AUMJ
Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، پاییز ۱۳۹۸، سال ۸، شماره ۴، صفحه‌های۳۶۵-۳۷۶
مقاله تحقیقی

شناسایی ژن‌های مقاومت به سولفانامید (*sul*$_2$، *sul*$_3$) ، تتراسایکلین(A)*tet* ، (C)*tet* ، (D)*tet* و اینتگرون *intI* در نمونه *اشریشیاکلی* جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان (Mastitis)

رضا سلیمی[۱]، علی چیتگر[۲]، علیرضا مختاری[۳*]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
[۳] مسئول فنی بخش میکروب‌شناسی، آزمایشگاه دامپزشکی آتیه البرز

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۳/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۷

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری *اشریشیاکلی* جزء میکروفلور طبیعی رودهٔ انسان و تمامی حیوانات خونگرم است. ورم پستان که توسط عوامل مختلف بیماریزا ایجاد می‌گردد. از عوامل مهم ایجاد ورم پستان (Mastitis) در دام، باکتری *E.coli* بوده وتحت عنوان ورم پستان‌های محیطی شناخته می‌شود. این مطالعه با هدف جداسازی ژن‌های مقاومت سولفونامیدی، اینتگرون و تتراسایکلین در *اشریشیاکلی* جدا شده از ورم پستان با علائم بالینی به روش Multiplex PCR انجام گرفته است.

مواد و روش‌کار: تعداد ۵۰ ایزوله شیر دارای علائم ورم پستان از دامداریهای غرب استان تهران جمع‌آوری شد. آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی انجام و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل ۲۰۱۶ CLSI و E-test با آنتی بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید.پس ازجداسازی باکتری واستخراج DNA ، حضور ژن‌های موردمطالعه به‌روش Multiplex PCR بررسی شد.

یافته‌ها: براساس یافته‌های این پژوهش از مجموع ۵۰ نمونه، ۱نمونه (۲٪) دارای ژن *Sul*$_2$و ۳۲ نمونه (٦٤٪) واجد ژن *tetA* و ۱۱ نمونه (۳٦٪) ژن *tetC* بود. همچنین ژن *Int* در ۱نمونه معادل ۲٪ از نمونه‌ها شناسایی و بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیک به آنتی‌بیوتیک سولتریم و کوتریموکسازول به ترتیب ٦۸ ٪ و ۵۰ ٪ و بیشترین حساسیت به تتراسایکلین ۹٦ ٪ گزارش شد.

بحث: مقایسه این مطالعه با سایر تحقیقات صورت گرفته نشان داد که ژن مقاومت در *اشریشیاکلی‌های* جدا شده از ورم پستان زیاد است. اختلاف نتایج بدست آمده از روش Multiplex PCR در این مطالعه با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا ممکن است به علت منبع نمونه وتفاوت در مناطق جغرافیایی باشد، درمطالعات سایرمحققین بیشترموارد برروی نمونه‌های مبتلا به اسهال بررسی شده است.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی*، ورم پستان، ژن‌های مقاومت سولفانامیدی، تتراسایکلین

***نویسنده مسئول:**
مسئول فنی بخش میکروب‌شناسی، آزمایشگاه دامپزشکی آتیه البرز

۰۹۱۹-۶۹۷۷۵۲۲
E-mail: alm3370@gmail.com

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه شامل تعداد زیادی گونه‌های مشابه بوده که در خاک، آب، مواد فاسد شده و روده بزرگ انسان، حیوانات و حشرات یافت می‌شوند. این باکتری‌ها در فلور طبیعی روده وجود داشته و به آن‌ها باسیل‌های روده ای اطلاق می‌شود. باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از قدیم به دو دسته باکتری‌های فرصت طلب و بیماریزای روده ای تقسیم شده اند. باکتری‌های پاتوژن روده ای مشتمل بر *سالمونلا*، *شیگلا* و *یرسینیا* و ... بوده و پاتوژن‌های فرصت طلب، سایر جنس‌ها را شامل می‌گردد. در این بین *اشریشیاکلی* یکی از معمول ترین باکتری‌های روده‌ای کامنسالی است که می‌تواند عامل عفونت‌های گوارشی و خارج گوارشی به شمار آید[1]. استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دامداری برای مبارزه با بیماری ورم پستان (Mastitis) باعث ظهور عوامل بیماریزای مقاوم به دارو در این صنعت شده است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک توانایی باکتری و میکروب‌های دیگر برای مقاومت در برابر اثرات آنتی‌بیوتیک است و مقاومت به آنتی‌بیوتیک وقتی ایجاد می‌شود که باکتری به‌گونه‌ای تغییر کند که اثر دارو را کم کند یا کاملاً از بین ببرد. در این حالت باکتری تغییریافته زنده می‌ماند و آسیب‌های جدیدی به سیستم بدن وارد می‌کند. استفاده از هر ماده ضد میکروبی می‌تواند ایجاد مقاومت در جمعیت میکروارگانیسم-های هدف کند و در نهایت ژن‌های مقاوم و باکتری‌های مقاوم را ایجاد نماید[2]. از آن جایی که ژن‌های مقاوم برای انتقال از هیچ الگوی فیزیولوژیک و اکولوژیک و جغرافیایی تبعیت نمی‌کنند، استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است سبب ایجاد مقاومت در موارد دیگر (از جمله بیماری‌های انسانی) شود. انتقال فاکتور مقاومت بین گونه‌های مشابه و حتی غیر مشابه دیده شده و به اثبات رسیده است. بدین ترتیب با انتقال این فاکتور تعداد گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد[3]. اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانسپوزون‌ها ژن‌های مقاومتی را که در داخل کاست‌های ژنی قرار دارند حمل و جابجا می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها به عنوان موفق ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌های مقاومت چندگانه (Multi Drug Resistance) مطرح می‌شوند. با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نمایند[4]. مقاومت به سولفانامیدها معمولا توسط سه ژن Sul به صورت Sul_1 و Sul_2 و Sul_3 کد می‌شود که این سه ژن معمولا توسط پلاسمید انتقال می‌یابند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که شیوع ژن Sul_2 بیشتر از Sul_1است. در روش M-PCR به دلیل استفاده از چند آغازگر توانایی ازدیاد و شناسایی چندین ژن به صورت همزمان با هم وجود دارد. صرفه جویی در مواد لازم PCR و ویژگی و حساسیت با کاهش زمان بررسی‌های ژنتیکی و الگوهای مورد نیاز با چند جفت آغازگر به صورت عمومی و اختصاصی و با قابلیت اعتماد و سرعت بالا برای شناسایی مولکولی پاتووارهای *اشریشیاکلی* به کار می‌رود. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط *اشریشیاکلی* جداشده از ورم پستان بوده که با بررسی جداسازی همزمان جنس و ژن مقاومت سولفونامیدی و تتراسایکلین اشریشیاکلی ایزوله شده از ورم پستان با علایم با روش Multiplex PCR می‌باشد. در همین راستا تشخیص و جداسازی هم زمان ژن مقاومت سولفونامیدی و تتراسایکلین و اینتگرون *اشریشیاکلی* عامل ورم پستان و مقایسه آن با نمونه‌های مشابه جهانی بسیار حائز اهمیت است چرا که کمک به دامپزشکان و پزشکان در تشخیص سریع آزمایشگاهی و جلوگیری از ضرر و زیان اقتصادی ناشی از مقاومتهای دارویی در درمان بیماریهاست.

مواد و روش‌ها

این تحقیق مطالعه‌ای مقطعی است که به روش توصیفی تحلیلی طراحی و اجرا شد. معیار آزمایشگاهی علائم ورم پستان با *اشریشیاکلی* شامل یک کشت مثبت با تعداد کلنی‌هایی کم در محیط کشت می‌باشد. در این پژوهش تعداد ۲۰۰ نمونه از شیر دامهای مبتلا به ورم پستان از گاوداریهای منطقه غرب تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در نهایت با انجام کشت و جداسازی و شناسایی نمونه‌ها مطابق بخش های بعدی ذکر شده تعداد ۵۰ باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان جهت انجام آزمونهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص باکتری E.coli

نمونه‌های شیر بعد از جمع‌آوری برای تأیید نهایی پس از کشت روی محیط‌های بلاد آگار، مک کانکی آگار و EMB آگار تشخیص باکتری *اشریشیاکلی* با روش‌های میکروب شناسی شامل تست کاتالاز و اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی مانند TSI، SIM ، MRVP، سیمون سیترات، اوره آگار، نیترات آگار، و نیز تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها، طبق جداول تشخیصی میکروب شناسی انجام گرفت[۵].

آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر)

مقداری از کلونی باکتری را بوسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل کردیم تا به کدورت مناسب و برابر با استاندارد نیم مک فارلند شود. بعد از تهیه محلول هموژن با سوآب استریل آن را به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده و به طور کامل بوسیله سوآب بر روی محیط، کشت شد. بعد از کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، آموکسی سیلین، کوتریموکسازول، سولتریم) بر روی محیط کشت منتقل گردید. بعد از قرار دادن دیسک ها، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه و بعد از ۲۴– ۱۸ ساعت زیر نور چراغ بررسی شد. سپس قطر هاله عدم رشد را با خط کش اندازه گیری کرده و با توجه به جدول همراه دیسک ها، گزارش تست آنتی بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت حساس (Susceptible)، مقاوم، (Resistant) و یا نیمه حساس (Intermediate) گزارش گردید[۵].

روش E.test

این روش بر روی تعدادی از نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان صورت گرفت. حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (MIC) به روش E.test بر روی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر صورت پذیرفت[۶]. در این روش برای آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین از نوع نواری (Strip) استفاده شد[۷].

Gentamicin (GEN) : Concentration (μg) =

240,120,60,30,10,5,0.1,0.01

Ciprofloxacin EzyMIC Strip (CIP)= (0.002-32) mcg/ml

در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند آن را روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس نوارهایی را که هرکدام معرف یک نوع آنتی‌بیوتیک بود بر روی آگار قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه منطقه عدم رشدی بصورت مثلثی شکل ایجاد شد. سپس وضعیت حساسیت، مقاومت و حدواسط باکتریهای نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور مشخص گردید.

آغازگرها (پرایمرها)

پرایمر الیگونوکلئوتیدی اساسی ترین عامل موثر بر راندمان و اختصاصی شدن واکنش PCR می‌باشد. طراحی دقیق پرایمر برای بدست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیر اختصاصی ضروری است. معمولاًM ۱– ۰/۱ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز می‌باشد[۸-۱۰].

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام گردید. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل۱/۵mM کلرید منیزیم، ۲۵۰ µmol از dNTP، ۰/٤ µmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های حدت و ۱/۵ واحد از*Taq* پلی مراز و ۵ میکرولیترDNA با غلظت (۱۰ نانو گرم) الگو انجام شد. شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

بهینه‌سازی PCR

بهینه سازی یعنی تعیین غلظت‌های مناسب مواد واکنشگر و دمای مناسب اتصال پرایمرها (Ta) جهت به دست آوردن محصول PCR مناسب است[۸و۱۰].

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام مولتی پلکس پی سی آر[۱۱] (Multiplex-polymerase chain reaction)

جدول پرایمرهای مورد استفاده			
نام پرایمر	توالی پرایمر (5’ to 3’)	ژن هدف	اندازه باند (bp)
Sul2-f	F= 5 -GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3	*Sul*	۲۹۳
Sul2-r	R= 5- GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3	*Sul*	
Sul3-f	TCC GTT CAG CGA ATT GGT GCA G	*Sul*	۱۲۸
Sul3-r	TTC GTT CAC GCC TTA CAC CAG C	*Sul*	
tet(A)-f	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	*tet(A)*	۲۱۰
tet(A)-r	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	*tet(A)*	
tet(C)-f	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	*tet(C)*	٤۱۸
tet(C)-r	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	*tet(C)*	
tet(D)-f	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	*tet(D)*	۷۸۷
tet(D)-r	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC	*tet(D)*	
Int 1-f	F= 5- GCCACTGCGCCGTTACCACC-3	*Int*	۸۹۸
Int 1-r	R= 5-GGCCGAGCAGATCCTGCACG-3	*Int*	

الکتروفورز

الکتروفورز ژل آگارز، روشی استاندارد برای بررسی و تفکیک قطعات DNA حاصل از PCR ، توانایی جداسازی قطعات DNA را داراست. موقعیت و محل قطعات DNA در ژل توسط رنگ آمیزی با غلظت‌های پایین محلول رنگ اریتروژل و مشاهده مستقیم آن تحت تأثیر تابش نور ماورای بنفش تشخیص داده می‌شود.

نتایج

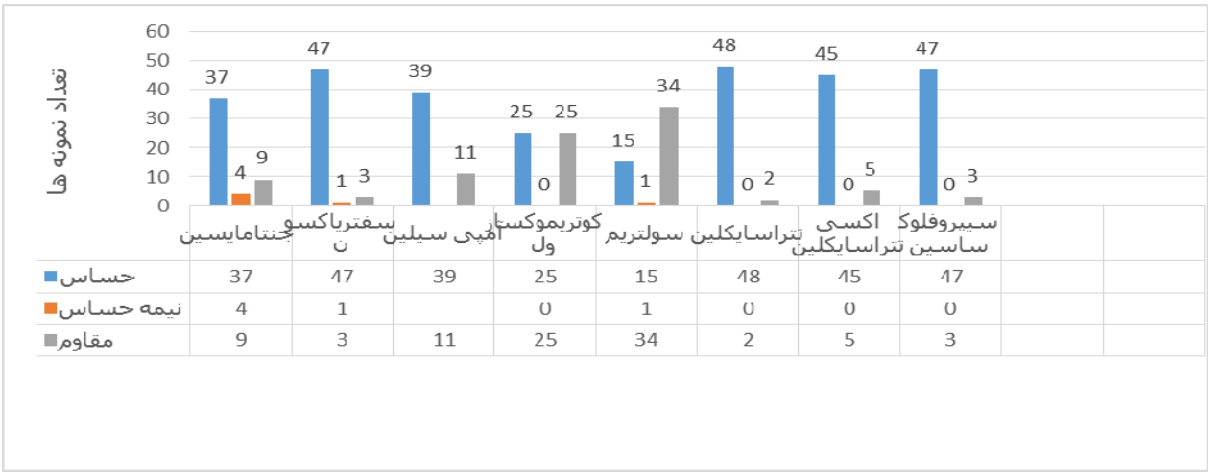
نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های جداشده: بعد از کشت دادن نمونه‌های جمع‌آوری شده، باکتری *E.coli* بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی گردید. نتایج این تست‌ها به قرارزیر است: سیترات منفی، تولید SH2 منفی، نیترات مثبت،MR مثبت، VP منفی، اوره آزمنفی، اندول مثبت، دآمیناسیون فینل آلانین منفی می‌باشد. تمام سویه‌ها روی محیط EMB کلنی با جلای فلزی ایجاد می‌نماید.

بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی: به منظور بررسی مقاومت-های آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، آنتی بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد و میزان درصد حساسیت و مقاومت کلیه سویه‌ها به آنتی بیوتیک های مورد نظر مشخص گردید. نتایج در جدول ۲ قابل مشاهده است. همانگونه که قابل مشاهده است بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سولتریم به میزان ٦۸٪ و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک تراسایکلین ٤٪ و بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به میزان ۹٦٪ نسبت به تراسایکلین گزارش شد.

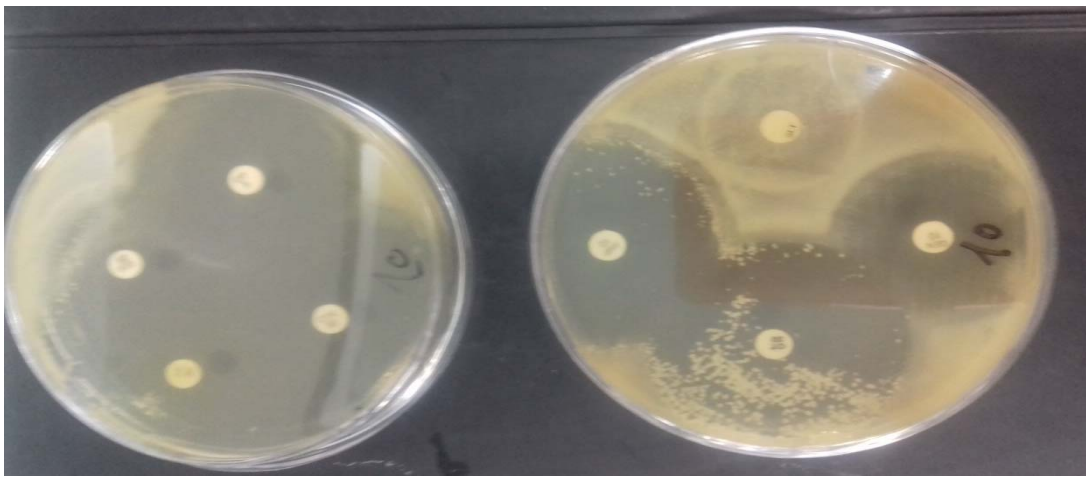
مطابق نتایج جدول ۲ بررسی مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نشان داد که بالاترین میزان مقاومت چندگانه (Multi Drug Resistance) نسبت به دو دارو و سه دارو مشاهده شد. در بین آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی بیشترین میزان مقاومت به کوتریموکسازول/سولتریم گزارش شده است که خود دلیل بر بروز پدیده مقاومت در مراکز پرورش می‌باشد.

جدول۲: جدول میزان حساسیت جدایه‌های دامی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن برحسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت (٪) Resistance	حساسیت متوسط(٪) Intermediate	میزان حساسیت (٪) Sensitive
جنتامایسین	(۱۸) ۹	(۸) ٤	(۷٤) ۳۷
سفتریاکسون	(٦) ۳	(۲) ۱	(۹۲) ٤۷
آمپی‌سیلین	(۲۲) ۱۱	–	(۷۸) ۳۹
کوتریموکسازول	(۵۰) ۲۵	–	(۵۰) ۲۵
سولتریم	(٦۸) ۳٤	(۲) ۱	(۳۰) ۱۵
تتراسایکلین	(٤) ۲	–	(۹٦) ٤۸
اکسی‌تتراسایکلین	(۱۰) ۵	–	(۹۰) ٤۵
سیپروفلوکساسین	(٦) ۳	–	(۹۲) ٤۷



نمودار ۱: توزیع فراوانی مقاومت و حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها



شکل ۱: نمونه ای از نتایج تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار پس از انکوباسیون

جدول ۳: نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های منتخب *اشریشیاکلی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به روشE-test

شماره نمونه	GM	CP
۱	2µg- 25 mm	25µg- 22 mm
۲	2µg- 22 mm	15µg- 22 mm
۱۰	2µg- 22 mm	10µg- 22 mm
۱٤	5µg- 11 mm	25µg- 22 mm
۱٦	50µg- 11 mm	R
۲٥	R	R
۳۰	R	R
٤٥	2µg- 20 mm	25µg- 22 mm

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E-test

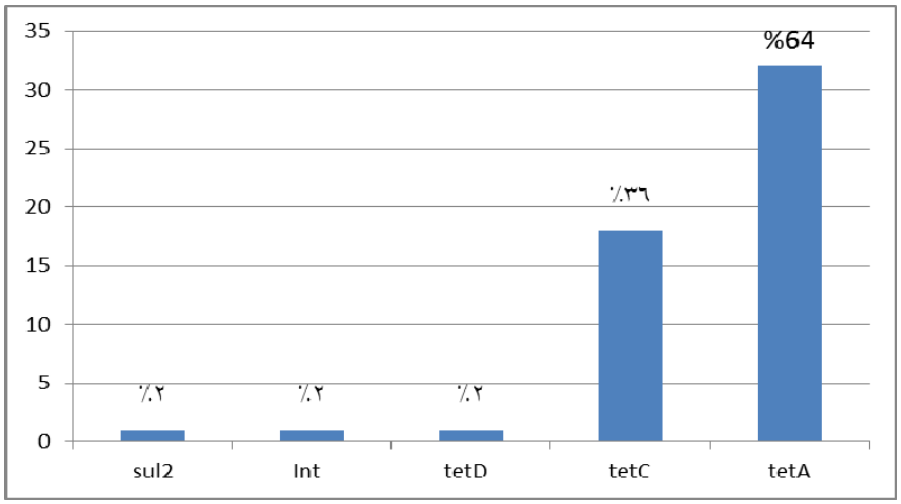
تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E-test برای ۲ آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بر روی برخی از جدایه‌های منتخب صورت گرفت. انجام این تست بر اساس پروتکل استاندارد CLSI بوده (۷) و به عنوان کنترل نیز از سویه استاندارد استفاده گردید. کمترین میزان غلظت داروهای مورد استفاده مربوط به داروی جنتامایسین با غلظت ۲ میکروگرم و بیشترین میزان غلظت موثره را آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در بین نمونه‌های *اشریشیاکلی* از خود بروز دادند.

نتایج حاصل از آزمون مولکولی با استفاده از روشMultiplex PCR

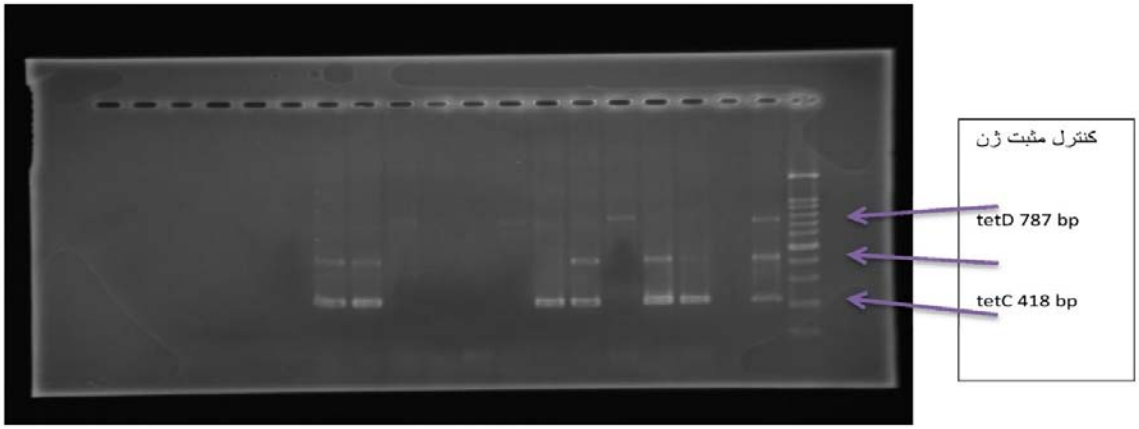
در این مطالعه ۵ جفت ژن *Int* ،Sul_2 ،Sul_3 ،*tetA,tetC,tetD* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۵۰ نمونه شیر جداشده از نمونه‌های ورم پستانی که وجود باکتری *اشریشیاکلی* در آنها به اثبات رسیده بود، میزان فراوانی ژن‌ها به ترتیب: ژن*tetA* ٦٤٪، ژن *tetC* ۳٦٪، و ژن *Int* و *tetD* ۲٪ بود. ولی ژن‌های Sul_2 و Sul_3 در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید.

جدول ٤: فراوانی ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه

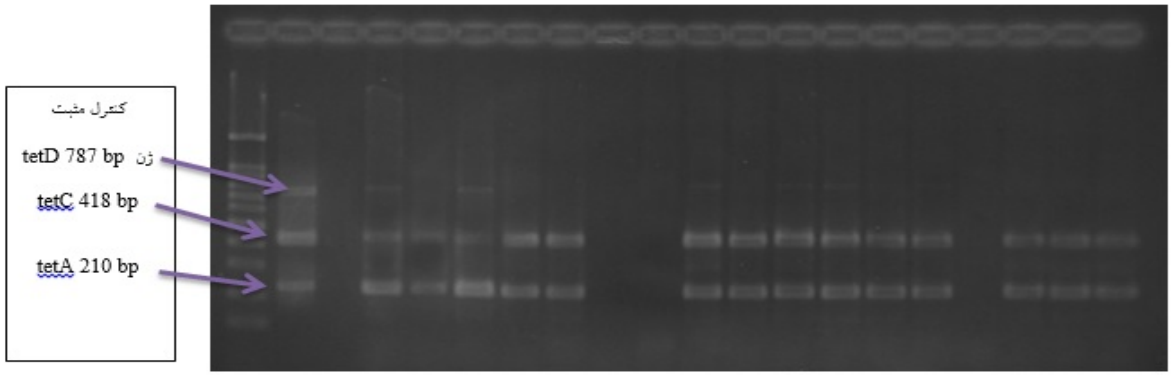
ژن	تعداد	درصد
Sul_2	۱	۲
Sul_3	۰	۰
tetA	۳۲	٦٤
tetC	۱۸	۳٦
tetD	۱	۲
Int	۱	۲



نمودار ۲: توزیع فراوانی ژن‌های مورد مطالعه



شکل ۱: نتایج آزمون M-PCR جهت تعیین ژن‌ها: از راست به چپ : Ladder 100bp – چاهک دوم کنترل مثبت ژن‌های تتراسایکلین- چاهک سوم کنترل منفی- چاهک ۲۰-٤ نمونه‌های شماره ۳٤-۱۸ . نمونه‌های چاهک شماره ۱۰ و ۱۱ و ۲۰-۱۵فاقد هر نوع ژن مقاومت به تتراسایکلین می‌باشند.



شکل ۲: نتایج آزمون M-PCR جهت تعیین ژن‌ها: از چپ به راست : Ladder 100bp – چاهک دوم کنترل مثبت ژن‌های تتراسایکلین- چاهک سوم کنترل منفی- چاهک ۲۰-٤ نمونه‌های شماره ۱۷-۱ . نمونه‌های چاهک شماره ۹ و ۱۰ فاقد هر نوع ژن مقاومت به تتراسایکلین می‌باشند.

بحث

از عوامل مهم ایجاد ورم پستان در دام، باکتری *E.coli* بوده و تحت عنوان ورم پستان‌های محیطی شناخته می‌شود. ورم پستان ناشی از *E.coli* ارتباط نزدیکی با وضعیت میزبان (دام) دارد که تحت تاثیر عملکرد دفاع سلولی توسط نوتروفیل‌ها می‌باشد. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و منشاء کروموزومی دارد. در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت‌های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و تبدیل سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود[۱۲]. ایرفان و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی بر روی اینتگرون‌ها و نقش آن‌ها در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده کردند که انتقال ژن‌های مقاومتی در باکتری‌ها توسط عناصری به نام اینتگرون‌ها انجام می‌شود. اینتگرون‌ها المنت‌های ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانسپوزون‌ها ژن‌های مقاومتی را در حالی که در داخل کاست‌های ژنی قرار دارند حمل و جابجا می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها به عنوان موفق ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌های مقاومت چند گانه (MDR) مطرح می‌شوند. با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نمایند[۱۳و۱۴]. فرج نیا و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی در نمونه کشت ادرار پرداختند. نتایج این مطالعه نشان از افزایش مقاومت سویه‌های اشریشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیکهای آمپی‌سیلین و تتراسایکلین دارد که شاید علت آن مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیکها باشد. لذا توصیه می‌شود از استفاده غیرضروری آنتی‌بیوتیکها خودداری گردد و تولید نسلهای جدید آنتی‌بیوتیکهای موثرتر و مقرون به صرفه‌تر مورد توجه قرارگیرد[۱۵و۱۶]. برخی محققین با ردیابی ژن sul_2 در اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری مراجعه کننده به مراکز کلینیکی شهر خوی به این نتیجه رسیدند که از کل ۱۰۰ ایزوله ۷۱ ایزوله (۷۱ درصد) مقاوم به کوتریموکسازول بودند که ژن sul_2 در ۵۷ ایزوله (۸۰ ٪) از آن‌ها مشاهده شد. این ژن در ایزوله‌های مقاوم به سولفونامیدها که هاله عدم رشد را تشکیل نداده بودند وجود داشت. در ایزوله‌هایی که دارای ژن sul_2 بودند به طور همزمان به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین مقاومت دیده شد. MIC و MBC برای آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول به ترتیب ۱۶ و ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد[۱۷]. در مطالعه‌ای که Schwaiger سال ۲۰۰۹ نتایج آن را منتشر نمود در میان ایزوله‌های انسانی و حیوانی انجام شده، ژنtetA در خوک با بیشترین فراوانی و ژن tetB به عنوان فراوانترین ژن مقاومت در نمونه‌های انسانی گزارش گردید. سایر ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین کمتر از ۷٪ گزارش شده است. همچنین بیشترین میزان بروز مقاومت در ژن‌های سولفانامید مربوط به ژنsulII (۴۰٪ در نمونه‌های حیوانی و ۶۲٪ در نمونه‌های انسانی) مشاهده شد[۱۸]. Lanz و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش نمودند که بیشترین میزان مقاومت در نمونه‌های *اشریشیاکلی* انسانی و دامی جداسازی شده مربوط به ژن‌های (tetA, tetB) و سولفانامید (sulII) مشاهده گردید. همچنین میزان بروز مقاومت به اینتگرون کلاس ۱ بیشتر در نمونه‌های مقاوم به سولفانامید sulI مشاهده گردید[۱۹]. Bryan و همکاران در سال ۲۰۰۴ با بررسی توزیع فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در نمونه‌های دامی و انسانی به این نتیجه رسیدند که از بین ۱۲۶۳ نمونه *اشریشیاکلی* جداسازی شده از انسان، جوجه، بوقلمون، گوسفند، گاو، بز، سگ، گربه، اسب؛ غاز و آهو، ۳۱٪ نمونه‌ها به تتراسایکلین مقاوم بودند. بیشترین مقاومت مشاهده شده در بین نمونه‌های جوجه، خوک و بوقلمون گزارش گردید. همچنین با روش Multiplex-PCR ، بیشترین مقاومت در بین ژنهای مقاوم به تتراسایکلین نسبت به tetA به میزان ۳۵٪ و ژن tetB ۶۳٪ گزارش گردید[۲۰]. Rubin در سال ۱۹۹۲ با بررسی مقاومت به سولفونامیدها به این نتیجه رسید که میزان مقاومت پاتوژن‌های دستگاه ادراری به آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح جهان درحال افزایش است که هدف اصلی بدست آوردن اطلاعاتی در زمینه الگوهای مقاومت اشریشیاکلی مرتبط به عفونت دستگاه ادراری و باکتریمی مربوط به اشریشیاکلی در دانمارک می‌باشد. مقاومت کلی که وجود دارد به صورت زیر است : آمپی سیلین ۲۰ تا ۴۷٪، متی سیلین صفر تا ۷٪، تری‌متوپریم ۱۰ تا ۲۸٪، سولفامتوکسازول ۲۲ تا ۴۷٪ و نیتروفورانتوئین ۰ تا ۳٪.

[۲۱و۲۲]. Moland و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه نوزادان از بدو تولد و مقایسه الگوی PFGE باکتریهای مقاوم در نوزاد و والدین با هم دریافتند که نتیجه آزمون در هردو منبع مشابه بوده است که می‌توان نتیجه گرفت از یک کلون منشأ گرفته اند. در مطالعات قبلی هم وجود دو ژن مقاومت به تتراسایکلین در یک سویه مشاهده شده است. در هیچ‌کدام از این مطالعات مانند این مطالعه همراهی ژن مقاومت به تتراسایکلین از نوع A-D مشاهده نشده است[۲۳و۲۴]. Scheutz و همکاران در سال ۲۰۱۲ اظهار کردند که افزایش مقاومت دارویی در سالهای اخیر در بین پاتوژن‌ها بویژه عوامل مسبب ورم پستان معضل بزرگی است که دلیل اصلی پیدایش سویه‌های مقاوم، بویژه سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)، انتشار عوامل مقاومتی به سویه‌های حساس، افزایش هزینه‌های درمانی و شکست درمان (Drug therapeutic failure -DTF)، می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از داروهای ضدمیکروبی سولفونامیدها و تری‌متوپریم برای درمان عفونت‌های ورم پستانی در اکثر مزارع پرورش درحال افزایش است واستفاده بیش از حد مجاز این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است[۲۵]. Atsumi و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان کردند که کد شدن ژن‌های پلاسمیدی *sul* شامل؛ sul1 ، sul2 و sul3 سبب بروز مقاومت به سولفونامیدها می‌گردد. آنزیم دی هیدرو پتروآت سنتتاز باکتریایی حاصل از کد شدن ژن‌های مذکور شباهت کمی را به PABA از خود نشان می‌دهد (KM ۰/٦~). مشخص شده که محصول ژن sul_2 توانایی تشخیص سوبسترای نرمال PABA را از بازدارنده (Inhibitor) دارد. همچنین مطالعات نشان داده است که شیوع ژن sul_2 بیشتر از ژن sul_1 می‌باشد[۲۶و۲۷]. ژن sul_1 بر روی کلاس یک اینتگرون قرار دارد، اما ژن‌های متالوبتالاکتاماز (MBLs) بر روی کلاس سه اینتگرون‌ها جای می‌گیرند[۲۷و۲۸]. مقاومت به سولفونامیدها معمولا توسط سه ژن *Sul* به صورت Sul_1 و Sul_2 و Sul_3 کد می‌شود که این سه ژن معمولا توسط پلاسمید انتقال می‌یابند. مطالعات انجام شده در نمونه‌های انسانی نشان می‌دهد که شیوع ژن Sul_2 بیشتر از Sul_1 است. نتایج آزمون Multiplex-PCR در تحقیقات ما نشان داد که توزیع ژن‌های Sul_2 و Int_1 به ترتیب برابر ۲٪(N=1) و ۲٪(N=1) می‌باشد. همچنین ژن Sul_3 در هیچ یک از ایزوله‌ها ردیابی نگردید. همانطور که محرز می‌باشد فراوانی ژن Sul_2 بیشتر از ژن Sul_3 بوده که هم عرض با مطالعه ممتاز، صفرپور دهکردی و همکاران در سال ۱۳۹۳ می‌باشد[۲۹]. تحقیقات اخیر نشان داده است که روند بروز مقاومت با انتقال ژن‌های دخیل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی رو به رشد است. در پژوهش اخیر نیز ردیابی یک ایزوله (۲٪) که واجد ژن sul_2 بوده دلیل بر شیوع بیشتر این ژن نسبت به سایر ژن‌های مقاومت به سولفونامیدها دارد.

نتیجه‌گیری

نتیجه این مطالعه و مقایسه با سایر تحقیقات صورت گرفته نشان داد که ژن مقاومت در *اشریشیاکلی‌های* جدا شده از ورم پستان در حد زیادی است. علت اختلاف نتایج بدست آمده از روش M-PCR در این مطالعه با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا ممکن است به علت منبع نمونه و شرایط و مناطق جغرافیایی باشد که در این مطالعه سویه‌های جدا شده از نمونه‌های دامی (شیر) مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که مطالعات سایر محققین در بیشتر موارد بر روی نمونه‌های مبتلا به اسهال خونی انجام شده است.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله اقتباس از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد باکتری شناسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن می‌باشد. بدینوسیله از مسئولین آزمایشگاه دامپزشکی آتیه متعلق به شرکت تامین آتیه سلامت البرز و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

Reference

1. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res 2012;6(39):6811-6.
2. Blum SE, Leitner G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis Escherichia coli. Vet. Microbiol 2013;163(3):305-12.

3. Joklik W, Willett H, Amos D, Wifert C. Salmonella, Shigella, Escherichia coli. Zinsser Microbiology 1992;20:556-63.

4. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw Hill Professional; 2015: 392-09.

5.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014: 756-83.

6. Wang X. Characterization of Escherichia coli colonizing the gastrointestinal tract and urinary tract catheters: Institutionen för mikrobiologi, tumör-och cellbiologi/Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; 2008:423-86.

7. Hsueh P-R, Ko W-C, Wu J-J, Lu J-J, Wang F-D, Wu H-Y, et al. Consensus statement on the adherence to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae in clinical microbiology laboratories in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2010;43(5):452-5.

8. Su C-C, Long F, Zimmermann MT, Rajashankar KR, Jernigan RL, Edward WY. Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of Escherichia coli. Nature 2011;470(7335):558-62.

9. Zhao Y, Yang J, Qin B, Li Y, Sun Y, Su S, et al. Biosynthesis of isoprene in Escherichia coli via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. Appl Microbiol Biotechnol 2011;90(6):1915.

10. Almrud JJ, Kern AD, Wang SC, Czerwinski RM, Johnson WH, Murzin AG, et al. The crystal structure of YdcE, a 4-oxalocrotonate tautomerase homologue from Escherichia coli, confirms the structural basis for oligomer diversity. Biochem 2002;41(40):12010-24.

11. Su H-C, Ying G-G, Tao R, Zhang R-Q, Fogarty LR, Kolpin DW. Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in Enterobacteriaceae isolated from integrated fish farms in south China. J Environ Monit 2011;13(11):3229-36.

12. Aertsen A, Vanoirbeek K, De Spiegeleer P, Sermon J, Hauben K, Farewell A, et al. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in Escherichia coli. J Appl Environ Microbiol 2004;70(5):2660-6.

13. Irfan S, Zafar A, Guhar D, Ahsan T, Hasan R. Metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit patients of a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol 2008;26(3):243.

14. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. Ann N Y Acad Sci 2013;1277(1):84-90.

15. Farajnia S, Alikhani MY, Ghotaslou R, Naghili B, Nakhlband A. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. Int J Infect Dis 2009;13(2):140-4.

16. Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, et al. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. Iran J Microbiol 2015;7(3):127.

17. Norouzi J, Bazzazzadeh N. Detection of Sul2 Gene in Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infections Admitted to Clinical Centers of Khoy City. ZUMS Journal 2013;21(88):76-83.

18. Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. Resistance gene patterns of tetracycline resistant Escherichia coli of human and porcine origin. Vet microbiol 2010;142(3):329-36.

19. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. Vet microbiol 2003;91(1):73-84.

20. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical Escherichia coli strains isolated from diverse human and animal sources. J Appl Environ Microbiol 2004;70(4):2503-7.

21. Arthur M, Johnson CE, Rubin RH, et al. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic Escherichia coli. Infect Immun 1989;57(2):303-13.

22. Rubin RH, Shapiro ED, Andriole VT, Davis RJ, Stamm WE. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. Clin Infect Dis 1992;15(Supplement_1):S216-S27.

23. Moland ES, Black J, Hossain A, Hanson N, Thomson K, Pottumarthy S. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum β-lactamases in Escherichia coli isolates from five US states. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(7):2382-3.

24. Lee SY, Chang HN. High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source. Biotechnol Lett 1993;15(9):971-4.

25. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol 2012;50(9):2951-63.

26.Hammerum AM, Sandvang D, Andersen SR, Seyfarth AM, Porsbo LJ, Frimodt-Møller N, et al. Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant Escherichia coli isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. Int J Food Microbiol 2006;106(2):235-7.

27. Atsumi S, Wu T-Y, Eckl E-M, Hawkins SD, Buelter T, Liao JC. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in Escherichia coli by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. Appl Microbiol Biotechnol 2010;85(3):651-7.

28. Gold HS, Moellering Jr RC. Antimicrobial-drug resistance. N Engl J Med 1996;335(19):1445-53.

29. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013;12(1):8.

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal
Alborz University of Medical Sciences Journal, November 2019, Vol. 8, No. 4: 365-376 *Original Article*

Reza Salimi[1], Ali Chitgar[2], Alireza Mokhtari[*3]

[1] *Department of Microbiology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Microbiology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran*
[3] *Technical Assistant of the Department of Microbiology, Atiyeh Veterinary Laboratory*

Survey and identification of Resistance Genes of Sulfanamide (*sul_2, sul_3*) and Tetracycline *Tet (A), tet (C), tet (D)* and *intI* Integron Genes in *Escherichia Coli* Isolated from Mastitis Samples

Received: 12 Jun. 2018; Accepted: 18 Mar .2019

Abstract

Background and Aims: *Escherichia coli* is a natural microflora of the human heart and all the warm animals. Mastitis is a disease caused by various pathogens. One of the important factors in the production of mastitis in the livestock is *E. coli* and is known as peripheral mastitis. The aim of this study was to isolate sulfonamide, integron and tetracycline resistance genes in *E.coli* isolated from mastitis with clinical symptoms using Multiplex PCR.

Materials and Methods: 50 milk isolates with mastitis symptoms were collected from livestock farms in west of Tehran. Biochemical and microbial tests were performed and antibiotic susceptibility test using disc diffusion method was performed according to CLSI 2016 and E-test with antibiotics of different groups. After isolating the bacteria and extracting DNA, the presence of the genes was investigated by Multiplex PCR.

Results: Based on the findings of this study, out of a total of 50 samples, 1 sample (2%) had *Sul_2* gene and 32 samples (64%) had the *tetA* gene and 11 samples (36%) of the *tetc* gene. Also Int gene was detected in 1 sample of 2% of the samples and the highest antibiotic resistance to the antibiotic sultrim and cotrimoxazole were 68% and 50%, respectively, and the highest sensitivity to tetracycline was 96%.

Conclusion: Comparison of this study with other studies has shown that the resistance gene in *E.coli* isolated from mastitis is high. The difference between the results of the M-PCR method in this study and the results of studies by other researchers in different parts of the world may be due to the source of the sample, while in studies of other researchers, most cases have been studied on samples of blood diarrhea. Another reason for the difference is the difference in geographical areas.

Keywords: *Escherichia coli*, Mastitis, Sulfonamides resistance genes, tetracycline

***Corresponding Author:**
Technical Assistant of the Department of Microbiology, Atiyeh Veterinary Laboratory

Tel: 0919-6977522
E-mail: Alm3370@gmail.com