مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع ژن های مقاومت به تتراسیکلین در سویه های اشریشیا کلی مولد اسهال جدا شده از کودکان

میثم سرشار[1*]، حدیث طوافی[2]، صادق قربانی دالینی[1]، نگار صعود[1]، محمد کارگر[3]، نادر شاهرخی[4]

1. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)
2. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
3 . میکروب شناس، دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
4. استادیار بیوتکنولوژی پزشکی، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تلفن: 09127870650 meysam_sarshar@yahoo.com
دریافت مقاله: دی نود پذیرش برای چاپ: اسفند نود

چکیده

سابقه و هدف: *اسهال از جمله علل مهم و اصلی مرگ و میر در کودکان زیر 5 سال در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. در میان پاتوژن های باکتریایی، اشرشیا کلی مولد اسهال (Diarrheagenic E. coli) از مهم ترین عوامل ایجاد کننده اسهال های اندمیک و اپیدمیک در سراسر جهان بشمار می رود. هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع ژن های مقاومت به تتراسیکلین در اشریشیا کلی های مولد اسهال جدا شده از کودکان زیر 5 سال می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه توصیفی - مقطعی، 450 نمونه مدفوع از 3 بیمارستان در جنوب شرق ایران، جمع آوری شد. آزمون های بیوشیمیایی افتراقی جهت جداسازی اشریشیا کلی انجام شد. با استفاده از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل CLSI، مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت از PCR جهت بررسی مولکولی ژن های مقاومت به تتراسیکلین (tetA، tetB و tetC) استفاده گردید.*

یافته ها: *از 450 نمونه مدفوع جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، 77 ایزوله اشرشیا کلی اسهال زا تشخیص داده شد. بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی، مربوط به تتراسیکلین (55/8%) بود. . مقاومت در برابر آمیکاسین در هیچ ایزوله ای دیده نشد. در میان ایزوله های مقاوم به تتراسیکلین، 38 ایزوله (88/4%)، دارای ژن های tet بودند که در 33 سویه (76/7%) ژن tetA، 27 سویه (62/7%) ژن tetB و 6 سویه (13/9%) ژن tetC تشخیص داده شد.*

نتیجه گیری: *مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی اسهال زا و همچنین درصد ژن های مقاومت به تتراسیکلین در کودکان مبتلا به اسهال بالا است. این مسئله می تواند نشان دهنده مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک ها باشد. لذا بهتر است که نسبت به استفاده از روش های درمانی رایج، اقدامات مناسب تری به عمل آید.*

واژگان کلیدی: ***اشریشیا کلی اسهال زا، مقاومت به تتراسیکلین، PCR، ژنهای tet***

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی می باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها است و این امر منجر به پیدایش و انتشار پاتوژن های مقاوم و ژن های مقاومت در آن ها می شود. در جمعیت های انسانی و حیوانی، آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری های عفونی استفاده می گردند(1). یکی از این بیماری‌های عفونی شایع، اسهال است که از جمله علل مهم و اصلی مرگ و میر در کودکان زیر 5 سال در کشورهای در حال توسعه معرفی شده است(2). سالانه نزدیک به یک میلیارد مورد اسهال در کودکان زیر 5 سال اتفاق می‌افتد که از این میان حدود 4/5 میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند(5-3). در ایران نیز اسهال دومین عامل مرگ و میر کودکان بعد از عفونت های تنفسی به شمار می‌رود(6). در میان پاتوژن‌های باکتریایی، اشریشیا کلی به عنوان یکی از باکتری‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. اشریشیا کلی مولد اسهال (Diarrheagenic E. coli) از مهم‌ترین عوامل مسبب اسهال های اندمیک و اپیدمیک در جهان شناخته شده است(8-5). سویه های اشریشیا کلی مقاوم به عوامل آنتی میکروبیال، می توانند بین فراورده های غذایی حیوانی و انسانی در زنجیره غذایی منتقل شده و ژن های مقاومت خود را به پاتوژن های دیگر انتقال دهند(1).

در میان اشریشیا کلی‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، شیوع سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین از فراوانی بالایی برخورد است(8). این آنتی بیوتیک به دلیل قیمت پایین و کم بودن اثرات جانبی آن کاربرد وسیعی در درمان عفونت‌های دامی و انسانی دارد. در صنعت دام داری از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به عنوان پروموتور رشد آنتی‌بیوتیکی استفاده فراوانی می‌گردد، که یکی از این پروموتورهای رشد، تتراسیکلین می‌باشد. استفاده بیش از حد و کنترل نشده از این آنتی‌بیوتیک در دام ها باعث افزایش سویه های باکتریایی مقاوم به آن شده است(12-9). مقاومت به تتراسیکلین، مربوط به ژن های tet می‌باشد. تشخیص و جداسازی ژن های tetA، tetB و tetC نسبت به ژن‌های دیگر tet بیشتر دیده شده و از اهمیت بیشتری برخوردار هستند(15-11). پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها از عوامل اصلی گسترش سریع ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در میان سویه‌های اشریشیا کلی می‌باشند(15). شیوع مقاومت به تتراسیکلین، نشانگر مناسبی برای ارزیابی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک است و ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم گردد(16).

مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و همچنین تعیین میزان توزیع ژن های مقاومت به تتراسیکلین (tetA، tetB و tetC) با استفاده از روش PCR در میان سویه های اشریشیا کلی مولد اسهال جداشده از کودکان زیر 5 سال می‌باشد.

روش کار

دریک مطالعه توصیفی- مقطعی، طی مدت 9 ماه (از فروردین لغایت آذر ماه 1389)، 450 نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال حاد، از بیمارستان‌های نمازی، شهید فقیهی و مطهری شیراز، جمع آوری گردید. نمونه برداری به شیوه نمونه‌گیری مستمر از کودکان زیر 5 سال که با بیماری اسهال به بیمارستان ارجاع شده بودند، صورت گرفت. اطلاعات مورد نیاز متناسب با اهداف ویژه طرح شامل اخذ مجوز از کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه و رضایت نامه کتبی از والدین بیماران براساس اطلاعات فهرست بندی شده تنظیم گردید. محاسبه حجم نمونه با توجه به شیوع متوسط 25 درصدی اشریشیا کلی مولد اسهال، با ضریب اطمینان 95 درصد و سطح خطای 0/04 انجام گرفت. جهت ایزوله سازی سویه های اشریشیا کلی، نمونه ها بر روی محیط EMB و هکتون انتریک آگار (MERCK) کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت انکوباسیون، کلنی‌های خالص تخمیر کننده لاکتوز با تست های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی نظیر اوره، SIM، MR/VP، TSI، سیمون سیترات و لیزین دکربوکسیلاز (تمامی محیط های فوق ساخت شرکت مرک آلمان) به عنوان سویه های اشریشیا کلی مورد تایید واقع شدند.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده با تعداد دوازده عدد دیسک آنتی بیوتیک رایج ساخت شرکت پادتن طب مورد استفاده قرار گرفت که عبارت بودند از: تتراسیکلین (30µg)، استرپتومایسین (10µg)، جنتامایسین (10µg)، نالیدیکسیک اسید (30µg)، ایمی پنم (20µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سفتری‌آکسون (30µg)، سفکسیم (5µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، نیتروفورانتوئین (300µg)، آمیکاسین (30µg) و کلرامفنیکل (30µg). به این منظور از روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل (CLSI) بهره گرفته شد(17).

کلنی های خالص شده باکتری ها بر روی محیط لوریا- برتانی آگار (Merck) به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. از کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت، برای استخراج DNA استفاده شد. به این منظور یک کلنی باکتریایی در 200 میکرولیتر سرم فیزیولوژی حل گردید و بعد از یکنواخت شدن محلول، با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت کیاژن طب) و طبق دستورالعمل گفته شده در کیت، استخراج DNA انجام شد. به منظور تشخیص حضور ژن های مقاومت به تتراسیکلین (tetA، tetB، tetC) از روش PCR استفاده گردید. در جدول1 توالی پرایمرهای استفاده شده آورده شده است. PCR از ژن های مذکور مطابق شرایط معمولی و با مقادیر ذکر شده صورت پذیرفت(جدول 2). برای بررسی نتایج حاصل از PCR، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز 1/5% و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده گردید. برنامه دمایی دستگاه ترموسیکلر برای تکثیر ژن های مورد نظر در جدول 3 نمایش داده شده است. نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS (IBM Co., SPSS Statistics) و آزمون های آماری مربع کای، و دقیق فیشر آنالیز گردید. مرز معنی داری روی $p<0/05$ قرار داده شد.

جدول 1: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های tet

ژن ها	توالی پرایمر ها (5'→3')	اندازه محصول (bp)	منبع
tetA	F: AAGCGAGCGGGTTGAGAG R: GCCTTTCCTTTGGGTTCTC	326	این مطالعه
tetB	F: ACTTCGGTATCTGTATTATCACG R: TTATCTTTGCTCCTTGGCTTG	415	این مطالعه
tetC	F: TTGTTTCGGCGTGGGTATG R: CTGACTGGGTTGAAGGCTCTC	188	این مطالعه

جدول 2: مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR (تمامی مواد فوق از شرکت کیاژن طب تهیه گردید)

مقادیر	ترکیبات (غلظت)
2/5 µl	DreamTaq™ PCR buffer(10X)
2 µl	MgCl2(25mM)
1 µl	dNTPs(2mM)
1 µl	Taq polymerase(5U/µl)
1/5 µl	Primer F: (20 p.mol)
µl 1/5	Primer R: (20 p.mol)
2 µl	DNA
13/5 µl	Distilled water
25 µl	Total Volum

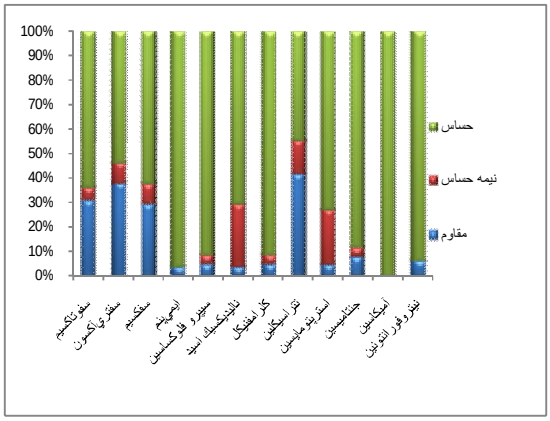
جدول 3: برنامه ی دمایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن های tetA، tetB و tetC

تعداد چرخه	زمان	دما	نام مرحله	چرخه
1 بار	5 دقیقه	95°C	واسرشت اولیه	اول
30 بار	1 دقیقه	94°C	واسرشت شدن	دوم
	1 دقیقه	58°C	اتصال پرایمر ها	
	1 دقیقه	72°C	گسترش	
1 بار	5 دقیقه	72°C	گسترش نهایی	سوم

یافته ها

از مجموع 450 نمونه مورد بررسی، 77 ایزوله اشریشیا کلی مولد اسهال شناسایی گردید. از این میان 49 مورد (63/64%) مربوط به جنس مذکر با میانگین سنی 17 ماه و 28 مورد (36/36%) مربوط به جنس مونث با میانگین سنی 14 ماه بودند. همچنین از بین 77 نمونه مثبت مورد بررسی،30، 31 و 16 مورد مربوط به نمونه‌هایی بودند که به ترتیب در فصل های بهار، تابستان و پاییز جمع آوری شدند. از متداول ترین علائم بالینی مشاهده شده در افراد مورد پژوهش می‌توان به اسهال خونی، تب و تهوع اشاره کردکه به ترتیب دارای فراوانی 20/78%، 64/93% و 67/53% بودند. بیشترین شیوع اشریشیا کلی مولد اسهال به ترتیب در گروه‌های سنی کمتر از 1 سال (45/45%) و 1 تا 2 سال (41/56%) و کمترین شیوع آن در گروه سنی 3 تا 5 سال (12/99%) دیده شد.

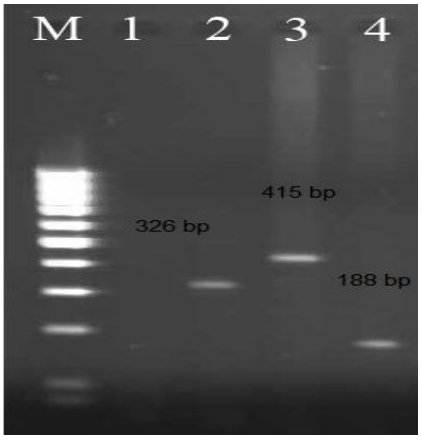
بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلین (55/8%) بود و مقاومت مربوط به آمیکاسین در هیچ نمونه ای دیده نشد. مقاومت به سفتری‌آکسون 46/7%، سفکسیم 37/7%، سفوتاکسیم 36/4%، نالیدیکسیک اسید 29/9%، استرپتومایسین 27/3%، جنتامیسین 11/7%، سیپروفلوکساسین 9/1%، کلرامفنیکل 9/1%، نیتروفورانتوئین 6/5% و ایمی‌پنم 3/9% مشاهده گردید(نمودار1).



شکل 1: شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های *اشریشیا کلی* مولد اسهال

از میان 77 ایزوله اشریشیا کلی جدا شده از کودکان، 51 نمونه (66/2%) دارای ژن های tet بود. از این میان، tetA، tetB و tetC به ترتیب در 38 (74/5%)، 31 (60/8%) و 7 نمونه (13/7%) شناسایی گردید. همچنین 43 ایزوله (55/8%) به صورت فنوتیپی نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین مقاومت داشت، که از این تعداد 38 نمونه (88/4%) دارای ژن های tet بود، بطوریکه ژن tetA در 33 نمونه (76/7%)، ژن tetB در 27 نمونه (62/7%) و ژن tetC در 6 نمونه (13/9%) مشاهده شد. نتایج حاصل از PCR ژنهای tet در شکل 2 نشان داده شده است.

مقاومت به تتراسیکلین، در همراهی با مقاومت با آنتی بیوتیک های سفتری‌آکسون (8 مورد)، سفکسیم (6 مورد)، سفوتاکسیم (6 مورد)، نالیدیکسیک اسید (4 مورد) و استرپتومایسین (4 مورد) بود. به علاوه سویه هایی که حامل ژن های tetA و tetB بودند (به ترتیب p=0/0003 و p=0/002)، مقاومت بسیار بیشتری به آنتی بیوتیک ها، نسبت به سویه هایی که به تتراسیکلین حساس بودند داشتند (61 و 42 درصد در برابر 13درصد).



شکل 1: آمپلیکون‌های حاصل از تکثیر ژن‌های tet،

ردیف M: سایز مارکر 1000 جفت بازی، ردیف 1: کنترل منفی، ردیف 2: آمپلیکون 326 جفت بازی ژن tetA، ردیف 3: آمپلیکون 415 جفت بازی ژن tetB و ردیف 4: آمپلیکون 188 جفت بازی ژن tetC

بحث

اسهال از عفونت های شایع و از جمله علل مهم و اصلی مرگ و میر در کودکان زیر 5 سال در کشور های در حال توسعه گزارش شده است(2، 6، 23 و 26). در میان طیف میکروبی عامل اسهال در انسان (ویروس‌ها، باکتری‌ها و ...)، اشریشیا کلی یکی از مهم ترین علل گاستروانتریت در نوزادان وکودکان زیر 5 سال است. مطالعات فراوانی جهت بررسی پاتوژن های روده‌ای مولد اسهال در دنیا انجام گرفته است که مقایسه نتایج آنها بیان کننده متغییر بودن شیوع آنها در مناطق مختلف می‌باشد(18و 19).

در سال های اخیر استفاده از طیف وسیعی از آنتی بیوتیک های مختلف از جمله سفالوسپورین ها، کینولون ها و آمینوگلیکوزیداز ها از تدابیر درمانی مناسب به منظور کنترل اسهال های عفونی در افراد مختلف می باشد(20و 21). به دلیل استفاده زیاد از داروهای آنتی میکروبی، شیوع و انتشار کلون‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در بیمارستان‌ها افزایش یافته است(1). اگر چه فلور روده از تعداد زیادی گونه‌ی باکتریایی تشکیل شده است، اما اشریشیا کلی نسبت به گونه‌های دیگر انتروباکتریاسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری را از خود نشان می‌دهد و این مسئله، هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است(22).

در این مطالعه، از 77 مورد اشریشیا کلی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (55/8%)، سفتری آکسون (46/7%)، سفکسیم (46/7%) و سفوتاکسیم (43/3%) نشان داده شد. در بررسی که توسط Djie-Maletz و همکارانش در سال 2008 صورت گرفت، نتایج نشان دهنده میزان بالایی از مقاومت دارویی در کودکان دارای اسهال بود. در نتایج بدست آمده توسط این گروه، 81 الی 91% از سویه های اشرشیا کلی های جدا شده، به آمپی سیلین، 76 الی 88% به تری متوپریم و 41 الی 44% به کلرامفنیکل، مقاومت داشتند(23). در گزارشی دیگر، Theresa و همکاران در سال 2009، میزان مقاومت دارویی را در مورد ایزوله های اشریشیا کلی اسهال زا در 1034 نوزاد، مورد مطالعه قرار دادند. در میان ایزوله جدا شده، 85% نسبت به آمپی سیلین، 79% به کوتریماکسازول، 65% به تتراسایکلین و 28% به نالیدیسیک اسید مقاومت نشان دادند(24). در مطالعه حاضر نیز بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به تتراسیکلین (55/8%) و کمترین مقاومت مربوط به آمیکاسین (0%) بود.

در طی بررسی که Tarig و همکاران در سال 2006، بر روی حساسیت ایزوله‌های اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف داشتند، نشان داد که ایزوله های مورد مطالعه حساسیت بالایی نسبت به ایمی پنم دارند(25). همچنین Garcia و همکارانش در سال 2011، مطالعه ای بر روی میزان شیوع سویه های اسهال زای اشریشیا کلی و مقاومت میکروبی شایع در میان نمونه‌های مدفوع کودکان زیر 5 سال انجام دادندکه نتایج حاکی از آن بود که بیشترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین، تتراسیکلین و سولفامتوکسازول می باشد. همچنین این گروه دارو های موثر در درمان عفونت های ایجاد شده را سفتازیدیم، سفتری‌آکسون و ایمی پنم گزارش کردند(2). نتایج این پژوهش نشان داد که آمیکاسین، ایمی‌پنم و نیتروفورانتوئین موثرترین آنتی‌بیوتیک ها در برابر سویه های ایزوله شده می باشند.

نکته جالب توجه در این مطالعه و سایر مطالعات صورت گرفته این است که، سویه های مقاوم به تتراسیکلین و حامل ژنهای tet، مقاومت بیشتری به آنتی بیوتیک ها، نسبت به سویه هایی که به تتراسیکلین حساس می باشند دارند. با وجود اینکه از تتراسیکلین در درمان عفونت های انسانی کمتر مورد استفاده قرار می گیرد، اما کماکان شیوع بالای مقاومت به آن مشاهده می شود. از طرفی یکی از مهمترین دلایل مقاومت بالا به تتراسیکلین، درمان سایر عفونت های روده ای در انسان و حیوانات با استفاده از این آنتی بیوتیک و در نهایت مقاومت باکتریها و انتقال ژن ها مقاومت به تتراسیکلین از طریق پلاسمید ها و ترانسپوزون ها به باکتری های کومنسال می باشد. استفاده بیش از حد از این آنتی بیوتیک در دامها یکی دیگر از دلایل مقاومت به این آنتی بیوتیک در انسان و انتقال ژنهای مقاومت از سویه های حیوانی به انسانی می باشد(14-11).

به همین منظور در مطالعه حاضر، به منظور تعیین میزان توزیع ژن های مقاومت به تتراسیکلین از روش PCR که روشی سریع و با اختصاصیت بالا می باشد، استفاده شد. نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که از میان اشریشیا کلی های مقاوم به تتراسیکلین، 38 ایزوله (76/6%)، دارای ژن های tet بودند، که از این تعداد، ژن tetA در 33 سویه (76/7%) ژن tetB در 27 سویه (62/7%) و ژن tetC در 6 سویه (13/9%) مشاهده گردید. Sandalli و همکاران در سال 2010، ژن های مقاومت به تتراسیکلین را در تعدادی از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه های مقاوم به تتراسیکلین مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گروه نشان داد که از 52 سویه مقاوم به تتراسیکلین، 15/3% از آنها دارای ژن tetA و 19/2% دارای ژن tetB بودند و تنها در یک مورد از آنها هر دو ژن tetA و tetB یافت شد(26). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از PCR ژنهای tet نشان داد که سویه های نیز وجود دارند که نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین مقاومت داشته اما در عین حال هیچ یک از ژن‌های tet مورد بررسی را حمل نمی کنند. با این وجود، نتایج بدست آمده در مطالعه Bryan و همکاران در سال 2004 (11)، Saenz و همکاران در سال 2004 (12) و Karimi و همکاران در سال 2006 (13) نشان داد که ژن های tetB و tetA با درصد متفاوتی، در تمامی سویه های اشریشیا کلی که به صورت فنوتیپی به تتراسیکلین مقاومت دارند، وجود دارد. همسوی با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، Tuchman و همکاران در سال 2007 نیز نشان دادند که برخی از سویه های مقاوم به تتراسیکلین وجود دارند که حامل هیچ یک از ژنهای tet نمی باشند(14). نکته جالب در مطالعه حاضر این بود که با توجه به شیوع بالای ژنهای tetB و tetA در سویه های اشریشیا کلی مقاوم به تتراسیکلین، نتایج این پژوهش نشان داد که ژن tetA از فرکانس و شیوع بیشتری نسبت به ژن tetB، در سویه های اشریشیا کلی مورد بررسی دارد (76/7% در برابر 62/7%). همسوی با نتایج بدست آمده در این مطالعه که ژن tetA نسبت به سایر ژن های مورد بررسی بیشترین فراوانی را داشت، در مطالعه ای که توسط Sianglum و همکارانش در سال 2009 انجام گرفت نیز در 15 مورد از 18 ایزوله ای که مقاومت به تتراسیکلین داشتند، 83/3% ایزوله ها، دارای ژن tetA بودند(27). این در حالی است که نتایج بررسی اکثر مطالعات صورت گرفته بیانگر شیوع بیشتر ژن tetB نسبت به ژن tetA در سویه های اشریشیا کلی مقاوم به تتراسیکلین می باشد(14-11).

نتیجه گیری

با توجه به مشاهده روز افزون مقاومت بـه برخـی از آنتـی بیوتیـک هـا و تغییرات گسترده طیف اثر بخشی نسبت به داروها و جلوگیری از افزایش موارد مقاوم به دارو، ضرورت اجرای آزمون های حساسیت دارویـی بسـیار ضروری به نظر می رسد. شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی اسهال زا و همچنین درصد بالای ژن هـای مقاومـت بـه تتراسـیکلین در کودکان مبتلا به اسهال در این مطالعه، می توانـد نشـان دهنـده مصـرف بـی‌رویـه آنتـی بیوتیـک هـا باشـد. سـرانجام اینکـه، شـیوع مقاومـت بـه تتراسیکلین، مارکر مفیدی برای بررسی ژن های مقاومت بوده و می تواند در بررسی های اکولوژیکی مفید واقع گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و باشگاه پژوهشگران دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل تامین بودجه مالی این تحقیـق، همچنین از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشـگاه آزاد شـهرکرد و جنـاب آقای دکتر عباس دوستی به دلیل حمایت از انجام طـرح در ایـن مرکـز و تهیه امکانات مورد نیاز کمال تشکر و قدردانی را دارد.

REFERENCES

1. Van den Bogaard, A. E.; Stobberingh, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents. 200, 14, 327–335.

2. Garcia, P. G.; Silva, V. L.; Diniz, C. G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. J Microbiol. 2011, 49, 46-52.

3. Guerrant, R. L.; Bobab, D. A.; Mandell, G. L.; Bennet, J. E.; Doli, R. Principles and practice at infections disease, nausea, vomiting and non-inflamatory diarrhea. New york, Churchill Livingstone. 2005, 6, 1236-49.

4. Phetsouvanh, R.; Midorikawa, Y.; Nakamura, S. The seasonal variation in the microbial agents implicated in the etiology of diarrheal disease among children in Lao southeast Asia. J Trop Med Public Health. 1999, 30, 319–23.

5. Seas, C.; Alarcon, M.; Aragon, J. C.; Beneit, S.; Quiñonez, M.; Guerra, H.; Gotuzzo, E. Surveillance of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in Lima Peru. J Infect Dis. 2000, 4, 96-9.

6. Katouli, M.; Jaafari, A.; Farhoudi-Moghaddam, A. A.; Ketabi, G. R. Etiological studies of diarrheal diseases in infants and young children in Iran. J Trop Med Hyg. 1990, 93, 22-7.

7. Sunabe, T.; Honma,Y. Relathionship between o_serogroup and presence of pathogenic factor genes in Esherichia coli. Microbiol Immunol. 1998, 42, 845-9.

8. Koo, H. J.; Woo, G. J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. Int J Food Microbiol. 2011, 14, 407– 413.

9. Chopra, I.; Roberts, M. C. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001, 65, 232 –260.

10. Ahmed, M. O.; Clegg, P. D.; Williams, N. J.; Baptiste, K. E.; Bennett, M. Antimicrobial resistance in equine faecal Escherichia coli isolates from North West England. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010, 9, 12-18.

11. Bryan, A.; Shapir, N.; Sadowsky, M. J. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical Escherichia coli strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 2004, 70, 2503-7.

12. Sáenz, Y.; Briñas, L.; Domínguez, E.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Vila, J.; Torres, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48, 3996-4001.

13. Karami, N.; Nowrouzian, F.; Adlerberth, I.; Wold, A. E. Tetracycline resistance in Escherichia coli and persistence in the infantile colonic microbiota. Antimicrob Agents Chemother. 2006, 50,156-61.

14. Tuckman, M.; Petersen, P .J.; Howe, A. Y.; Orlowski, M.; Mullen, S.; Chan, K.; Bradford, P. A.; Jones, C. H. Occurrence of tetracycline resistance genes among Escherichia coli isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51, 3205-11.

15. Ogeppaard, H.; Steinum, M. T.; Wasteson, Y. Horizontal Transfer of a Multi-Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a Farm Environment. Appl Environ Microbiol. 2001, 67, 3732–3734.

16. Gow, S. P.; Waldner, C. L.; Harel, J.; Boerlin, P. Associations between Antimicrobial Resistance Genes in Fecal Generic Escherichia coli Isolates from Cow-Calf Herds in Western Canada. App Environ Microb. 2008, 47, 3658–66.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Document M10-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.

18. Dadie, A.; Tagro, G.; Ocho Anin, L.; Dako, E.; Dje, M.; Dosso, M. Gastroenteritis E. Coli carried by milk products sold in the street of Abidjan, cote d'ivoire. Europ J Sci Res. 2010, 39, 143-152.

19. Kandakai-Olukemi, Y. T.; Mawak, J. D.; Onojo, M. M. Isolation of enteropathogenic Escherichia coli from children with diarrhoea attending the national hospital in Abuja,Nigeria. Shiraz E Med J. 2009, 10, 99-101.

20. Hammerum AM, Heuer OE. Human Health Hazards from Antimicrobial Resistant Escherichia coli of Animal Origin. Clin Infect Dis. 2009, 48, 916-21.

21. Chastre J. Evolving problems with resistant pathogens. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14, 3–14.

22. Osterblad, M. A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. Antimicrob Agents Chemother. 2000, 44, 1479–1484.

23. Djie-Maletz, A.; Reither, K.; Danour, S.; Anyidoho, L.; Saad, E.; Danikuu, F. et al. High rate of resistance to locally used antibiotics among enteric bacteria from children in Northern Ghana. J Antimicrob Chemother. 2008, 61, 1315–1318.

24. Theresa, J. O.; Joaquim, R.; Margarita, M.; Luis, J. D.; Valle, M. V. O.; Ana, I. G. et al. High frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic E. coli in Peruvian infants. Am J Trop Med Hyg. 2009, 81, 296–301.

25. Tariq, N.; Jaffery, T.; Ayub, R.; Alam, A. Y.; Javid, M. H.; Shafique, S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. J Coll Physicians Surg Pak. 2006, 16, 196-199.

26. Sandalli, C.; Sevim, A.; Ozgumus, O. B. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol. 2010, 26, 2099–2103.

27. Sianglum, W.; Kittiniyom, K.; Srimanote, P.; Wonglumsom, W. Development of Multiplex PCR assays for detection of antimicrobial resistance genes in Escherichia coli and enterococci. Journal Rapid Methods Autumn Microbiol. 2009, 17, 117–134.