

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی های جدا شده از موارد اسهال گوساله های زیر یک ماه در دامداریهای اطراف شهرستان گرمسار

دکتر تقی زهرایی صالحی^۱،* دکترسید محمد مدنی^۲

Antimicrobial Resistance of isolated *Escherichia coli* from diarrhetic calves in Garmsar

Zahraei Salehi. T¹, Madani. M²

1-Department. of Microbiology, Faculty of Vet. Med.Tehran University, Tehran, Iran

2-Graduated of Faculty of Vet. Medicine, Islamic Azad University, Branch of Garmsar, Garmsar, Iran.

The present study was conducted to isolation of *E. coli* diarrhea from diarrhetic calves up to one month old, in Garmsar. Which haven't already been treated by antibiotics. Isolation was carried out using standard Entrobacteriaceae media and tests. Antibiotic susceptibility (Antibiogram) by Kirby - Bauer method was performed. In antibiogram test were used Mueller-Hinton agar and common antibiotics. From total of 124 stool specimens, *E. coli* were isolated in 70 specimens (56.45%).

The other agents were proteos (15.3%), non-specified bacterial agent (12.9%) and no-bacterial agent (15.3%). The most frequency of diarrhea was calves of 22-30 days old frequent (27.34%). *E. coli* was the most isolated bacteria in 1-7 days old calves (64.5%).

Antibiotic susceptibility for Quinolone family was more than other antibiotics susceptibility to Enrofloxacin. Flomiquil and Gentamicin were 91.5%, 81.42% and 51.4% respectively. The most antibiotic resistance were seen for Penicillin and Tylosin (100%).

Key words: Antibiotic resistance, *E.coli*, Diarrhea, Calf

هدف از این تحقیق جدا سازی اشریشیا کلی از موارد اسهال گوساله های زیر یک ماه و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدا شده ها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بود. در این تحقیق از گوساله های ۱-۳۰ روزه مبتلا به اسهال که آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند نمونه مدفوع اخذ گردید و روی محیطهای تشخیصی آنتروباکتریاسه کشت داده شد. بر روی سویه های *E. coli* جدا شده آزمایش آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک (کربی بانر) انجام شد تا میزان حساسیت *E. coli* جدا شده نسبت به آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در اسهال گوساله ها مشخص گردد. از ۱۲۴ رأس گوساله مورد مطالعه از ۷۰ مورد (۵۶/۴۵٪) اشریشیاکلی جدا شد. سایر موارد شامل ۱۹ مورد (۱۵/۳٪) پروتئوس، ۱۶ مورد (۱۲/۹٪) با عامل باکتریایی نامشخص و ۱۹ مورد (۱۵/۳٪) بدون عامل باکتریایی بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع اسهال در گروه سنی ۲۲-۳۰ روز با ۳۹/۵٪ بیش از سایر گروهها میباشد. اما اگر چه شیوع اسهال در گروه سنی ۱-۷ روز با ۲۷/۴۳٪ از گروه سنی ۲۲-۳۰ روز کمتر است ولی نقش بیماری زائی اشریشیاکلی در بروز اسهال در این گروه با ۶۴/۷٪ از سایر گروهها بیشتر است. نتایج آنتی بیوگرام نیز بیانگر مقاومت اشریشیا کلی های جدا شده نسبت به اکثر گروههای آنتی بیوتیکی بود ولی نسبت به آنتی بیوتیکهای خانواده کینولون حساسیت خوبی نشان دادند. میزان حساسیت به انروفلوکساسین ۹۱/۵٪، فلومکوئین ۸۱/۴۲٪، جنتاماسین ۵۱/۴٪ بود. بیشترین میزان مقاومت نسبت به پنی سیلین و تایلوزین (۱۰۰٪) دیده شد.

واژه های کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، اشریشیا کلی، اسهال، گوساله

یکی از عمده ترین مشکلاتی که دامداران به خصوص در ایران با آن مواجه هستند، اسهال گوساله های نوزاد می باشد که موجب هزینه های اقتصادی فراوانی جهت درمان، کاهش تولید وحتى مرگ و میر ناشی از اسهال، می شود. تحقیقات مختلف نشان داده است که عوامل متعددی باعث ایجاد اسهال در گوساله های نوزاد می شود که به طور کلی آنها را به دو دسته عوامل عفونی و غیر عفونی تقسیم می کنند. عوامل عفونی میکروبی عمدتاً شامل اشریشیاکلی،

سالمونلا، کلستریدیوم، روتاویروس، کروناویروس (۷ و ۹) و عوامل غیر عفونی در ارتباط با تغذیه، شیوه مدیریت و

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(* نویسنده مسئول مکاتبات Email: zahraei2000@yahoo.com)

۲- دانش آموزانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی گرمسار، گرمسار، ایران

محیط نگهداری دامها می‌باشند. این بیماری در تمام نژادهای شیری و گوشتی اتفاق می‌افتد و در مناطقی که دامها به صورت جمعی نگهداری می‌شوند بیشتر شیوع دارد. موارد تک گیر در گله های کوچک و در فصل زایمان مشاهده می‌شود (۹).

از بین عوامل مختلف، اشریشیاکلی به دلیل شیوع بالا از اهمیت بیشتری برخوردار است. این باکتری فلور طبیعی بخش انتهایی روده کوچک و روده بزرگ حیوانات خونگرم را تشکیل می‌دهد.

در روده حیوانات خونسرد اغلب وجود ندارد و در معده و قسمتهای ابتدایی دستگاه گوارش حیوانات خونگرم نیز به ندرت یافت میشود (۹ و ۲).

آنتریت (اسهال سفید) در گوساله ها توسط سروتیپهای خاصی از اشریشیاکلی بروز می‌کند و در هفته اول پس از تولد بسیار مهم است.

عفونتهای روده ای به وسیله سویه‌های EIEC، EAEC، EHEC، EPEC و ETEC کلی باسیل رخ می‌دهد که شایعترین فرم در گوساله ها، کلی باسیلوز ناشی از سویه های آنترتوکسیژنیک است ولی فرم هموراژیک نیز گزارش شده است (۷).

بولگین در تحقیقات خود در ۲۰ درصد از گوساله های شیری (ماده) و ۱۲ درصد از گوساله های پرواری (نر) اسهال با منشا چند عاملی را مشاهده نمود (۴).

بولگین و سایر محققین نیز چند عاملی بودن اسهال گوساله ها را پدیده‌ای عادی بر می‌شمارند. شیوع E.coli آنترتوکسیژنیک در گوساله های اسهالی بین گله های مختلف بر حسب سن آنها در نقاط مختلف متفاوت است. شیوع می‌تواند بیشتر از ۶۰-۵۰٪ در گوساله های اسهالی با سن کمتر از ۳ روز و ۱۰-۵٪ در گوساله های اسهالی ۸ روزه باشد. در تعدادی از کشورها میزان شیوع در گوساله های اسهالی با سن کمتر از ۳ روز ۵-۸٪ است (۴).

در بیشتر موارد عفونت E. coli آنترتوکسیژنیک در گوساله‌های بالای ۲ تا ۳ روز همراه با یک عفونت ویروسی است. اسهال کلی باسیلی همراه با مدفوع زیاد و آبکی تا نیمه جامد و معمولاً زرد کم‌رنگ تا سفید یا سبز بوده و گاهی همراه با رگه ای از خون و بوی تعفن شدید می‌باشد (۹ و ۴).

با توجه به شیوه های دامداری سنتی در ایران و به ویژه در گرمسار (بدلیل اقلیم کویری آن)، می‌توان دریافت که کنترل و درمان این بیماری با مشکلات زیادی همراه است.

شیوه سنتی دامداری از آنجا که معمولاً با سطح پایین بهداشت همراه است همواره در معرض بیماری‌های گوناگون می‌باشد.

در گرمسار نیز چون اصول ساخت و بهداشت دامداریها و نگهداری دام با استاندارد فاصله دارد، بیماریهای مختلف از جمله اسهال گوساله ها شایع است.

در این تحقیق تلاش شده است که با بررسی منابع قابل دسترس، مشاهده، نمونه گیری و آزمایش، شناخت صحیحی از الگوی مقاومت اشریشیاکلی جدا شده از گوساله های اسهالی در دامداریهای اطراف گرمسار به دست آید.

مواد و روش کار

در این تحقیق مجموعاً ۱۲۴ نمونه مدفوع گوساله های اسهالی زیر یک ماه در طول فصول بهار و تابستان بعد از تکمیل فرم مشخصات جمع آوری شد. این گوساله ها قبل از نمونه گیری آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند.

نمونه ها را در محیط مک کانکی (Merck) کشت داده و باکتریهای رشد یافته بر اساس تخمیر یا عدم تخمیر لاکتوز به دو گروه لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی تفکیک شدند.

در مورد باکتریهای لاکتوز منفی ابتدا آزمایش اوره آز در محیط اوره برات (Merck) انجام شد و این گروه خود به دو دسته اوره آز مثبت و اوره آز منفی تقسیم گردید.

۳ مورد که معادل ۲/۴٪ می باشد با آنکه فرمول IMViC مشابه E. coli از خود نشان دادند ولی در محیط TSI ایجاد H₂S کردند.

۴ مورد آخر نیز فرمول IMViC دیگری از خود نشان دادند (جدول ۱).

باکتریهای لاکتوز منفی به محیط اوره تلقیح شد که از ۲۸ نمونه مورد آزمایش ۲۴ مورد معادل ۱۹/۳٪ اوره آز مثبت و ۴ مورد معادل ۳/۲٪ اوره آز منفی بودند.

در مورد باکتریهای لاکتوز منفی نیز آزمایشات IMViC انجام شد که نتایج آن بدین شرح است:

از ۲۴ مورد نمونه اوره آز مثبت ۱۹ مورد معادل ۱۵/۳٪ فرمول مشابه پروتئوس (+ + - ±) و در سایر موارد یعنی ۴٪ باکتریها فرمولی غیر پروتئوس داشتند.

نمونه های لاکتوز منفی و اوره آز منفی که در واقع مشکوک به سالمونلا بودند از لحاظ آزمایشات IMViC تشابهی با فرمول سالمونلا (+ - + -) نداشتند.

بیشترین میزان حساسیت اشریشیا کلی های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیکهای خانواده کینولون (انروفلوکساسین ۹۱/۵٪ و فلومکوتین ۸۱/۴٪) بود.

حساسیت به سایر آنتی بیوتیکها عبارت بود از جنتامایسین ۵۱/۳٪، تیامولین ۲۱/۵٪، تری متوپریم- سولفوکسازول ۱۸/۵٪، لینکواسپکتین و تتراسیکلین ۵/۷٪، نئومایسین و کلرامفنیکل با ۴/۳٪، اریترومایسین واکسی تتراسیکلین ۲/۶٪.

میزان حساسیت سویه ها نسبت به سه آنتی بیوتیک فورازولیدون، کلیستین و کانامایسین در حد متوسط بود و نسبت به پنی سیلین و تایلوزین کاملا مقاوم بودند (جدول ۲). نتایج مربوط به ارتباط سن و جنس در بروز اسهال در جدول ۳ آمده است.

سپس آزمایشات IMViC در مورد هر سه گروه انجام پذیرفت. باکتریهای لاکتوز مثبت با فرمول IMViC مشابه اشریشیاکلی (- -++) به محیطهای TSI و ائوزین متیلن بلو (Merck) تلقیح شدند.

آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک (کربی - بوئر) در مورد اشریشیاکلی های جدا شده در محیط مولر هیتون آگار انجام شد.

دیسکهای مورد استفاده عبارت بودند از: انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اکسی تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول- تری متوپریم (۴۰۰/۸۰ میکروگرم)، تایلوزین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم)، لینکواسپکتین (۱۵/۲ میکروگرم)، فلومکوتین (۵ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم)، تیامولین (۲۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، فورازولیدون (۱۰۰ میکروگرم) و پنی سیلین (۱۰ میکروگرم). نتایج آنتی بیوگرام بر اساس جدول NCCL در سه مرتبه حساس، حساسیت متوسط و مقاوم مورد ارزیابی قرار گرفتند (۶ و ۱).

از ۱۲۴ مورد کشت داده شده روی محیط مک کانکی ۷۷ مورد معادل ۶۲/۰۹٪ باکتری لاکتوز مثبت، ۲۸ مورد معادل ۲۲/۶٪ باکتری لاکتوز منفی و ۱۹ مورد معادل ۱۵/۳۲٪ هیچگونه باکتری در محیط مک کانکی رشد نکرد.

از ۷۷ مورد لاکتوز مثبت، ۷۰ مورد معادل ۵۶/۴٪ کل نمونه ها دارای فرمول IMViC مشابه اشریشیا کلی یعنی (- - + +) بودند و در محیط TSI نیز H₂S تولید نکردند.

E. coli :

جمع		ماده		نر		جنس گروهها
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	سن به روز
۲۱	۳۰	۸	۱۱/۴۳	۱۳	۱۸/۵۷	۱-۷
۷	۱۰	۳	۴/۲۹	۴	۵/۷۱	۸-۱۴
۱۶	۲۲/۸۵	۹	۱۲/۸۵	۷	۱۰	۱۵-۲۱
۲۶	۳۷/۱۵	۱۷	۲۴/۲۹	۹	۱۲/۸۵	۲۲-۳۰
۷۰	۱۰۰	۳۷	۵۲/۸۶	۳۳	۴۷/۱۴	جمع

:

تفسیر						ردیف	
مقاوم		متوسط		حساس			
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	آنتی بیوتیک	
۷۰	۱۰۰	-	-	-	-	<i>Penicillin</i>	۱
۱۱	۱۵/۷	۲۳	۳۲/۹	۳۶	۵۱/۴	<i>Gentamycin</i>	۲
۶۲	۸۸/۶	۸	۱۱/۴	-	-	<i>Kanamycin</i>	۳
۵۸	۸۲/۸	۹	۱۲/۹	۳	۴/۳	<i>Neomycin</i>	۴
۶۰	۸۵/۷	۸	۱۱/۴۲	۲	۲/۸۵	<i>Erythromycin</i>	۵
۵۶	۸۰	۱۰	۱۴/۳	۴	۵/۷۱	<i>Lincospectin</i>	۶
۶۱	۸۷/۱	۵	۷/۱۵	۴	۵/۷۱	<i>Tetracyclin</i>	۷
۵۷	۸۱/۴	۱۱	۱۵/۷	۲	۲/۵۸	<i>Oxytetracyclin</i>	۸
۳۷	۵۲/۸	۱۸	۲۵/۷	۱۵	۲۱/۵	<i>Tiamulin</i>	۹
۲۸	۴۰	۲۹	۴۱/۵	۱۳	۱۸/۵	<i>Trimethoprim+Sulfamethoxazol</i>	۱۰
۷۰	۱۰۰	-	-	-	-	<i>Tylosin</i>	۱۱
۲	۲/۸۵	۴	۵/۷۱	۶۴	۹۱/۵	<i>Enrofloxacin</i>	۱۲
۵	۷/۱۵	۸	۱۱/۴۲	۵۷	۸۱/۴۲	<i>Flumequine</i>	۱۳
۵۹	۸۴/۲	۸	۱۱/۴۲	۳	۴/۳	<i>Chloramphenicol</i>	۱۴
۳۴	۴۸/۵	۳۶	۵۱/۵	-	-	<i>Furazolidone</i>	۱۵
۶۱	۸۷/۱	۹	۱۲/۹	-	-	<i>Colistin</i>	۱۶

جمع		نر		ماده		جنس گروهها
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	سن به روز
۳۴	۲۷/۴۳	۱۹	۱۵/۳۲	۱۵	۱۲/۱	۱-۷
۱۵	۱۲	۷	۵/۶۴	۸	۶/۴۶	۸-۱۴
۲۶	۲۱/۰۷	۱۴	۱۱/۳	۱۲	۹/۶۷	۱۵-۲۱
۴۹	۳۹/۵	۱۷	۱۳/۷	۳۲	۲۵/۸	۲۲-۳۰
۱۲۴	۱۰۰	۵۷	۴۶	۶۷	۵۴	جمع

ماده و ۱۲٪ از گوساله های پرواری نر اسهال با منشاء چند عامل را مشاهده نموده است. بولگین (Bulgin) و سایر محققین چندعاملی بودن اسهال را امری عادی میدانند (۴). با توجه به نتایج بدست آمده و فرمهای تکمیل شده در مورد تاریخچه هر گوساله مورد بررسی به نظر می رسد که شیوع اسهال در گروه سنی ۲۲-۳۰ روز با ۳۹/۵٪ بیش از سایر گروهها می باشد (به جدول ۲ و ۳ مراجعه شود). همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که اگر چه شیوع اسهال در گروه سنی ۱-۷ روز با ۲۷/۴۳٪ از گروه سنی ۲۲-۳۰ روز کمتر است ولی عاملیت اشیرشیاکلی در بروز اسهال در این گروه با ۶۴/۷٪ از سایر گروهها بیشتر است. مشابه این نتایج در تحقیقات انجام شده توسط عظیمی در بابل و قائمشهر به دست آمده است (۳). شیوع بیشتر اسهال در سن چهار هفتگی را نیز می توان علاوه بر کاهش پادتن مادری به تغییر جیره غذایی مرتبط دانست زیرا در این سن دامداران شروع به تغذیه گوساله ها با آرد، علوفه خرد شده و سایر جانشین شونده های شیر می کنند. نتایج نشان می دهد که تفاوت قابل ملاحظه ای بین جنسهای نر و ماده وجود ندارد. همچنین دمای اخذ شده از گوساله های اسهالی هیچ

در این تحقیق از ۱۹ مورد (۱۵/۳٪) گوساله اسهالی عامل باکتریایی جدا نشد. این امر بیانگر این مطلب است که عوامل دیگری مثل ویروسها، انگلها و یا حتی تغذیه نیز در بروز اسهال نقش دارند. در تحقیقات انجام شده توسط رینولد و همکاران نیز در ۳۱٪ موارد عامل عفونت زای روده ای جدا نشده است. سایر محققین نیز در تحقیقات خود چنین نتایجی داشته اند. آنها این دست یافته ها را ناشی از عدم شناسایی عامل اسهال (بطور مثال ویروسها یا انگلها که در این تحقیق بررسی نشدند) و یا به علل تغذیه ای میدانند (۵ و ۸). لذا می توان نتیجه گیری نمود که اتیولوژی اسهال گوساله ها چند عاملی است. تحقیقات انجام شده توسط اسند گراس نشان می دهد که علت اتیولوژیک ۱۵٪ موارد اسهال دو عاملی و ۳/۰٪ موارد سه عاملی است (۱۰). بیشترین همراهی معمول در بین عوامل اسهال، بین روتاویروس و کریپتوسپوریدیوم مشاهده شده است ولی هیچ ارتباط متقابل بین آنها بصورت تجربی بدست نیامده است؛ ولی ارتباط متقابل و قابل ملاحظه ای بصورت تجربی بین روتاویروس و اشیرشیاکلی توکسیژنیک مشاهده گردیده است. بولگین (۴) در تحقیقات خود در ۲۰٪ از گوساله های

۲. حسنی طباطبایی. ع، فیروزی. ر، (۱۳۸۰): بیماریهای باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۲۳۱-۲۰۶

۳. عظیمی. ف، (۱۳۷۹): بررسی عفونت روده و سپتی سمی در اثر اشرشیا کلی در گوساله های نوزاد، پایان نامه عمومی شماره ۱۶۹، برای دریافت دکترای دامپزشکی (DVM)، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد گرمسار.

4. Bulgin, M. S., Anderson, B. C., Ward, A and Everman, J.F. (1982): Infections agents associated with neonatal calf disease in south western Idaho and eastern organ. JAVMA. 180(10): 1222

5. Me Nulty, M. A. and Logan, E. F. (1987): Veterinary Record 120, 250 sited in ref 57

6. Quinn, P.J, M. E., Carter, B. Markey, and G. R. Carter, 1994: Clinical Veterinary Microbiology. Wolf publishing, Pp: 95-102, 213-224 and 618-620.

7. Radostis, O.M., Blood, D. C. and Gouy, C. C. (1994): Veterinary Medicine 8th ed., Balliere Tindall, Pp: 1181-1190 and 711-712.

8. Reynold, D.J; Morgan, J.H. (1986): Microbiology of calf diarrhea in southern Britaine, Veterinary Record, 119:34-39

9. Smit B.P. (1996): Large Animal Internal Medicine. 2nd ed. Mosby, Pp: 390-414.

10. Snodgrass, D. R. Terzolo, H. R. Sherwood, D. Campbell, I. Menzies, J. D. Synge, B. A. (1986): Aetiology of diarrhoea in young calves. Veterinary Record. 119: 2, 31-34.

الگوی خاصی را نشان نمی‌دهد. از لحاظ نژاد، گوساله‌ها اکثراً از نژاد هولشتاین دو رگ بوده و با هدف شیرواری نگهداری می‌شدند. از آنجا که گوساله‌های گوشتی باسن بیشتر از یک ماه از دامداریهای خارج از استان آورده می‌شوند، عملاً بررسی اسهال در گوساله‌های گوشتی این منطقه غیر ممکن به نظر می‌آید، به همین دلیل گوساله‌های مورد مطالعه شیری بودند. از دیگر مواردی که در این تحقیق مشاهده شد، خوراندن میزان کم آغوز (کمتر از ۱/۵ لیتر) به گوساله‌ها در ۶ ساعت اول بعد از تولد بود.

از آزمایش آنتی بیوگرام نیز این نتیجه حاصل شد که اشریشیای جدا شده به اکثر گروههای آنتی بیوتیکی مورد استفاده در درمان اسهال مقاومت دارند. این مقاومت دارویی در دامداریهای سنتی بیشتر از صنعتی مشاهده شد که شاید به دلیل مصرف بی رویه و مداوم یک نوع دارو و یا عدم رعایت دزهای درمانی آنتی بیوتیکها باشد. بولگین و همکاران (۴) نیز در تحقیقات خود مشاهده کردند که سالمونلا و اشریشیاکلی در شرایط آزمایشگاه نسبت به برخی داروها، خصوصاً آنهایی که در درمان اسهال گوساله‌ها استفاده می‌شوند، مقاومت دارند. در این مطالعه *E. coli* جدا شده از گله‌های پرواری آیداهو حساسیت کمی نسبت به تتراسیکلین و نئومايسين داشتند (۴). در نهایت آنچه که باید در کنترل و درمان اسهال گوساله‌های نوزاد مورد توجه قرار گیرد افزایش سطح بهداشت محیط نگهداری آنها، دریافت مقدار کافی و به موقع آغوز غنی از ایمونوگلوبولین توسط گوساله‌ها و انتخاب آنتی بیوتیکهای موثر با دزهاژ صحیح برای درمان کامل اسهال، می‌باشد.

فهرست منابع

۱. نادری نسب. م، راشد. ط (۱۳۷۰): باکتری شناسی آزمایشگاهی، چاپ اول، انتشارات آستان قدس رضوی، صفحات ۷۳-۵۱