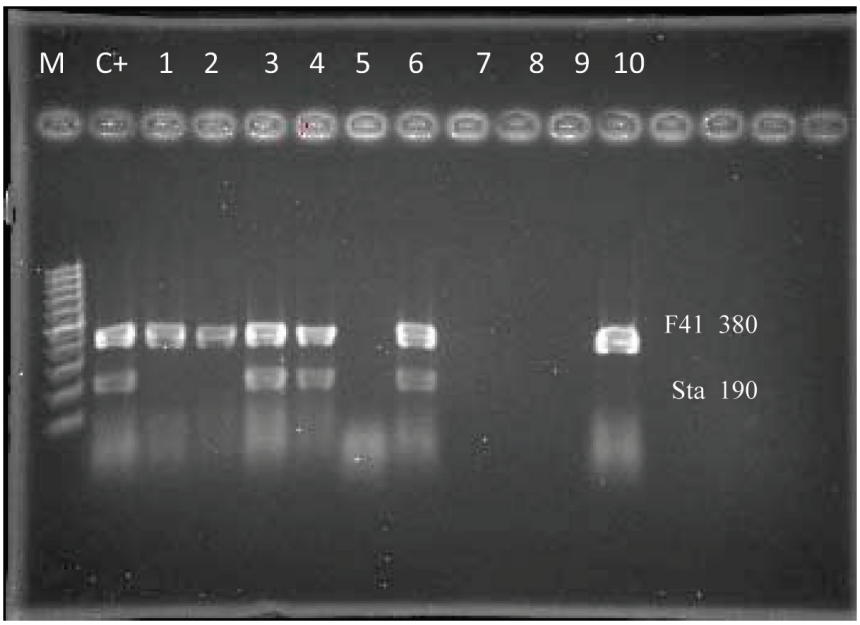
21. Verdier, K.D., Nyman, A., Greko, C., Bengtsson, B. 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 54(1):2-10.

22. White, P. A., Mciver, C.H. J., Rawlinson, W. 2001. Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (9): 2658–2661.

23. Yaghubzadeh, N,. Onagh, A., Mardani, K,. Khalili, M., Tukmuchi, A,. Nick Bakhsh, P,. 2011. molecular characterization, Study of Antibiotic Resistance Pattern of *Escherichia coli* Producing Shiga Toxin and Antibacterial Effects of Thyme and Cumin Essences Against them. *Urmia Medical Journal*, NO: 3. (In Persian)

among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(12): 5429-5433.

24. Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., Tae, S. H., Choi, C. H., Lee, E. Y., Seol, S.Y., Lee ,Y. C., Cho, D.T .2003. Changes in gene cassettes of class 1 integrons



شکل۱-نتایج Multiplex PCR و تشکیل باندهای *STa(190 bp)*، *F41(380 bp)* ، ستون M: مارکر به قدرت تفکیک ۱۰۰ bp؛ ستون + C: نمونه کنترل مثبت از نظر حضور ژن *STa* و *F41* ، (نمونه ها۱۰-۱): نمونه های ۱،۲،۱۰ دارای فاکتور *F41*، نمونه های ۳،۴،۶ دارای هر دو فاکتور *STa* و *F41*، نمونه های ۵،۷،۸، ۹، برای هر سه فاکتور منفی بودند.