مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دهم، شماره چهارم، پیاپی چهلم، بهار ۱۴۰۱ (۸۶-۷۷)

DOI: 10.30473/eab.2021.59054.1831

مقاله پژوهشی:

ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به کینولون و تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی

نواب قبادی[1*]، رضا حکیمی آلنی[2]

۱. مربی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه غیرانتفاعی روزبهان، روزبهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲۱- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۶)

چکیده

اشرشیاکلی یک باکتری است که سبب بیماری‌های متعدد در انسان و دام میگردد. این باکتری به‌دلیل افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات عدیده‌ای در صنعت دامداری و پزشکی ایجاد کرده است. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت به فلوروکینولون‌ها، شناسایی ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به کینولون (PMQR) و تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های انسانی و گاوی در همدان می‌باشد. در این مطالعه توصیفی تحقیقی، تعداد ٤٠ جدایه اشریشیاکلی (۲۰ جدایه انسانی، ۲۰ جدایه گاوی) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا مقاومت جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین با روش میکرودایلوشن براث سنجیده شد و سپس شناسایی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها (qnrA، qnrB، qnrC، qnrD، qnrS و acc) با روش PCR انجام گرفت. در ادامه توانایی جدایه‌های اشرشیاکلی در تولید بیوفیلم با روش میکر تیتر پلیت و میکروسکوپ الکترونی سنجیده شد و نتایج با استفاده از آزمون مربع کای با نرم‌افزار SPSS (ورژن ۱۹) مورد آنالیز قرار گرفت نتایج میکرو دایلوشن براث نشان داد که از ٤٠ جدایه *اشریشیاکلی*، ٢٦ جدایه (٦٥ درصد) به سیپروفلوکساسین و ۲۳ جدایه (۵۷/۵ درصد) به لوفلوکساسین مقاوم بود. در بررسی فراوانی ژن‌های PMQR با روش PCR، فراوانی ژن‌های qnrA، qnrB، qnrC، qnrD، qnrS و aac به‌ترتیب ٤٥، ٤٧/٥، ٦٧/٥، ٢٧/٥، ٦٠ و ٥٥ درصد گزارش شد. همچنین نتایج میکروتیتر پلیت نشان داد که٤٠ درصد ایزوله ها توانایی تشکیل بیوفیلم قوی را دارند و تنها ٤ درصد بیوفیلم تشکیل ندادند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مکانیسم اصلی مقاومت این‌جدایه‌ها به فلوروکینولون‌ها مربوط به ژن‌های PMQR می‌باشد و احتمالاً مصرف بی‌رویه فلوروکینولون‌ها در عفونت‌های انسانی، منجر به گسترش مقاومت به این داروها در جدایه‌های انسانی نسبت به جدایه‌های گاوی شده است. همچنین تشکیل بیوفیلم در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها نقش بسزایی داشت.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، بیوفیلم، ژن‌های PMQR، فلوروکینولون.

Evaluation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Escherichia coli*

NavabGhobadi[1*], Reza HakimiAleni[2]

1. Instructor, Department of Animal science, School of Agriculture, Payame Noor University, P.O.Box: 19395-3697, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Rouzbahan Non-Profit University, Rouzbahan, Iran

(Received: May 11, 2021 - Accepted: Nov. 27, 2021)

Abstract

Escherichiacoli is an opportunistic pathogenic bacterium that causes numerous diseases in humans and animals.Because of increased resistance to antibiotics, this bacterium has raised many concerns in the livestock industry as well as in medicine. The aim of this study was to determine the resistance to fluoroquinolones, to identify plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and to determine the biofilm formation ability of E. coli strains isolated from human and bovine samples in Hamadan.In this descriptive study, 40 isolates of E. coli(20 human isolates, 20 bovine isolates) were studied. First, the resistance of the isolates to ciprofloxacin and levofloxacin was measured by microdilution broth method, and then the identification of fluoroquinolone resistance genes (qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS and acc) was performed by PCR method. In the following, the ability of E. coli isolates to produce biofilm was evaluated by microtiter plate method and the results were analyzed by chi-square test using SPSS software (version 19). Microdilution results showed of 40 E.coli isolates, 26 (65%) were resistant to ciprofloxacin and 23 (57.5%) were found to be resistant to levofloxacin.In PMQR genes frequency analysis by PCR,the qnrA, qnrB, qnrC,qnrD, qnrS and aac genes were detected in 45%, 47.5%, 67.5%, 27.5%, 60% and 55% of the isolates, respectively. Also microtiter plate test results showed that 40% of the isolates were capable of forming strong biofilm and only 4% did not form biofilm.The results of the present study showed that the main mechanism of resistance to fluoroquinolones is related to PMQR genes and possibly excessive use of fluoroquinolones in human infections leads to the development of resistance to these drugs.Biofilm formation has also been shown to be effective in creating fluoroquinolone resistance.

Keywords: Escherichia coli, Fluoroquinolone, Biofilm, PMQR genes.

* نویسنده مسئول: نواب قبادی Email: navabd21@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی شایع‌ترین گونه باسیل گرم منفی در فلور مدفوعی است که از طریق آب و غذا بین انسان و دام قابل انتقال است (Alni *et al*., 2018). این باکتری موجب بیمارهای متعدد در انسان و دام می‌گردد به طوری که یکی از عوامل مهم عفونت بیمارستانی بوده که به‌دلیل مقاومت دارویی بالا منجر به مشکلات عدیده‌ای در پزشکی شده است (Rasko *et al*., 2008). از طرفی دیگر اشریشیاکلی از عوامل مهم ایجاد کننده ورم پستان در گاو بوده که به‌دلیل کاهش تولید شیر منجر به ضرر و زیان اقتصادی بالا در صنعت دامداری می‌گردد (Burvenich *et al*., 2003).کینولون‌ها از داروهای رایج در درمان عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی از جمله اشریشیاکلی به حساب می‌آید. متاسفانه در سال‌های اخیر مقاومت به این داروها در بین انتروباکتریاسه‌ها در حال افزایش است. مقاومت به کینولون‌ها در انتروباکتریاسه به‌طور عمده به‌علت موتاسیون در ژن‌های کروموزومی کدکننده توپوایزومرازها رخ می‌دهد (Rodríguez-Martínez*et al*., 2011; FarajzadehSheikh *et al*., 2019). اما در بیشتر مطالعات انجام شده درسالهای اخیر گزارش‌هایی ازمقاومت به کینولون‌ها با واسطه ژن‌های پلاسمیدی (PMQR) گزارش گردیده است. این ژن‌ها به‌دلیل قرارگیری بر روی پلاسمید به راحتی در بین گونه‌های اشرشیاکلی قابل انتقال بوده و این امر باعث گسترش مقاومت به کینولون‌ها می‌شود (Rodríguez-Martínez *et al*., 2011). PMQRها اولین بار در یک جدایه *کلبسیلا پنومونیه* در آمریکا شناسایی گردید.در مجموع سه گروه از ژن‌های PMQR در بین انترو باکتریاسه‌ها شناسایی شده است که در مقاومت به فلوروکینولون‌ها نقش دارد و شامل ژن‌های qnr، aac(6)-Ib و qepA می‌باشد (Karah *et al*., 2010). ژن‌های کدکننده پروتئین‌های Qnr (qnrA، qnrB، qnrC، qnrD و qnrS) به خانواده پنتاپپتیدهای تکراری تعلق دارند و آنها با مهار اتصال کینولون‌ها به DNA آز و توپو ایزومزاز IV، از اثر این داروها ممانعت به‌عمل می‌آورند (Rodríguez-Martínez *et al*., 2011). گروه *qnr* نسبت به دو گروه دیگری از قدرت مقاومت‌زایی بالاتری برخوردار است، طوری‌که حداقل غلظت مهارکننده کینولون‌ها علیه جدایه‌های حامل این ژن‌ها، ۳ تا ۸ برابر جدایه‌های فاقد این ژن‌ها افزایش می‌یابد (Jiang *et al*., 2008). یکی دیگر از عوامل ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها می‌باشد. بیوفیلم اجتماعی از باکتری‌ها بر روی سطح غیر زنده و ارگان‌های بدن است که توسط پلی‌مری از پلی‌ساکاریدها احاطه شده و از نفوذ مواد شیمیایی و سایر ترکیبات ضد میکروبی ممانعت می‌کند (Mah & O'Toole, 2001). یکی از دلایل مهم بی‌پاسخی به دارو در عفونت‌های مجاری ادراری، تشکیل بیوفیلم توسط اشریشیاکلی در این ارگان می‌باشد. همچنین تشکیل بیوفیلم توسط اشریشیاکلی در بافت پستان، از عوامل مهم در ایجاد ورم پستان مزمن در گاوهای شیری به حساب می‌آید. هدف از پژوهش حاضر تعیین مقاومت به فلوروکینولون‌ها،شناسایی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های انسانی و نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بوده است.

مواد و روش‌ها

جامعه هدف در این مطالعه توصیفی–تحقیقی، ۴۰ جدایه اشریشیاکلی بود که ۲۰ جدایه از نمونه‌های بالینی افراد بستری شده از بیمارستان شهید بهشتی و ۲۰ مورد از نمونه‌های شیر دام مبتلا به ورم پستان جدا سازی شده بود. در این مطالعه دوباره برای اطمینان کار، همه جدایه‌ها با استفاده از روش مولکولی

(شناسایی ژن *UspA*) به‌عنوان سویه اشریشیاکلی تأیید شدند (Chen & Griffiths, 1998).برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. در این تست چسبندگی به کف میکرو پلیت‌های پلی‌استیرن معادل تشکیل بیوفیلم در نظر گرفته می‌شود. برای انجام این تست از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها، میزان ۲۰۰ میکرولیتر به گوده‌های میکروپلیت منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط TSB داخل گوده‌ها خالی شده و با ۲۰۰ میکرولیتر PBS سه بار شسته شدند. سپس میکرو پلیت در دمای اتاق خشک شده و گوده‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ شدند. سپس رنگ اضافی خارج شده و سلول‌های چسبیده به کف میکروپلیت پس از دو با شستشو، با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر الکل- استیک اسید کنده می-شوند. در این روش ابتدا میزان جذب نوری کنترل منفی (ODc) محاسبه شد و برحسب کمتر یا بیشتربودن میزان OD جدایه‌ها به ODc، در چهار گروه فاقد بیوفیلم (OD≤Odc)، بیوفیلم ضعیف (ODc<OD≤2 Odc)، بیوفیلم متوسط (2 OD<OD<4 Odc) و بیوفیلم قوی (OD > 4ODc) قرار گرفتند (Tendolkar *et al*., 2004, Ebrahimi *et al*., 2015). از میکروسکوپ الکترونی نگاره جهت بررسی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها استفاده شد. برای این منظور دو جدایه با بیوفیلم قوی و ضعیف انتخاب شده و در محیط TSB کشت داده شد و یک لامل استریل با اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع در داخل محیط قرار داده شد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد لامل‌ها با پنس از محیط خارج شده و ابتدا با محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد فیکس شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از اتانول آب‌گیری و در دمای اتاق خشک گردیدند. نمونه‌های باکتریایی فیکس‌شده روی لام با عنصر طلا پوشش داده شد و سپس با میکروسکوپ الکترونی (مدل JEOL JSM-840) با ولتاژ ۱۵ کیلوولت مشاهده و عکس‌برداری شدند (Sharifi *et al*., 2018). برای شناسایی جدایه‌های مقاوم به کینولون ابتدا پودر دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین از گروه فلوروکینولون‌ها، ازشرکت مست انگلستان تهیه شد و با استفاده از روش میکرو دایلوشن، جدایه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها طبق دستورالعمل سیستم CLSI در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شناسایی شد (Junior *et al*., 2016). بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد و یا عدم رشد باکتری در گوده‌ها تعیین شد.کمترین غلظتی که باعث مهار رشد باکتری شده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت پایین‌تر به عنوان MBC به حساب آمد. استخراج DNA با استفاده از روش بویلینگ از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط TSB انجام گرفت (Junior *et al*., 2016) و با استفاده از دستگاه نانودراپ از نظر کمی سنجیده شد. در ادامه، وجود ژن‌های qnrA، qnrB، qnrC، qnrD، qnrSو aac در بین همه جدایه‌ها با استفاده از روش PCR بررسی شد. برای تکثیر این ژن‌ها از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد که به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت سیناژن تهیه شده بودند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon,2X)، ۰/۵ میکرو لیتر از هرکدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۹ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. همچنین برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۴۵ ثانیه، دمای اتصال بین ۵۳ تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، تکثیردردمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر نهایی دردمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود (Ciesielczuk *et al*., 2013).

جدول ۱. پرایمرهای به‌کاررفته برای تکثیر ژن‌های فلوروکینولون‌ها

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی (′3 -′5)	اندازه محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال	منبع
qnrA -F *qnrA* -R	CAGCAAGAGGATTTCTCACG AATCCGGCAGCACTATTACTC	۶۳۰	۵۳	(Ciesielczuk *et al*., 2013).
qnrB-F *qnrB*-R	GGCTGTCAGTTCTATGATCG GAGC*AAC*GATGCCTGGTAG	۴۸۸	۵۳	
qnrC - F *qnrC* - R	GCAGAATTCAGGGGTGTGAT *AAC*TGCTCCAAAAGCTGCTC	۱۱۸	۵۵	
qnrD - F *qnrD* - R	CGAGATCAATTTACGGGGAATA *AAC*AAGCTGAAGCGCCTG	۵۸۱	۵۷	(Cavaco *et al*., 2009)
qnrS-F *qnrS*-R	GCAAGTTCATTG*AAC*AGGGT TCTA*AAC*CGTCGAGTTCGGCG	۴۲۸	۵۳	Cattoir *et al*., 2007)
aac-F *aac*-R	TTGGAAGCGGGGACGGAM ACACGGCTGGACCATA	۳۱۳	۵۷	(Wareham *et al*., 2010)

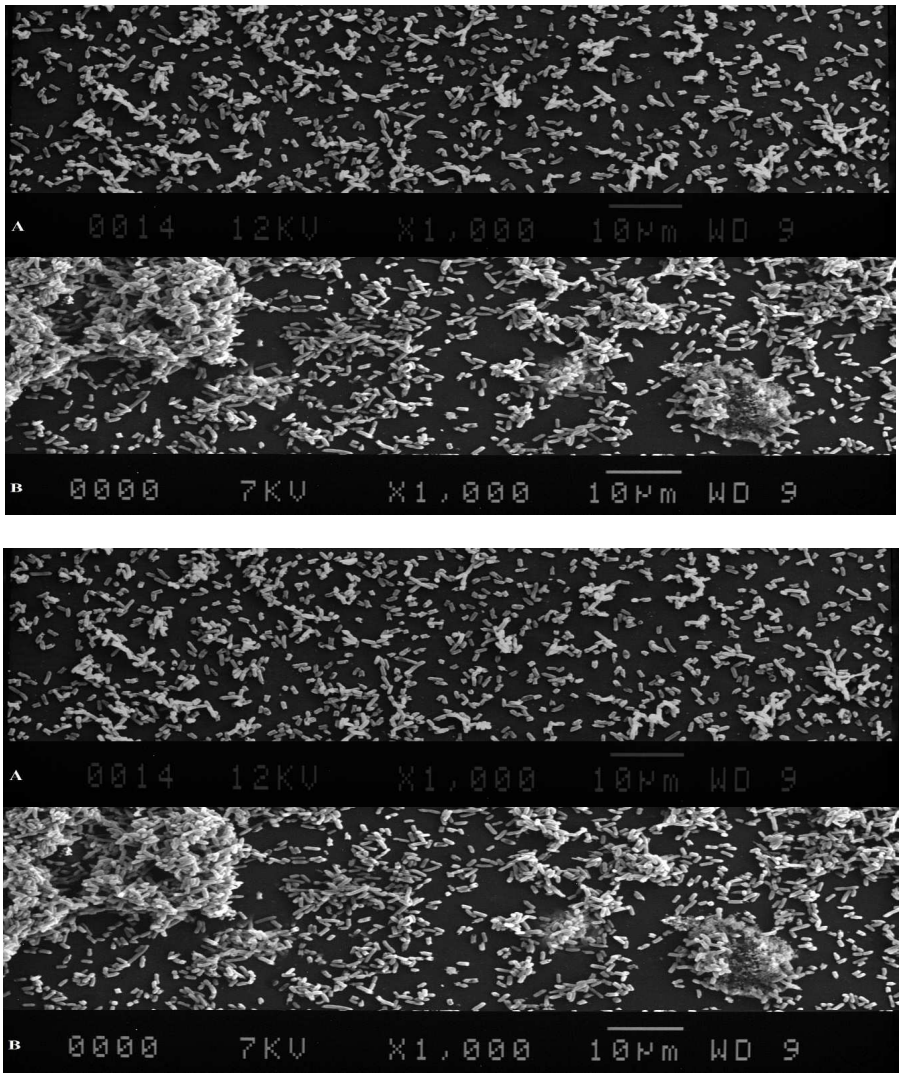
در نهایت نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۹، با آزمون مربع کای و ضریب همبستگی اسپیرمن در حد معنی‌داری P<۰/۰۵ آنالیز شد.

نتایج

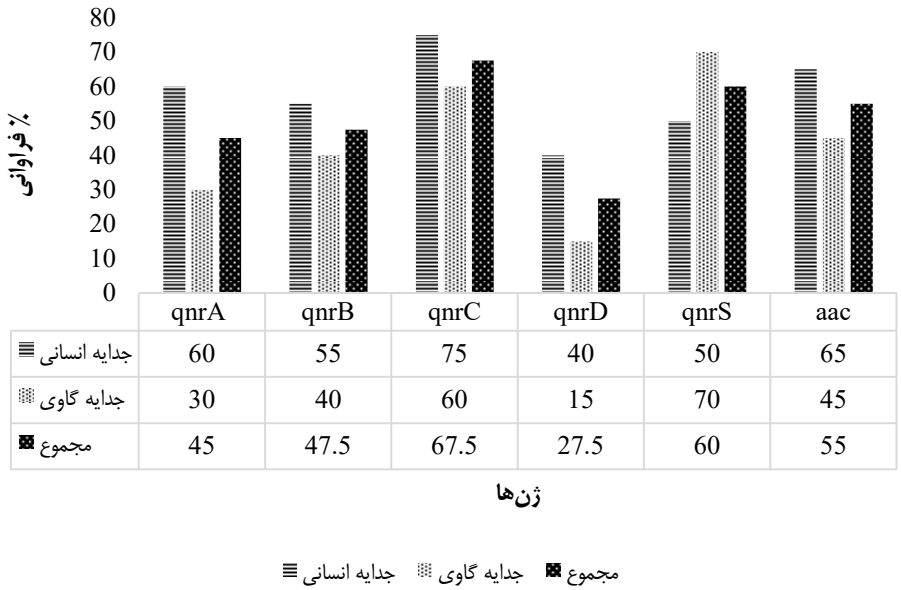
از ۲۰ جدایه انسانی اشریشیاکلی، ۱۵جدایه (۷۵ درصد) بیوفیلم قوی و ۵ جدایه (۲۵ درصد)بیوفیلم ضعیف داشتند.اما در بین جدایه‌های گاوی ۱۰ جدایه بیوفیلم قوی (۵۰ درصد)، دو جدای بیوفیلم متوسط (۱۰درصد) و ۸ جدایه (۴۰ درصد) بیوفیلم ضعیف نشان دادند. در مجموع قدرت تشکیل بیوفیلم در بین جدایه‌های انسانی به مراتب بیشتر از جدایه‌های گاوی بود. نگاره حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که جدایه‌هایی که بیوفیلم قوی داشتند در تصویر میکروسکوپی هم تجمعات گسترده‌ای از باکتری به‌صورت کلنی‌های بیوفیلم ایجاد کرده بود، اما در سویه با بیوفیلم ضعیف تجمعاتی از باکتری‌ها که نشان از تشکیل بیوفیلم باشد مشاهده نگردید. نتایج مربوطه در شکل ۱ نشان داده شده است.

در مجموع تعیین میزان MIC و MBC ۴۰ جدایه بالینی *اشریشیاکلی* به فلوروکینولون‌ها نشان داد که میزان مقاومت به این خانواده در بین جدایه‌های مورد مطالعه بسیار بالا است و این مقاومت در بین جدایه‌های انسانی بیشتر از جدایه‌های دامی بود. طبق سیستم CLSI برای سیپروفلوکساسین، مقدار MIC≤1 به عنوان حساس، MIC=2 به عنوان نیمه حساس و MIC≥4 به عنوان حساس در نظر گرفته شد. همچنین برای لووفلوکساسین مقدار MIC≤2 به عنوان حساس، MIC=4 به عنوان نیمه حساس و MIC≥8 به عنوان جدایه حساس قلمداد شد.در شناسایی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون با روش PCR، نتایج حاکی از درصد بالای این ژن‌ها در بین جدایه‌های انسانی نسبت به جدایه‌های گاوی بود هر چند در یک مورد (qnr S)، جدایه‌های گاوی از فراوانی بالاتری برخوردار بودند.بیشترین فراوانی مربوط به ژن qnr C بود که در ۷۵ درصد جدایه‌های انسانی و ۶۰ درصد جدایه‌های گاوی وجود داشت.در مجموع در همه جدایه‌های انسانی حداقل یکی از ژن‌های مورد مطالعه وجود داشت. اما در ۴ جدایه گاوی، هیچ کدام از ژن‌های مورد مطالعه گزارش نشد (شکل ۲).

نتایج حاصل از تست مربع کای نشان داد که رابطه معنی‌داری بین مقاومت به فلوروکینولون‌ها و تشکیل بیوفیلم قوی در بین جدایه‌های مورد مطالعه وجود داشته است (P≤۰/۰۵). همچنین نتایج ضریب همبستگی بین تشکیل بیوفیلم و مقاومت به فلوروکینولون‌ها ۰/۹۳ بود.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی. A: جدایه *اشریشیاکلی* با بیوفیلم ضعیف B: جدایه اشریشیاکلی با بیوفیلم قوی



شکل ۲. فراوانی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون در بین جدایه‌های انسانی و گاوی

بحث و نتیجه‌گیری

ظهور و افزایش سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به فلوروکینولون‌های جداشده از نمونه‌های دامی و انسانی درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها را با مشکل مواجه کرده است و تبدیل به یک مسأله نگران‌کننده بالینی در سراسر دنیا شده است (Sabaté *et al.*, 2008). یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که میان منشأ فیلو ژنتیکی و مقاومت به آنتی بیوتیک ها از جمله فلوروکینولونها در سویه‌های اشریشیاکلی ارتباط وجود دارد (Kawamura-Sato *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر مقاومت فنوتیپی جدایه‌های دامی و انسانی با روش میکرودایلوشن براث مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در بین جدایه‌های انسانی به‌ترتیب ۷۵ و ۷۰ درصد بود همچنین در بین جدایه‌های گاوی، مقاومت به سیپروفلوکساسین ۵۵ درصد و لوفلوکساسین ۴۵ درصد گزارش گردید که حاکی از بالا بودن میزان مقاومت جدایه‌های انسانی نسبت به گاوی است و علت آن می‌تواند ناشی از مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های انسانی باشد. همچنین از آنجایی که گروه‌های فیلوژنی اشریشیاکلی در بین نمونه‌های گاوی و انسانی تفاوت دارد(گروه فیلوژنی B1 در انسان و B2 در گاو شایع است) و از طرفی به‌دلیل تنوع مقاومت دارویی در بین این گروه‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت قابل توجهی در شدت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بین جدایه‌های انسانی و دامی وجود داشته باشد (Escobar-Páramo *et al.*, 2006). مطالعات متعددی در مورد شیوع مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایران انجام یافته است. در این مورد Soleimani-Asl *et al.* (2013) در ایلام، با استفاده از تست دیسک دیفیوژن مقاومت ۱۴۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی را به فلوروکینولون‌ها مورد بررسی قرار دادند و مقاومت به نالیدیک‌سیک اسید و سیپروفلوکساسین را به‌ترتیب ۸۳ و ۶۱ درصد گزارش کردند، که درمورد سیپروفلوکساسین، مقاومت جدایه‌های انسانی ما بالاتر (۷۵درصد) بود. در مطالعه DoostiMohajer *et al.* (2017) در کرمانشاه، درصد مقاومت به سیپرو فلوکساسین در بین جدایه‌های بیمارستانی اشریشیاکلی ۵۵ درصد گزارش شد. در مطالعه Hakami Vala (2014) در تهران، مقاومت *اشریشیاکلی* جدا شده از بخش زنان بیمارستان امام خمینی(ره) ۵۱ درصد گزارش شد که در مقایسه با مطالعه ما از میزان پایین‌تری برخوردار بودند. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها به طور چشم گیری در بین جدایه‌های گاوی پایین‌تر از جدایه‌ها انسانی بود که احتمالاً به‌دلیل مصرف کم آنتی‌بیوتیک‌ها در گاوداری‌ها باشد. در مطالعات انجام شده مانند مطالعه Bonyadian *et al.* (2017) در شهرکرد، میزان مقاومت جدایه‌های گاوی *اشریشیاکلی* نسبت به سیپروفلوکساسین ۳/۲ درصد بود که نشان از پاسخ دارویی مناسب این جدایه‌ها به فلوروکینولون‌ها دارد، که با نتایج مطالعه حاضر کاملاً مغایرت داشت. عوامل زیادی در ایجاد مقاومت جدایه‌های اشریشیاکلی به فلوروکینولون‌ها وجود دارد که از مهم‌ترین آنها وجود ژن‌های دخیل در مقاومت به فلوروکینولون‌ها و تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری‌هاست که از نفوذ دارو به داخل باکتری ممانعت می‌کند. در مطالعه اخیر فراوانی ۶ ژن دخیل در مقاومت به فلوروکینولون‌ها با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد فراوانی این ژن‌ها در بین جدایه‌های انسانی بیشتر از جدایه‌های گاوی بود و به عبارتی تأیید کننده روش فنوتیپی بوده است که در روش میکرودایلوشن نیز مقاومت جدایه‌های انسانی بیشتر از گاوی بود. این نتایج از طرفی نشان می‌دهد که احتمال زیاد مکانیسم اصلی مقاومت به فلوروکینولون‌ها وجود ژن‌های مورد مطالعه بوده باشد. در این مورد در مطالعه Akya *et al.* (2017) در کرمانشاه، فراوانی ژن‌های qnrA، qnrB، qnrS و aac(6)-Ib در بین جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی

به‌ترتیب ۲۹، ۴۱، ۴/۵ و ۶۵ درصد گزارش شد. در مطالعه دیگر توسط Norouzia *et al.* (2016) در بیمارستان استهبان فارس، فراوانی ژن‌های qnrA و qnBr در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* که از نمونه‌های ادرار جمع آوری شده بود مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه ژن qnrB در ۳۳ درصد جدایه‌ها مشاهده شد و همچنین ژن qnrA در هیچ کدام از جدایه‌ها وجود نداشت. Norouzia *et al.* (2016) در کرمان نیز فراوانی ژن‌های qnrA، qnrB و qnrS به‌ترتیب صفر، ۱/۲ و ۶/۲ درصد گزارش کردند (Bartlli *et al*., 2019). مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در سایر شهرهای نشان داد که میزان فراوانی ژن‌های مذکور در مطالعه حاضر بسیار بالاتر می باشد که این موضوع می‌تواند، به‌دلیل روند رو به افزایش میزان مقاومت به داروی فلوروکینولون‌ها به‌علت مصرف بالای آن باشد که در نهایت منجر به انتخاب و گسترش جدایه‌های مقاوم می‌شود. همچنین به‌دلیل قرار گیری تعدادی از ژن‌های مذکور بر روی پلاسمید، انتقال آنها به راحتی در بین سویه‌های یک جنس و حتی خانواده انتروباکتریاسه‌ها انجام می‌شود که در نهایت سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون افزایش می‌یابد. یکی از مواردی که در این مطالعه قابل توجه بود وجود دو جدایه گاوی مقاوم به سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین بود که هیچ‌کدام از ژن‌های مورد مطالعه را حمل نمی‌کرد که احتمالاً مربوط به فعالیت سایرعوامل دخیل در مقاومت به فلوروکینولون ها باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است.یکی دیگر از عوامل مقاومت دارویی باکتری‌ها ساختار بیوفیلم آنهاست. تشکیل بیوفیلم توسط اشریشیاکلی درمان عفونت‌های ناشی از آن در دام و انسان را با مشکل مواجه کرده است. در واقع ساختار بیوفیلم با ممانعت از ورود آنتی‌بیوتیک به داخل باکتری از اثر ضد میکروبی آن ممانعت به عمل می‌آورد. در مطالعه اخیر بیشتر جدایه‌های انسانی و گاوی دارای قدرت تشکیل بیوفیلم بودند که با روش میکروتیتر پلیت و میکروسکوپ الکترونی تأیید شدند و احتمال عدم پاسخ این جدایه‌ها به فلوروکینولون‌ها می تواند ناشی از این مکانیسم باشد. در این مورد در مطالعات انجام یافته در سایر نقاط ایران قدرت تشکیل بیوفیلم در بین جدایه‌های *اشریشیاکلی* کمتر از مطالعه اخیر بود به عنوان مثال در مطالعه Jalilian *et al.* (2018) در زاهدان، تنها در ۱۶/۶ درصد جدایه‌های اشریشیاکلی توانایی تشکیل بیوفیلم قوی داشتند. در یک تحقیق انجام یافته توسط(2008)Barilli *et al*، توانایی تشکیل بیوفیلم در ۲۷ درصد سویه‌های اشریشیاکلی که از نمونه گوشت گاو جدا شده بود گزارش گردید (۲۹) که در مقایسه با جدایه‌های گاوی ما از میزان پایین‌تری برخوردار بود. همچنین نتایج این مطالعه حاکی از بالا بودن قدرت تشکیل بیوفیلم در بین جدایه‌های انسانی نسبت به جدایه‌های گاوی بود که می‌تواند ناشی از حضور ژن‌های تشکیل دهند بیوفیلم مانند ژن‌ها کدکننده پروتئین سطحی (bap)، ژن‌های کدکننده پیلی (pap، sfa) در بین جدایه‌های انسانی باشد (Boroumand *et al*., 2019)، که باید مطالعات گسترده‌ای در این زمینه برای بررسی دقیق مکانیسم‌های مقاومت جدایه‌های مذکور انجام گردد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در بین جدایه‌های انسانی و دامی در حد بالا می‌باشد و از طرفی میزان مقاومت در بین جدایه‌های انسانی به مراتب بیشتر از جدایه‌های دامی می‌باشد. همچنین در جستجوی مکانیسم‌های مقاومت مشخص شد که وجود ژن‌های PMQR در کنار قدرت تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها، از دلایل اصلی این نوع مقاومت می‌باشد که پیشنهاد می‌گردد با مصرف درست آنتی‌بیوتیک‌ها و انجام تست‌های دوره‌ای شناسایی جدایه‌های مقاوم به دارو، از شیوع سویه‌های مقاوم به دارو جلوگیری گردد.

REFERENCES

Akya, A.; Chegenelorestani, R.; Elahi, A.; Hamzavi, Y. (2017). Frequency of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-spectum β-lactamase-producing Escherichia coli. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*; 27(151): 41-51.

Alni, R.H.; Ghobadi, N.; Asl, M.N.; Sharifi, A. (2018). Genotyping of Escherichia coli isolated from human and water samples using ERIC-PCR method in Hamadan city. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*; 25(4): 297-306.

Barilli, E.; Vismarra, A.; Frascolla, V.; Rega, M.; Bacci, C. (2008). Escheri chia coli Strains Isolated from Retail Meat Products: Evaluation of Biofilm Formation Ability, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Group Analysis. *Journal of Food Protection*; 83(2): 233-240.

Bonyadian, M.; Moshtaghi, H., Behroozi P. (2017). Occurrence of verotoxigenic E. coli in cow feces and antimicrobial resistance of the isolates in cattle farms in Shahrekord area. *Biological Journal of Microorganism* :6(23):75-84.

Boroumand, M.; Sharifi, A.; Manzouri, L.; Khoramrooz, S.S.; Khosravani, S.A. (2019) Evaluation of pap and sfa genes relative frequency P and S fimbriae encoding of uropathogenic Escherichia coli isolated from hospitals and medical laboratories; Yasuj City, Southwest Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*; 21(8): 1-8.

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.

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.

Cavaco, L.; Hasman, H.; Xia, S. (2009). Aarestrup FM. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica serovar Kentucky and Bovis morbi ficans strains of human origin. *Antimicrobial agents and chemo therapy*; 53(2): 603-608.

Chen, J.; Griffiths, M. (1998). PCR differen tia tion of Escherichia coli from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in applied microbiology*; 27(6): 369-371.

Ciesielczuk, H.; Hornsey, M.; Choi, V.; Woodford, N., Wareham, D. (2013). Develop ment and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance deter minants. *Journal of medical micro biology*; 62(12): 1823-1827.

Doosti; Mohajer, M.; Pajavand, H.; Abiri R.; Alvandi, A.(2017) Phenotypic and Genotypic Efflux Pumps in Resistance to Fluoroquinolones in E. coli Isolated from Inpatients in Kermanshah Hospitals in 2013. *Journal of Arak University of Medical Sciences*; 20(9): 22-32.

Ebrahimi, K.A.A.; Shabanpour, Z.; Habibiyan, S., Hakimi-Alni, R.; Hemati, M.; Aflakiyan, F.; *et al*. (2015). Chlor hexi dine effect on bacterial biofilms iso leated from nosocomial infections. *Bio logical Journal Of Micr oorganism*; 4(14): 83-92.

EscobarPáramo, P.; Le, Menac'h, A.; Le Gall, T.; Amorin, C.; Gouriou, S.; Picard, B.; *et al*. (2006). Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. *Envir onmental microbiology*; 8(11): 1975-1984.

FarajzadehSheikh, A.; Veisi, H.; Shahin, M. (2019). Getso M., Farahani A. Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections. *Tropical medicine and health*; 47(1): 19.

Hakami-Vala, S.A.; Ranjbar, R.; Bagheri Bejetani, A.; Bagheri-Bejestani, F. (2014). Distribution of qnrA gene in fluoroquinolone-resistant Escherichia coli isolates isolated from urine Patients Referred to Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Journal of Infectious and Tropical Diseases*; 64(19): 63-66.

Jalilian, S. (2017). Evaluating the ability of Biofilm formation in Escherichia coli isolated from clinical samples in Zahedan. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*; 15(1): 36-42.

Jiang, Y.; Zhou, Z.; Qian, Y.; Wei, Z.; Yu, Y.; Hu, S.; *et al*. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6′)-Ib-cr in extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in China. *Journal of Antimicrobial Chemo therapy*; 61(5): 1003-1006.

Junior, J.C.R.; Tamanini, R.; Soares, B.F.; de Oliveira, A.M.; de Godoi Silva, F.; da Silva, F.F.; *et al*. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. Semina: *Ciências Agrárias*; 37(5): 3069-3078.

Karah, N.; Poirel, L.; Bengtsson, S.; Sundqvist, M.; Kahlmeter, G.; Nordmann, P.; *et al*. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6′)-Ib-cr in Escherichia coli and Klebsiella spp . from Norway and Sweden. *Diagnostic microbiology and infectious disease*; 66(4): 425-431.

Kawamura-Sato, K.; Yoshida, R.; Shiba ya ma, K.; Ohta, M. (2010). Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic back ground of uro patho genic Escherichia coli strains isolated in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*; 63(2): 113-115.

Mah, T-F.C.; O'Toole, G.A. (2001). Mecha nisms of biofilm resistance to anti microbial agents. *Trends in micro biology*; 9(1): 34-39.

Norouzia; Hossieni, N.H.; Mohebi, S., Kan dehkar, G.M.; Taati, M.M. (2016). Fre quency of plasmid-mediated qnrA, qnrB, and qnrS genes and determination of antibiotic suscep tibility among quinolones and fluoro quinolones resistance Escheri chia coli isolated from Kerman hospitals; 23(148): 98-105.

Rasko, D.A.; Rosovitz, M.; Myers, G.S.; Mon godin, E.F.; Fricke, W.F.; Gajer, P.;*et al*. (2008). The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. *Journal of bacteriology*; 190(20): 6881-6893.

Rodríguez-Martínez, J.M.; Cano, -M.E.; Velasco, C.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journalof Infection and Chemo therapy*; 17(2): 149-182.

Sabaté, M.; Prats, G.; Moreno, E.; Ballesté, E.; Blanch, A.R.; Andreu, A. (2008). Viru lence and antimicrobial resistance pro files among Escherichia coli strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbio logy*; 159(4): 288-293.

Sharifi, A.; Mohammadzadeh, A.; Zahraei Salehi, T.; Mahmoodi, P. (2018).Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of Thymus daenensis and Satureja hortensisessential oils against Staphylococcus aureus isolates. *Journal of applied microbio logy*; 124(2): 379-388.

Soleimani-Asl, Y.; Zibaei, M.; Firoozeh, F. (2013). Detection of qnrA gene among quinolone-resistant Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*; 17(5): 1-7.

Soto, S.; Smithson, A.; Martinez, J.; Hor caja da, J.; Mensa, J.; Vila J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic Escheri chia coli strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *The Journal of urology*; 177(1): 365-368.

Tendolkar, P.M.; Baghdayan, A.S.; Gilmore, M.S.; Shanka, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis. *Infection and immunity*; 72(10): 6032-6039.

Wareham, D.; Umoren, I.; Khanna, P.; Gordon, N. (2010). Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of the aac (6′)-Ib-cr quinolone resistance gene. *Inter national journal of antimicrobial agents*; 36(5): 476-487.