

## شناسایی ژن‌های مقاومت به سولفانامید ( $sul_3$ ، $sul_2$ )، تتراسایکلین ( $tet(A)$ )، $tet(C)$ ، $tet(D)$ و اینتگرون $intI$ در نمونه‌های شیر/شیرشیکلی جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان (Mastitis)

رضا سلیمی<sup>۱</sup>، علی چیتگر<sup>۲</sup>، علیرضا مختاری<sup>۳</sup>

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

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

### چکیده

**زمینه و اهداف:** باکتری /شیرشیکلی جزء میکروفلور طبیعی روده 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 و تحت عنوان ورم پستان‌های محیطی شناخته می‌شود. این مطالعه با هدف جداسازی ژن‌های مقاومت سولفونامیدی، اینتگرون و تتراسایکلین در /شیرشیکلی جدا شده از ورم پستان با علائم بالینی به روش Multiplex PCR انجام گرفته است.

**مواد و روش کار:** 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 آنتی‌بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید. پس از جداسازی باکتری و استخراج DNA، حضور ژن‌های مورد مطالعه به روش Multiplex PCR بررسی شد.

**یافته‌ها:** براساس یافته‌های این پژوهش از مجموع ۵۰ نمونه، انمونه (۲٪) دارای ژن  $Sul_2$  و ۳۲ نمونه (۶۴٪) واجد ژن  $tetA$  و ۱۱ نمونه (۳۶٪) ژن  $tetC$  بود. همچنین ژن  $Int$  در انمونه معادل ۲٪ از نمونه‌ها شناسایی و بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیک به آنتی‌بیوتیک سولتریم و کوتریموکسازول به ترتیب ۶۸٪ و ۵۰٪ و بیشترین حساسیت به تتراسایکلین ۹۶٪ گزارش شد.

**بحث:** مقایسه این مطالعه با سایر تحقیقات صورت گرفته نشان داد که ژن مقاومت در /شیرشیکلی‌های 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 و تفاوت در مناطق جغرافیایی باشد، در مطالعات سایر محققین بیشتر موارد بر روی نمونه‌های مبتلا به اسهال بررسی شده است.

**کلمات کلیدی:** /شیرشیکلی، ورم پستان، ژن‌های مقاومت سولفانامیدی، تتراسایکلین

**نویسنده مسئول:**

مسئول فنی بخش میکروب‌شناسی،  
آزمایشگاه دامپزشکی آتیه البرز

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

## مقدمه

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. مقاومت به سولفانامیدها معمولاً توسط سه ژن  $Sul_1$ ،  $Sul_2$  و  $Sul_3$  کد می‌شود که این سه ژن معمولاً توسط پلاسمید انتقال می‌یابند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که شیوع ژن  $Sul_2$  بیشتر از  $Sul_1$  است. 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 پاتوورهای/شریشیالکی به کار می‌رود. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط/شریشیالکی جدا شده از ورم پستان بوده که با بررسی جداسازی همزمان جنس و ژن مقاومت سولفونامیدی و تتراسایکلین اشریشیالکی ایزوله شده از ورم پستان با علائم با روش Multiplex PCR می‌باشد. در همین راستا تشخیص و جداسازی هم زمان ژن مقاومت سولفونامیدی و تتراسایکلین و اینتگرون/شریشیالکی 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/شریشیالکی 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 گاودارهای منطقه غرب تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در نهایت با انجام کشت و جداسازی و شناسایی نمونه‌ها مطابق بخش‌های بعدی ذکر شده تعداد ۵۰ باکتری/شریشیالکی جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان جهت انجام آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

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 اشریشیالکی یکی از معمول ترین باکتری‌های روده‌ای کامنسالی است که می‌تواند عامل عفونت‌های گوارشی و خارج گوارشی به شمار آید<sup>۱</sup>. 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 تغییر یافته زنده می‌ماند و آسیب‌های جدیدی به سیستم بدن وارد می‌کند. استفاده از هر ماده ضد میکروبی می‌تواند ایجاد مقاومت در جمعیت میکروارگانیزم‌ها را هدف کند و در نهایت ژن‌های مقاوم و باکتری‌های مقاوم را ایجاد نماید<sup>۲</sup>. از آن جایی که ژن‌های مقاوم برای انتقال از هیچ‌گونه 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<sup>۳</sup>. 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

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

Ciprofloxacin EzyMIC Strip (CIP) =  $\frac{mcg}{ml}$  (0.002-32)

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

### آغازگرها (پرایمرها)

پرایمر الیگونوکلئوتیدی اساسی ترین عامل موثر بر راندمان و اختصاصی شدن واکنش PCR می باشد. طراحی دقیق پرایمر برای بدست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیر اختصاصی ضروری است. معمولاً  $M^{1-}$  از تکثیر در هر واکنش مورد نیاز می باشد<sup>۱۰-۸</sup>.

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام گردید. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل  $1/5mM$  کلرید منیزیم،  $250 \mu mol$  از  $dNTP$ ،  $0/4 \mu mol$  از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های حدت و  $1/5$  واحد از  $Taq$  پلی مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۰ نانو گرم) الگو انجام شد. شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ سیکل هر کدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

### بهینه سازی PCR

بهینه سازی یعنی تعیین غلظت‌های مناسب مواد واکنشگر و دمای مناسب اتصال پرایمرها (Ta) جهت به دست آوردن محصول PCR مناسب است<sup>۱۰-۸</sup>.

### 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 /شریشیاکلی 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<sup>۹</sup>.

### 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 هیتون آگار انتقال داده و به طور کامل بوسیله سوآب بر روی محیط، کشت شد. بعد از کشت، دیسک‌های آنتی بیوتیک (دیسک‌های آنتی بیوتیک، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، جنتامایسین، سپیروفلوکسازین، سفتریاکسون، آموکسی سیلین، کوتریموکسازول، سولتریم) بر روی محیط کشت منتقل گردید. بعد از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، 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 دیسک‌ها، گزارش تست آنتی بیوگرام برای هر یک از آنتی بیوتیک‌ها به صورت حساس (Susceptible)، مقاوم (Resistant) و یا نیمه حساس (Intermediate) گزارش گردید<sup>۹</sup>.

### 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 آنتی بیوتیک‌های مورد نظر صورت پذیرفت<sup>۱۰</sup>. در این روش برای آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و سپیروفلوکسازین از نوع نواری (Strip) استفاده شد<sup>۹</sup>.

Gentamicin (GEN) : Concentration ( $\mu g$ ) =

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام مولتی پلکس پی سی آر<sup>۱۱</sup> (Multiplex-polymerase chain reaction)

نام پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	ژن هدف	اندازه باند (bp)
Sul2-f	F= 5 -GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3	<i>Sul</i>	۲۹۳
Sul2-r	R= 5- GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3	<i>Sul</i>	
Sul3-f	TCC GTT CAG CGA ATT GGT GCA G	<i>Sul</i>	۱۲۸
Sul3-r	TTC GTT CAC GCC TTA CAC CAG C	<i>Sul</i>	
tet(A)-f	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	<i>tet</i> (A)	۲۱۰
tet(A)-r	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	<i>tet</i> (A)	
tet(C)-f	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	<i>tet</i> (C)	۴۱۸
tet(C)-r	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	<i>tet</i> (C)	
tet(D)-f	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	<i>tet</i> (D)	۷۸۷
tet(D)-r	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC	<i>tet</i> (D)	
Int 1-f	F= 5- GCCACTGCGCCGTTACCACC-3	<i>Int</i>	۸۹۸
Int 1-r	R= 5-GGCCGAGCAGATCCTGCACG-3	<i>Int</i>	

## 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 اریترورژل و مشاهده مستقیم آن تحت تأثیر تابش نور ماورای بنفش تشخیص داده می‌شود.

## نتایج

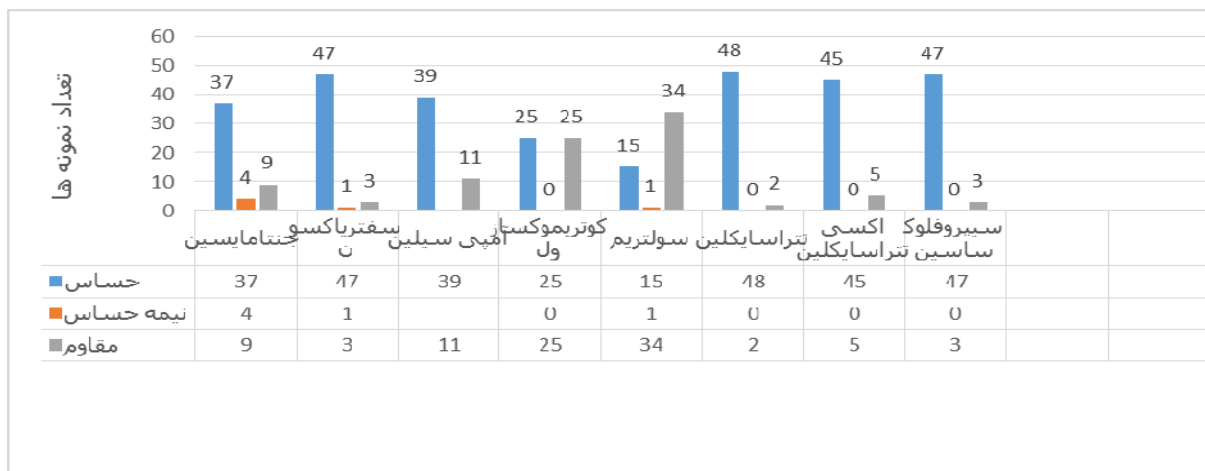
**نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های جداشده:** بعد از کشت دادن نمونه‌های جمع‌آوری شده، باکتری *E. coli* بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی گردید. نتایج این تست‌ها به قرار زیر است: سیترات منفی، تولید SH2 منفی، نیترات مثبت، MR مثبت، VP منفی، اوره آزمنفی، اندول مثبت، دامیناسیون فینل آلانین منفی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

**بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی:** به منظور بررسی مقاومت-های آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، آنتی‌بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد و میزان درصد حساسیت و مقاومت کلیه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های 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 ۶۸٪ و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۴٪ و بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به میزان ۹۶٪ نسبت به تتراسایکلین 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.

جدول ۲: جدول میزان حساسیت جدایه‌های دامی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت (%)	حساسیت متوسط (%)	میزان حساسیت (%)
	Resistance	Intermediate	Sensitive
جتاماسین	۹ (۱۸)	۴ (۸)	۳۷ (۷۴)
سفتریاکسون	۳ (۶)	۱ (۲)	۴۷ (۹۲)
آمپی‌سیلین	۱۱ (۲۲)	-	۳۹ (۷۸)
کوتریموکسازول	۲۵ (۵۰)	-	۲۵ (۵۰)
سولتریم	۳۴ (۶۸)	۱ (۲)	۱۵ (۳۰)
تتراسایکلین	۲ (۴)	-	۴۸ (۹۶)
اکسی‌تتراسایکلین	۵ (۱۰)	-	۴۵ (۹۰)
سیپروفلوکساسین	۳ (۶)	-	۴۷ (۹۲)



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 هیتون آگار پس از انکوباسیون

جدول ۳: نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های منتخب/شریشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و

سیپروفلوکساسین به روش E-test

CP	GM	شماره نمونه
25µg- 22 mm	2µg- 25 mm	۱
15µg- 22 mm	2µg- 22 mm	۲
10µg- 22 mm	2µg- 22 mm	۱۰
25µg- 22 mm	5µg- 11 mm	۱۴
R	50µg- 11 mm	۱۶
R	R	۲۵
R	R	۳۰
25µg- 22 mm	2µg- 20 mm	۴۵

نتایج حاصل از آزمون مولکولی با استفاده از

#### روش Multiplex PCR

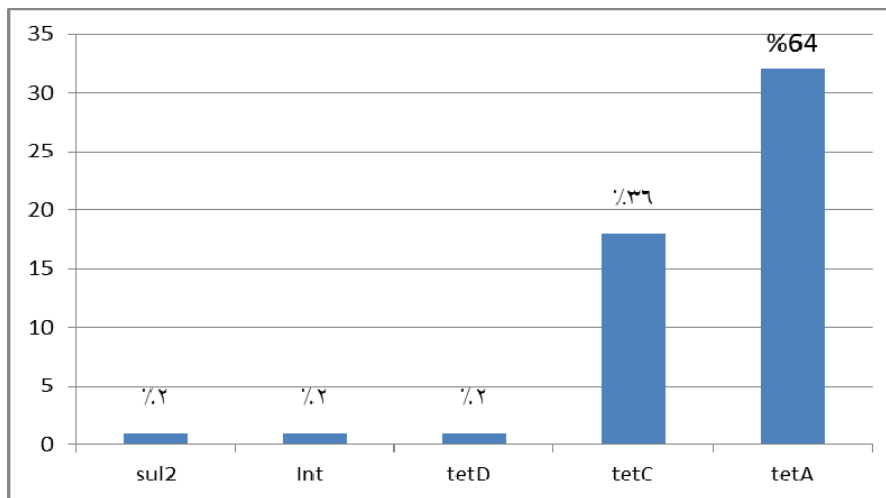
در این مطالعه ۵ جفت ژن *Int*، *Sul<sub>2</sub>*، *Sul<sub>3</sub>*، *tetA*، *tetC*، *tetD* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۵۰ نمونه شیر جدا شده از نمونه‌های ورم پستانی که وجود باکتری/شریشیاکلی در آنها به اثبات رسیده بود، میزان فراوانی ژن‌ها به ترتیب: ژن *tetA* ۶۴٪، ژن *tetC* ۳۶٪، و ژن *Int* و *tetD* ۲٪ بود. ولی ژن‌های *Sul<sub>2</sub>* و *Sul<sub>3</sub>* در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید.

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E-test

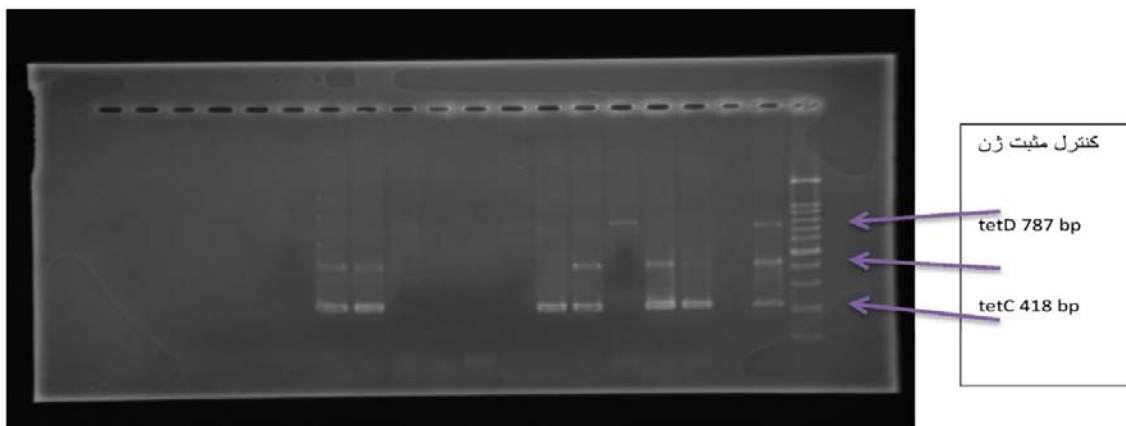
تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E-test برای ۲ آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بر روی برخی از جدایه‌های منتخب صورت گرفت. انجام این تست بر اساس پروتکل استاندارد CLSI بوده (۷) و به عنوان کنترل نیز از سویه استاندارد استفاده گردید. کمترین میزان غلظت داروهای مورد استفاده مربوط به داروی جنتامایسین با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

جدول ۴: فراوانی ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه

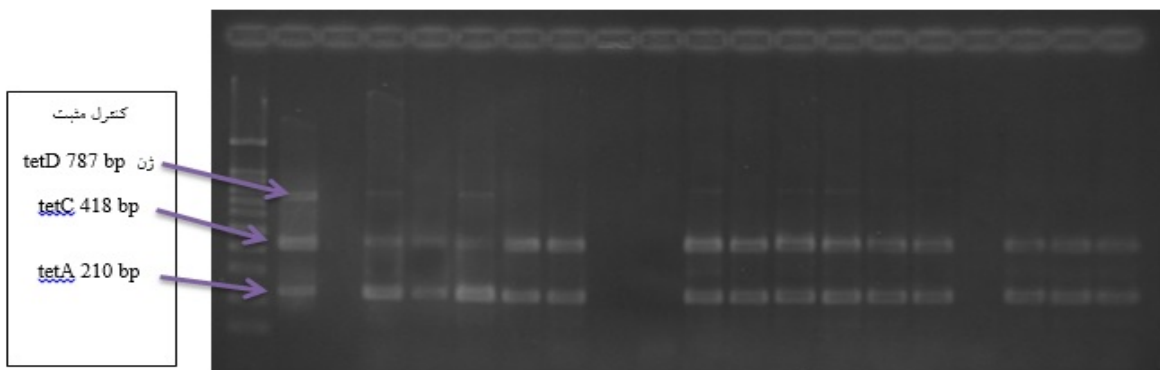
ژن	تعداد	درصد
<i>Sul<sub>2</sub></i>	۱	۲
<i>Sul<sub>3</sub></i>	۰	۰
<i>tetA</i>	۳۲	۶۴
<i>tetC</i>	۱۸	۳۶
<i>tetD</i>	۱	۲
<i>Int</i>	۱	۲



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 ۲۰-۴ نمونه‌های شماره ۱۸-۳۴. نمونه‌های چاهک شماره ۱۰ و ۱۱ و ۲۰-۱۵ فاقد 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 ۲۰-۴ نمونه‌های شماره ۱-۱۷. نمونه‌های چاهک شماره ۹ و ۱۰ فاقد هر نوع ژن مقاومت به تتراسایکلین می‌باشند.

## بحث

ایزوله‌های مقاوم به سولفونامیدها که هاله عدم رشد را تشکیل نداده بودند وجود داشت. در ایزوله‌هایی که دارای ژن *sul*<sub>2</sub> 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<sup>۱۷</sup>. در مطالعه‌ای که Schwaiger سال ۲۰۰۹ نتایج آن را منتشر نمود در میان ایزوله‌های انسانی و حیوانی انجام شده، ژن *tetA* 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 ژن *sulIII* (۴۰٪) در نمونه‌های حیوانی و ۶۲٪ (در نمونه‌های انسانی) مشاهده شد<sup>۱۸</sup>. Lanz و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش نمودند که بیشترین میزان مقاومت در نمونه‌های/شریشیاکلی انسانی و دامی جداسازی شده مربوط به ژن‌های (*tetA*، *tetB*) و سولفانامید (*sulIII*) مشاهده گردید. همچنین میزان بروز مقاومت به اینتگرون کلاس ۱ بیشتر در نمونه‌های مقاوم به سولفانامید *sulI* مشاهده گردید<sup>۱۹</sup>. 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/شریشیاکلی 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<sup>۲۰</sup>. Rubin در سال ۱۹۹۲ با بررسی مقاومت به سولفونامیدها به این نتیجه رسید که میزان مقاومت پاتوژن‌های دستگاه ادراری به آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح جهان در حال 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: آمپی‌سیلین ۲۰ تا ۴۷٪، متی‌سیلین صفر تا ۷٪، تری‌متوپریم ۱۰ تا ۲۸٪، سولفامتوکسازول ۲۲ تا ۴۷٪ و نیتروفورانتوئین ۰ تا ۳٪.

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<sup>۲۱</sup>. 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 موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌های مقاومت چندگانه (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<sup>۱۴، ۱۳</sup>. فرج‌نیا 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 نسله‌های جدید آنتی‌بیوتیک‌های موثرتر و مقرون به صرفه‌تر مورد توجه قرارگیرد<sup>۱۶، ۱۵</sup>. برخی محققین با ردیابی ژن *sul*<sub>2</sub> 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*<sub>2</sub> در ۵۷ ایزوله (۸۰٪) از آن‌ها مشاهده شد. این ژن در



آزمون Multiplex-PCR در تحقیقات ما نشان داد که توزیع ژن‌های *Sul2* و *Int1* به ترتیب برابر  $(N=1)/.2$  و  $(N=1)/.2$  می‌باشد. همچنین ژن *Sul3* در هیچ یک از ایزوله‌ها ردیابی نگردید. همانطور که محرز می‌باشد فراوانی ژن *Sul2* بیشتر از ژن *Sul3* بوده که هم عرض با مطالعه ممتاز، صفرپور دهکردی و همکاران در سال ۱۳۹۳ می‌باشد.<sup>۲۹</sup> 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 *sul2* بوده دلیل بر شیوع بیشتر این ژن نسبت به سایر ژن‌های مقاومت به سولفونامیدها دارد.

### نتیجه گیری

نتیجه این مطالعه و مقایسه با سایر تحقیقات صورت گرفته نشان داد که ژن مقاومت در *اشریشیاکلی*‌های 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.

Moland.<sup>۲۲،۲۱</sup> 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 هر دو 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 هیچ کدام از این مطالعات مانند این مطالعه همراهی ژن مقاومت به تتراسایکلین از نوع A-D مشاهده نشده است.<sup>۲۴،۲۳</sup> 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 ضد میکروبی سولفونامیدها و تری‌متوپریم برای درمان عفونت‌های ورم پستانی در اکثر مزارع پرورش درحال افزایش است و استفاده بیش از حد مجاز این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است.<sup>۲۵</sup> 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 دی‌هیدرو پتروآت سنتتاز باکتریایی حاصل از کد شدن ژن‌های مذکور شباهت کمی را به PABA از خود نشان می‌دهد (۶/۶ KM). مشخص شده که محصول ژن *sul2* توانایی تشخیص سوبسترای نرمال PABA را از بازدارنده (Inhibitor) دارد. همچنین مطالعات نشان داده است که شیوع ژن *sul2* بیشتر از ژن *sul1* می‌باشد.<sup>۲۶،۲۷</sup> ژن *sul1* بر روی کلاس یک ایتگرون قرار دارد، اما ژن‌های متالوبتالاکتاماز (MBLs) بر روی کلاس سه ایتگرون‌ها جای می‌گیرند.<sup>۲۸،۲۷</sup> مقاومت به سولفونامیدها معمولاً توسط سه ژن *Sul* به صورت *Sul1* و *Sul2* و *Sul3* کد می‌شود که این سه ژن معمولاً توسط پلاسمید انتقال می‌یابند. مطالعات انجام شده در نمونه‌های انسانی نشان می‌دهد که شیوع ژن *Sul2* بیشتر از *Sul1* است. نتایج

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, Nakhband 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.

Reza Salimi<sup>1</sup>, Ali Chitgar<sup>2</sup>,  
Alireza Mokhtari<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology,  
Roudehen Branch, Islamic  
Azad University, Roudehen,  
Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor,  
Department of Microbiology,  
Roudehen Branch, Islamic  
Azad University, Roudehen,  
Iran

<sup>3</sup> Technical Assistant of the  
Department of Microbiology,  
Atiyeh Veterinary Laboratory

## Survey and identification of Resistance Genes of Sulfanamide (*sul*<sub>2</sub>, *sul*<sub>3</sub>) 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*<sub>2</sub> 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