بررسی مولکولی ژنهای *پلاسمیدی مقاومت به کینولونهای* جداشده از *اشریشیاکلی* مقاوم به آنتی بیوتیک ایجاد کننده ورم پستان در گاوهای شیری

فتاحی، ح.[۱*]، شهریور، م.[۲]، جویبار، ف.[۳]، جوکار، ف.[۴]، هاشمی نسب، س.ع.[۵].

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

خلاصه

ورم‌پستان(Mastitis) بیماری مهمی است که در تمام دوران زندگی می‌تواند دام را مبتلا کند. باکتری گرم‌منفی *اشریشیاکلی* یکی از عوامل ایجاد کننده ی این بیماری است. هدف از این مطالعه بررسی جدایه‌های *اشرشیاکلی* واجد ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک های خانواده کینولون ها در شیرگاوهای مبتلا به ورم‌پستانی با استفاده از تکنیک مولتی‌پلکس PCR است .در این مطالعه از۱۵۰نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم‌پستان استفاده شد. نمونه‌های شیر برای ارزیابی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه کازرون ارسال گردید.پس از کشت،کلونی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* جدا و مطابق با جداولCLSI میزان حساسیت سویه‌های جداشده مورد ارزیابی قرارگرفت . نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که از میان ۱۷ جدایه *اشرشیاکلی* مقاوم به انروفلوکساسین(۳۶/۳۶ درصد) ، ۱ جدایه دارای ژن *qnrB* ، ۱ جدایه دارای ژن *qnrS* و ۱ جدایه نیز دارای هر دو ژن *qnrS* و *qnrB* و از ۷ جدایه *اشرشیاکلی* مقاوم به فلوموکوئین؛ ژن *qnrS* دریک سویه و ژن *qnrB* نیز در یک سویه مشاهده شد و همچنین یک سویه نیز دارای هر دو ژن *qnrS* و *qnrB*بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد وقوع مقاومت به کینولون‌ها در سویه‌های بیماریزای *اشریشیاکلی* بدلیل مصرف نادرست فلورکینولونها،می‌تواند به عنوان خطری در بهداشت عمومی باشد. نتایج نشان داد که ژنهای *qnrS* و*qnrB* مهم‌ترین عوامل ژنتیکی دخیل درمقاومت پلاسمیدی علیه کینولونها و فلورکینولونها در این مطالعه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: ورم‌پستان گاوشیری، *اشریشیاکلی*، PCR، ژنهای مقاومت به کینولون ها

---

۱. استادیار گروه میکروبیولوژی،گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون،کازرون، ایران.
۲. دانشجوی دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران.
۳. مربی گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران.
۴. دانشجوی دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران.
۵. دانشجوی دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران.
*نویسنده مسئول: fattahi_h@sums.ac.ir

مقدمه

ورم پستان Mastitis یکی از بیماری های مهمی است که در دوران شیرواری و هم دوران خشکی، پستان های دام را مبـــتلا می کـــند و به عنـــوان پر هزینه ترین بیماری گاو شیری در سراسر جهان مطرح است به طوری که سالیانه خسارات زیادی را به صنعت دام پروری در جهان وارد می سازد(رمضان زاده و همکاران، ۲۰۱۰) ..خسارات اقتصادی آن ناشی از کاهش تولید و افت کیفیت شیر، هزینه های درمان، دامپزشک و حتی تلفـــات دامی می باشد. در بسیاری از کشورها تورم پستان یکی از شایع ترین بیماری ها در بیـــن گـــاوهای شیری است. مهم ترین تغییراتی که در نتیجه ورم پستان در شیر ایجاد می شود شامل: تغییر رنگ، وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لوکوسیت(گلبول سفید) با علائم تورم، گـــرمی، درد و ســـفت شـــدن غـــدد پستانی می باشد(Burvenich و همکاران ، ۲۰۰۳). بقایای داروهای دامپزشکی در مواد غذایی می توانند در انسان سرطان زا، جهش زا، عجیب الخلقه زایی، حساسیت زا و یا مسموم کننده باشند(Quinn و همکاران ۲۰۰۲). باکتری های مسبب ورم پستان محیطی از قبیل *اشریشیا کلی، استرپتوکوکوس یوبریس، سیترو باکتر، آنترو باکتر، پزودوموناس آئروژینوز، باسیلوس سرئوس، باسیلوس لیچینی فورمیس، پاستورلا، استرپتوکوکوس فکالیس* و سایر میکروارگانیسم‌ها می باشد(Zaatout ، ۲۰۲۲).

اخیراً مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها به عنوان یک مشکل بزرگ در سلامت عمومی در نظر گرفته می شود و مواد غذایی فاکتور مهمی برای انتقال عوامل باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک هستند. توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی خصوصا مقاومت به کینولونها که با واسطه ی پلاسمید عمل می‌کنند سریعا باعث انتقال ژن مقاومت دارویی به *اشرشیا کلی‌های* حساس و سایر باکتریهای گرم منفی گردیده و ارگانیزم را نسبت به درمان مقاوم می کنند(Lim *et al* ، ۲۰۱۰). گونه‌های وحشی باکتری‌ها حساسیت یا مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند. عفونتهای ایجاد شده توسط این باکتری به وسیله ی آنتی بیوتیک هایی که از لحاظ ساختمانی غیر مرتبط می‌باشند نظیر بتالاکتامها، آمینوگلیکوزیدها و کینولونها درمان می‌شوند. مقاومت به کینولونها ممکن است ذاتی یا اکتسابی باشد. میزان مقاومت ذاتی در گونه های باکتریایی نسبت به کینولونها با میزان حساسیت محل‌های مورد هدف دارو و همچنین میزان بیان پمپ‌های داخلی خارج کننده تعیین می‌شود. بررسی توپوایزومرازها نشان داده که کینولونها اثرات متفاوتی علیه دو آنزیم مورد هدف خود دارند(Lim *et al*، ۲۰۱۰).

پلاسمید ساختار ژنتیکی مجزایی در باکتری بوده که به صورت خودمختار رونویسی شده وبین ۳ تا ۳۰۰ ژن اضافی را با خود حمل می‌نمایند. ویژگی های بسیار وگوناگونی توسط پلاسمید در باکتری بوجود می آید. ماهیت پلاسمید در باکتریها دائما با از دست دادن یا کسب کردن ژنهای جدید تغییر می کنند. پلاسمیدهایی که منجر به ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند، فاکتورهای R نامیده می شوند. اولین بار فاکتور R در باکتری مقاوم به پنی‌سیلین در دهه‌ی ۱۹۵۰ کشف گردید. این پلاسمیدهای R مسئول ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در باکتری می باشند. در اواخر دهه‌ی ۱۹۹۰ به طور اتفاقی توسط لوئیس مارتینز و همکارانش مقاومت به کینولون با واسطه‌ی پلاسمید PMQR، کشف شد. در مطالعه‌ی مارتینز، از کینولون به عنوان عامل کنترل کننده جهت بررسی اثر پلاسمید PMG۲۵۲ بر میزان افزایش مقاومت نسبت به چند آنتی‌بیوتیک در یک سویه‌ی *اشریشیا کلی* که دارای نارسایی سنتز پورین‌های غشایی بود، استفاده شد. مارتینز به طور غیرمنتظره ای افزایش قابل توجهی در حداقل میزان ممانعت کنندگی رشد کینولونها مشاهده نمود. همچنین در مطالعه مارتینز بیان شده است که ایجاد مقاومت ناشی ازپلاسمید در باکتریهای که در سنتز پورین نقص دارند چند برابر بیشتر از مقاومت کسب شده توسط باکتریهای فاقد تقص است. وجود پلاسمید PMG۲۵۲، حتی در بین سویه های *اشریشیا کلی* که از نظر سنتز پورین های غشایی در آنها کمبودی دیده نمی شد، هم موجب افزایش ۶ تا ۸ برابری حداقل میزان ممانعت کنندگی رشد در برابر کینولون می شود. (Martinez et al, 1990) بررسی های بعدی در این زمینه، ثابت کرد که یک ساختار ۶۵۷ جفت بازی که ژن *qnr* نامیده می شود در باکتری وجود دارد که این ژن پروتئینی را به نام پروتئین Qnr کد

می کند که این پروتئین پیش ساز پروتئینی به نام PMQR است (Kreten V et al,.2017).

کانو و همکاران در مطالعاتی بررسی کردند که اثر متقابل پلاسمید و مکانیسم‌های کینولونها را در افزایش میزان مقاومت نشان داده و بیانگر این است که پلاسمیدهای *qnr* می‌تواند مکمل مقاومت به کینولون در جدایه‌های بالینی *اشریشاکلی* باشد. بعلاوه پروتئین Qnr انتخاب جهش‌های منجر به مقاومت کینولونی را با افزایش دفعات انتخاب جهش، تسهیل می‌کند (Cano و همکاران ، ۲۰۰۶).

وجود مقاومت به کینولونها در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان نشان می‌دهد که این سویه‌ها نه تنها بهداشت عمومی را به مخاطره می‌اندازند، بلکه به عنوان یک مخزن مقاومت نیز مطرح می‌باشند. به هر حال در صورت مصرف نادرست فلور کینولونها، وقوع مقاومت به کینولونها در سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا* می‌تواند به عنوان خطری در بهداشت عمومی باشد زیرا این سویه‌ها می‌توانند موجب ایجاد بیماری در انسان شوند و همچنین مقاومت به فلورکینولونهای مورد استفاده در دامپزشکی، موجب مقاومت در برابر فلورکینولونهای مورد استفاده در طب انسان می گردد. با توجه به مصرف روز افزون استفاده از انتی بیوتیکها در درمان عفونتهای ورم پستان ردیابی ژن های مقاومت کمک موثری برای یافتن راههای تشخیصی موثر دارویی ، در زمینه کنترل و درمان ورم پستان گاوها به دامپزشکان می کند .

مواد و روش ها

مطالعه از نوع توصیفی – تحلیلی بود که به روش مقطعی می باشد. در این مطالعه از تعداد ۵۰ راس گاو مبتلا به ورم پستان شهرستان کازرون و ۱۰۰ راس گاو مبتلا به ورم پستان شهر شیراز، در مجموع ۱۵۰ نمونه شیر آلوده، با کمک سوآپ استریل نمونه ی شیر از پستان آلوده اخذ گردید و برای ارزیابی های اولیه به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه کازرون ارسال گردید. پس از بررسی، از تعداد ۱۵۰ نمونه شیر جدا شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی که دارای نتیجه + تا +++ در آزمایش CMT(California Mastitis Test) بودند. به صورت کاملاً تصادفی و به مدت هفت ماه از اردیبهشت تا آذر ماه ۱۴۰۱ با رعایت شرایط استریل از گاوهای موجود در مناطق مختلف شهرستان کازرون و شهر شیراز جمع آوری شدند. نمونه های شیر از دوشش‌های میانی پستان پس از ضدعفونی کردن سرپستانک گرفته و در حجم ۲۰ میلی لیتر در ظروف استیل ریخته شد. سپس نمونه های شیرورم پستانی اخذ شده در اسرع وقت و در کنار یخ به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگده دامپزشکی دانشگاه کازرون انتقال یافتند. نمونه ها در آزمایشگاه در محیط نوترینت آگار، مک کانکی آگار و محیط EMB کشت داده شد. باکتری گرم منفی باسیلی شکل، بیهوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد. باکتری های *اشریشیا کلی*، اغلب متحرک می‌باشند. *اشریشیا کلی* گلوکز و اکثر قندها را تخمیر می کند و گاز ایجاد می نمایند و بر اثر تخمیر لاکتوز در روی محیط مک کانکی آگار ، کلنی های به رنگ صورتی تولید می کند. *اشریشیا کلی* به خوبی روی محیط های معمولی رشد کرده و یک باکتری کم نیاز است . بعضی سویه ها بویژه آنهایی که در رابطه با عفونت های دستگاه ادراری هستند ، روی محیط بلاد آگار دارای بتا همولیز هستند. و بر روی محیط EMB کلنی ها جلای فلزی دارند. (Mahon و همکاران ، ۲۰۲۲. Alessiani et al. ، ۲۰۰۹. فتاحی، ۱۴۰۰). پس از اطمینان از خالص بودن کشت باکتریها، *اشریشیا کلی ها جهت انجام آزمایش حساسیت ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفتند.*

آزمایش حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن کربی – بائر

برای شناسایی سویه های مقاوم به انروفلوکساسین، ابتدا از ذخیره ی باکتریایی کشت مجدد انجام شد. جهت کشت مجدد باکتری های ذخیره شده، به اندازه ی یک لوپ استریل کامل، از میکروتیوب ذخیره شده برداشت شد و در محیط کشت (L.B) لوریا برتانی آگار کشت داده شد و برای مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. در نهایت از کلنی های به دست آمده برای انجام مراحل بعدی استفاده گردید. برای انجام آزمایش حساسیت ضدمیکروبی از روش انتشار دیسک، استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده عبارت بودند از: فلومکوئین Flumequine دامی و انروفلوکساسین(محصول شرکت پادتن طب ساخت کشور ایران). برای تهیه‌ی بذر میکروبی بر طبق روش استاندارد آزمایش حساسیت ضد میکروبی، از کلنی‌های رشد یافته‌ی باکتری اشریشیاکلی، ابتدا باکتری مورد نظر در محیط کشت

نوترینت براث کشت داده شد. بعد از رشد باکتری ؛ سوسپانسیونی در آب مقطر استریل تهیه گردید و کدورت آن را با کدورت سوسپانسیون نیم مک فارلند، یعنی تعداد CFU/ml ۱۰^۸ × ۱/۵ باکتری مطابقت داده شد. سپس بوسیله سوآپ استریل مقداری از محیط نوترینت براث، حاوی این سوسپانسیون، برداشته شد و به روش چمنی در محیط مولرهینتون آگار کشت داده شد. نتایج با استاندارد های ارائه شده در جداول موسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی CLSI 2023 مورد تفسیر قرار گرفت و جهت اطمینان از شناسایی تمام جدایه های مقاوم؛ سویه های با حساسیت نسبی نیز جهت ادامه کار انتخاب شدند(Forcella *et al.* ، ۲۰۱۰).

استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن (CAT IR.1396.39)

برابر دستورالعمل کیت شرکت سیناژن جهت استخراج **DNA** اقدام شد که ابتدا در حدود ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه را درون میکروتیوپ ریخته و جهت رسوب گیری به مدت ۱۵ در ۱۳۰۰۰ rpm ساتریفیوژ شدند. محلول رویی به تیوپ جدید منتقل شد و رسوب ته نشین شده را دور ریخته و سپس در مرحله بعد از روی محلول رویی جهت انجام آزمایشات مولکولی استفاده شد.

برنامه دمایی PCR

ترکیب DNA تخلیص شده با حجم مورد نیاز واکنش در یک میکروتیوپ و انتقال میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکر براساس برنامه زیر:

شرایط سیکل حرارتی برای PCR اینگونه است که واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت ثانویه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (جدول ۱). محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

جدول۱- مراحل انجام واکنش PCR برای ژن مقاومت داروئی باکتری *اشریشیاکلی* از ورم پستان

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	۳۵
اتصال	۵۵	۴۵	۳۵
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۳۵
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	۱

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 توالی های غیر اختصاصی ضروری است. معمولاً M ۱- ۰/۱ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز می باشد.

جدول۲- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه(Cattoir و همکاران . ۲۰۰۷)

ژن	توالی نوکلئوتیدی '۳ به '۵	پرایمر	اندازه ی محصول PCR
qnrA	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	*qnrA*-F *qnrA*- R	۵۸۰bp
qnrB	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCYCYYCGCCAGTCGAA	*qnrB*-F *qnrB*-R	۲۶۴ bp
qnrS	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	*qnrS*-F *qnrS*-R	۴۲۸bp

آزمون مولتی‌پلکسPCR

جهت تکثیر DNA، از میکروتیوپ های آماده (PCR Premix) محصول شرکت Bioneer (کره جنوبی) به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. دراین مطالعه، از ۶ پرایمر، جهت ردیابی ژنهای *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در اشریشیاکلی استفاده شد. این ۶ پرایمر که اندازه ی هر یک از آنها ۲۰ جفت باز است، جهت آنالیز ۵۰ سویه‌ی اشریشیاکلی با استفاده از روش مولتی‌پلکسPCR مورد استفاده قرار گرفتند(Cattoir *et al* ، ۲۰۰۷). پس از مخلوط کردن با دستگاه میکروفیوژ، به دستگاه ترموسایکلر انتقال داده شد. برنامه‌ی مورد استفاده در (جدول۲) آورده شده است(Cattoir *et al*. ، ۲۰۰۷).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰۲۲ صورت گرفت. برای تعیین ارتباط متغیرها از آزمون مربع کای (χ^2) استفاده گردید. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد($p<0.05$).

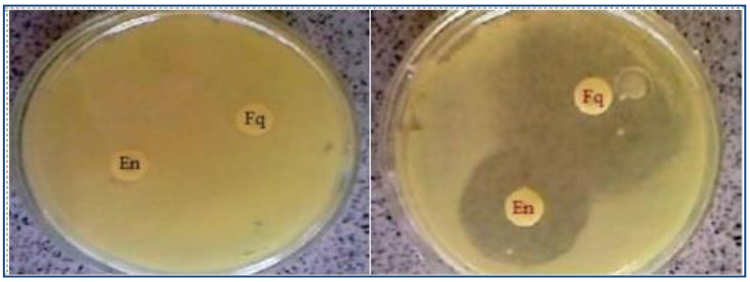
نتایج

از ۵۰ نمونه شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی شهرستان کازرون، ۱۵ نمونه (۳۰ درصد) آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* و از ۱۰۰نمونه شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی شهر شیراز، ۳۵ نمونه (۳۵درصد) آلوده به این باکتری بودند. ایزوله های جدا شده درکشت میکروبی با ردیابی ژن 16S با استفاده از روش PCR مولتی پلکس تایید شدند.

نتایج آزمایش حساسیت ضدمیکروبی

از ۱۵۰ نمونه‌ی اخذ شده فقط ۵۰ سویه‌ی *اشریشیاکلی* جداشده از شیر ورم پستانی گاوهای مبتلا به ورم پستان، پس از کشت در محیط آگار مغذی و تایید کلنی با آزمایشهای تاییدی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شدند (تصویر ۱). در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۵۰ جدایه ی *اشریشیاکلی* به دست آمده از ۵۰ راس گاو بیمار در شهرستان کازرون و ۱۰۰ راس گاو بیمار در شهر شیراز نسبت به آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و فلوموکوئین مورد ارزیابی قرار گرفت. مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک انروفلوکساسین در ۱۷ جدایه ی *اشریشیاکلی*(۸/۵ درصد) مورد شناسایی قرار گرفت. این جدایه ها متعلق به ۶ گاو بیمار در شهرستان کازرون (۳۵/۳۰ درصد) و ۱۱ راس گاو بیمار در شهر شیراز (۶۴/۷۰ درصد) بود. ۷ جدایه هم (۴/۶۷ درصد) به فلوموکوئین مقاوم بودند که متعلق به ۳ گاو بیمار در شهرستان کازرون (۶ درصد) و ۴ راس گاو بیمار شهر شیراز(۴ درصد) بود. ۱ جدایه هم نسبت به هر دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند (۰/۶۷ درصد) که در گاوهای مبتلا در شهر شیراز دیده شد.

بر اساس اندازه گیری قطر ناحیه‌ی عدم رشد و مطابقت آن با جداول CLSI، به صورت حساس (S)، مقاوم (R) و متوسط (I) در مورد سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از شیر ورم پستانی گاوهای مبتلا به ورم پستان شهرستان کازرون (جدول ۳) و نیز در مورد سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از شیر ورم پستانی گاوهای مبتلا به ورم پستان شهر شیراز (جدول ۳) آورده شده است.



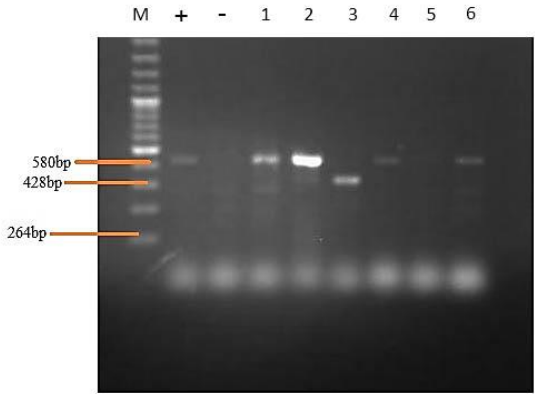
تصویر ۱. نتایج حاصل از آزمایش حساسیت ضدمیکروبی باکتری *اشریشیاکلی* با دیسک آنتی بیوگرام (انروفلوکساسین و فلومکوئین)

الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

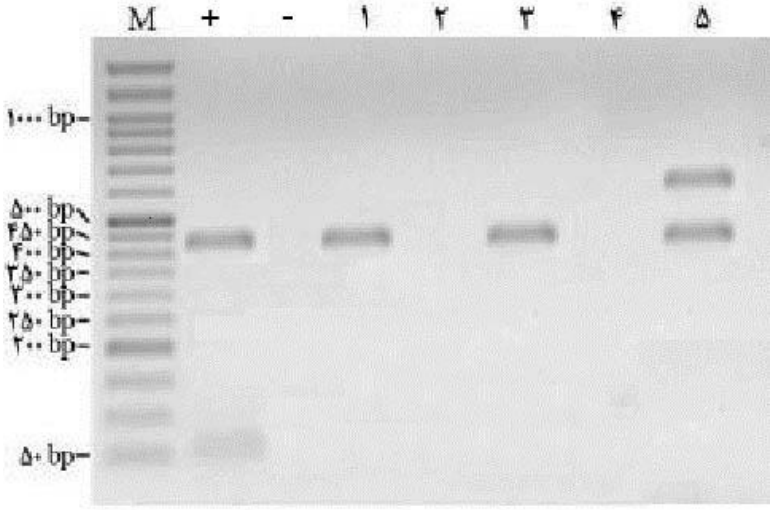
آمپلیکونها یا فرآورده های حاصل از تکثیر واکنش PCR، شامل میلیون ها قطعه از DNA مورد هدف است که به‌طور طبیعی واجد طول مشخصی در ناحیه بین دو پرایمر می باشد. یکی از روش‌های شناسایی محصولات PCR، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ است.

بررسی نتیجه استخراج DNA ژنومی

به منظور بررسی صحت الگوی ژنومی استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (شکل ۲). با استفاده از اشعه ماوراءبنفش در این دستگاه، حضور احتمالی قطعاتی از DNA با اندازه ی مطلوب در ژل بررسی شد. اندازه ی قطعات در ژل با استفاده از bp ۱۰۰ GeneRuler^{TM} Plus DNA ladder محصول شرکت Fermentase LIFE SCIENCE به عنوان معیار، تعیین گردید. محصولات PCR مربوط به *اشریشیاکلی* جداشده از شیر ورم پستانی گاوهای مبتلا به ورم پستان شهر شیراز و شهرستان کازرون در چند نوبت با استفاده از ژل الکتروفورز، در دستگاه داکیومنتاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که از میان ۷ جدایه *اشرشیاکلی* مقاوم به فلوموکوئین؛ ژن *qnrS* دریک سویه و ژن *qnrB* نیز در یک سویه مشاهده شد و همچنین یک سویه دارای هر دو ژن *qnrS* و*qnrB* بود. در این مطالعه از میان ۱۷ جدایه *اشرشیاکلی* مقاوم به انروفلوکساسین(۳۶/۳۶ درصد) ، ۱ جدایه دارای ژن *qnrB* ، ۱ جدایه دارای ژن *qnrS* و ۱ جدایه نیز دارای هر دو ژن *qnrS* و *qnrB* شناسایی شدند. در هیچ نمونه ای ژن qnr A دیده نشد.(تصویر ۲).



تصویر ۲. بررسی کیفی محصولات ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪؛ مشاهده باندهای حاصل از ارزیابی کیفی DNA استخراج شده به ترتیب از چپ به راست: M؛ DNA size marker 100bp، کنترل منفی (آب مقطر) و چاهک های۱ تا ۶ محصول DNA جداشده از نمونه های تحت مطالعه و باندی به اندازه ۲۶۴bp مشاهده نشد، کنترل مثبت؛ DNA از قبل موجود در بانک ذخیره ای.



تصویر ۳. بررسی کیفی محصولات ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪؛ مشاهده باندهای حاصل از ارزیابی کیفی DNA استخراج شده به ترتیب از چپ به راست: M؛ DNA size marker 50bp، . کنترل مثبت؛ DNA موجود از قبل در بانک ذخیره ای. کنترل منفی (آب مقطر) و چاهک های ۱-۵ محصول DNA جداشده از نمونه های تحت مطالعه،

بحث

یکی از اثرات اجتناب ناپذیر مصرف آنتی بیوتیک ها، پیدایش و انتشار باکتریهای مقاوم است. بسیاری ازمطالعات نشان می دهند که پس از معرفی یک آنتی بیوتیک، نه تنها سطح مقاومت باکتریهای بیماریزا، بلکه سطح مقاومت باکتری های کمنسال(همزیست) نیز افزایش می یابد. باکتری های کمنسال مقاوم می توانند منبعی از ژن های مقاومت را برای باکتری های بالقوه بیماریزا تشکیل دهند. بررسی فراوانی مقاومت در باکتری های شاخصی چون اشریشیاکلی مدفوعی در جمعیت های مختلف حیوانی، امکان مقایسه فراوانی مقاومت و همچنین شناسایی مکانیسم های انتقال باکتری های مقاوم وعوامل ژنتیکی مقاومت از حیوانات به انسان و بر عکس را فراهم می سازد(Vasilaki *et al.*, 2008). مقاومت نسبت به کینولون ها با واسطه پلاسمید(PMQR)به دنبال تولید پروتئین های Qnr ، بیان ژن آمینوگلایکوزید استیل ترانسفراز واریانت *aac-(6')-Ib-cr* و بیان ژن کدکننده ی پمپ *qepA* ، موجب کاهش حساسیت فنوتیپی سویه های باکتریایی نسبت به کینولون ها شده است. (میرزایی و همکاران، ۲۰۱۸)

میرزایی و همکاران در تحقیقی شیوع ژنهای *qnrA*, *qnrB* و *qnrS* در بین نمونه های ای کلای به ترتیب ۳۱/۸ ،۵۶/۵٪ و ۲۸/۹٪ بود که در حالت کلی ۱۰۶ نمونه(۷۰/۶٪) ای‌کلای حداقل به یکی از کینولون ها مقاومت نشان دادند. علت متفاوت بودن نتایج ممکن است به این دلیل باشد که ژن های مقاومت در هر منطقه و زمان متغییر است.بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، نمونه های ای‌کلای بیشترین مقاومت را به ترتیب نسبت به نالیدیکسیک اسید(۶۹,۳٪) و سیپروفلوکساسین (۴۶٪) نشان دادند. مقاومت به افلوکساسین وکلرامفنیکل به ترتیب ۴۰٪ و ۲۲/۷٪ بود(Mirzaii *et al* ، ۲۰۱۸).

زینالی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۸۳ ایزوله ای کلای جدا شده از نمونه های بالینی ۴۴٪ ESBL مثبت گزارش نمودند. (۲۰) در این مطالعه ۵ نمونه (۶,۸٪) از سویه های ESBLمثبت ای کلای به ترتیب حامل ژنهای *qnrA*, *qnrB*و*qnrS* بودند. این در حالی است که شیوع این ژن ها در بین سویه های ESBL منفی ۲,۸٪ بود. (زینالی و همکاران، ۲۰۱۲).

Wangو همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی شناسایی ژنهای کدکننده ی QnrA و QnrB که عوامل مقاومت علیه

فلوروکینولون ها با واسطه پلاسمید می باشند در میان جدایه های اشریشیاکلی به دست آمده از گاوها در نیجریه مطالعه کردند. این مطالعه با هدف بررسی پیامدهای مصرف فلوروکینولون در دامپزشکی و زنجیره غذایی انجام شده بود. آن ها برای این منظور از ۵۰۰ جدایه اشریشیاکلی به دست آمده از مدفوع گاوهای به ظاهر سالم در نیجریه استفاده کردند و روش PCR را برای شناسایی حضور ژن های *qnrA*و *qnrB* و به دنبال آن روش دیسک دیفیوژن را جهت مشاهده مقاومت فنوتیپی جدایه ها نسبت به فلوروکینولون بکار بردند. نتایج PCR نشان داد که ۱۰ عدد از هفده جدایه مقاوم به کینولون ها، از نظر ژن *qnrB* ، و تنها یک جدایه از بیست جدایه اشریشیاکلی از نظر ژن *qnrA*مثبت است. بنابراین مقاومت به کینولون با واسطه پلاسمید، به عنوان یک مکانیسم احتمالی در بین جدایه های اشریشیاکلی کمنسال در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم مطرح می باشد (Wang *et al* ، ۲۰۰۸).

طبق مطالعات یوسفی و همکاران بین نمونه هایی که دارای ژن *qnrA* بودند ۵/۸ درصد سویه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم و ۳/۵ درصد سویه ها حساس بودند. علیرغم اینکه فراوانی ژن *qnrA* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین نسبت به سویه های حساس حاوی ژن مذکور بیشتر بود ولی ارتباطی بین وجود($p>0.05$) در مورد حضور ژن *qnrB* و مقاومت به آنتی ژن *qnrA* و مقاومت به سیپروفلوکساسین وجود نداشت آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین نیز بررسی در بین سویه های حساس و مقاوم به این آنتی بیوتیکها انجام گرفت که بین وجود این ژن و مقاومت به سیپروفلوکساسین ارتباط معنی دار مشاهده نگردید($p>0.05$) همچنین بین حضور ژن *qnrS*و مقاومت به آنتی بیوتیک مورد مطالعه در سویه های حساس و مقاوم بررسی انجام گرفت و بین حضور این ژن و مقاومت به سیپروفلوکساسین همچنین، در ارتباط معنی داری وجود داشت($p<0.05$). در سویه هایی که به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند فقط ۷ سویه (۵ درصد) دارای هر سه ژن مقاوم به *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* ضمن اینکه ۶۳ سویه (۴۵/۳ درصد) نیز دارای دو ژن*qnrB* و *qnrS* بطور همزمان بودند که بیشترین حضور همزمان ژن ها بود(یوسفی و همکاران ، ۲۰۱۸).

Flach و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی بیان ژن *qnr* پرداختند. ۶ خانواده از پلاسمید های حاوی ژن *qnr* یافت شدند: qnrA, qnrB,qnrC,qnrD,qnrS,qnrVC. علاوه بر آن آلل های کروموزومی *qnr* در تعدادی از گونه های باکتریایی نیز یافت شدند(Flach ، ۲۰۱۳).

سلیمانی اصل و همکاران در سال ۱۳۹۳ یافتند از نظر فراوانی ژن های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید نشان می دهد که فراوانی ژنهای *qnr* در ایران نسبت به سایر مناطق از میزان بالاتری برخوردار می باشد و به ویژه فراوانی ژن *qnrA* نسبت به سایر ژن های با مکانیسم مقاومت مشابه بالاتر می باشد. فراوانی بالای ژن های فوق در میان سویه های با اهمیت بالینی به ویژه به دلیل حمل وابسته به پلاسمید آنها که انتقال و گسترش سریع آنها را تسهیل می نماید، بسیار حائز اهمیت بالینی می باشد(سلیمانی اصل و همکاران ، ۲۰۱۴).

یو و همکاران، ۲۳۲ سویه‌ی اشریشیاکلی که از خوک و طیور جداشده بود را از نظر حضور *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* با روش PCR و توالی‌یابی بررسی کردند که ۱۴ مورد آنها (۶درصد) از نظر حضور ژن *qnr* مثبت بودند. یک مورد *qnrB* و ۱۳ مورد *qnrS* شناسایی شد ولی *qnrA* مشاهده نشد(Yue *et al* ، ۲۰۰۸).

داهمن و همکاران، در سپتامبر ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۷، ۲۸۱ جدایه های انتروباکتریاسه‌ی مقاوم به نالیدیکسیک اسید از نمونه‌های بیمارستانی در تونس را جداسازی کردند که بررسی با روش مولتی‌پلکسPCR نشان داد ۱۶درصد آنها ژنهای PMQR، شامل *qnrB*، *qnrB*، *qnrA* و *qnrS* را حمل می‌کردند اما هیچکدام از نمونه‌ها *qnrC* و *qnrD* را نداشتند(Dahmen, وهمکاران ، ۲۰۱۰).

واسیلاکی و همکاران، با استفاده از روش PCR و توالی‌یابی از بین ۳۱۳ سویه‌ی بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین که در طی سالهای ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ در یونان جمع‌آوری شده بود، ۱۱ سویه‌ی دربردارندهی ژن *qnrS* را گزارش کردند. هیچکدام از سویه‌های مورد بررسی آنها ژن *qnrA* یا *qnrB* را نداشتند(Vasilaki *et al*و همکاران ،۲۰۰۸).

در صورت مصرف نادرست فلور کینولونها، وقوع مقاومت به کینولون‌ها در سویه های بیماری زای *اشریشیاکلی* می تواند به عنوان خطری در بهداشت عمومی باشد زیرا این سویه ها می توانند موجب ایجاد بیماری در انسان نیز شوند و همچنین مقاومت به فلورکینولونهای مورد استفاده در

دامپزشکی، موجب مقاومت در برابر فلورکینولون های تجویز شده در طب انسانی می گردد. فنوتیپ تیپیک مقاومت پلاسمیدی به کینولون ها در خانواده انتروباکتریاسه، کاهش حساسیت به فلورکینولون ها و مقاومت به نالیدیکسیک اسید را نیز بدنبال دارد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج دست آمده، می توان بیان کرد که هر چند فراوانی سویه های مقاوم به عوامل آنتی بیوتیکی متعلق به کینولون و فلورکینولون هادر این مطالعه بالا نبود ولی به هیچ عنوان قابل چشم پوشی نمی باشد. مخصوصا اینکه فراوان ترین الگوی مقاومت چندگانه به دست آمد مربوط به سویه هایی بود که به طور همزمان به چند آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین نتایج نشان داد که ژنهای *qnrS* و *qnrB* مهم ترین عوامل ژنتیکی دخیل در بروز مقاومت علیه کینولونها و فلورکینولونها در مطالعه ی حاضر می باشند. میزان کلی مقاومت به انروفلوکساسین در جدایه های دامی بالای ۸ درصد بود ولی در حدود ۷۵ درصد موارد مقاومت متقاطع نسبت به سایر کینولون ها مشاهده نگردید که نیازمند بررسی بیشتر و مطالعات تکمیلی است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش اقتباسی از پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی با ثبت در شورای پژوهشی دانشگاه بوده و در نهایت محققین این مقاله برخود لازم می‌دانند تا از زحمات کارشناسان و متخصصین آزمایشگاه میکروب شناسی(بیطاران) شیراز و دکتر اختری مسئول محترم آزمایشگاه اکتیو وت و عزیزانی که با راهنمایی‌های ارزنده و گرانقدر خود در پیشبرد این پژوهش، کمال تشکر و امتنان را داشته باشند.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 14(2022-23)139-150

Molecular investigation of qnr A-B genes isolated from antibiotic-resistant Escherichia coli causing mastitis in dairy cows

Fattahi, H.[1*], Shahrivar, M.[2], Jouibar, F.[3], Jokar, F.[4], Hashemi Nasab, S. A.[5].

Received:2.06.2022 Accepted: 13.03.2023

Abstract

Mastitis is an important disease that can infect livestock throughout their life. Gram-negative *EscherichiaColi* is the main cause of most of this disease. The aim is to investigate *EscherichiaColi* isolates containing fluoroquinolone antibiotic resistance genes in mastitis milk using multiplex PCR technique. In this study,150milk samples from cows suffering from mastitis were used. The samples were sent to the microbiology laboratory of Faculty of Veterinary Medicine of Kazeroon University for evaluation. After culturing the suspected *EscherichiaColi* colonies, according to the CLSI tables, the sensitivity of the isolated strains was evaluated. The results of electrophoresis of PCR products showed that among the 7 strains of Escherichia coli resistant to flumoquine; The qnrS gene was observed in one strain and the qnrB gene was observed in one strain, and one strain had both qnrS and qnrB genes. In this study, among 17 isolates of Escherichia coli resistant to enrofloxacin (36.36%), 1 isolate has qnrB gene, 1 isolate has qnrS gene and 1 isolate has both qnrS and qnrB genes. occurrence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* pathogenic strains can be a danger to public health. The most abundant pattern of multiple resistance obtained was related to the strains that were resistant to several antibiotics at the same time.The results showed that qnr S and qnrB genes are the most important genetic factors involved in resistance against quinolones and fluoroquinolones.

Keywords: dairy cow mastitis, *Escherichia coli*, PCR, qnr genes.

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran.
2. Student of Veterinary Medicine.Department of Veterinary Medicine. Faculty of Veterinary Medicine.Islamic Azad University.Kazerun Branch.Kazerun.Iran.
3. Instructor of Veterinary Physiology Medicine.Department of Veterinary Medicine. Faculty of Veterinary Medicine.Islamic Azad University.Kazerun.
4. Student of Veterinary Medicine.Department of Veterinary Medicine. Faculty of Veterinary Medicine.Islamic Azad University.Kazerun.
5. Student of Veterinary Medicine.Department of Veterinary Medicine. Faculty of Veterinary Medicine.Islamic Azad University.Kazerun.
*Corresponding author: fattahi_h@sums.ac.ir

Alessiani, A., Di Giannatale, E., Perilli, M., Forcella, C., Amicosante, G., & Zilli, K. (2009). Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in Escherichia coli strains resistant to nalidixic acid isolated from animal faeces. *Veterinaria Italiana, **45*****(4)**, 521-527 .

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., & Duchateau, L. (2003). Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary research, **34*****(5)**, 521-564 .

Cano, M., Rodriguez-Martinez, J., Aguero ,J., Pascual, A., & Martinez-Martinez, L. (2006). Detection of qnrS in clinical isolates of Enterobacter cloacae in Spain. *Clin Microbiol Infect, 12*(supp. 4), 12 .

Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **60*****(2)**, 394-397 .

Dahmen, S., Poirel, L., Mansour, W., Bouallegue, O., & Nordmann, P. (2010). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection, **16*****(7)**, 1019-1023 .

Firoozeh, F., Zibaei, M., & Soleimani-Asl, Y. (2014). Detection of plasmid-mediated qnr genes among the quinolone–resistant Escherichia coli isolates in Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries, **8*****(07)**, 818-822 .

Flach, C.-F., Boulund, F., Kristiansson, E., & Larsson, D. (2013). Functional verification of computationally predicted qnr genes. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials, **12*****(1)**, 1-4 .

Forcella, C., Alessiani, A., Perilli, M., Zilli, K., Di Giannatale, E., & Amicosante, G. (2010). Characterization of quinolone resistance in Escherichia coli strains of animal origin from Italy. *Journal of Chemotherapy, **22*****(3)**, 165-168 .

Fattahi, H., Pikar, M., pourMohammadi, M., dabiri, E. Gorgin, Z..(1400). General Veterinary Microbiology. Norbakhsh press.

Levine, M. M. (1987). Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases**, 155*****(3)**, 377-389 .

Li, X.-Z. (2005). Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *International journal of antimicrobial agents, **25*****(6)**, 453-463 .

Lim, S.-K., Lim, K.-G., Lee, H.-S., Jung, S.-C., Kang, M.-I., & Nam, H.-M. (2010). Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli isolated from diarrheic cattle in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science, **72*****(5),** 611-614 .

Mahon, C. R., & Lehman, D. C. (2022). *Textbook of diagnostic microbiology-e-book*: Elsevier Health Sciences.

Mirzaii, M., Jamshidi, S., Zamanzadeh, M., Marashifard, M., Hosseini, S. A. A. M., Haeili, M., . . . Khoramrooz, S. S. (2018). Determination of gyrA and parC mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *Journal of global antimicrobial resistance, **13***, 197-200 .

Quinn, P., Markey, B. K., Carter, M., Donnelly, W., & Leonard, F. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*: Blackwell science.

Ramazan zadeh Rashid. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of Klebsiella spp. African Journal of Microbiology Research. 4 July 2010; Vol. **4 (13)**: pp 1359-1362.

Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases, **6*(10)**, 629-640 .

Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy, **17***, 149-182 .

Saei, M., Jamshidi, A., Zeinali, T., & Khoramian, B. (2022). Phenotypic and genotypic determination of β-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from raw milk and clinical mastitis samples, Mashhad, Iran. *International dairy journal, **133***, 105406 .

Vasilaki, O., Ntokou, E., Ikonomidis, A., Sofianou, D., Frantzidou, F., Alexiou-Daniel, S., . . . Pournaras, S. (2008). Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrS1 in Escherichia coli isolates in Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy, **52*(8)**, 2996 .

Veldman, K., Cavaco, L. M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N,. . . .De Frutos Escobar, C. (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in Salmonella enterica and Escherichia coli isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries .*Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **66*(6)**, 1278-1286 .

Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., . . . Wang, C. (2008). Presence of qnr gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infectious Diseases, **8***, 1-6 .

Yousefi, S., Mojtahedi, A., & Shenagari, M. (2018). A survey of gyrA target-site mutation and qnr genes among clinical isolates of Escherichia coli in the north of Iran. *Jundishapur journal of microbiology, **11*(9)** .

Yue, L., Jiang, H.-X., Liao, X.-P., Liu, J.-H., Li, S.-J., Chen, X.-Y., . . . Liu, Y.-H. (2008). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of Escherichia coli. *Veterinary microbiology, **132*(3-4)**, 414-420 .

Zaatout, N. (2022). An overview on mastitis-associated Escherichia coli: Pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies. *Microbiological research, 256*, 126960 .