نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ٤٤، پاییـز ١٤٠١
ص‌ص: ٦٣~٧٠

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع شتر های سالم شهرستان مشهد نسبت به ژن های خانواده های تتراسایکلین، بتالاکتام، سولفانامید، استرپتومایسین، جنتامایسین و کینولون

• **حمید رضا فرزین[1]، فاطمه امانی[2]، علیرضا صدر[3]، محدثه امیری[4]، سید الیاس طباطبایی زاده[5]، رضا محمد زاده[6] مجید جمشیدیان مجاور[7*]**

۱و۳و۵و۷. استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

۲. دکتری تخصصی باکتری شناسی، آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، سازمان دامپزشکی کشور.

۴. بخش تحقیقات – مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.

۶. دانش آموخته ی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۴۰۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۲۵۶۰۰۱

Email: mjmojaver@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2022.128155

چکیده:

هدف این مطالعه تعیین میزان مقاومت و حساسیت باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از شتر های سالم می باشد. باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان مهم ترین عضو خانواده ی *انتروباکتریاسه* و فلور طبیعی روده ی انسان ها، پرندگان و پستانداران می باشد. سویه های *اشریشیاکلی* بیماری زا باعث عفونت روده ای و یا خارج روده ای در میزبان خود می شوند. افزودن آنتی بیوتیک به جیره غذایی دام ها و استفاده نادرست و بیش از حد و خودسرانه از آنتی بیوتیک ها سبب بروز سویه های مقاوم از میکروب ها شده است.

در این مطالعه ٢٦ سوآب معقدی از شتر های سالم شهرستان مشهد جمع آوری شد. سوآب های مقعدی بر روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند و جدایه های بدست آمده توسط تست های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. حضور ژن های *tetA*، *OnRA* ، *blaTEM*، *Sul1*، *aac(3)-IV* و *aadA1* به روش مولکولی با پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید.

بر اساس نتایج بدست آمده ٣٤/٦١ درصد جدایه ها دارای ژن *blaTEM*، ٢ درصد جدایه ها دارای ژن *aadA1*، ٧٣/٠٩ درصد جدایه ها دارای ژن *aac(3)-IV*، ٣٨/٤٦درصد جدایه ها دارای ژن *tetA* و ٧/٦٩ درصد جدایه ها دارای ژن *Sul1* بودند همچنین در این مطالعه میزان فراوانی ژن *OnRA* صفر درصد بوده است.

مقاومت های آنتی بیوتیکی در حیوانات، از طریق گوشت یا دیگر محصولات وارد زنجیر غذایی انسان می شوند. به همین دلیل است که مقاومت های آنتی بیوتیکی یک تهدید برای سلامت انسان و حیوان به شمار می آید و باید جدی گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، شتر، مقاومت آنتی بیوتیکی

Applied Animal Science Research Journal No 44 pp: 63-70

Evaluation of antibiotic resistance of Escherichia coli isolates isolated from feces of healthy camels in Mashhad against genes of tetracycline, beta-lactam, sulfonamide, streptomycin, gentamicin and quinolone families

Hamidreza Farzin[1], Fatemeh Amani[2], Ali Reza Sadr[3], Mohadese Amiri[4] ,Seyed-Elias Tabatabaeizadeh[5], Reza Mohamadzadeh[6],Majid Jamshidian-Mojaver[7*]

1,3,4,5,7.Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

2. PhD in Bacteriology,Central Laboratory of the Veterinary Head Office of Khorasan Razavi Province, Veterinary Organization of the country.

6. Graduate of Biochemistry, Payame Noor University of Mashhad

Received: May 2022 **Accepted: September 2022**

The aim of this study was to determine the resistance and susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy camels. *Escherichia coli* is the most important member of the *Enterobacteriaceae* family and the natural intestinal flora of humans, birds and mammals. Pathogenic *Escherichia coli* strains cause intestinal or extra-intestinal infection in their host. Adding antibiotics to animal feed and misuse and overuse of the antibiotics have caused resistant strains of germs.

In this study, 26 intestinal swabs were collected from healthy camels in Mashhad. Anal swabs were cultured on MacConkey agar medium and the isolates were confirmed by biochemical tests. The presence of *tetA*, *OnRA*, *blaTEM*, *Sul1*, *aac (3) -IV* and *aadA1* genes were investigated by molecular methods with specific primers.

Results showed that 34.61% of isolates had *blaTEM* gene, 2% isolates had *aadA1* gene, 73.09% isolates had *aac (3) -IV* gene, 38.46% isolates had *tetA* gene and 7.69% The percentage of isolates had Sul1 gene. Also, the frequency of *OnRA* gene was zero percent in this study.

Antibiotic resistance in animals enters the human food chain through meat or other products. That is why antibiotic resistance is a threat to human and animal health and must be taken seriously.

Key words: Escherichia coli Antibiotic resistance, Camel,

مقدمه

هدف این مطالعه تعیین میزان مقاومت و حساسیت باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از شتر های سالم می باشد. باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان مهم ترین عضو خانواده ی *انتروباکتریاسه* و فلور طبیعی روده ی انسان ها، پرندگان و پستانداران می باشد. سویه های *اشریشیاکلی* بیماری زا باعث عفونت روده ای و یا خارج روده ای در میزبان خود می شوند. افزودن آنتی بیوتیک به جیره غذایی دام ها و استفاده نادرست و بیش از حد و خودسرانه از آنتی بیوتیک ها سبب بروز سویه های مقاوم از میکروب ها شده است.

در این مطالعه ۲۶ سوآب معقدی از شتر های سالم شهرستان مشهد جمع آوری شد. سوآب های مقعدی بر روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند و جدایه های بدست آمده توسط تست های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. حضور ژن های *tetA*، *OnRA* ، *blaTEM*، *Sul1*، *aac(3)-IV* و *aadA1* به روش مولکولی با پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید.

بر اساس نتایج بدست آمده ۳۴/۶۱ درصد جدایه ها دارای ژن *blaTEM*، ۲ درصد جدایه ها دارای ژن *aadA1*، ۷۳/۰۹ درصد جدایه ها دارای ژن *aac(3)-IV*، ۳۸/۴۶درصد جدایه ها دارای

ژن *tetA* و ۷/۶۹ درصد جدایه ها دارای ژن *Sul1* بودند همچنین در این مطالعه میزان فراوانی ژن *OnRA* صفر درصد بوده است.

مقاومت های آنتی بیوتیکی در حیوانات، از طریق گوشت یا دیگر محصولات وارد زنجیر غذایی انسان می شوند. به همین دلیل است که مقاومت های آنتی بیوتیکی یک تهدید برای سلامت انسان و حیوان به شمار می آید و باید جدی گرفته شود.

کلمات کلیدی:

اشریشیاکلی، شتر، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی*، باکتری بی هوازی اختیاری و بخشی از فلور فیزیولوژیک دستگاه گوارش در تمامی پستانداران و پرندگان خون گرم، محسوب می گردد با این حال، برخی از سویه های *اشریشیاکلی* با بیماری های دستگاه ادراری و تناسلی، اسهال و استفراغ، سپتی سمی و عفونت های پلورال در انسان و حیوانات در ارتباط می باشند (۱).

مقاومت میکروبی یکی از بزرگترین تهدید های سلامتی در سراسر جهان است. مقاومت میکروبی یا مقاومت دارویی عبارت است از کاهش اثر یک دارو در درمان یک بیماری یا کاهش اثر آن در بهبود نشانه های بالینی حاصل از آن. مقاومت میکروبی به طور طبیعی رخ میدهد اما سوء استفاده از آنتی بیوتیک ها در انسان و دام روند مقاومت میکروبی را به طور قابل توجهی تسریع می کند. در واقع مقاومت میکروبی به معنای مقاومت یک میکروارگانیسم به یک یا چند داروی ضد میکروبی است که پیش از آن به این داروها حساس بوده است. مقاومت میکروبی در مورد انواع گوناگون پاتوژن ها شامل باکتری ها، انگل ها، ویروس ها، قارچ ها و سلول های سرطانی اتفاق می افتد و ممکن است حیات هر فردی، در هر سن و در هر کشور را تهدید نماید (۲و۳).

اخیراً مقاومت دارویی *اشریشیاکلی* به چندین آنتی بیوتیک از دسته های دارویی مختلف شامل آمینوگلیکوزیدها، کینولون ها، تتراسیکلین ها، سولفانامید ها و آنتی بیوتیک های بتالاکتام مورد توجه قرار گرفته است. به عبارتی یکی از مشکلات مهم در بخش درمان، هم در حوزه پزشکی و هم در حوزه دامپزشکی، روند پیشرونده مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت درمان است (۶و۵و۴).

مقاومت به داروهای ضدمیکروبی مورد استفاده در طب دامپزشکی، منجر به مخاطرات در بهداشت عمومی، مخاطرات در صنایع غذا و بهداشت مواد غذایی، مخاطرات محیط زیست و همچنین منجر به تضعیف اقتصاد جهانی گردیده است (۷). از مهم ترین دلایل بروز این مشکل، استفاده ی بی رویه ی آنتی بیوتیک ها در صنعت پرورش دام، طیور و در عرصه ی پزشکی است (۸) .

هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان مقاومت و حساسیت جدایه های *اشریشیاکلی* جدا شده از مدفوع شتر می باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۲۶ سوآب مدفوع شتر های سالم شهرستان مشهد اخذ شد. به منظور جداسازی و شناسایی فنوتیپی باکتری *اشریشیاکلی*، نمونه ها در محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و به منظور تایید نهایی پرگنه های مشکوک، از تست های بیوشیمیایی (تست اوره، سیمون سیترات، TSI (Triple Sugar Iron) و SIM (Sulfid Indol Motility) استفاده شد. پس از تایید جدایه های مذکور جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد (۹). برای انجام PCR به منظور ردیابی ژن های مورد مطالعه، از پرایمر های اختصاصی معرفی شده در مطالعات جدول ۱ استفاده شد. از سویه استاندارد *کلبسیلا* ۷۰۰۶۰۳ATCC به عنوان کنترل مثبت ژن *blaTEM* و برای ژن های *tetA*، *Sul1*، *aadA1*، *aac(3)-IV* از کنترل های مثبت مطالعه ی امیری و همکاران استفاده گردید همچنین از آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۰). جهت انجام PCR از مستر میکس آماده به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، ۰/۱ از هر کدام از پرایمر ها DNA نمونه های مورد نظر به میزان ۵ میکرولیتر و آب مقطر استریل تا حجم واکنش (۲۵ میکرو لیتر) استفاده شد.

برنامه دمایی مورد استفاده جهت ردیابی ژن های مذکور در دستگاه ترموسایکلر در منابع جدول شماره ۱ آورده شده است. برای شناسایی سویه هایی که از نظر ژن ها و توالی های مورد نظر مثبت بودند، تمامی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸

درصد، الکتروفورز گردید. بدین منظور ابتدا بافر TBE تهیه شد و پس از ساخت ژل آگارز، نمونه ها در آن الکتروفورز شدند و ژل مربوطه با ژل داک از ژل عکس برداری شد و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن های مورد مطالعه

ژن های مورد مطالعه	اندازه ی محصول(bp)	منبع
tetA	۵۰۲	(۱۱)
blaTEM	۲۴۷	(۱۱)
Sul1	۴۳۳	(۱۲)
aadA1	۴۴۷	(۱۳)
aac(3)-IV	۲۸۶	(۱۴)
OnRA	۵۸۰	(۱۵)

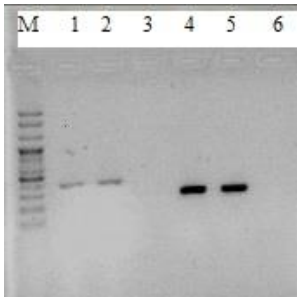
نتیجه‌گیری

نتیجه ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *tetA*، *blaTEM*، *OnRA* ، *aadA1*، *aac(3)-IV* و *Sul1*

از میان ۲۶ جدایه مورد بررسی همه ی جدایه ها دارای یک یا چند ژن مقاومت آنتی بیوتیکی بودند، که ۳۴/۶۱ درصد دارای ژن *blaTEM*، ۲ درصد دارای ژن *aadA1*، ۷۳/۰۹ درصد دارای ژن *aac(3)-IV*، ۳۸/۴۶درصد دارای ژن *tetA*، صفر درصد ژن *OnRA* و ۷/۶۹ درصد دارای ژن *Sul1* بودند. جدول شماره ۲ و همچنین تصاویر شماره ۲،۱و۳ بیانگر نتیجه آزمایش PCR نسبت به ژن های مورد بررسی می باشد. از سویه استاندارد *کلبسیلا* ATCC۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت ژن *blaTEM* و برای ژن های *tetA*، *OnRA*، *Sul1*، *aadA1*، *aac(3)-IV* از کنترل های مثبت مطالعه ی امیری و همکاران استفاده گردید همچنین از آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول۲: میزان فراوانی ژن های مورد مطالعه

Antimicrobial agents	Gene	میزان فرواوانی
Oxytetracycline	*tetA*	۳۸/۴۶ درصد
β-Lactamase	*blaTEM*	۳۴/۶۱ درصد
Sulfonamide	*Sul1*	۷/۶۹ درصد
Streptomycin	*aadA1*	۲ درصد
Gentamicin	*aac(3)-IV*	۷۳/۰۹ درصد
Quinolone	*OnRA*	۰ درصد



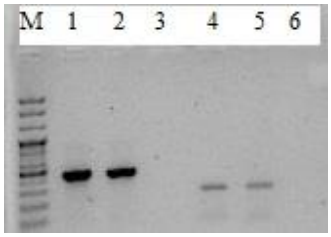
تصویر شماره ۱

نتیجه ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *aadA1* و *Sul1*

M: lad 100bp

ستون شماره ۱ ژن (*aadA1*, 447 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *aadA1*، ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *aadA1*

ستون شماره ۴ ژن (*Sul1*,433 bp)، ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *Sul1*، ستون شماره ۶ کنترل منفی *Sul1*



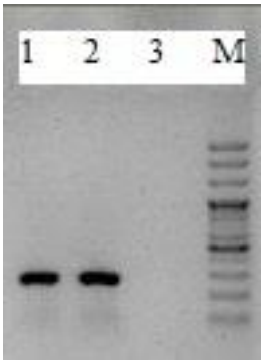
تصویر شماره ۲

نتیجه ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *tetA*، *aac(3)-IV*

M: lad 100bp

ستون شماره ۱ ژن (*tetA*, 502 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *tetA*، ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *tetA*

ستون شماره ۴ ژن (*aac(3)-IV*, 286 bp)، ستون شماره ۵ کنترل مثبت ژن *aac(3)-IV*، ستون شماره ۶ کنترل منفی ژن *aac(3)-IV*



تصویر شماره ۳

نتیجه ی آزمایش PCR جهت شناسایی ژن *blaTEM*

M: lad 100bp

ستون شماره ۱ ژن (*blaTEM*, 247 bp)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت ژن *blaTEM*

ستون شماره ۳ کنترل منفی ژن *blaTEM*

بحث

در این مطالعه تعداد ۲۶ سوآب مقعدی از شتر های سالم شهرستان مشهد جمع آوری شد و به بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *اشریشیاکلی* جدا شده از فلور فیزیولوژیک دستگاه گوارش پرداخته شد. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های مذکور نسبت به ژن های *tetA*، *OnRA* ، *blaTEM*، *Sul1*، *aadA1* و *aac(3)-IV* بررسی شد. بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این پژوهش مربوط به ژن *aac(3)-IV* (۷۳/۰۹ درصد) بود و ژن های *tetA* (۳۸/۴۶ درصد)، *blaTEM* (۳۴/۶۱ درصد)، *Sul1* (۷/۶۹ درصد)، *aadA1* (۲ درصد) و *OnRA* (صفر درصد) بعد از آن قرار گرفتند.

نادری و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *اشریشیاکلی* جدا شده از موفوع گوساله های اسهالی کرمان پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این بود که بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به ژن ۲۰درصد)، سولفانامید (۱۱/۲ درصد) و بتالاکتام (۱۱/۷ درصد) بود (۱۶). *aadA1* (حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ارومیه به بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های *اشریشیاکلی* جدا شده از ۱۰۵ گاو میش پرداختند. در این پژوهش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۷).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه "تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی "شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H., Marches O., Caprioli A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* characterization of a new intimin variant, Infect. Immun, 6(8): 64-71.

2. world health organization. Antibiotic resistance: WHO; 2015

3. Yavari P. Antimicrobial resistances. In: SHarifi H, Akbarian H, Bloki Z. (2014). Epidemiology Textbook of Prevention diseases in Iran. 1. Rasht: GAPNashr, 10(8): 373- 93

4. Caniça, M., Ferreira, M., Ferreira, E., & Cabral, L. (2000). Phenotype and molecular characterization of the first inhibitor-resistant TEM-derived β-lactamase identified in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11): 3688-3689.

5. Costa, D., Vinué, L., Poeta, P., Coelho, A. C., Matos, M., Sáenz, Y. & Torres, C. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary microbiology*, 138(3): 339-344.

6. Daoud, Z., Moubareck, C., Hakime, N., & Doucet-Populaire, F. (2006). Extended spectrum β- lactamase producing enterobacteriaceae in lebanese ICU patients: epidemiology and patterns of resistance. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52(3): 169-178.

7. Yavari P. Antimicrobial resistances. In: SHarifi H, Akbarian H, Bloki Z, editors. (2014). *Epidemiology Textbook of Prevention diseases in Iran*,10(5): 373- 93

8. Ghanbarpour R, Daneshdoost S. (2012). Identification of Shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (Columba livia) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. *Tropical animal health and production*,44(2):307-12.

9. Askari Badouei M, Jajarmi M, Mirsalehian A. (2015). Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 3(8):15-20.

10. Amiri M, Farzin H, Jamshidian-Mojaver M. (2019). Phenotypic and Genotypic Study of Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Human Urinary Infection Cases in Bojnord Province. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, 26(3):173-180.

11. Kozak G, Boerlin P, Janecko N, Jardine C.(2009). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada,75(3): 559–566.

12. Kerrn M, Klemmensen T, Espersen F. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring ulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3): 513–516.

13. Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. (2007). Portuguese Resistance Study Group. High diversity of extended-spectrum betalactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother*, 60(6): 1370-1374.

14. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3):217-223.

15. CattoirV., Poirel L., Rotimi V., Soussy C. J., Nordmann P. (2007).Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistanceqnr genes in ESBL-producing *enterobacterial* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(2):394–397.

16. Naderi Z, Ghanbarpour R, Sami M. (2016). Antimicrobial resistance characteristics and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in southeast of Iran. *Int J Enteric Pathogen*, 4(4):537-548.

17. Hoseini, S.Sh., Dastmalchi Saei, H., Ownagh, A. (2014). Molecular detection of extended spectrum *β-lactamase* (*ESBL*) genes *bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*SHV in *Escherichia coli* isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) feces in West Azerbaijan province, Iran. *Journal of Veterinary Research*, 69(3):203-212.