Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۴۴-۳۵

مطالعه فراوانی و نقش اینتگرون کلاس ۱ *اشریشیا کلی* های جدا شده از طیور در القای مقاومت باکتری به ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت سدیم

فرزاد حسین‌زاده[۱]، حسن شریفی یزدی[۲]، مهران قائمی بافقی*[۳]، بهمن عبدی هاچه سو[۴]

۱) دانش آموخته دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۲) استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۳) استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۴) استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

چکیده:

یکی از ضدعفونی‌کننده‌های پرکاربرد در صنعت طیور کشور، هیپوکلریت‌سدیم می‌باشد. باکتری *اشریشیا کلی* *(E. coli)* یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌هایی است که توسط این ضدعفونی‌کننده کنترل می شود. امروزه، از باکتری *E. coli* به عنوان باکتری مهمی در نگهداری و انتقال مقاومت‌های چندگانه‌ی دارویی و ضدعفونی کننده ها یاد می شود که می تواند این مقاومت را به سایر باکتری‌ها نیز منتقل کند. اینتگرون‌ها از جمله قطعات ژنی مهمی هستند که از طریق پذیرش و بیان ژن‌های مقاومت در انتقال و بروز مقاومت در باکتری‌های مختلف نقش دارند. در مطالعات گذشته، در کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ علاوه بر ژن های مقاومت به داروها و مواد ضدعفونی کننده ترکیبات چهارتائی آمونیوم (ژن های *qacE*) ، توالی‌هایی با قالب خواندن باز (ORF)، شناسائی شده اند. تاکنون چندین ORF که ژن هائی با عملکرد ناشناخته هستند، در کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ شناسائی شده اند.

در مطالعه حاضر، فراوانی اینتگرون کلاس ۱و نیز ژن *orfF* به روش Multiplex PCR در باکتری های *اشریشیا کلی* جدا شده از طیور و نقش آن ها در القای مقاومت باکتری به ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم با آزمایش کمترین غلظت مهاری بررسی گردید.

در این مطالعه فراوانی اینتگرون کلاس۱، ۶۱ درصد به دست آمد. فراوانی حضور اینتگرون کلاس۱ در میان جدایه‌های حاصل از نمونه های مدفوع و یا پریکارد تفاوت معناداری نداشتند. همچنین هیچ گونه ارتباط معنی داری بین فراوانی حضور اینتگرون کلاس۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد (P>۰/۰۵). فراوانی ژن *orfF* نیز ۸ درصد بود که ارتباط آماری معنی داری با حضور اینتگرون کلاس۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد (P>۰/۰۵) .

علی رغم وجود فراوانی بسیار بالای اینتگرون کلاس۱ در میان جدایه‌های مورد آزمایش، با توجه به عدم وجود ارتباط آماری بین اینتگرون کلاس۱ و مقاومت به هیپوکلریت سدیم می توان نتیجه گرفت که ژن های مقاومت به این ضدعفونی کننده از طریق کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ منتقل نمی شوند و نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه درک مقاومت به این ضدعفونی کننده وجود دارد.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، اینتگرون کلاس۱، ضدعفونی کننده، هیپوکلریت سدیم، orfF

* نویسنده مسئول: مهران قائمی بافقی

آدرس: بخش بیوتکنولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۳۶۱۳۸۶۵۴

پست الکترونیک: m.ghaemi@shirazu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

امروزه جنبه‌های مختلف امنیت زیستی، نقش مهمی در صنعت طیور دارند که استفاده از ضدعفونی‌کننده ها برای مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماریزای طیور یکی از مهمترین جنبه های آن است. اگر ضدعفونی‌کننده‌ها در غلظت‌های مناسب مورد استفاده قرار گیرند، مقاومت میکروارگانیسم ها نسبت به آنها گسترده نخواهد بود اما با این وجود، نگرانی‌های زیادی در ارتباط با امکان ایجاد مقاومت علیه ضدعفونی‌کننده‌ها در میکروارگانیسم ها بویژه در شرایط استفاده از مقادیر کمتر از حد استاندارد، وجود دارد (۱). یکی از ضدعفونی‌کننده‌های کاربردی و بسیار معمول که در صنعت طیور به کار می رود، هیپوکلریت‌سدیم است که در این مطالعه مقاومت به آن در باکتری های *E. coli* بررسی گردید.

هیپوکلریت سدیم از ترکیب هیپوکلریت (ClO^-) با سدیم تری هیدراته (Na^+) به صورت مایع تولید می شود که محلول رقیق شده آن به عنوان سفیدکننده مورد استفاده قرار می گیرد. قدرت هیپوکلریت سدیم در کشندگی اجرام بیماری زا به درصد کلر فعال آن، pH محلول و نیز دما بستگی دارد. افزایش درصد کلر فعال، کاهش pH و افزایش دما باعث افزایش اثر ضدعفونی کنندگی آن می شود. اسید هیپوکلریت یک اسید ضعیف است و pH محلول حاصل از آن به میزان یون ClO^- و H^+ وابسته است. به طورکلی، HClO ترکیب فعال در عمل ضدعفونی به حساب می آید (۶). هیپوکلریت سدیم کاربردهای فراوانی در صنعت طیور دارد. از این ضدعفونی کننده برای ضد عفونی کردن مخازن آب، آبخوری ها و آب مصرفی مرغداری ها (۱۲)، کاهش بار میکروبی لاشه های کشتارگاهی طیور و همچنین ضدعفونی‌کردن تاسیساتی مانند ماشین‌های جوجه‌کشی، گاری های مخصوص ستر و هچر و دیگر فضاهای مجاور هچر، به علاوه ضدعفونی کردن سطوح صاف سیمانی استفاده می شود (۱). برای ضدعفونی کردن سطوح با هیپوکلریت سدیم، باید به دقت مواد آلی پاکسازی شده تا عمل ضدعفونی با کارآیی بالایی انجام شود. با توجه به فرار بودن کلر، در هر بار ضدعفونی باید از محلول تازه ی هیپوکلریت سدیم استفاده گردد (۱).

از مهمترین میکروارگانیسم‌هایی که توسط این ضدعفونی‌کننده‌ها کنترل می شود *E. coli* است که از جنبه‌ی اقتصادی به لحاظ ایجاد بیماری کلی باسیلوز در صنعت طیور و نیز از جنبه‌ی بهداشت عمومی (سویه *E. coli* O157:H7) از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). باکتری *E. coli* از جنس اشریشیا متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه، میله‌ای، گرم‌منفی، غیراسپورزا، چندشکلی و غیراسیدفست می‌باشد. بیشتر واریته‌های مربوط به این باکتری به علت داشتن تاژک پیرامونی، متحرک هستند. *E. coli* معمولا در دستگاه گوارش انسان و حیوانات مختلف یافت شده و در طیور عامل ایجادکننده ی بیماری کلی باسیلوز است که شایع ترین بیماری باکتریایی در طیور بوده و یکی از خسارت بارترین عوامل بیماری زای طیور محسوب می شود. کلی‌باسیلوز در پرندگان به دو شکل موضعی و عمومی می تواند ایجاد شود (۱۴).

امروزه، از باکتری *E. coli* به عنوان باکتری شاخصی در نگهداری و انتقال مقاومت‌های چندگانه‌ی دارویی و ضدعفونی کننده ها یاد می شود که می تواند این مقاومت را به سایر باکتری‌ها نیز منتقل کند و باعث انتشار مقاومت در سایر باکتری‌ها گردد. بنابراین مقابله با آن، به مقابله با

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت‌های باکتریایی در سایر باکتری‌ها نیز کمک می‌کند (۱۰). در حقیقت سویه های باکتری *E. coli* به عنوان منابع بالقوه‌ی پلاسمیدها و ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای حدت و همچنین مقاومت چندگانه‌ی باکتریایی هستند (۱۳). مقاومت در برابر دارو و ضدعفونی کننده ها اغلب توسط کاست های ژنی بین باکتری‌ها منتقل می‌شوند. انواع کاست های ژنی حامل ژن های مقاومت داروئی، پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها هستند. گسترش باکتری های دارای این کاست های ژنی در سطح جهان باعث گسترش مقاومت‌ها و در پی آن ایجاد مشکل در نابودی میکروارگانیسم ها با استفاده از ضدعفونی کننده ها و نیز درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها و ایجاد معضلات جدی در مساله‌ی بهداشت عمومی می‌شود (۲).

اینتگرون‌ها از جمله قطعات ژنی مهمی هستند که از طریق پذیرش و بیان ژن‌های مقاومت در انتقال و بروز مقاومت در باکتری‌های مختلف نقش دارند. تاکنون، کاست ژنی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته، اینتگرون کلاس۱ بوده و بیشترین ژن های مقاومت در برابر دارو و ضدعفونی کننده ها در این کاست ژنی شناسائی شده اند (۱۵). همه اینتگرون های کلاس۱ دارای یک قسمت ثابت در انتهای ´۵ (CS5-5) هستند که این قسمت شامل سه توالی به نام‌های ژن int1، پروموتور PC و جایگاه اتصال att1 می‌باشد. برخی نیز بخش ثابتی در انتهای ´۳ دارد که معمولا ۲۳۸۴ جفت‌باز طول داشته و ۴ ژن رمزکننده را شامل می شود (۲۲).

در مطالعات گذشته، در کاست ژنی اینتگرون۱ علاوه بر ژن های مقاومت به داروها و مواد ضدعفونی کننده، توالی‌هایی با قالب خواندن باز (ORF) که قادر به رمزگذاری پروتئین ها هستند، شناسائی شده اند. به دلیل ناشناخته بودن عملکرد آن ها از حروف برای نامگذاری این ORF ها استفاده شده است. به طور مثال در مطالعه لیامتونگ و همکاران که در سال ۲۰۰۸ بر روی باکتری‌های *E. coli* و *سالمونلای* جداشده از طیور انجام شده است، یک توالی ژنی *orfD* با عملکرد ناشناخته یافت شده است (۱۱). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی اینتگرون کلاس ۱ در باکتری‌های جداشده از باکتری‌های *E. coli* انسان انجام شد، با تعیین توالی اینتگرون‌های کلاس۱، *orf* با عملکرد ناشناخته شناسائی گردید (۱۵). در مطالعه دیگری که توسط کنگ و همکاران بر روی اینتگرون‌های کلاس ۱ باکتری‌های *E. coli* انسان و حیوانات انجام گردید نیز ژن ناشناخته orfF ردیابی گردید (۹).

در مطالعه حاضر، وضعیت مقاومت نسبت به ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت‌سدیم در جدایه‌های *E. coli* طیور بررسی و ارتباط این مقاومت با حضور اینتگرون‌های کلاس ۱ ارزیابی گردید. همچنین وجود رابطه بین منشا نمونه گیری و حضور اینتگرون کلاس ۱ در این جدایه ها مورد توجه قرار گرفت. در مطالعات قبلی، توالی *orfF* در اینتگرون کلاس ۱ ردیابی شده اما عملکرد آن کاملا ناشناخته مانده بود لذا کسب اطلاعات بیشتر درباره فراوانی این ژن ناشناخته و نیز ارتباط آن با کاست ژنی اینتگرون کلاس۱، در این مطالعه هدف قرار گرفت. با توجه به اینکه برخی ژن های درون اینتگرون کلاس ۱ می توانند مقاومت به ضدعفونی کننده ها مانند ترکیبات چهارتائی آمونیومی (qac) را رمز کنند لذا احتمال ارتباط عملکرد ژن *orfF* با مقاومت به ضدعفونی کننده ها وجود دارد. از آن جائی که هیچ شاهدی درباره عملکرد این ژن

www.SID.ir

Archive of SID

وجود نداشت، بررسی ارتباط آن با مقاومت به ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم به عنوان یک فرضیه بررسی گردید.

مواد و روش کار:

نمونه گیری و جداسازی باکتری های *E. coli*:

در مطالعه حاضر، تعداد ۱۰۰ نمونه از جدایه های مختلف باکتری *E. coli* مربوط به فارم‌های مختلف پرورش جوجه های گوشتی استان فارس مورد بررسی قرار گرفتند. از این ۱۰۰ جدایه *E. coli*، ۷۷ نمونه از مدفوع جوجه های گوشتی سالم و ۲۳ نمونه از پریکارد قلب جوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز بالینی جداسازی باکتری انجام شد. نمونه های مدفوع و پریکارد بر روی محیط جامد ائوزین متیلن آبی(Eosin MethyleneBlue) کشت داده شده و باکتری های رشد یافته به محیط مک کانکی (MacConkey) منتقل شدند. کلنی های صورتی رنگ بر روی این محیط توسط تست های بیوشیمیایی تایید شده و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۶).

آزمایش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):

تعیین MIC هیپوکلریت سدیم با استفاده از روش استاندارد رقت سازی براث (Broth microdilution) مطابق با دستورالعمل‌های ارائه شده توسط موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI) صورت گرفت. به طور خلاصه، از روی محیط‌های مک‌کانکی یک کلنی برداشته و به لوله آزمایش استریل دربدار محتوی محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) انتقال داده شد و به مدت ۲ تا ۸ ساعت در دمای 37 °C تا زمان مشاهده کدورتی منطبق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (معادل 10^8 CFU/mL) گرمخانه گذاری شد. در این روش، تعداد نهایی باکتری در هر یک از چاهک‌های میکروپلت می‌بایست در حدود 5×10^5 CFU/ml باشد. بدین منظور در ابتدا لوله حاوی باکتری با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند با اضافه کردن محیط مایع TSB به میزان ۱ به ۱۰۰ رقیق شد (1×10^6 CFU/mL). با استفاده از آب مقطر استریل، رقت های سریالی دو برابر از هیپوکلریت سدیم با ۶ درصد کلر فعال (Merck, Germany) در چاهک های میکروپلیت تهیه شده و به همان میزان (۱۰۰ میکرولیتر) محیط کشت حاوی باکتری (1×10^6 CFU/mL) به تمامی چاهک ها اضافه گردید تا تعداد نهایی 5×10^5 CFU/mL از باکتری در هر لوله بدست آید. در هر آزمایش یک چاهک فاقد ضدعفونی کننده تلقیح شده با محیط کشت حاوی باکتری به عنوان کنترل رشد باکتری در نظر گرفته شد. پلیت های تلقیح شده در دمای ۳۵ °C به مدت ۲۰- ۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت این مدت زمان نتایج قرائت شد. MIC کمترین غلظتی از ضدعفونی کننده در نظر گرفته شد که به طور کامل از رشد قابل مشاهده باکتری توسط چشم غیر مسلح ممانعت به عمل آورد (CLSI). رشد در رقت‌های بالاتر از ۰/۷۵ درصدکلر فعال (رقت چهارم) به عنوان حد آستانه (cut off) مقاومت به هیپوکلریت‌سدیم در نظر گرفته شد.

استخراج DNA:

استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گرفت (۱۹). در این روش، یک کلنی مجزای صورتی رنگ از روی محیط مک کانکی برداشته شده و در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۲۵۰ µl بافر TE (Tris-EDTA) حل شدند. بافر حاوی باکتری به مدت ۲۰- ۱۵ ثانیه ورتکس شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در آبجوش ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس میکروتیوب های حاوی باکتری های جوشیده شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۵۰۰ g× سانتریفیوژ شده و پس از اتمام کار مایع رویی جمع آوری شد. با استفاده از نانودراپ (Thermo scientific, NanoDrop 1C, USA) کمیت و کیفیت DNA استخراجی کنترل گردید و DNA های استخراج شده تا زمان انجام آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در فریزر ۲۰ °C- نگهداری شدند.

:PCR

با توجه به اینکه هدف ما بررسی وجود دو قطعه ی ژنی اینتگرون کلاس۱ و *orf F* بود، از روش Multiplex PCR استفاده گردید. ترکیب مخلوط PCR شامل ۱ µl از هر یک از دو جفت پرایمر (جدول ۱)، ۱۲/۵ µl از Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon, Denmark)، ۵/۵ µl آب مقطر، ۳ µl نمونه DNA با حجم نهائی 25 µl بود. جهت یافتن دمای بهینه اتصال در اولین واکنش شیب دمائی بین۵۰°C تا ۶۲°C برای نمونه های کنترل مثبت آزمایش شد که دمای ۵۳°C به عنوان دمای بهینه اتصال انتخاب گردید. از نمونه های پلاسمیدی که از طریق تعیین توالی وجود اینتگرون ۱ و ژن *orfF* در آن ها اثبات شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برنامه دمائی PCR، ۹۵°C، ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه دمائی شامل ۹۵°C، ۴۵ ثانیه، ۵۳°C، ۴۵ ثانیه و ۷۲°C، ۴۵ ثانیه، به علاوه ۷۲°، ۱۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

جدول ۱) مشخصات پرایمرها:

نام توالی هدف	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
اینتگرون کلاس۱ (intI)	5`-ACGAGCGCAAGGTTTCGGT-3`	۵۶۵	۲۳
	5`-GAAAGGTCTGGTCATACATG-3`		
orfF	5`-GCAGGTTTTCAGTCTTTT-3`	۱۶۷	طراحی شده در این مطالعه
	5`-CTTGACCGAAATGTTAGAA-3`		

آنالیز آماری:

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (Version 22, SPSS Inc., USA) نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی حضور کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ و نیز ژن *orfF* در میان جدایه ها به صورت تعداد و درصد گزارش شد. وجود رابطه آماری بین حضور این ژن ها و مقاومت به هیپوکلریت سدیم و نیز منشا جداسازی باکتری ها با استفاده از آزمون آماری مربع کای محاسبه گردید. عدد P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

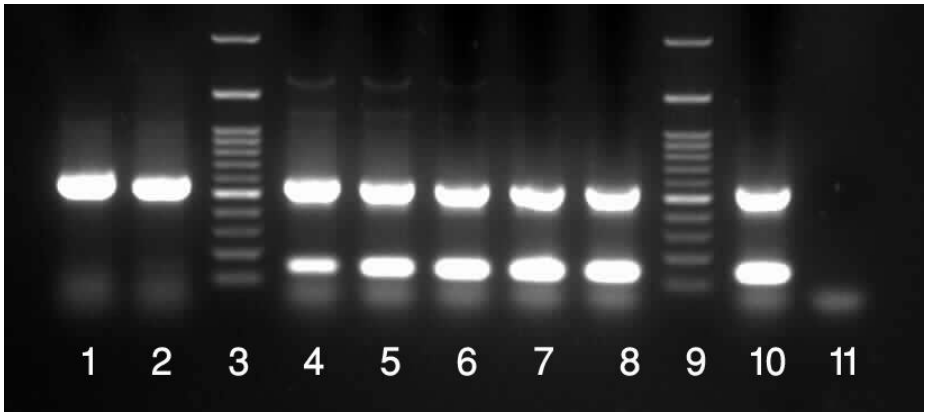
نتایج:

در این مطالعه، وجود کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ و نیز ژن *orfF* به روش Multiplex PCR تعیین گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تصویر ۱) تصویر ژل الکتروفورز نتایج Multiplex PCR



چاهک های ۱ و ۲ حاوی نمونه های دارای اینتگرون کلاس۱ ولی فاقد *orfF* هستند. در چاهک ۳ و ۹ شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی مشاهده می شود. چاهک‌های ۴ تا ۸ نمونه‌های دارای هر دو توالی اینتگرون کلاس۱ و *orfF* را نشان می دهد. در چاهک ۱۰ نمونه کنترل مثبت و در چاهک ۱۱ نمونه کنترل منفی فاقد الگو (No Template Control) یا آب مقطر دیده می شود.

در مجموع ۵۲ درصد از جدایه‌ها مقاوم و ۴۸ درصد در گروه حساس به هیپوکلریت‌سدیم بودند. در گروه حساس، ۲۶/۱ درصد مربوط به نمونه‌های پریکارد و ۵۹/۷ درصد از نمونه‌های مدفوعی بود و اختلاف آماری معناداری بین منشا باکتری و مقاومت به هیپوکلریت‌سدیم در این مطالعه مشاهده گردید، به نحوی‌که میزان مقاومت به هیپوکلریت در جدایه‌های مدفوعی به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه‌های پریکارد بود (P=۰/۰۰۸).

جدول ۲) مقایسه فراوانی حضور مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌ی هیپوکلریت‌سدیم در جدایه‌های باکتریایی با منشا مختلف

وضعیت مقاومت / منشا جداسازی	مقاوم	حساس	درصد کل (تعداد)
مدفوع، درصد (تعداد)	۴۰/۳ (۳۱) [a]	۵۹/۷(۴۶) [b]	۱۰۰(۷۷)
پریکارد، درصد (تعداد)	۷۳/۹ (۱۷) [a]	۲۶/۱ (۶) [b]	۱۰۰(۲۳)
درصد کل (تعداد)	۱۰۰(۴۸)	۱۰۰(۵۲)	۱۰۰(۱۰۰)

* حروف لاتین نامتشابه (a,b) نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

همچنین در این مطالعه فراوانی اینتگرون کلاس۱، ۶۱ درصد به دست آمد. فراوانی حضور اینتگرون در میان جدایه های حاصل از مدفوع و یا پریکارد تفاوت معناداری نداشتند (جدول ۳). همچنین هیچگونه ارتباط معنی داری بین فراوانی حضور اینتگرون کلاس۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد (P>۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳) مقایسه فراوانی حضور اینتگرون کلاس ۱ در جدایه های باکتریایی بر اساس منشا جداسازی آنها

وضعیت حضور اینتگرون / منشا جداسازی	منفی	مثبت	درصد کل (تعداد)
مدفوع، درصد (تعداد)	۳۹ (۳۰) [a]	۶۱ (۴۷) [a]	۱۰۰ (۷۷)
پریکارد، درصد (تعداد)	۳۹/۱ (۹) [a]	۶۰/۹ (۱۴) [a]	۱۰۰ (۲۳)

* حروف لاتین نامتشابه (a,b) نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

فراوانی ژن *orfF* در میان نمونه‌های مورد مطالعه، ۸ درصد بود، به نحوی که ۲ درصد موارد مثبت *orfF* مربوط به نمونه‌های پریکارد و ۶ درصد مربوط به نمونه‌های با منشا مدفوع بودند. فراوانی ژن *orfF* در میان جدایه‌های مدفوعی (۷/۸ درصد) کمتر از فراوانی موارد مثبت *orfF* در نمونه‌های پریکارد (۸/۷ درصد) بود اما از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). از طرف دیگر، ارتباط معنی داری بین حضور ژن *orfF* و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم در میان جدایه‌ها دیده نشد (P>۰/۰۵). همچنین اختلاف آماری معنی داری میان حضور ژن *orfF* و اینتگرون کلاس۱ نیز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر میزان فراوانی کاست‌ژنی اینتگرون کلاس۱ و نیز ژن *orfF* در باکتری‌های *E. coli* جداشده از طیور و همچنین وضعیت مقاومت به ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت‌سدیم در آن ها اندازه‌گیری شد و ارتباط حضور این کاست‌ژنی با مقاومت به این ضدعفونی‌کننده بررسی گردید. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات مربوط به کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ در ارتباط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بوده است. مطالعه حاضر اولین تحقیقی است که به بررسی ارتباط کاست‌ژنی اینتگرون کلاس۱ و ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت سدیم می‌پردازد. همچنین اولین مطالعه ای است که به تعیین عملکرد احتمالی ژن *orfF* توجه دارد.

شناخت کمی در رابطه با مقاومت باکتری *E. coli* در برابر ضدعفونی‌کننده‌ها در دسترس می باشد. فقط مقاومت در برابر ترکیبات چهارتائی آمونیوم توصیف شده که این مقاومت توسط ژن های *qacE* موجود در اینتگرون کلاس۱ رمز می شود (۵). در مطالعه آموس و همکاران (۲۰۱۸) در ۷۵ درصد باکتری‌های *E. coli* حاوی کاست‌ژنی اینتگرون۱، ژن مقاومت به ترکیبات چهارتائی آمونیوم یافت گردید (۳). همچنین در مطالعه گیس و همکاران (۲۰۰۵) نیز ارتباط مستقیمی بین مقاومت به ترکیبات چهارتائی آمونیوم و اینتگرون کلاس۱ را نشان دادند (۷).

فراوانی کاست ژنی اینتگرون کلاس۱ در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است، در مطالعه حاضر میزان فراوانی کاست‌ژنی اینتگرون کلاس۱ در باکتری‌های *E. coli* جداشده از طیور ۶۱ درصد بوده است که اندکی بیشتر از نتایج سایر مطالعات در این زمینه بیشتر می‌باشد. به طور مثال در ۱۶۶ نمونه‌ی *E. coli* جداشده از طیور گوشتی در کشور تونس، مشاهده شد که ۵۲ درصد جدایه ها، اینتگرون‌کلاس۱ و ۲ در ژنوم خود داشته‌اند و این مطالعه به توانایی بالقوه‌ی *E. coli* به عنوان مخزنی برای انتشار اینتگرون‌ها و فاکتورهای

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت به دارو تاکید دارد (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر روی باکتری‌های گرم منفی دستگاه گوارش نمونه‌های انسانی نشان داده شد که ۵۹ درصد آن ها حاوی اینتگرون‌کلاس۱ بودند (۱۸). گلدشتان و همکاران (۲۰۰۱) متوجه شدند که ۴۶ درصد باکتری های جداشده از دام‌های اهلی و انسان حاوی اینتگرون‌کلاس۱ بوده اند (۸). در مطالعه‌ای که توسط یانگ و همکاران (۲۰۰۴) در چین بر روی ۷۱ مرغ گوشتی انجام شد، دیده شد که ۴۷ درصد سویه‌های *E. coli* جداشده، اینتگرون‌کلاس۱ داشتند که اکثر آنها دارای ژن مقاوم به تری‌متوپریم و استرپتومایسین بودند (۲۴). همچنین در مطالعه دیگری، اینتگرون کلاس۱ در باکتری های *E. coli* و *سالمونلای* جداشده از طیور مورد بررسی گردید که از جدایه‌های ۳۸۲۴ مرغ گوشتی، تعداد ۱۷۳۲ باکتری دارای اینتگرون کلاس۱ بودند که نشان‌دهنده فراوانی ۴۵ درصدی این کاست‌ژنی می‌باشد (۱۱).

در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که این کاست‌ژنی، حامل و مرتبط با ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده است. در مطالعه‌ای که توسط باس و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد، حدود ۴۶ درصد از نمونه‌های *E. coli* جداشده از ماکیان بیمار، مقاومت چندگانه‌ی دارویی را نشان دادند و سپس این جدایه‌ها از جهت داشتن اینتگرون‌کلاس۱ ارزیابی شدند. ۶۳ درصد از نمونه‌هایی که مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی داشتند، حاوی اینتگرون کلاس۱ نیز بودند (۴). اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر تجویز سه داروی اکسی‌تتراسایکلین، سالافلوکساسین و انروفلوکساسین را بر روی توزیع مقاومت برروی سویه‌های مختلف *E. coli* جدا شده از فارم‌های جوجه‌های گوشتی بررسی کردند. شیوع بالای اینتگرون کلاس۱ در میان سویه‌ها مشاهده شد که اکثرا حاوی کاست مقاومت به استرپتومایسین بودند (۲۰).

از آن جایی که معمولا این کاست ژنی همراه با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده ها می‌باشد می‌توان انتظار داشت که سویه‌های مقاوم به دارو و مواد ضدعفونی‌کننده (بویژه ترکیبات چهارتایی آمونیومی) فراوانی بالائی داشته باشد. فراوانی بالای ۶۰ درصد در هیچ یک از مطالعات قبلی دیده نشده است، نتایج این مطالعه بالاترین فراوانی تاکنون را نشان داد که احتمال وجود میزان بالای مقاومت‌های داروئی در منطقه محل جداسازی باکتری‌ها را نشان می دهد و نیازمند توجه بیشتر به این موضوع حیاتی می‌باشد. از آن جایی که باکتری *E. coli* از باکتری‌های فلور طبیعی مشترک بین طیور، حیوانات و انسان است، احتمال انتقال این کاست‌ژنی بین باکتری‌های *E. coli* با میزبان های مختلف نیز وجود دارد. اگر چه مطالعه حاضر بر روی طیور انجام شده است، از نتایج این مطالعه می توان انتظار داشت که باکتری های *E. coli* مقاوم به دارو و ضدعفونی‌کننده در افراد و دام های مختلف نیز وجود داشته باشد. در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *orfF* در باکتری‌های جداشده از طیور ۸ درصد بوده است. از آن جائی که این مطالعه اولین مطالعه شیوع این ژن در جدایه های باکتریائی است، گزارشی درباره فراوانی آن در باکتری ها برای مقایسه وجود ندارد. حضور این ژن با حضور کاست‌ژنی اینتگرون۱ ارتباط آماری نداشت که نشان می‌دهد پراکندگی و انتشار آن مستقل از کاست‌ژنی

www.SID.ir

Archive of SID

اینتگرون۱ می باشد. از طرف دیگر، از آن جایی که از نظر آماری حضور ژن *ofrF* و میزان مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های هیپوکلریت‌سدیم معنی‌دار نبود، می‌توان نتیجه گرفت که ژن *orfF* در ایجاد مقاومت به این ضدعفونی‌کننده نقشی ندارد و تعیین عملکرد این ژن، نیازمند انجام تحقیقات گسترده‌تر و بیشتر می‌باشد.

میزان مقاومت به هیپوکلریت در جدایه‌های مدفوعی به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه‌های پریکارد بود (P=۰/۰۰۸) که علت این ارتباط آماری را می توان احتمالا به ورود باکتری های *E. coli* مقاوم محیطی از طریق دهانی-مدفوعی به دستگاه گوارش طیور دانست. در مطالعه حاضر بین وجود کاست‌ژنی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت‌سدیم ارتباط آماری وجود نداشت ولی تاثیر سایر کاست‌های ژنی شناخته شده و یا کاست های ژنی با عملکردهای ناشناخته بر روی القای مقاومت در سویه های باکتری *E. coli* در برابر ضدعفونی کننده‌ی هیپوکلریت سدیم دور از ذهن نمی‌باشد و امید است که در مطالعات آتی بر روی آن ها تحقیقات بیشتری انجام گردد. در نهایت می توان گفت که مقاومت فزاینده در باکتری‌ها به ضدعفونی‌کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها مخاطرات زیادی را در آینده برای صنعت پرورش طیور و همچنین بهداشت عمومی ایجاد خواهد نمود.

تقدیر و تشکر:

منابع مالی لازم برای انجام این مطالعه توسط دانشگاه شیراز تامین گردید.

منابع:

۱. صدرزاده، ا. (۱۳۸۷). *مدیریت و پیشگیری از بیماریهای طیور (جوجه‌های گوشتی)*. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی (گرمسار)، صفحات ۴۰ تا ۵۲.

2. Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, ***128*****:** *1037-1050.*
3. Amos, G.C., Ploumakis, S., Zhang, L., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., and Wellington, E.M. (2018). The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, ***12:*** *681.*
4. Bass, L., Liebert, C.A., Lee. M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G., and Maurer, J.J. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli* . *Antimicrobial agents and chemotherapy*. ***43:*** *2925-2929.*
5. Canal, N., Meneghetti, K.L., Almeida, C.P.D., Bastos, M.D.R., Otton, L.M., and Corção, G. (2016). Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant Escherichia coli isolated from surface water. *brazilian journal of microbiology*, ***47:*** *337-344.*
6. Fucuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontr ol Science*, ***11:*** *147-157.*
7. Gaze, W. H., Abdouslam, N., Hawkey, P. M., and Wellington, E. M. H. (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, ***49:*** *1802-1807.*
8. Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., and White, D.G. (2001). Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, ***45:*** *723-726.*
9. Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, Ch.H., Moon, D.Ch., Lee, W.K., Lee, Y.Ch., Seol, S.Y., Cho, D.T., Lee, J.Ch., Characterization of antimicrobial resistance

www.SID.ir

Archive of SID

*Microbiology, **9**: 28-32.*

18. Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., and Mabilat, C. (1995). Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microbial Drug Resistance, **1**: 195-202.*
19. Sambrook, J., Russel D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. NY: Cold Spring Harbor: 1. 44.
20. Smith, J., Drum, D., Dai, Y., Kim, J., Sanchez, S., Maurer, J., Hofacre, C., and Lee, M. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli strains colonizing broiler chickens. *Applied and environmental microbiology, **73**: 1404-14.*
21. Soufi, L., Abbassi, MS., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., and Ben Hassen, A. (2009). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease, **6**: 1067-1073.*
22. Stokes, Ht., and Hall, RM. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology, **3**:1669-1683.*
23. Su, J., Shi, L., Yang, L., Xiao, Z., Li, X., and Yamasaki, S. (2006). Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiology Letters, **254**: 75-80.*
24. Yang, H., Chen, Sh., White, D. G., Zhao, Sh., McDermott, P., Walker, R., Meng. J., (2004) Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant Escherichia coli Isolates from Diseased Chickens and Swine in China, *Journal of Clinical Microbiology, **42**: 3483-3489;DOI: 10.1128/JCM.42.8.3483-3489.2004.*

and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,**55**:639644 https://doi.org/10.1093/jac/dki076*
10. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K,. and Tamura, Y. (2003). A national surveillance of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from food-producing animals in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **51**: 447-451.*
11. Liamthong, S. (2008). Prevalence of Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance Patterns in Bacteria of Swine and Chicken in the US and Thailand. Doctoral Dissertation, University of Tennessee. USA.
12. Maharjan, P., Clark, T., Kuenzel, C., Foy, M.K., and Watkins, S. (2016). On farm monitoring of the impact of water system sanitation on microbial levels in broiler house water supplies. *The Journal of Applied Poultry Research, **25**: 266-271.*
13. Mokady, D., Gophna, U., and Ron, E.Z. (2005). Virulence factors of septicemic Escherichia coli strains. *International Journal of Medical Microbiology, **295**: 455-462.*
14. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T., and Logue, C.M. (2013). Diseases of Poultry, Coli bacillosis, 13th edition.751-805.
15. Oliveira-Pinto, C., Diamantino, C., Oliveira, P.L., Reis, M.P., Costa, P.S., Paiva, M.C., Nascimento, A.M. (2017). Occurrence and characterization of class 1 integrons in Escherichia coli from healthy individuals and those with urinary infection. *Journal of medical microbiology, **66**: 577-583.*
16. Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., & Carter, G. R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London WC1H9LB, England: 209-236.
17. Ron, E.Z. (2006). Host specificity of septicemic Escherichia coli : human and avian pathogens. *Current Opinion in*

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

A study on the abundance and the role of integron class 1 of Escherichia coli isolated from poultry in the induction of bacterial resistance to sodium hypochlorite

Farzad Hossainzadeh[1], Hasan Sharifiyazdi[2], Mehran Ghaemi*[3], Bahman Abdi Hachesoo[4]

1) DVM, School of Veterinary Medicine, Shiraz University

2) Professor, Department of clinical sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University

3) Assistant professor, Department of pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University

4) Assistant professor, Department of clinical sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University

Received: 30 October 2019 *Accepted: 19 February 2020*

Abstract:

The regular use of disinfectants in broiler farms is one of the main bases of the biosecurity. Disinfectants destroy the different disease agents that remained from the last breeding season. Hypochlorite is one of the most suitable disinfectants used in the poultry industry. Nowadays, resistant pathogens to disinfectants and antibiotics are growing worldwide, becoming a serious concern in the public health. Resistance factors are coded by different genes that are commonly present in the different gene cassettes like Integron1 that distribute resistance genes among bacteria. In the previous studies, the relationship between Integron1 and multidrug resistance genes also quaternary ammonium compounds (QACs) resistance genes was clarified. Still, there is no study on the relationship of Integron1 and other disinfectants like Sodium hypochlorite resistance genes. Escherichia coli (E. coli) is one of the most important pathogens of poultry industry. In the present study, 100 isolates of E. coli from the cloak of healthy broilers and from pericarditis cases were studied. Presence of Integron1 gene cassette and orfF gene by Multiplex PCR was detected. Also, the amount of resistance to the Sodium hypochlorite by MIC method was measured. The results showed that there are no significant relationships between the Presence of Integron1 gene cassette and the resistance of the Sodium hypochlorite disinfectant ($P<0.05$). This result indicates that the genetic reserve and translocation of the resistance gene of Sodium hypochlorite are not related to the Integron1 gene cassette, which shows the need for more studies.

Keywords: Escherichia coli, integron class1, disinfectant, sodium hypochlorite, orfF

**Corresponding author: Mehran Ghaemi*

Address: Biotechnology division, Department of pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University.

Tel: +987136138654

E. mail: m.ghaemi@shirazu.ac.ir

www.SID.ir