



ارزیابی شیوع و حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی K99 در گوساله‌های مبتلا به اسهال در استان فارس

زهرا شمس^۱، دکتر یحیی تهمتن^{۲*}، دکتر محمد کارگر^۳، دکتر سید محمد حسین حسینی^۲، دکتر سید علی پوربخش^۲

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، ^۲ استادیار، بخش باکتری شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شیراز

^۳ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده در نتیجه عفونت با اشریشیاکلی انتروتوکسیژن K99 یکی از معضلات مهم صنعت دام پروری است. هدف از این پژوهش، تعیین فراوانی و حساسیت آنتی‌ژنی سویه‌های اشریشیاکلی K99 جدا شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال در استان فارس بود.

مواد و روش‌ها: ۳۱۲ نمونه سواب رکتوم از گوساله‌های مبتلا به اسهال در نقاط مختلف استان فارس تهیه و با روش‌های استاندارد باکتریولوژی سعی در جداسازی و شناسایی اشریشیاکلی K99 انجام شد. سپس برای کلیه جدایه‌های اشریشیاکلی به دست آمده تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک انجام شد.

یافته‌ها: مجموع نمونه‌های مورد مطالعه ۲۹۸ جدایه اشریشیاکلی به دست آمد که از آن میان به روش اسلاید آگلوتیناسیون ۱۳ جدایه اشریشیاکلی K99 تعیین هویت شدند. جدایه‌های اشریشیاکلی K99 به آنتی بیوتیک‌های انروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و فلوموکوئین حساس بودند. اما مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها در اشریشیاکلی‌های K99 و کم‌نسب وجود داشت.

نتیجه‌گیری: شیوع اشریشیاکلی K99 در گوساله‌های دارای اسهال در استان فارس ۴/۳٪ تعیین گردید، که در مقایسه با دیگر گزارشات در طیف پایین‌تری قرار دارد.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی K99، گوساله، حساسیت آنتی بیوتیکی

دریافت مقاله: آبان ۸۸ پذیرش برای چاپ: بهمن ۸۸

مقدمه

K99 هستند که به عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد اسهال در نخستین روزهای زندگی در گوساله‌ها مطرح می‌باشد (۳ و ۴). این میکروارگانیسم به طور گسترده‌تر تنها در میان گوساله‌های دارای اسهال بلکه در گاوهای سالم وجود دارد (۵ و ۶). بر اساس گزارش‌های موجود عامل K99 مهم‌ترین و شایع‌ترین عامل چسبنده بر روی اشریشیاکلی بیماری‌زا در گوساله می‌باشد (۶ و ۷). این عامل سبب اتصال باکتری به دیواره روده و در نتیجه افزایش بقا و تکثیر آن در روده می‌گردد. هم‌چنین این باکتری با

کلی باسیلوز در گوساله‌های تازه متولد شده یکی از اساسی‌ترین مشکلات در صنعت دامپروری است که سالانه سبب مرگ و میر و کاهش تولید پروتئین می‌گردد (۱ و ۲). از عوامل ایجادکننده اسهال در گوساله‌ها، اشریشیاکلی‌های انتروتوکسیژنیک

(* آدرس برای مکاتبه: شیراز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش باکتری شناسی

تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹۴۰

پست الکترونیک: yahyathamtan@yahoo.com

تریپتیک سوی برات (TSB) به آزمایشگاه باکتری شناسی بخش تحقیقات موسسه رازی شعبه شیراز منتقل گردیدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد جهت جداسازی اشریشیا کلی بر روی محیط های کشت اختصاصی کشت داده شدند. (ب) جداسازی اشریشیا کلی: به منظور جداسازی اشریشیا کلی، ابتدا نمونه ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (EMB) و مک کانکی آگار کشت داده شدند. در محیط EMB، اشریشیا کلی های آبی-مشکی با تالو سبز متالیک ایجاد می نماید و در محیط مک کانکی آگار اشریشیا کلی به علت تخمیر لاکتوز، کلنی های صورتی رنگ ایجاد می کند. پس از به دست آمدن کلنی با ویژگی های گفته شده جهت تایید جدایه اشریشیا کلی از تست های بیوشیمیایی استاندارد استفاده گردید.

(ج) تست های بیوشیمیایی: جدایه های اشریشیا کلی حاصل از مک کانکی آگار (کلنی های صورتی رنگ) توسط تست های بیوشیمیایی استاندارد اختصاصی اشریشیا کلی نظیر TSI، اوره آز، سیترات، MR-VP، ایندول و موتیلیتی (حرکت) مورد تایید قرار گرفتند.

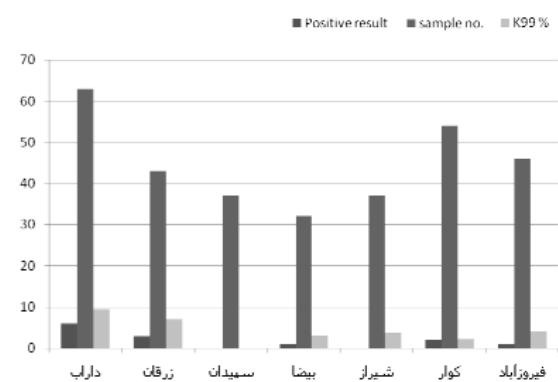
(د) تست اسلاید آگلوتیناسیون برای تعیین هویت اشریشیا کلی K99 از آنتی بادی تجاری بر علیه K99 (تهیه شده از شرکت Mast group آلمان) استفاده گردید. برای این منظور ۲۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته اشریشیا کلی در محیط مینکا (برای بیان فیبری K99) را در طرف راست یک لام میکروسکوپی تمیز قرار داده با ۲۰ میکرولیتر از آنتی بادی تجاری بر علیه فیبر K99 در دایره ای به قطر ۱۰ میلی متر مخلوط کرده برای دو دقیقه حرکت دورانی داده شد. همچنین به عنوان کنترل منفی در سمت چپ لام ۲۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته اشریشیا کلی در محیط مینکا با ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین به همان ترتیب مخلوط گردید. پس از دو دقیقه نتایج بررسی و مقایسه می شد.

(ه) تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیا کلی K99 و کمینسال به دست آمده از موارد اسهال گوساله از روش انتشار از دیسک استفاده گردید و نتایج براساس روش Clinical CLSI تجزیه و تحلیل شد.

تولید انترتوکسین مقاوم به حرارت STa موجب افزایش ترشح مایع در روده و در نهایت ایجاد اسهال می شود (۸). با توجه به شیوع اشریشیا کلی K99، در بررسی های مختلف این سویه از اشریشیا کلی از ۱ تا ۵۰ درصد از گوساله های مبتلا به اسهال در مناطق مختلف جهان جداسازی گردیده است (۹-۱۱). از زمان کشف آنتی بیوتیک توسط فلمینگ استفاده از این مواد همواره یکی از راه های مهم برای درمان عفونت های باکتریایی بوده است، مخصوصاً در مواردی که رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون مشکل بوده و یا اصلاً وجود ندارد. از آن جا که یکی از معضلات پیش رو در استفاده از آنتی بیوتیک ها مقاومت های آنتی بیوتیکی است که منجر به کم اثر و بی اثر شدن آنتی بیوتیک می گردد، ضروری است تا حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیا کلی K99 به دست آمده از موارد اسهالی مطالعه گردد تا به توان در درمان بیماری از آنتی بیوتیک های موثر استفاده نمود. هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع اشریشیا کلی K99 در گوساله های مبتلا به اسهال و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها و هم چنین جدایه های کمینسال می باشد.

مواد و روش ها

(الف) نمونه گیری: در این تحقیق مجموعاً ۳۱۲ نمونه سوآب رکتوم از گوساله های ۳۰-۱ روزه مبتلا به اسهال از شهرستان های داراب، زرقان، سپیدان، بیضا، شیراز، کوار و فیروزآباد استان فارس در سال های ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۸ جمع آوری گردید. نمونه ها در محیط انتقالی



نمودار ۱: فراوانی نمونه های مورد بررسی و جداسازی سویه های اشریشیا کلی K99.

نتایج

حمل، رعایت یا عدم رعایت اصول بهداشتی در گاوداری و هم چنین خوراندن آغوز به میزان کافی و در زمان مناسب به گوساله تازه متولد شده قابل توجه باشد. اگر چه منطقه جغرافیایی و به کارگیری روش های متفاوت مطالعه و هم چنین شرایط نمونه گیری (قبل و یا بعد از تیمار دام مبتلا به اسهال) و نیز عفونت های هم زمان روده ای شاید در این تفاوت در فراوانی نقش داشته باشند، ولی دلیل قطعی این گستردگی در فراوانی در مطالعات مختلف شناخته شده نمی باشد.

بررسی های حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داده اند که درصد بالایی از اشریشیاکلی به آنتی بیوتیک ها مخصوصاً آن هایی که به طور معمول برای درمان اسهال استفاده می شوند مقاوم هستند (۵ و ۱۵). در این مطالعه جهت بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی از ۱۲ دیسک استاندارد از آنتی بیوتیک های مختلف به روش کربی باور استفاده گردید. هر دو جدایه های اشریشیاکلی K99 و کمسال به دست آمده از موارد اسهال گوساله به ترتیب حساسیت به سه آنتی بیوتیک انروفلوکساسین، فلوموکوئین و نالیدیکسیک اسید حساس بودند، در حالی که به سایر آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در این تحقیق مقاومت نشان دادند. در مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نیز مقاومت گسترده اشریشیاکلی به آنتی بیوتیک ها گزارش گردید (۱۱ و ۱۵). در برخی از مطالعات حساسیت به یک آنتی بیوتیک خاص مانند جنتامایسین نشان داده شده است (۵ و ۱۵) اما در گزارش های دیگر (۹) و این مطالعه مقاومت به این آنتی بیوتیکی مشاهده می گردد. مقاومت آنتی بیوتیکی به ویژه در میان بیماری زا های حیوانی می تواند به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و پیشگیری قبل از بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی به ویژه در دام پزشکی انجام شود.

نتیجه گیری

بیماری کولی باسیلوز گوساله یکی از بیماری های شایع در استان فارس می باشد که متأسفانه تحقیقی در این زمینه صورت نگرفته است. این بیماری هر ساله باعث مرگ و میر تعدادی از گوساله های شیر خوار می شود و ضرر اقتصادی فراوانی به صنعت گاوداری می زند. به دلیل استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک

از ۳۱۲ نمونه سوپ رکتوم از موارد اسهال گوساله ها بر اساس نوع کلنی و تست های بیوشیمیایی ۲۹۸ جدایه اشریشیاکلی به دست آمد، که از این ۲۹۸ جدایه با استفاده از تست اسلاید آگلوتیناسیون و به کارگیری آنتی بادی تجاری ضد فیمبری K99 مشخص گردید که ۱۳ جدایه اشریشیاکلی K99 می باشد و بقیه جدایه ها اشریشیاکلی کمسال هستند (نمودار ۱).

حساسیت آنتی بیوتیکی: از ۱۲ دیسک آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق هر دو جدایه های اشریشیاکلی K99 و کمسال به آنتی بیوتیک های انروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و فلوموکوئین حساس بودند. موثرترین آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و پس از آن به ترتیب فلوموکوئین و نالیدیکسیک اسید بودند. کلیه جدایه ها به ۹ آنتی بیوتیک دیگر درجات مختلفی از مقاومت نشان دادند.

بحث

اشریشیاکلی K99 یک انتر و پاتوژن شناخته شده در گوساله ها است (۳ و ۴)، که به طور وسیع در میان گوساله های دارای اسهال و هم چنین گاو های سالم شیوع دارد (۵ و ۶). در ارتباط با فراوانی اشریشیاکلی K99 در گوساله های مبتلا به اسهال گزارش های متفاوتی در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، که این فراوانی از تقریباً یک درصد تا ۵۰ درصد متفاوت می باشد (۱۲ و ۱۳). در این مطالعه با استفاده از روش های باکتری شناسی کشت در محیط اختصاصی مینکا و به کارگیری اسلاید آگلوتیناسیون، فراوانی اشریشیاکلی K99 در موارد اسهال گوساله در استان فارس ۴/۱۶٪ تعیین گردید. این یافته با یافته های ناگی که شیوع اشریشیاکلی انترتوکسیژن را در گوساله های مبتلا به اسهال ۴٪ گزارش کردند و یا در بررسی های مختلفی که این فراوانی را سه الی ۱۰ درصد گزارش نموده اند (۸ و ۱۰) هم خوانی دارد. اگر چه در برخی از مطالعات شیوع اشریشیاکلی K99 را در گوساله های دارای اسهال ۳۰-۴۰ درصد گزارش نموده اند (۱۴). تفاوت در فراوانی اشریشیاکلی K99 در نقاط مختلف جهان و هم چنین مکان های مختلف یک منطقه می تواند به دلایل متنوعی مانند ایمن سازی یا عدم ایمن سازی گاوهای باردار بر علیه اشریشیاکلی K99 قبل از وضع

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از اداره کل دامپزشکی فارس به خاطر حمایت‌های اجرایی در تهیه نمونه‌کمال امتنان را دارند.

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی زیادی نیز به وجود آمده است که به جز در مورد چند آنتی‌بیوتیک غیر مرسوم این باکتری به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. مطالعه حاضر در راستای جداسازی نمونه‌های پاتوژن از حیوانات بیمار بود تا به توان در آینده قدم‌هایی برای تهیه واکسن بر علیه آن برداشت.

References

1. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol.* 2007; 123:145-152.
2. Watterworth L, Topp E, Schraft H, Leung KT. Multiplex PCR DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 2005; 60:93-105.
3. Nasr-Eldin M, Mahdi Saeed A. Design and characterization of highly immunogenic heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* K99+. *J Immun Methods.* 2011; 366: 100-105.
4. Lundborg GK, Svensson EC, Oltenacu PA. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0-90 days. *Prev Vet Med.* 2005; 68:123-143.
5. Foster D, Smith G. Pathophysiology of Diarrhea in Calves, *Veterinary Clinics of North America. Food Anim Pract.* 2009; 25: 13-36.
6. Younis EE, El-Naker YFI, El-Khodery SA, Osman SA, El-Naker YF. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp, in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Res Vet Sci.* 2009; 87(3):373-379.
7. Acha SJ, Kuhn I, Jonsson P, Mbazima G, Katouli M. Studies on calf diarrhea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *Acta Vet Scand.* 2004; 45:27-36.
8. Nagy B, Fekete P. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Veterinary Medicin. *Inter J Med Microb.* 2005; 295:443-454.
9. Miraglia F, Jerez JA, Gregori F, Melville PA, Costa EO. Neonatal enteric disease outbreak caused by *E. coli* and Rotavirus in calves, Napgama. *Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo.* 2001; 4:3-6.
10. Guth BEC. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, An overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:95-97
11. Akam A, Khelef D, Kaidi R, Othmani A, Lafri M, Tali-Maamar H, Rahal K, Tahrat N, Chirila F, Cozma V, Abdul-Husain MS. Frequency of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* K99 and *Salmonella* spp. isolated from healthy and unhealthy calves in six breeding farms from Mitidja, Algeria (preliminary results). *Rev Sci Parasitol.* 2004; 5:13-21.
12. O'Ryan M, Nataro J, Cleary T. Infectious diseases of the fetus and newborn, microorganisms responsible for neonatal diarrhea. *Seventh Edition.* 2011; 11:359-418.
13. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res.* 1999; 30:259-284.
14. Salvadori MR, Valadares GF, Leite DS, Blanco J, Yano T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz, J Microbiol.* 2003; 34:230-235.
15. Barrington GM, Gay JM, Evermann JF. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *The vet clin North Am Food Anim Pract.* 2002; 18:7-34.



Isolation and antibiotic sensitivity of *E. coli* K99 isolates from diarrheic calves at Fars province

Zahra Shams¹, Yahya Tahamtan², Mohammad Kargar³,
Seyed Mohammad Hosein Hoseini², Seyed Ali Pourbakhsh²

¹M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

²Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran

³Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Abstract

Background and Objective: Diarrhea in newborn calves caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 is one of the important problems in the animal industrial husbandry. In this study we try to find the frequency of *E. coli* k99 in diarrheal newborn calf, and also determine antibiotic susceptibility of isolates.

Material and Methods: 312 rectal swabs of diarrheal calves were obtained in various parts of Fars province. The samples were investigated using biochemical test. All *E. coli* isolates tested for antibiotic susceptibility using disc diffusion method.

Results: of 312 samples, 298 *E. coli* isolates were obtained, from which the slide agglutination method 13 isolates were identified *Escherichia coli* k99. These isolates were susceptible to enrofloxacin, nalidixic acid and flomocuen antibiotics. Also, there is some wide range of antibiotics resistance to in *Escherichia coli* k99.

Conclusion: The prevalence of *Escherichia coli* k99 with diarrhea in calves was 4 / 3% in Fars province which compared to other reports ranking in the lower range.

Key words: *Escherichia coli* K99, Antibiotic susceptibility, Calves.