بررسی میزان شیوع ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک در باکتری‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی باسیلوز طیور

محمود نخعی*[۱]، محمد جهانتیغ[۲]، محسن نجیمی[۳]، سعید سالاری[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ شهریور ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۲ اسفند ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ۱۴۰۰

چکیده

از مدت‌ها قبل آنتی‌بیوتیک‌ها اولین خط دفاعی برای جلوگیری از عفونت *اشریشیاکلی* بودند، اما از آنجا که باکتری‌ها به‌طور فزاینده‌ای در برابر درمان مقاوم شده‌اند، قدرت خود را از دست داده‌اند. تحقیق حاضر با هدف بررسی مقاومت به تتراسایکلین‌ها و شیوع ژن‌های مقاومت *tetA* و اینتگرون کلاس یک در *اشریشیاکلی* جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز انجام شد. با انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام در این مطالعه 96/6 درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم به یک یا هر دو آنتی‌بیوتیک داکسی سایکلین و تتراسایکلین بودند. نتایج آزمایش نشان داد 98/2 درصد از باکتری‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی‌باسیلوز حامل *tetA* می‌باشند. میزان شیوع ژن اینتگرون کلاس یک 98/2 درصد می‌باشد. همچنین 96/5 درصد از جدایه‌های این باکتری حامل هر دو ژن اینتگرون کلاس یک و *tetA* می‌باشند. با در نظر گرفتن نتایج، شیوع دو ژن *tetA* و اینتگرون کلاس یک در این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌های انجام گرفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است که این تفاوت می‌تواند بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیاد در مرغداری‌های این منطقه باشد که بر لزوم استفاده محتاطانه از تتراسایکلین‌ها در تولید طیور برای کاهش شیوع *اشریشیاکلی* مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها تأکید می‌کند.

واژگان کلیدی: *اینتگرون کلاس یک، tetA، اشریشیاکلی، کلی‌باسیلوز، تتراسایکلین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mnakhaei74@gmail.com

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات، از جمله طیور، اغلب برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند (۱، ۲). مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک توسط دام‌ها یک مشکل جهانی است که می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های انسانی و حیوانی مانند *اشریشیاکلی* را افزایش دهد (۳، ۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های طیور و انتقال این توانایی به دست آمده به باکتری‌های انسانی می‌تواند درمان عفونت‌های انسانی را مختل کند (۳).

تتراسایکلین‌ها آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده‌ای هستند که به‌طور وسیع در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت استفاده می‌شوند (۵). خانواده تتراسایکلین‌ها را باید متشکل از دو رده عمومی از داروها دانست. تتراسایکلین‌های قدیمی‌تر شامل تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین می‌باشد که آب دوست بوده و دامنه اثر ضد باکتریایی و نحوه‌ی اثر آنها در بدن یکسان است. دومین رده از تتراسایکلین‌ها در برگیرنده داروهای جدیدتر مانند داکسی‌سایکلین و مینوسایکلین هستند که در چربی بیشتر حل می‌شوند و بهتر از تتراسایکلین‌های قدیمی در بافت‌ها نفوذ می‌کنند، داکسی‌سایکلین آنتی‌بیوتیک به‌دست آمده از آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین می‌باشد و به خاطر ویژگی‌های خاص جایگاه ویژه‌ای در گروه تتراسایکلین‌ها دارد. همچنین دسترسی زیستی این دارو برای دستگاه گوارش بهتر می‌باشد. نتایج مطالعات نشان داده است که استفاده از داکسی‌سایکلین برای درمان کلی‌باسیلوز تجربی در جوجه‌های گوشتی از طریق آب آشامیدنی مؤثر بوده و اثرات درمانی ناشی از آن مشابه تتراسایکلین و فلومکوئین می‌باشد (۶، ۷). این داروها از اتصال aminoacyltRNA به زیر واحد ۳۰ ریبوزومی جلوگیری کرده و سنتز پروتئین را، مختل می‌کنند که مانع رشد باکتری‌های حساس می شود (۵). به دلیل مزایای بی‌شمار تتراسایکلین‌ها، از جمله در دسترس بودن گسترده، هزینه کم و عوارض جانبی اندک، استفاده از این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های حیوانی و انسانی در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۸). این امر منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم به تتراسایکلین شده است که اکنون استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود کرده است (۹).

بررسی‌های ژنوتیپی که توسط دانشمندان ژاپنی در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، نشان می‌دهد، برخی از سویه‌های *اشریشیاکلی* به دلیل وجود ژن مقاومت در برابر بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و از آنجایی که به روش‌های مختلف مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها قادر به انتقال عوامل ژنتیکی مقاومت به سویه‌های دیگر هستند، شاهد افزایش قابل توجه این مقاومت‌ها هستیم (10). ارزیابی اپیدمیولوژیک مولکولی سویه‌های مقاوم به این ترکیبات می‌تواند دانش ما را در مورد درمان‌های مناسب گسترش دهد و از اتلاف سرمایه جلوگیری کند (۱۳). مکانیسم اصلی مقاومت به تتراسایکلین از طریق کسب ژن‌های *tet* عمدتاً شامل عملکرد پمپ بیرون‌ریز، محافظت از ریبوزوم و غیر فعال سازی آنزیمی است. جهش‌ها همچنین به مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کنند (۱۲). ژن‌های *tet* موجود در باکتری‌های گرم منفی عمدتاً مربوط به پمپ بیرون‌ریز هستند که توسط ژن‌های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *tetD* و *tetG* کدگذاری می‌شوند (۱۴، ۱۵). در بسیاری از موارد ، مشخص شده است که مقاومت چندگانه با پلاسمیدهای قابل انتقال مرتبط است و اهمیت اینتگرون‌ها در اکتساب ژن‌های مقاومت به‌عنوان ناقل اصلی مقاومت چندگانه در باکتری‌های گرم منفی و تا حد کمتری در باکتری‌های گرم مثبت است (۱۱، ۳۴). اینتگرون‌ها

از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی هستند که می‌توانند ژن‌های مقاومت به ترکیبات ضد باکتریایی را حمل کنند و با محل‌های خاصی از ژنوم ترکیب شوند (۱۷، ۱۸). تا کنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده است، اما ژن‌های مسئول به مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی اغلب با اینتگرون کلاس ۱ همراه هستند (۱۹). ساختار پایه اینتگرون‌های کلاس ۱ شامل دو بخش محافظت شده (CS) است که معمولاً توسط یک ناحیه متغیر که شامل کاست‌های متحرک حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک است، از هم جدا می شوند (۳۵). ناحیه اختصاصی سیستم نوترکیب بین attI و attC باعث شده است که آرایه متنوعی از عوامل تعیین کننده مقاومت توسط اینتگرون‌های کلاس ۱ ترسیم شوند (۱۱، ۳۵، ۳۶). ناحیه‌های کدکننده کاست‌های ژنی فاقد پروموتر هستند. با این حال، اکثر کاست‌هایی که ژن‌های مختلف مقاومت ضد میکروبی را رمزگذاری می‌کنند با بیش از ۱۳۰ ژن مقاومت قابل تشخیص تا کنون پیدا شده است (۳۷). در مطالعه‌ای که در کشور کره بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* صورت گرفت ارتباط مثبتی بین جدایه‌های دارای ژن *int1* و *tetA* مشاهده شد که این امر تأیید می‌کند که جدایه‌های حاوی ژن *tetA* به احتمال زیاد حامل اینتگرون‌های کلاس ۱ هستند (۱۶). این مشاهدات قبلاً توسط دیگران نیز گزارش شده است، آنها دریافتند که اینتگرون کلاس یک و *tetA* بر روی یک پلاسمید قابل انتقال بزرگ یا سایر عناصر ژنتیکی در *اشریشیاکلی* همزیستی دارند و ارتباط بین ژن‌های *tetA* و اینتگرون‌های کلاس یک را تأیید می‌کند (۴۱، ۴۲).

استراتژی‌های جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیاز به نظارت بر ژن‌های رمزگذار آن دارد. این مطالعه بینش جدیدی را برای توضیح دو ژن رمزگذار مقاومت در برابر تتراسایکلین‌ها فراهم می‌کند که ممکن است به‌طور هم‌افزایی مقاومت ضد میکروبی را در برابر تتراسایکلین‌ها در جدایه‌های *اشریشیاکلی* افزایش دهند. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی مقاومت در برابر تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین و شیوع دو ژن مقاومت به آنها (*tetA* و اینتگرون کلاس یک) در *اشریشیاکلی* جدا شده از جوجه‌های گوشتی مبتلا به کلی‌باسیلوز در مزارع گوشتی منطقه سیستان انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها:

جمعیت مورد مطالعه شامل جوجه‌های گوشتی صنعتی مبتلا به کلی‌باسیلوز، می‌باشد. نمونه‌گیری از هشت مزرعه گوشتی طی سال ۹۹ در منطقه سیستان، ایران انجام شد. پس از کالبدگشایی و شناسایی ضایعات مربوطه، در مجموع ۱۰۰ نمونه از جوجه‌های آلوده گرفته شد. به این صورت که از ضایعات اندام‌های داخلی با استفاده از یک سواب استریل نمونه‌برداری شد و سپس سواب در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Tryptic Soy Agar قرار گرفت و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل منتقل شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس در محیط کشت مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) کشت داده شد (مرک ، آلمان). جدایه‌های *اشریشیاکلی* از ضایعات مربوط به کلی‌باسیلوز تهیه و با استفاده از روش‌های دقیق میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی شد. به‌طور خلاصه، جدایه‌های باکتریایی دارای کلنی تیپیک در محیط‌های مک کانکی آگار و EMB آگار که لاکتوز، ایندول و متیل رد مثبت، در حالی که VP ، سیترات، اوره آز و H2S منفی بودند به‌عنوان *E. coli*

در نظر گرفته شدند (۴۳).

تست حساسیت ضد میکروبی: برای مطالعه مقاومت به تتراسایکلین نمونه‌ها، از روش دیسک دیفیوژن روی محیط مولر- هینتون آگار (مرک، آلمان) با دو دیسک آنتی‌بیوتیک شامل داکسی‌سایکلین (۳۰ µg) و تتراسایکلین (۳۰ µg) استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت هامون طب، تهران، ایران تهیه گردید. بدین منظور، ابتدا کلونی‌های خالص باکتری جداسازی شده در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی حل گردید تا کدورت آن برابر کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند شود. نمونه باکتری از این لوله بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت به دستگاه انکوباتور منتقل و نتیجه آزمایش پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر ناحیه مهار اندازه‌گیری و نتایج بر اساس دستورالعمل CLSI تفسیر گردید، بدین صورت که نتایج با قطر کمتر مساوی ۱۱ میلی‌متر مقاوم به تتراسایکلین و برای آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین نتایجی با قطر کمتر مساوی ۱۰ میلی‌متر مقاوم به داکسی‌سایکلین در نظر گرفته شد (۴۴).

استخراج ژنوم باکتری: به جهت استخراج DNA باکتری‌ها، ابتدا باکتری *اشریشیاکلی* را در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن پنج دقیقه در 3600 g سانتریفیوژ گردید. با حذف مایع رویی (supernatant) قسمت رسوب شده (pellet) را در 200 µl آب دوبار تقطیر حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه در دستگاه Thermomixer قرار گرفت و در نهایت برای مدت ۱۰ دقیقه در 15000 g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی آن به‌عنوان DNA در میکروتیوب 200 µl در دمای 20- نگهداری و ذخیره شد.

واکنش PCR و تکثیر ژن tetA و اینتگرون کلاس یک: برای تکثیر ژن *tetA* و اینتگرون کلاس یک (*int1*) از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی (Conventional PCR) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۱ آمده است. برای بررسی ژن‌های مورد نظر از توالی تأیید شده در مطالعات قبلی استفاده شد (۲۰، ۲۱). در واکنش PCR برای نمونه کنترل مثبت از نمونه‌ای که بهترین باند را در محدوده مورد نظر داشت استفاده شد و برای نمونه کنترل منفی از تمام موارد مورد استفاده برای واکنش بجز نمونه DNA استفاده گردید. برنامه کامل PCR برای ژن‌های مورد نظر در جداول ۲ و ۳ آمده است. تمامی پرایمرها و محلول‌ها از شرکت پیشگام تهران ایران تهیه گردید. واکنش PCR با حجم 16 µl شامل 2 µl از DNA الگو، 8 µl محلول مستر میکس، 1 µl از هر کدام از پرایمرهای بالا دست و پایین دست و 4 µl آب مقطر استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در محلول اتیدیوم بروماید (سیناژن، ایران) در دستگاه ژل داک (کمبریج، آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری Likelihood ratio کای و ضریب همبستگی فی کرامر استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *tetA* و *IntI*

ژن هدف	توالی پرایمر	وزن باند	نام پرایمر	رفرانس
IntI	5'- GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	متغیر	intI–F	۲۱
	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'		intI–R	
TetA	5'-CGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATC-3'	۱۸۲	tetA-F	۲۰
	5'-CAGCCCACCGAGCACAGG-3'		tetA-R	

جدول ۲- برنامه استفاده شده در واکنش PCR برای تکثیر ژن‌*های tetA*

مرحله	تعداد سیکل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشت اولیه	۱	۹۴	۳۰۰
واسرشت شدن	۳۵	۹۴	۳۰
اتصال آغازگر	۳۵	۵۵	۳۰
بسط	۳۵	۷۲	۳۰
بسط نهایی	۱	۷۲	۳۰۰

جدول ۳- برنامه استفاده شده در واکنش PCR برای تکثیر ژن‌*های IntI*

مرحله	تعداد سیکل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشت اولیه	۱	۹۴	۱۸۰
واسرشت شدن	۳۵	۹۴	۳۰
اتصال آغازگر	۳۵	۵۶	۴۰
بسط	۳۵	۶۸	۴۰
بسط نهایی	۱	۷۲	۳۰۰

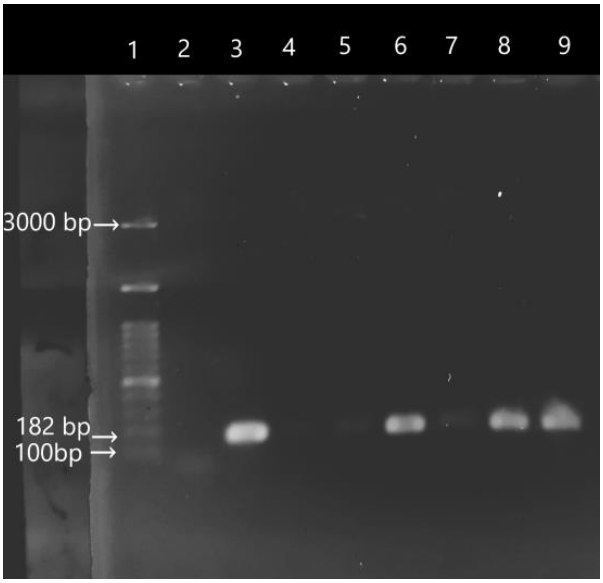
نتایج

نتایج مربوط به جداسازی باکتری‌ها: از مجموع ۱۰۰ جوجه گوشتی کالبدگشایی شده، ۶۰ جدایه مثبت *اشریشیاکلی* جداسازی و با آزمایشات استاندارد بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شده و برای آزمایش‌های بعدی استفاده گردید.

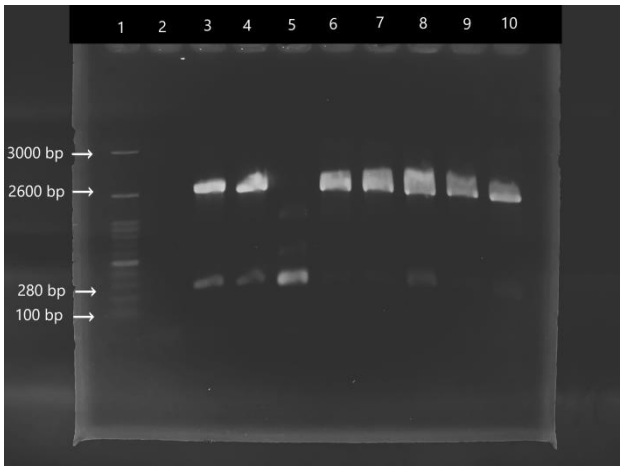
الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها: در این مطالعه 96/6 درصد (۵۸ نمونه) از جدایه‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به یک یا هر دو آنتی‌بیوتیک مورد بررسی بودند همچنین میزان جدایه‌های مقاوم به هر دو آنتی‌بیوتیک 93/3 درصد مشاهده شد. میزان ۹۵ درصد نمونه‌ها مقاوم به تتراسایکلین، و به همین میزان به داکسی‌سایکلین مقاوم بودند.

واکنش PCR وتکثیر ژن‌های tetA و اینتگرون کلاس یک: نتایج آزمایش نشان داد 98/2 درصد از باکتری‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به تتراسایکلین جداسازی شده از ضایعات بیماری کلی‌باسیلوز حامل *tetA* می‌باشند که وزن باند آن در محدوده ۱۸۲ مشاهده شد (شکل ۱). میزان شیوع ژن اینتگرون کلاس یک 98/2 می‌باشد و وزن باندهای اینتگرون نیز در محدوده‌های 280 الی 2600 جفت باز مشاهده گردید (شکل ۲). همچنین 96/5

درصد از جدایه‌های این باکتری حامل هر دو ژن می‌باشند. ارتباط آماری معنی‌داری بین شیوع ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک مشاهده نشد (P<0.05). همچنین ارتباط آماری معنی‌داری بین وجود ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک و مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P<0.05).



شکل ۱- نتایج PCR معمولی برای جستجوی *tetA* (ستون شماره یک مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز، ستون شماره ۲ نمونه کنترل منفی و ستون شماره ۳ کنترل مثبت)



شکل ۲- نتایج PCR معمولی برای جستجوی اینتگرون کلاس یک (ستون شماره یک مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز، ستون شماره ۲ نمونه کنترل منفی و ستون شماره ۳ نمونه کنترل مثبت)

بحث

تتراسایکلین بیشترین آنتی‌بیوتیک استفاده شده در درمان و کنترل بیماری‌های مختلف طیور است. تتراسایکلین می‌تواند به صورت خوراکی تجویز شود و خطر بسیار کمی از نظر عوارض جانبی دارد. بعلاوه، تتراسایکلین یکی از ارزانترین عوامل ضد میکروبی موجود است (۲۹). در این مطالعه، مقاومت در برابر هردو آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه برای

بسیاری از جدایه‌ها مشاهده شد، 96/6 درصد جدایه‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به یک یا هر دو آنتی‌بیوتیک مورد بررسی بودند که این مقاومت می‌تواند به دلیل استفاده بیش از اندازه از ترکیبات تتراسایکلین در تولید و پرورش طیور باشد در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده است، فراوانی مقاومت به تتراسایکلین در *اشریشیاکلی* جدا شده از کلی‌باسیلوز در ایران ۹۵/۸ درصد گزارش شده است که مشابه نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد (38). علاوه بر این، شیوع مقاومت ضد میکروبی *اشریشیاکلی* جدا شده از بوقلمون در ایران، برای تتراسایکلین ۵۱/۷ درصد بود (22). Adesiyun و همکاران (۲۰۰۷) میزان مشابهی از مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی را در بین *اشریشیاکلی‌های* جدا شده از تخم‌مرغ به تتراسایکلین (۵۸/۵ درصد) گزارش کردند (۲۳).

تاکنون مطالعات زیادی در مورد رابطه بین شیوع اینتگرون‌ها و مقاومت‌های دارویی چندگانه یا مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک در سویه‌های *اشریشیاکلی* صورت گرفته است (۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر بسیاری از جدایه‌ها حامل ژن اینتگرون کلاس یک بودند، میزان شیوع این ژن در جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین ۹۸/۲ درصد مشاهده شد. در مطالعه انجام شده توسط کهن سال (۲۰۱۸) میزان مقاومت جدایه‌های *اشریشیاکلی* را در برابر تتراسایکلین ۹۱/۵ درصد گزارش نمود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد همچنین میزان شیوع اینتگرون کلاس یک را ۴۸/۷۵ درصد گزارش نمودند که کمتر از نتایج این مطالعه می‌باشد (۲۶). در مطالعه‌ای مشابه انجام شده توسط Cavicchio و همکاران در سال 2015 میزان شیوع اینتگرون کلاس یک را ۴۹/۸ درصد از تعداد 299 نمونه *اشریشیاکلی* بیماریزای طیور (APEC) گزارش نمودند (39). در پژوهشی دیگر که توسط Oosterik و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی مرغان تخم‌گذار انجام گرفت در ۹۶ نمونه APEC جدا شده ۲۱/۶ درصد اینتگرون کلاس یک گزارش شد، همچنین وابستگی معنی‌داری بین وجود اینتگرون و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مشاهده شد (40). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن *tetA* در جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین ۹۸/۲ درصد مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر انجام شده توسط Sandalli و همکاران (۲۰۱۰) حضور ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین متعدد در *اشریشیاکلی* گزارش شده است. آنها مشاهده کردند که ژن *tetA* می‌تواند به خوبی در *اشریشیاکلی* بیان شده و متعاقباً به تتراسایکلین مقاومت نشان دهد (۲۸). Chopra و Roberts (۲۰۰۱) گزارش کرده‌اند که *tetA* باعث ایجاد مقاومت در برابر تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و کلرتتراسایکلین می‌شود (۲۹). در مطالعه روی گوشت و فرآورده‌های گوشتی، Woo و Koo (۲۰۱۱) مشاهده کردند که بسیاری از جدا شده‌ها (۹۸/۳ درصد) حداقل یک ژن *tet* دارند که 52/4 درصد *tetA* را نشان می‌دهد که این میزان کمتر از نتایج این تحقیق می‌باشد (۱۲). Guerra و همکاران (۲۰۰۳) شیوع *tetA* را ۶۶ درصد در *اشریشیاکلی* جدا شده از گاو ، خوک و طیور گزارش کرد (۳۰). Maynard و همکاران (۲۰۰۴)، در یک مطالعه بر روی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های انسانی و حیوانی، نشان داد که فراوانی *tetA* بیشتر از *tetB* در جدا شده از هر دو منبع است (۳۱). سیفی و خوشبخت (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای انجام شده در ایران گزارش دادند که ۷۳ درصد از سویه‌های *E. coli* جدا شده از گله‌های گوشتی مورد مطالعه مقاوم به تتراسایکلین بودند و علاوه بر این ۴۶ درصد جدا شده‌ها حاوی ژن *tetA* می‌باشند (۳۲). در مطالعه انجام شده توسط اسدی و همکاران در سال ۹۷ بر روی برخی از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در

اشریشیاکلی جداشده از کلی‌باسیلوز در طیور گوشتی آنها دریافتند که بیشترین ژن موجود در جدایه‌های *اشریشیاکلی* *tetA* می‌باشد که شیوع آن را ۶۳/۸۵ درصد گزارش کردند (۳۸). Belaynehe و همکاران بیان داشته‌اند که همه جدایه‌های *اشریشیاکلی* مورد مطالعه دارای حداقل یک ژن *tet* بوده و ۹۵ درصد از سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین دارای *tetA* یا *tetB* می‌باشند، همچنین ۵۱/۱ درصد دارای فقط *tetA* می‌باشند، بعلاوه ارتباط مثبتی بین جدایه‌های دارای ژن *int1* و *tetA* مشاهده شد (۱۶). در بررسی دیگر که نتایجی مشابه تحقیق حاضر داشت توسط Mohamed و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کشور اندونزی بر روی *اشریشیاکلی* جدا شده از سبزیجات انجام شد آنها مشاهده کردند که تمام جدایه‌ها مقاوم به تتراسایکلین بوده و حاوی ژن‌های *tetA* و اینتگرون کلاس یک می‌باشند (۳۳).

به دلیل آن که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعددی می‌توانند در اینتگرون قرار داشته باشند، وزن باندهای اینتگرون متغیر می‌باشد. در مطالعه حاضر وزن باندهای اینتگرون در محدوده‌های 280 الی 2600 جفت باز مشاهده شد. Roe و همکاران (۲۰۰۳) وزن باندهای اینتگرون کلاس یک را در محدوده ۶۸۰ الی ۲۰۰۰ جفت باز گزارش نمودند (۲۷). که این اختلاف می‌تواند بیانگر تفاوت توالی ژنی اینتگرون باکتری‌های *اشریشیاکلی* جدا شده در منطقه مورد مطالعه در تحقیق حاضر باشد که احتمالاً دارای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری هستند.

ارزیابی الگوی مقاومت به تتراسایکلین می‌تواند در انتخاب عوامل مناسب آنتی‌بیوتیکی برای درمان بیماری‌های طیور مفید باشد. با توجه به نتایج ما، شیوع دو ژن *tetA* و اینتگرون کلاس یک در این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌های انجام گرفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است که این تفاوت می‌تواند بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیاد در مرغداری‌های این منطقه باشد که احتمالاً به دلیل استفاده فراوان و غیر اصولی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی طیور باشد. از آنجایی که انتقال افقی اینتگرون‌ها تحت عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و مقاومت چندگانه مطرح می‌باشد بنابراین نتیجه شیوع بالای اینتگرون‌ها مطمئناً ایجاد و گسترش هرچه سریع‌تر گونه‌های مقاوم به درمان است و روز به روز، درمان بیماری‌های طیور و حتی بیماری‌های انسانی با مشکلات بیشتری مواجه می‌شود. با شناسایی انواع ژن‌های مسئول مقاومت، ممکن است رویکردهای مؤثرتری برای درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شود. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه بر لزوم استفاده محتاطانه از تتراسایکلین‌ها در تولید طیور برای کاهش شیوع *E. coli* مقاوم در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها تأکید می‌شود. با این حال، همچنین توصیه می‌شود که برای کاهش مقاومت ضد میکروبی و درمان مؤثرتر بیماری‌های عفونی طیور، از آنتی‌بیوتیک‌های کلاس‌های مختلف و تست آنتی‌بیوگرام استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی و ژنتیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل نهایت قدردانی و تشکر را دارد. شماره گرنت: UOZ-GR-7846.

References

1- Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. APMIS. *Supplementum.* 2000; 101: 1-48.

2- Miranda JM, Guarddon M, Vázquez BI,

Fente CA, Barros-Velázquez J, Cepeda A, Franco CM. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food control*. 2008; 19(4): 412-6.

3- Hammerum AM, Heuer OE. Human health hazards from antimicrobial-resistant Escherichia coli of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48(7): 916-21.

4- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*. 2012; 127(1): 4-22.

5- Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Archives of microbiology. 1996; 165(6): 359-69.

6- Bill RL. Clinical Pharmacology and Therapeutics for Veterinary Technicians-E-Book. *Elsevier Health Sciences*; 2016.

7- Goren E, De Jong WA, Doornenbal P, Laurense T. Therapeutic efficacy of doxycycline hyclate in experimental Escherichia coli infection in broilers. *Veterinary Quarterly*. 1988; 10(1): 48-52.

8- Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. *The Journal of Microbiology*. 2011; 49(1): 46-52.

9- Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical microbiology reviews*. 1992; 5(4): 387.

10- Kawano M, Yaguchi K, Osawa R. Genotypic analyses of Escherichia coli isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiology and immunology*. 2006; 50(12): 961-6.

11- Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annual review of genetics. 2010 1; 44: 141-66.

12- Koo HJ, Woo GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. *International journal of food microbiology*. 2011; 145(2-3): 407-13.

13- Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic Escherichia coli isolates from cow-calf herds in western Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(12): 3658.

14- Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. Resistance gene patterns of tetracycline resistant Escherichia coli of human and porcine origin. *Veterinary microbiology*. 2010; 142(3-4): 329-36.

15- Skočková A, Cupáková Š, Karpíšková R, Janštová B. Detection of tetracycline resistance genes in Escherichia coli from raw cow's milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021; 2021: 777-84.

16- Belaynehe KM, Shin SW, Yoo HS. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal Escherichia coli isolates from cattle farms. *BMC veterinary research*. 2018; 14(1): 1-1.

17- Bissonnette L, Roy PH. Characterization of In0 of Pseudomonas aeruginosa plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1992; 174(4): 1248.

18- Barlow RS, Gobius KS. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006; 58(6): 1133-8.

19- Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002; 292(2): 115-25.

20- Koo HJ, Woo GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. *International journal of food microbiology*. 2011; 145(2-3): 407-13.

21- Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(1): 185.

22- Shahbazi P, Jahantigh M, Salari S. Antibiotial resistance pattern and prevalence of some extende-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolated from Turkey. *Vet Res Biol Prod*. 2018; 15: 647-79.

23- Adesiyun A, Offiah N, Seepersadsingh N, Rodrigo S, Lashley V, Musai L. Antimicrobial resistance of Salmonella spp. and Escherichia coli isolated from table eggs. *Food Control*. 2007; 18(4): 306-11.

24- Cavicchio L, Dotto G, Giacomelli M, Giovanardi D, Grilli G, Franciosini MP, *et al*. Class 1

and class 2 integrons in avian pathogenic Escherichia coli from poultry in Italy. *Poultry science*. 2015; 94(6): 1202-8.

25- Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013; 303(8): 475-83.

26- Kohansal M. Isolation charactirization and molecular evaluation of genetic factors of antibiotic resistance in pathogenic Escherichia coli. *Veterinary Research and Biological Products*. 2018; 31(3): 10-9.

27- Roe MT, Byrd JA, Smith DP, Pillai SD. Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *Journal of food protection*. 2003; 66(8): 1426-31.

28- Sandalli C, Özgümüş OB, Sevim A. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26(11): 2099-103.

29- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001; 65(2): 232.

30- Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52(3): 489-92.

31- Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, *et al*. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal Escherichia coli isolates of animal and human origin. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42(12): 5444.

32- Seifi S, Khoshbakht R. Prevalence of tetracycline resistance determinants in broiler isolated Escherichia coli in Iran. *British poultry science*. 2016; 57(6): 729-33.

33- Mohamed SA, Ardiyati T, Rifa'i M. Detection of class 1 integron-associated gene cassettes and tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from ready to eat vegetables. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020; 55: 327-31.

34- Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The integron: adaptation on demand. Microbiology spectrum. 2015; 3(2): 3-2.

35- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006; 4(8): 608-20.

36- Stokes HW, Nesbø CL, Holley M, Bahl MI, Gillings MR, Boucher Y. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn 402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(16): 5722-30.

37- Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2015; 14(1): 1-1.

38- Asadi A, Zahraei Salehi T, Jamshidiyan M. Molecular analysis of antibiotic resistance genes in Escherichia coli from broiler chickens in shahrebabak by Multiplex PCR Technique. *Iranian Journal of Animal Science*. 2018; 49(2) :203-11.

39- Cavicchio L, Dotto G, Giacomelli M, Giovanardi D, Grilli G, Franciosini MP, *et al*. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic Escherichia coli from poultry in Italy. *Poultry science*. 2015; 94(6): 1202-8.

40- Oosterik LH, Peeters L, Mutuku I, Goddeeris BM, Butaye P. Susceptibility of avian pathogenic Escherichia coli from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. *Avian diseases*. 2014; 58(2): 271-8.

41- Sunde M, Norström M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolated from Norwegian meat and meat products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 58(4): 741-7.

42- Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Heather Lim NJ, Nicholson V, *et al*. Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario. *Applied and environmental microbiology*. 2005; 71(11): 6753-61.

43- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary microbiology and microbial disease. *Blackwell science*. 2002.

44- Wayne, P.A. Clinical and laboratory standards institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 2011.

Survey of prevalence of tet(A) and class 1 Integron genes in tetracycline-resistant *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis

Mohamoud Nakhaei[1*], Mohammad Jahantigh[2], Mohsen Najimi[3], Saeed Salari[3]

1- D.V.M., Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: September 9, 2021; Revise: March 3, 2022; Accept: March 6, 2022

Summary

Antibiotics have long been the first line of defense against *Escherichia coli* infection, but they have lost their potency as the bacteria become increasingly resistant to treatment. The aim of this study was to evaluate the resistance to tetracyclines and the prevalence of tetA and integron class I resistance genes in *E. coli* isolated from broilers with colibacillosis. In this study, 96.6 % of *Escherichia coli* isolates resistant to one or both tetracycline antibiotics were studied. Experimental results showed that 98.2 % of tetracycline-resistant *Escherichia coli* bacteria isolated from lesions of colibacillosis carry tetA. The prevalence of class I integron gene was 98.2%. Also, 96.5% of the isolates of this bacterium carried both genes. Considering the results, the prevalence of tetA and integron class 1 genes in this study was significantly higher than other studies. This difference could indicate high antibiotic resistance in poultry farms in this region which emphasizes the need for cautious use of tetracyclines in poultry production to reduce the prevalence of *E. coli* resistant to these antibiotics.

Key words: *Integron class, tet (A), Escherichia coli, Colibacillosis, tetracycline*