بررسی و شناسایی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک در منطقه سیستان

وحیده کدایی[۱]، زهرا راشکی قلعه‌نو[۲*]

۱- دانش آموخته ژنتیک، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار میکروب شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله : ۱۸ اسفند ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۴ خرداد ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۶ مرداد ۱۳۹۷

چکیده

برخی از سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی خارج روده‌ای می‌توانند باعث عفونت مجاری ادراری در جوامع انسانی شود. امروزه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز مقاومت در بین جمعیت‌های باکتریایی شده است. این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های مقاومت بها تتراسایکلین و بررسی میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی مولد عفونت ادراری انجام گرفت. در این تحقیق توصیفی- مقطعی، ۳۵۰ نمونه ادراری طی ۶ ماه از افراد مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی زابل جمع آوری و اشریشیاکلی با استفاده از روش‌های مرسوم باکتری شناسی تعیین هویت شد. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس توصیه‌های موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) با استفاده از روش انتشار دیسک انجام و سپس برای شناسایی ژن‌های *tetA*, *tetB* و *tetC* از روش PCR استفاده گردید. از مجموع ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جمع آوری شده، بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسایکلین (۵۷ درصد) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم (۳۴ درصد) بود. میزان مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، آزترونام و سفوتاکسیم به ترتیب ۴۴، ۴۴ و ۴۰ درصد بود. در میان ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲ ایزوله (۵۶/۱۴ درصد) دارای ژن *tetA*، ۲۸ ایزوله (۴۹/۱۲ درصد) دارای ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۰/۵۲ درصد) دارای ژن *tetC* بودند. ۱۶ ایزوله (۲۸/۰۷ درصد) همزمان دو ژن (۱۵ ایزوله دو ژن *tetA* و *tetB* و یک ایزوله دو ژن *tetA* و *tetC*) و ۳ ایزوله (۵/۲۶ درصد) نیز هر سه ژن را داشتند. ۱۴ ایزوله (۲۴/۵۶ درصد) فاقد ژن‌های مورد مطالعه بودند. مقاومت به تتراسایکلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور ژن‌های *tetA* و *tetB* در سویه مولد عفونت ادراری نشانه‌های هشدار دهنده در منطقه سیستان است. مطالعه حاضر به شدت محدود کردن مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها شامل تتراسایکلین را توصیه می‌کند. انجام مطالعات بیشتری در سایر مناطق کشور ضروری به نظر می‌رسد تا اقدامات مناسب‌تری نسبت به روش‌های درمانی رایج صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک، ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین، مقاومت به تتراسایکلین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: zahrarashki@yahoo.co.uk

مقدمه

اشریشیاکلی از ساکنین طبیعی روده‌ی انسان و حیوان به شمار می‌رود و مقاومت دارویی این باکتری اهمیت زیادی به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارد. این باکتری از مهم‌ترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری است که به علت کسب پلاسمیدهای کدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و پمپ‌های انتشار به خارج تتراسایکلین، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تتراسایکلین مقاوم شده‌اند و می‌توانند در بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل سپسیس، عفونت‌های زخم،گاستروانتریت و مننژیت نوزادی زندگی بیمار را تحدید کند (۱، ۲). به همین دلیل، درمان بیماری‌های ناشی از آن با مشکل مواجه شده است. مقاومت تتراسایکلینی یک مدل جالب برای مطالعات اکولوژی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. تتراسایکلین عملکرد ضد باکتریایی خود را به وسیله اتصال به جزء 30s ریبوزوم باکتریایی و مهار سنتز پروتئین نشان می‌دهد. یکی از سریع‌ترین ضد باکتری‌های وسیع‌الطیف است که از دهه ۱۹۴۰ توسعه یافته و در مقیاس وسیعی تولید می‌شود. بجز استفاده آن در طب انسانی و دامپزشکی، در تحریک رشد محصولات کشاورزی و باغبانی نیز کاربرد دارد (۳، ۴). تتراسایکلین در درمان عفونت‌های اشریشیاکلی در انسان به‌کار برده نمی‌شود، ولی مقاومت به تتراسایکلین در عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی رایج می‌باشد. مقاومت باکتریایی به تتراسایکلین بیشتر به روش انتشار به خارج و به صورت انرژی‌خواه می‌باشد، که تتراسایکلین را به بیرون از سلول باکتریایی منتقل می‌کند. ژن‌های *tet(A), (B), (C), (D), (E), (Y), (I)* در باکتری‌های گرم منفی نیز سیستم‌های انتشار به خارج را کد می‌کنند (۶-۴). پمپ‌های تتراسایکلین بر اساس توالی اسید آمینه‌ای به ۶ گروه تقسیم بندی می‌شوند، که Tet(A), Tet(B), T(C), Tet(D) و Tet(E) به علت تشابهات آمینواسیدی که با هم دارند در گروه ۱ قرار می‌گیرند. اکثر پمپ‌های انتشار به خارج تتراسایکلین به صورت اختصاصی تنها در ایجاد مقاومت به تتراسایکلین شرکت دارند (۷). شش ژن به عنوان ژن‌های مقاومت تتراسایکلین مورد هدف قرار گرفته‌اند، که از بین آنها تنها ژن‌های *tetA, tetB, tetC* شناسایی شده‌اند (۸). ژن *tetB* در ۸۰ درصد از ایزوله‌های جدا شده مقاوم به تتراسایکلین وجود دارد. در ۲۵ درصد ایزوله‌های جدا شده مقاوم به تتراسایکلین، هیبرید دو ژن *tetA* و *tetC* در تمام دوره‌های مطالعه وجود دارد. این درصدها، در مراحل اولیه کمتر شایع هستند (۹، ۱۰).

در ایران مطالعات فراوانی بر روی سویه‌های اشریشیاکلی بیمارستانی انجام شده و کمتر به بررسی ژن‌های عامل مقاومت به تتراسایکلین و میزان شیوع آن در مناطق مختلف ایران پرداخته شده است. از این رو شناسایی سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین و تعیین نوع ژن‌های دخیل جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب عفونت ادراری حائز اهمیت می‌باشد، لذا شناسایی الگوی مقاومتی این باکتری در هر منطقه جغرافیایی می‌تواند به‌عنوان راهنمایی برای درمان تجربی چنین عفونت‌هایی ارزشمند باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری: این مطالعه توصیفی- مقطعی در یک بازه زمانی شش ماهه از ابتدای فروردین لغایت پایان شهریور ماه سال ۱۳۹۱ انجام گردید. در مجموع تعداد ۳۵۰ نمونه طبق شرایط استریل از ادرار میانی بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی شهرستان زابل

جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. در آزمایشگاه کلیه ایزوله‌ها با انجام تست‌های افتراقی شامل کشت در محیط TSI، تولید اندول، بررسی از نظر داشتن حرکت در محیط SIM، واکنش در محیط VP,MR و سیمون سیترات بررسی شد و ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید.

بررسی مقاومت ضد میکروبی ایزوله‌ها:

واکنش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کربی بائر و بر اساس دستورالعمل مؤسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) انجام گردید (۱۱). محیط کشت مولر هینتون آگار با ضخامت ۵ میلی‌متر به طور یکنواخت در تمامی پلیت‌ها در شرایط استریل تهیه شد. سپس با سواپ استریل از کشت میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند (CFU/ml ۱۰۸ ×۱/۵) درسطح پلیت تلقیح گردید. بعد از آن، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سفتازیدیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg) و آزترونام (30µg) خریداری شده از شرکت پادتن طب بر روی سطح پلیت قرار داده و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از گرماگذاری، به وسیله خط‌کش، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و ثبت شدند. با توجه به جدول همراه دیسک‌ها، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت حساس (Sensitive)، مقاوم (Resistant) یا نیمه‌حساس (Intermediate) گزارش شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژی، استخراج DNA باکتری مقاوم به تتراسیکلین با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (۱۲). به منظور شناسایی ژن‌های *tetA*, *tetB* و *tetC* از آغازگرهای موجود در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA الگو ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix RED 2X (شرکت پیشگام) و ۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۲۰ پیکومول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه در۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (extension) در۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲ درصد به مدت۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 bp ارزیابی گردید (شکل ۱).

نتایج

در این مطالعه از ۳۵۰ نمونه ادرار تعداد ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا گردید که ۶۷ ایزوله (۱۹/۱۴ درصد) از نمونه ادراری افراد مؤنث و ۳۳ ایزوله (۹/۴۲ درصد) متعلق به نمونه ادراری جنس مذکر بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع اشریشیاکلی در بین بیماران مورد بررسی ۲۹ درصد بود. نتایج آزمون کربی بائر نشان داد که ۵۷ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین (۵۷ درصد)، ۴۴ ایزوله به سفتریاکسون و آزترونام (۴۴ درصد)، ۴۰ ایزوله به سفوتاکسیم (۴۰درصد) و ۳۴ ایزوله به سفتازیدیم

(۳۴ درصد) مقاوم بودند و ایزوله‌های غیر مقاوم به هر آنتی‌بیوتیک نیز به صورت حساس و نیمه‌حساس گزارش شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. بر طبق این بررسی بیشترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۵۷ درصد) بود (جدول ۲).

پس از بررسی ۵۷ ایزوله مقاوم به تتراسایکلین، ۳۲ ایزوله از ۵۷ ایزوله مقاوم (۵۶/۱۴ درصد) دارای ژن *tetA*، ۲۸ ایزوله (۴۹/۱۲ درصد) دارای ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۰/۵۲ درصد) دارای ژن *tetC* بودند، علاوه بر آن ۱۵ ایزوله دارای *tetA* و *tetB* ، ۱ ایزوله دارای *tetA* و *tetC* و ۳ ایزوله هر ۳ ژن مقاومت به تتراسایکلین را دارا بودند (جدول ۳). با توجه به آنچه که در این مطالعه مشخص شد، بعضی از نمونه‌ها حامل دو یا سه ژن مقاومت به تتراسایکلین بوده و مواردی نیز فاقد ژن‌های فوق بودند، که ممکن است دارای دیگر ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین باشند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام آغازگر ها	توالی	اندازه (جفت باز)	منبع
tetA-F	GTGAAACCCAACATACCCC	۸۸۸	این مطالعه
tetA-R	GAAGGCAAGCAGGATGTAG		این مطالعه
tetB-F	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	۷۷۴	این مطالعه
tetB-R	ACTGCCGTTTTTTCGCC		این مطالعه
tetC-F	ACTTGGAGCCACTATCGAC	۸۸۱	این مطالعه
tetC-R	CTACAATCCATGCCAACCC		این مطالعه

جدول۲- درصد مقاومت و یا حساسیت ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی مولد عفونت‌های ادراری به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم٪	نیمه حساس٪	حساس٪
آزترونام	۴۴	۲۲	۳۴
تتراسایکلین	۵۷	۵	۳۸
سفتازیدیم	۳۴	۱۶	۵۰
سفتریاکسون	۴۴	۲۶	۳۰
سفوتاکسیم	۴۰	۱۵	۴۵

بحث و نتیجه‌گیری

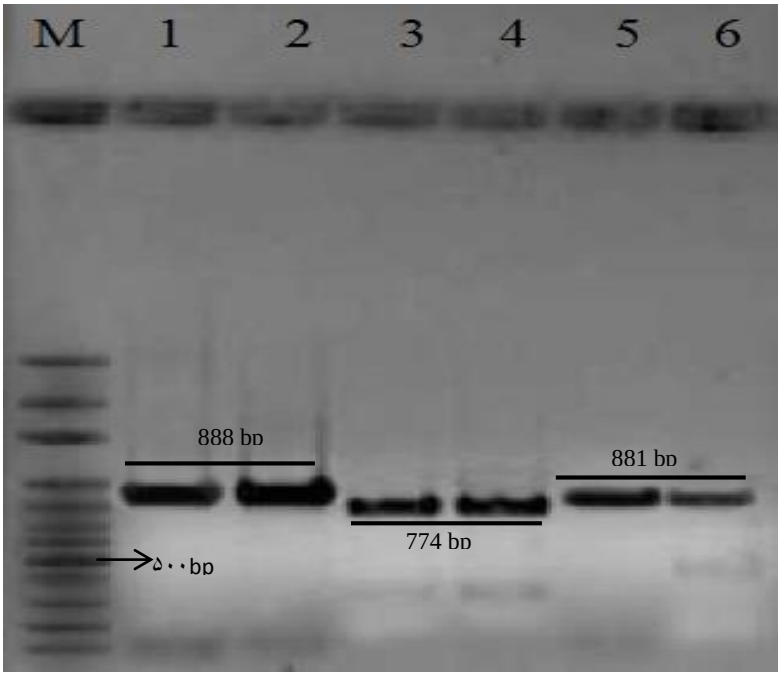
عفونت‌های مجاری ادراری در سراسر دنیا از اهمیت خاصی برخوردار بوده و در این موارد اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری به خصوص در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است. امروزه یکی از مشکلات مهم سیستم درمانی کشور افزایش میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین جمیعت

باکتری‌های پاتوژن انسانی و حیوانی می‌باشد. مصرف بی رویه دارو، وجود مراکز غیر مجاز فروش دارو و مصرف خودسرانه دارو از عوامل اصلی افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جمعیت باکتری‌های پاتوژن است که منجر به پیدایش و شیوع باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور ژن‌های مقاوم در آنها می‌شود. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در جمعیت‌های دامی کشور (به منظور درمان و یا فاکتور رشد) که نقش اساسی در تأمین فراورده‌های پروتئینی را دارند نیز باعث ایجاد سویه‌های مقاوم و انتشار آنها در جمعیت‌های انسانی شده است. در این مطالعه، از ۱۰۰ ایزوله اشریشیاکلی جداشده از بیماران، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۵۷ درصد، به سفتریاکسون و آزترونام ۴۴ درصد، به سفوتاکسیم ۴۰درصد و به سفتازیدیم ۳۴ درصد مشاهده شد. که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود. همچنین در این پژوهش میزان فراوانی و شیوع ژن‌های تتراسایکلین، به ترتیب در*tetA* (۵۶/۱۴ درصد)، در *tetB* (۴۹/۱۲ درصد) و در*tetC* (۱۰/۵۲ درصد) بود. در یک بررسی Ochoa و همکاران در سال ۲۰۰۹، میزان مقاومت به تتراسایکلین را ۶۵ درصد گزارش کردند (۱۳). همچنین در مطالعه سرشار و همکاران که بر روی ۷۷ ایزوله اشریشیاکلی انجام شد میزان مقاومت به تتراسایکلین ۵۵/۸ درصد گزارش شده است. این محققین دریافتند که۳۳ ایزوله مقاوم به تتراسیکلین (۷۶/۷ درصد) ژن *tetA*، ۲۷ ایزوله (۶۲/۷ درصد) ژن *tetB* و ۶ ایزوله (۱۳/۹ درصد) ژن *tetC* را دارا بودند (۱۴) که مقایسه بین درصدهای به‌دست آمده در این مطالعه با درصدهای حاصل از مطالعه فوق اختلاف اندکی را نشان می‌دهد. درمطالعه‌ای که توسط Ruslan و همکاران بر روی الگوی مقاومت آنت بیوتیکی در ایزوله‌های شیگلا فلکسنری و شیگلاسونئی انجام شد. ۹۳ درصد ایزوله‌ها به تتراسایکلین مقاوم بودند (۱۵). درمطالعه کرمی و همکاران درسال ۱۳۹۱ در همدان میزان مقاومت ایزوله‌های اشریشیاکلی نسبت به تتراسایکلین ۵۸/۴ درصد گزارش شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۶). نتایج حیدری و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع ژن‌های *tetB* و *tetA* را به ترتیب ۸۴/۴۱ درصد و ۸۵ درصد گزارش کردند که خیلی بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۱۷). مشایخی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که میزان حضور ژن‌های القاکننده مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک تتراسایکلین *tetA* و *tetB* ۷۱ درصد بود (۱۸). دورمنش و همکارانش در سال ۲۰۱۳ شیوع ژن‌های *tetA* و *tetB* علیه تتراسایکلین را ۸۲ درصد و ۶۵ درصد گزارش کردند که با مطالعه حاضر همخوانی ندارد (۱۹). در مطالعه Sandalli و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در تعدادی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه نشان داد که از ۵۲ ایزوله مقاوم ۱۵ درصد از آنها داری ژن *tetA* و ۱۹ درصد دارای ژن *tetB* بودند و تنها در یک مورد از آنها هر دو ژن مشاهده شد (۲۰). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که در ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین شیوع ژن‌های *tetB* و *tetA* متفاوت است که با سایر مطالعات مطابقت دارد (۲۱، ۲۲). این تفاوت در نتایج آنتی بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیایی ناشی از تفاوت ژنتیکی سویه‌های باکتری، میزان مهاجرت و عوامل متعدد دیگری است که در انتخاب داروی مناسب در درمان در هر منطقه تأثیرگذار می‌باشد. نتایج حاصل از PCR در این مطالعه همسو با گزارش Tuckman و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص ژن‌های tet نشان داد که بعضی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاومت داشته ولی حامل هیچ یک از ژن‌های tet

مورد بررسی نبودند (۲۳). جهش در ناحیه اتصال پرایمر و نیز وجود ژن‌های مقاومت دیگر می‌تواند از دلایل کم بودن فراوانی ژن‌های مقاوم به تتراسایکلین علی‌رغم وجود مقاومت فنوتیپی در این مطالعه باشد. همچنین در این مطالعه میزان فراوانی ژن *tetA* نسبت به ژن *tetB* در ایزوله‌های اشریشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین بیشتر بود که با گزارش ارائه شده توسط Sianglum در سال ۲۰۰۹ تطابق دارد (۲۴). در آمریکا و بعضی از کشورها از تتراسایکلین در دوزهای کمتر از دوز درمانی به عنوان فاکتور رشد در غذای دام‌ها استفاده می‌گردد (۲۵) در حالی که از تتراسایکلین به عنوان داروی انتخابی در درمان انسان استفاده نمی‌شود که می‌تواند یکی از دلایل افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک باشد.

جدول۳- نتایج PCR ژن‌های tet در ۵۷ نمونه مقاوم به تتراسیکلین

نوع ژن	تعدادایزوله های مثبت
tetA	۱۳
tetB	۱۰
tetC	۲
tetB و *tetA*	۱۵
tetC و *tetA*	۱
tetC و *tetB*	۰
tetA, *tetB* و *tetC*	۳



شکل۱- نمونه‌ای از PCR ژن‌های tet را نشان می‌دهد. ردیف M مارکر ۱۰۰ جفت باز، ردیف‌های ۱و۲ ژن *tetA*، ردیف‌های ۳و۴ ژن *tetB* و ردیف‌های ۵ و۶ ژن *tetC*

در ایـــن مطالعـــه میـــزان بـــالای مقاومـــت بـــه تتراسـایکلین در ایزولـه‌های اشریشـیاکلی مولـد عفونـت ادراری، شـــرایط مســـاعدی بـــرای رشـــد و تکثیـــر باکتری‌هـای حامـل ژن‌هـای مقـاوم بـه تتراسـایکلین را در سـطح منطقـه فـراهم نمـوده کـه می‌توانـد بـه انتقـال ایـــن ژن‌هـــا از طریـــق پلاســـمیدها و ترانســـپوزون‌ها از سویه های حیوانی به انسانی مرتبط باشد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وســـیله از حمایـــت بخـــش میکروب‌شناســـی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه زابـل و دوسـتانی کـه مـا را در اجـرای ایـــن تحقیـــق صـــمیمانه یـــاری داده انـــد، سپاسگزاری می شود.

References

1- Beheshti M, Talebi M, Ardebili A, Bahador A, Lari AR. Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. Journal of pharmacy & bioallied sciences. 2014 Oct;6(4):229-32.

2- Rezaei A, Fazeli H, Moghadampour M, Halaji M, Faghri J. Determination of antibiotic resistance pattern and prevalence of OXA-type carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from inpatients in Isfahan, central Iran. Leinfezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive. 2018;26(1):61-6.

3- Akers KS, Mende K, Yun HC, Hospenthal DR, Beckius ML, Yu X, *et al.* Tetracycline susceptibility testing and resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* complex from a U.S. military hospital. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(6):2693-5.

4- Alexander TW, Jin X, Li Q, Cook S, McAllister TA. Characterization oftetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered therapeutic or subtherapeutic levels of tetracycline. Canadian journal of microbiology. 2013;59(4):287-90.

5- Nawaz M, Khan AA, Khan S, Sung K, Kerdahi K, SteeleR. Molecular characterization of tetracycline-resistant genes and integrons from avirulent strains of *Escherichia coli* isolated from catfish. Foodborne pathogens and disease. 2009;6(5):553-9.

6- Seifi S, Khoshbakht R. Prevalence of tetracycline resistancedeterminants in broiler isolated *Escherichia coli* in Iran. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016;57(6):729-33.

7- Abo-Amer AE, Shobrak MY, Altalhi AD. Isolation and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolated from farm chickens in Taif province, Saudi Arabia. Journal of global antimicrobial resistance. 2018.

8- Moawad AA, Hotzel H, Awad O, Tomaso H, Neubauer H, Hafez HM, *et al.* Occurrence of Salmonella enterica and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. Gut pathogens. 2017;9:57.

9- Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, *et al.* Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. PloS one. 2017;12(9):e0185326.

10- Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, *et al.* Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(10):3214-21.

11- Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. CLSI; 2014. 2009.

12- Rashki A. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Microbial pathogenesis. 2014;75:29-34.

13- Ochoa TJ ,Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, *et al.* High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2009;81(2):296-301.

14- Sarshar M, Toophani H, Ghorbani S. Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Humans Journal of colloid and interface science. 2011;17(57):433-43.

15- Ruslan SM, Amir MB, Gulnara A, K.A. G, Aybek VK, Ladaporn B, *et al.* Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. Gut pathogens. 2018;2(18):1-6.

16- Karami P, Aslani MM, Najafi Mosleh M, Alikhani MY. Determine thepattern of antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains Entropathogen isolated from children with diarrhea. Korean journal for food science of animal resources. 2012;1(1):27-31.

17- Heidary M, Momtaz H, Madani M. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. Iran Red Crescent Med J. 2014;16(4):e12329.

18- Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpoor M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Tarhriz V. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. Iran. Food and environmental virology. 2014;12(2):e16833.

19- Dormanesh B, Mirnejad R, Khodaverdi Dariyan E, Momtaz H, Yahaghi E. Characterization and study the antibiotic resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pediatrics with pyelonephritis and cystitis in Iran. Iran J Med Microbiol. 2013;7(2):27-39.

20- Sandalli C, Sevim A, Ozgumus OB. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol. 1990;26:2099–103.

21- Bryan A, Shapir N, Sadowsky M. Frequency and distribution of tetracyclin resistanc genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strain isolated from diverse human and animal Sources. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2004;7o(1):2503–7.

22- Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, *et al.* Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(10):3996-4001.

23- Tuckman M, Petersen PJ, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, *et al.* Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(9):3205-11.

24- 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;17:117–34.

25- Nelson ML, Levy SB. Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(7):1719-24.

Identification and Determination of Tetracycline Resistance Genes in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Sistan

Vahideh Kadaei[1], Zahra Rashki Ghalenoo[2*]

1- Graduated Student of genetic, Department of Biology, Faculty of Science, Univercity of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant professor of Microbiology and Molecular Genetics, Department of Microbiology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Receive; March 9, 2018; Revise: June 4 2018; Accept: July 28, 2018

Summary

Certain strains of extraintestinal pathogenic *E. coli* can cause urinary tract infection (UTI) in humans. Today, unnecessary consumption of antibiotics has led to resistance in bacterial populations. The aim of this study was to determine the tetracycline resistance genes and to evaluate the prevalence of antibiotic resistance among *E. coli* isolates collected from patients with UTI. In this descriptive cross-sectional study, 350 urine samples were collected from patients with UTI who were referred to the teaching hospital in Zabol during 6 months. *E. coli* was identified by conventional bacteriological test methods. Antibiotic susceptibility test was performed as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) using disk diffusion method. All tetracycline-resistant isolates were then examined for presence of the *tetA*, *tetB* and *tetC* genes. Of the 100 isolates of *E. coli*, the most antibiotic resistance was related to tetracycline (57%) and the least antibiotic resistance was related to ceftazidim (34%). Resistance to other antibiotics ceftriaxone, aztreonam and cefotaxime were 44%, 44% and 40%; respectively. Among tetracycline resistant isolates, 32 isolates (56.14%), had *tetA* gene and *tetB* and *tetC* genes were found in 28 (49.12%) and 6 (10.52%) isolates respectively. 16 (28.07%) and 3 (5.26%) isolates were positive for both genes (*tetA* and *tetB*) and three genes, and 14 (24.56%) isolates were negative for them. Resistance to tetracycline and other antibiotics, and the presence of *tetA* and *tetB* genes in UPEC strains are alarming signs in Sistan. The current study strongly recommends restricted consumption of antibiotics including tetracycline. Further studies are needed in other parts of the country to take more appropriate measures than common therapies.

Key words: *Uropathogenic E. coli, Tetracycline -resistance genes, Tetracycline-resistant*