DOI: 10.22092/vj.2019.124829.1548
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی مولکولی وجود ژن اینتگرون کلاس یک و مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های باکتری اشریشیا کلی بیماری‌زای طیور

• رضا اسمعیل زاده دیزجی
دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
• محمد جهانتیغ (نویسنده مسئول)
دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
• احمد راشکی
دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۰-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۳-۱۹
Email: mjahantig@yahoo.com

FINAL

چکیده

اینتگرون‌ها از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی هستند که توانایی حمل ژن‌های مربوط مقاومت به ترکیبات ضدباکتریایی در باکتری‌های مختلف مانند اشریشیا کلی را دارند. در سال‌های اخیر تعیین الگوی حساسیت دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا به منظور درمان موثرتر بیماری‌ها، اهمیت شایانی پیدا کرده است. هدف از این تحقیق بررسی حضور و فراوانی ژن اینتگرون کلاس یک در اشریشیا کلی جداسازی شده از ضایعات کلی‌باسیلوز طیور و مطالعه الگوی مقاومت دارویی این باکتری‌ها می‌باشد. بدین منظور تعداد ۱۰۰ نمونه اشریشیا کلی از ضایعات بافتی جوجه‌های گوشتی مشکوک به عفونت کلی‌باسیلوز، از طریق روش کشت میکروبی جداسازی و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. برای بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باکتری، از روش دیسک دیفیوژن با هفت دیسک آنتی‌بیوتیکی و طبق دستورالعمل CLSI استفاده گردید. ژنوم باکتری‌ها با روش جوشانیدن استخراج گردید و نمونه‌های DNA به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای حضور ژن اینتگرون کلاس یک مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ درصد)، تتراسیکلین (۹۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۹۱ درصد)، نورفلوکساین (۸۸ درصد)، لینکوسپکتین (۵۳ درصد)، سفروکسیم (۵۰ درصد) و جنتامایسین (۱۷ درصد) مشاهده گردید. بعلاوه، ۹۷ درصد باکتری‌های اشریشیا کلی جداسازی شده، حامل ژن اینتگرون کلاس یک بودند. بر اساس یافته‌های این تحقیق، میزان بالایی از شیوع ژن اینتگرون و مقاومت به ترکیبات ضدباکتریایی در بین سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی در طیور منطقه مورد مطالعه وجود دارد.

کلمات کلیدی: جوجه‌های گوشتی، مقاومت دارویی، اشریشیا کلی، ژن‌های اینتگرون، شیوع

● Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 68-74

The molecular survey of *intI* gene and antibacterial resistant in avian pathogenic *Escherichia coli*

By: Esmaeelzadeh Dizaji. R., Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran. Jahantigh. M., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran. and Rashki. A., Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Received: 2019-01-05 **Accepted: 2019-06-09**

Emali: mjahantig@yahoo.com

Integrons are mobile genetic factors that are able to carry resistance gene in some bacteria like *Escherichia coli*. Drug resistance study in pathogenic bacteria is important. The aim of this study was to investigate the prevalence of integron class 1 and antibiotic susceptibility pattern in *Escherichia coli* strains isolated from broilers with colibacillosis infection. A total of 100 Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) were isolated from the lesions of the birds suspected to colibacillosis by sampling aseptically from internal organs. All isolates of *Escherichia coli* were confirmed by biochemical tests. To evaluate antimicrobial resistance, the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar was used in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines by using of seven antibacterial paper discs. The DNA of these isolates was extracted by a boiling method and was screened for the presence of class 1 integron gene by conventional polymerase chain reaction (PCR). Antimicrobial resistance test showed resistance to nalidixic acid (100%), tetracycline (96%), ciprofloxacin (91%), norfloxacin (88%), lincospectin (53%), cefuroxime (50%) and gentamicin (17%). Furthermore, 97% of the isolates contained integron class 1. According to the results of this study, there is high prevalence of integron gene in *Escherichia coli* isolated from colibacillosis lesions. Besides, high prevalence of drug resistance was observed among the isolated pathogenic *Escherichia coli*.

FINAL

Key words: Broiler chickens, Drug resistance, *Escherichia coli*, Integron genes, Prevalence

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی می‌باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری‌های پاتوژنیک استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱۳). اشریشیا کلی بیماریزای طیور (Avian pathogenic *Escherichia coli* APEC) می‌تواند باعث عفونت‌های مختلف در طیور گردد که بطور کلی به عفونت‌ها یا بیماری‌های حاصل از این باکتری در طیور کلی‌باسیلوز گفته می‌شود. کلی‌باسیلوز باعث تلفات، حذف کشتارگاهی لاشه‌های مبتلا و ضررهای اقتصادی در صنعت طیور می‌گردد (۱۱, ۱۶). باکتری اشریشیا کلی بیماری‌زا می‌تواند عفونت سیستمیک ایجاد کند که با سپتی‌سمی و ضایعات در ارگان‌های مختلف شامل: پری-کاردیت، تورم کیسه‌های هوایی، پری‌هپاتیت و پری‌تونیت همراه است (۱۸). به‌دلیل استفاده‌های زیاد و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها امروزه مقاومت به ترکیبات ضدباکتریایی به‌ویژه در اشریشیا کلی یک پدیده معمول می‌باشد (۹, ۱۰, ۲۱, ۲۳, ۲۴). در سال‌های اخیر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یکی از نگرانی‌ها در بهداشت عمومی مطرح است.

محققین زیادی براین نکته تاکید دارند که فشار انتخابی در استفاده از ترکیبات ضدباکتریایی در انسان و حیوانات ممکن است مقاومت در باکتری‌ها من‌جمله اشریشیا کلی را افزایش دهد (۷, ۱۰, ۱۴). اینتگرون‌ها از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی هستند که می‌توانند ژن‌های مقاومت به ترکیبات ضدباکتریایی را حمل کنند و با محل‌های خاصی از ژنوم ترکیب شوند (۳, ۴). تاکنون 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 و سپس کلاس ۲ همراه هستند (۲۰). از آنجائی‌که بروز همزمان مقاومت به چند دارو در باکتری‌ها با اینتگرون‌ها در ارتباط است (۸) و همچنین بسیاری از اینتگرون‌ها دارای بیش از یک کاست ژنی مقاومتی هستند که اغلب توسط عناصر ژنتیکی متحرک حمل و جابه‌جا می‌شوند، این امر به انتشار گسترده عوامل مقاومت از یک سویه به سویه دیگر منجر می‌شود. لذا، شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۲۵). تاکنون، مطالعات زیادی در مورد رابطه

بین شیوع اینتگرون‌ها و مقاومت‌های دارویی چندگانه (Multidrug resistance) یا مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک در سویه‌های اشریشیا کلی صورت گرفته است (۱, ۵). بر اساس مطالعات کهن‌سال (۲۰۱۸) مقاومت چندگانه دارویی و کلاس یک اینتگرون در اشریشیا کلی جدا شده از موارد اسهال گوساله رایج است (۱۳). مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از موارد طیور و دام به‌وسیله استاجی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است. براساس گزارش استاجی و همکارن (۲۰۱۸) مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در اشریشیا کلی جداسازی شده از نمونه‌های دامی بیشتر از موارد طیور بوده است. بعلاوه، در بین ژن‌های مقاومت بیشترین شیوع مربوط به اینتگرون کلاس یک می‌باشد (۲۲). با توجه به اینکه در خصوص ژن‌های مقاومت اینتگرون در APEC یا اشریشیا کلی جداسازی شده از موارد کلی‌باسیلوز طیور در ایران گزارشی دیده نشده و ارتباط آن‌ها با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص نشده است، لذا این مطالعه به منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و شیوع ژن اینتگرون کلاس یک در APEC طراحی گردید. در تحقیق حاضر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اشریشیا کلی بیماریزای طیور با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی که برای درمان عفونت‌های طیور استفاده می‌شوند تعیین گردید و سپس با استفاده از روش PCR معمولی، ژنوم این باکتری‌ها برای حضور ژن اینتگرون کلاس یک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

نمونه گیری از هشت گله‌ی صنعتی طیور گوشتی مبتلا به عفونت‌های کلی‌باسیلوز با سن هفت تا ۴۲ روزگی در منطقه زابل، استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت. بدین منظور از تعداد ۱۴۴ قطعه جوجه گوشتی مشکوک به عفونت کلی‌باسیلوز پس از کالبدگشایی، نمونه‌گیری بعمل آمد. جوجه‌های مشکوک دارای علائم بالینی بیماری از جمله بی‌حالی، سینوزیت، ترشحات بینی و چشم، التهاب بند ناف بودند. جوجه‌ها در کالبدگشایی نیز دارای ضایعات پری‌هپاتیت، پری‌کاردیت، عفونت کیسه‌های هوایی و پری‌تونیت بودند. برای نمونه‌گیری از هر جوجه یک نمونه سوآب از ضایعات اندام‌های داخلی تهیه و سوآب در پنج میلی‌لیتر محیط کشت TSB (Tryptic soy broth) قرار گرفت و سپس محیط‌های کشت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری

محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه گردید و سپس با استفاده از لوپ بر روی محیط‌های کشت آگار مک‌کانکی یا آگار ائوزین متیلن بلو EMB (Eosin methylene blue agar) کشت گردید و کلنی‌های باکتری به کمک تعدادی از واکنش‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت. بطور خلاصه، باکتری‌های تخمیر کننده قند لاکتوز در محیط‌های کشت آگار مک‌کانکی و EMB، که دارای واکنش اسید/اسید در محیط TSI (Triple sugar iron agar)، اکسیداز منفی، ایندول مثبت، H2S منفی، اوره‌آز منفی و سیترات منفی بودند به‌عنوان اشریشیا کلی شناسایی و جداسازی گردید. در مجموع ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلی (هر نمونه باکتری از یک جوجه) جداسازی و بر اساس روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شناسایی شدند که در نهایت برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها

به‌منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های اشریشیا کلی از روش دیسک دیفیوژن بر روی آگار مولرهینتون با هفت دیسک آنتی‌بیوتیکی شامل: سیپروفلوکساسین (۳ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، نورفلوکساسین (۱۰ µg)، لینکوسپکتین (15/200µg) و سفروکسیم (۳۰ gµ) استفاده گردید. تمام دیسک‌های ضدباکتریایی از شرکت پادتن طب، تهران، ایران تهیه گردید. بدین منظور، ابتدا کلونی‌های خالص اشریشیا کلی جداسازی شده در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی حل گردید تا کدورت آن برابر کدورت لوله استاندارد نیم مک‌فارلند شود. نمونه باکتری از این لوله بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار تلقیح گردید و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فواصل معین 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 قرائت و نتیجه براساس دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تفسیر گردید. نتایج حساسیت به ترکیبات آنتی‌باکتریال تعیین و به‌صورت درصد از نمونه‌های اشریشیا کلی محاسبه و گزارش گردید.

استخراج ژنوم باکتری

برای استخراج DNA، ابتدا باکتری اشریشیا کلی در پنج میلی‌لیتر محیط Luria Bertani broth (LB) در لوله‌های آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد و سپس به مدت پنج دقیقه در ۳۶۰۰g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی (supernatant) را دور ریخته و قسمت رسوب شده (pellet) در ۲۰۰ µl آب دوبار تقطیر حل گردید و در دستگاه Thermomixer در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در نهایت این محلول در ۱۵۰۰۰g برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جداسازی و به‌عنوان DNA در میکروتیوب‌های ۲۰۰ µl در دمای ۲۰- تا زمان استفاده نگهداری گردید.

واکنش PCR و تکثیر ژن اینتگرون کلاس یک

برای تکثیر ژن اینتگرون کلاس یک (*intI*) از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی (Conventional PCR) استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده برای واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است. به‌منظور بررسی ژن اینتگرون کلاس ۱ از توالی‌های تایید شده در مطالعات قبلی استفاده شد (۱۵). پرایمرها پس از بررسی منابع معتبر موجود و تطابق توالی نوکلئوتیدی (BLAST) انتخاب گردید. در واکنش PCR به‌علت امکان وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعدد در داخل اینتگرون با باندهای هدف با وزن‌های متفاوت، نمونه کنترل مثبت مورد استفاده قرار نگرفت.

FINAL

برنامه‌ی کامل استفاده شده در واکنش PCR در جدول ۲ توضیح داده شده است. تمام پرایمرها و محلول‌ها از شرکت پیشگام، تهران، ایران تهیه گردید. واکنش PCR در حجم ۱۵ µl شامل ۲ µl از محلول DNA باکتری، ۸ µl از محلول مسترمیکس، ۱ µl از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس و ۳ µl از آب مقطر تقطیر شده استفاده گردید. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت و ۲۲۰ میلی‌آمپر در مدت ۶۰ دقیقه انجام گردید.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری

در کل از مجموع ۱۴۴ جوجه کالبدگشایی شده تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی مثبت باکتری اشریشیا کلی با اسفاده از روش کشت میکروبی جداسازی و از طریق آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی و تایید گردید.

الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها

نتایج تعیین مقاومت به ترکیبات آنتی‌باکتریال نمونه‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از ضایعات کلی‌باسیلوز در نمودار ۱ نشان داده شده است. فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده شامل: نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ درصد)، تتراسیکلین (۹۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۹۱ درصد)، نورفلوکساین (۸۸ درصد)، لینکوسپکتین (۵۳ درصد)، سفروکسیم (۵۰ درصد) و جنتامایسین (۱۷ درصد) بود. همان‌طوری‌که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود بیشترین مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به جنتامایسین (۱۷ درصد) می‌باشد.

واکنش *PCR* وتکثیر ژن اینتگرون کلاس یک

نتایج آزمایش PCR برای تکثیر ژن اینتگرون کلاس یک نشان داد که ۹۷ درصد باکتری‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از ضایعات کلی‌باسیلوز طیور حامل ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند. وزن باندهای اینتگرون نیز در محدوده‌های ۲۸۰ الی ۲۶۰۰ جفت باز مشاهده گردید (شکل ۱).

بحث

مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که مصرف انتخابی آنتی‌بیوتیک می‌تواند موجب افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در باکتری‌های انسانی و حیوانی مانند باکتری اشریشیا کلی شود. بدین منظور یافتن راهکارهایی برای جلوگیری از گسترش مقاومت به این داروها ضروری است. یکی از عوامل انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها، اینتگرون‌ها هستند که بصورت قطعات ژنتیکی متحرکی با قرار گیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانسپوزون‌ها، ژن‌های مسئول مقاومت دارویی را در خود حمل و جابه‌جا می‌کنند. انتقال افقی اینتگرون‌ها به‌عنوان موفق‌ترین

FINAL

جدول ۱-توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن *intI*.

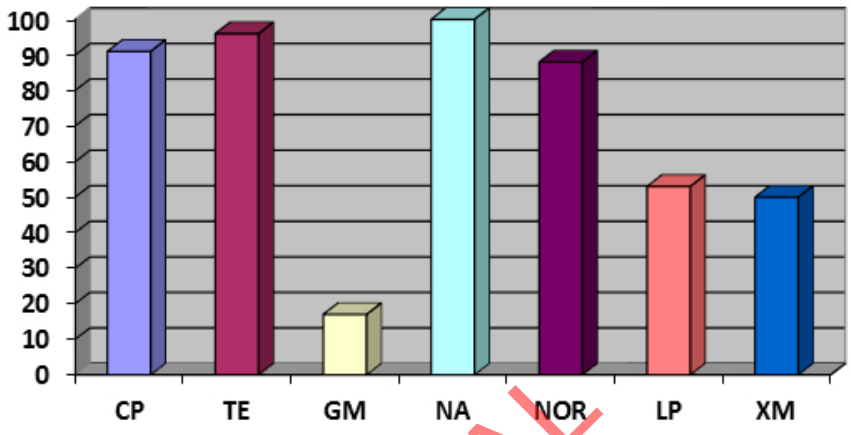
ژن هدف	توالی پرایمر	وزن باند	نام پرایمر	رفرانس
intI	5'- GGCATCCAAGCAGCAAG-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	متغیر	*intI*–F *intI*–R	(۱۵)

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

راه انتشار ژن‌های مسئول مقاومت و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه دارویی مطرح می‌باشد. انتقال افقی یا جانبی فرآیندی است که مواد ژنتیکی در بسته‌های کوچک DNA می‌توانند بین باکتری‌های منفرد در گونه یا حتی گونه‌های متفاوت انتقال یابد. از بین ۹ کلاس شناسایی شده از اینتگرون‌ها، اینتگرون کلاس ۱ و ۲ به ترتیب شایع‌ترین کلاس اینتگرون‌ها هستند (۲).

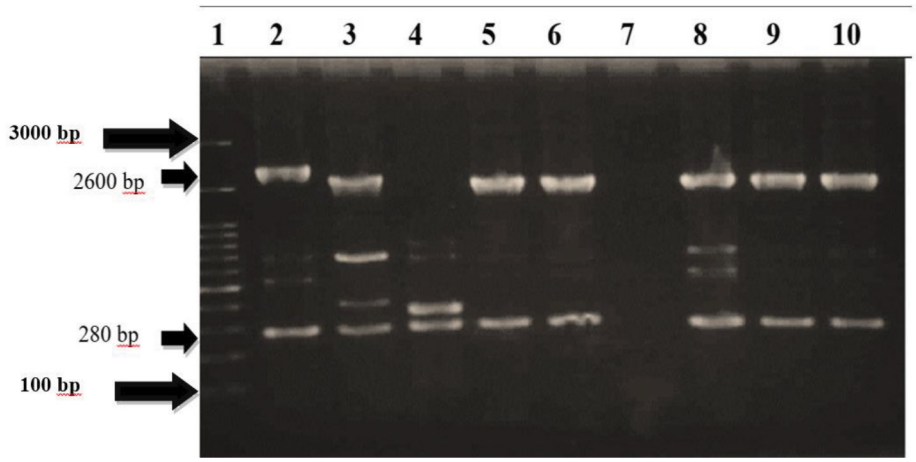
در این مطالعه از ۱۴۴ جوجه گوشتی مشکوک به عفونت کلی‌باسیلوز پس از کالبدگشایی نمونه‌گیری گردید و در مجموع ۱۰۰ نمونه مثبت از باکتری اشریشیا کلی شناسایی گردید. براساس نتایج تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ درصد)، تتراسیکلین (۹۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۹۱ درصد)، نورفلوکساین (۸۸ درصد)، لینکوسپکتین (۵۳ درصد)، سفروکسیم (۵۰) و جنتامایسین (۱۷ درصد) مشاهده گردید. در این مطالعه، میزان شیوع ژن اینتگرون کلاس یک ۹۷ درصد مشاهده گردید. میزان شیوع ژن اینتگرون در این



نمودار ۱-میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در باکتری‌های اشریشیا کلی جداسازی شده از ضایعات کلی‌باسیلوز طیور.

سیپروفلوکساسین (CP)، تتراسیکلین (TE)، جنتامایسین (GM)، نالیدیکسیک اسید (NA)، نورفلوکساین (NOR)، لینکوسپکتین (LP) و سفروکسیم (XM).

FINAL



شکل ۱-نتایج PCR معمولی برای تشخیص اینتگرون کلاس ۱ در سویه های اشریشیا کلی.

ستون ۱ مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز، ستون¬های ۲-۶ و ۸-۱۰ دارای اینتگرون کلاس ۱ بوده و ستون ۷ از نظر وجود اینتگرون کلاس ۱ منفی است.

تحقیق نسبت به سایر تحقیقات انجام شده بصورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر است، که این اختلاف می‌تواند به وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیاد در باکتری‌های جدا شده از مرغداری‌های منطقه مورد بررسی اشاره کند که احتمالاً به دلیل استفاده زیاد و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های طیور باشد. کهن‌سال (۲۰۱۸) میزان مقاومت در اشریشیا کلی بیماریزا را برای کوتریموکسازول (۱۰۰ درصد) و برای تتراسیکلین (۹۱/۵) درصد گزارش نمود که با نتایج تحقیق حاضر در مورد مقاومت اشریشیا کلی به ترکیبات ضدباکتریایی هم‌خوانی دارد (۱۳). کهن‌سال (۲۰۱۸) میزان شیوع اینتگرون کلاس یک را ۴۸/۷۵ درصد گزارش نمود که کمتر از نتایج این تحقیق می‌باشد (۱۳). استاجی و همکاران (۲۰۱۸) میزان مقاومت سویه‌های اشریشیا کلی را به حداقل یک ترکیب ضدباکتریایی ۷۶ درصد گزارش نمودند. آنها میزان مقاومت به ترکیبات ضد باکتریایی در سویه‌های جداسازی شده از گوساله را ۷۷/۱۴ درصد و در سویه‌های جداسازی شده از طیور را ۲۲/۸۶ درصد گزارش کردند (۲۲). همچنین، استاجی و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که ۲۴ درصد سویه‌های اشریشیا کلی فاقد ژن مقاومت هستند و بیشترین شیوع مربوط به اینتگرون کلاس یک است. براساس یافته‌های آنها، حداقل یک ژن اینتگرون در ۲۳ سویه از ۶۳ نمونه اشریشیا کلی وجود داشت (۲۲).

کاویچیو و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که مقدار ۴۹/۸ درصد از تعداد ۲۹۹ نمونه اشریشیا کلی بیماری‌زای طیور (APEC) حامل اینتگرون کلاس ۱ بودند (۵). همچنین احمد و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقات خود مشاهده کردند که میزان ۴۶/۶ درصد از اشریشیا کلی بیماریزا (۳۴ از ۷۳ ایزوله) دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۱). در تحقیق دیگری که توسط نوگرادی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مجارستان انجام گرفت، از ۲۷ نمونه APEC جدا شده از طیور، میزان ۴۱ درصد از نمونه‌ها دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۱۷). همچنین رو و همکاران (۲۰۰۳) شیوع اینتگرون کلاس ۱ را در باکتری‌های جدا شده از لاشه‌های فارمی ۷۵ درصد گزارش کردند (۱۹). لازم به ذکر است که در تمامی گزارشات فوق باندهای هدف برای ژن‌های اینتگرون متغیر و دارای اندازه‌های مختلف بوده‌اند که مطابق با متغیر بودن باندهای ژن اینتگرون در این تحقیق است.

دوستی ایرانی و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای بر روی سالمونلاهای جدا شده از طیور گوشتی، شیوع اینتگرون‌های کلاس ۱ را ۵۰ درصد (با باند هدف ژن اینتگراز ۱ به اندازه ۴۸۳ bp) گزارش کردند (۶). کارگر و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه بر روی ۶۹ باکتری اشریشیا کلی دارای مقاومت چندگانه جدا شده از اسهال انسانی، شیوع اینتگرون کلاس ۱ را ۷۸ درصد (با باند هدف ژن اینتگراز ۱ به اندازه ۴۸۳ bp) گزارش کردند (۱۲). ژن‌های اینتگراز ۱ و ۲ قطعات ثابتی در اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ می‌باشند که از این ژن‌ها که اندازه‌ی ثابتی دارند برای تشخیص اینتگرون استفاده می‌شود.

در این مطالعه از پرایمرهای ژن اینتگرون کلاس یک استفاده گردید و از آنجایی که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعددی می‌تواند در داخل اینتگرون قرار گیرند بنابراین وزن باندهای اینتگرون متغیر هستند. همچنین، در این تحقیق وزن باندها نیز در دامنه ۲۸۰ الی ۲۶۰۰ جفت باز مشاهده گردید. رو و همکاران (۲۰۰۳) نیز وزن باندهای اینتگرون کلاس ۱ را در محدوده ۶۸۰ الی ۲۰۰۰ جفت باز، گزارش نمودند (۱۹) که نزدیک به وزن باندهای ژن اینتگرون در این تحقیق می‌باشد. در هر صورت، اختلاف وزن باندهای این تحقیق و تحقیقات رو و همکاران (۲۰۰۳) می‌تواند بیانگر این باشد که در اینتگرون باکتری‌های اشریشیا کلی جدا شده از منطقه‌ی مورد مطالعه، توالی‌های ژنی متفاوتی وجود دارد که احتمالاً حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری نیز هستند.

نتیجه‌گیری کلی

نه کلاس از ژن‌های اینتگرون‌ها وجود دارد و میزان شیوع آنها در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ در منطقه مورد مطالعه، به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از سایر گزارشات است. همچنین با توجه به میزان بالای مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشاهده شده به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمایش‌های تعیین حساسیت آنتی-بیوتیکی، نسبت به نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین، و نیز محدوده‌های بیشتر اندازه ژن اینتگرون کلاس یک، به نظر می‌رسد تعداد بیشتری ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اینتگرون وجود داشته باشد. پیامد شیوع بالای اینتگرون‌ها مطمئنا ایجاد و گسترش هرچه سریع‌تر گونه‌های مقاوم به درمان باشد و روز به روز، درمان بیماری‌های طیور و حتی بیماری-های انسانی با مشکلات بیشتری مواجه شود. بنابراین برای جلوگیری از این مهم، توصیه می‌شود که از استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها خودداری، و درمان فقط براساس نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از همکاری کارشناسان آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و ژنتیک مولکولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر نمایند. شماره گرنت: UOZ-GR-9618-56.

منابع مورد استفاده

1. Ahmed, A.M., T. Shimamoto and T. Shimamoto. 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology* 303: 475-483.

2. Azap, O.K., H. Arsalan, K. Serefhanogu, S. Colakoglu, H. Erdogan, F. Timurkaynak and S.S. Senger. 2010. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clinical Microbiology and infection* 16: 147-151.

3. Barlow, R.S. and K.S. Gobius. 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial chemotherapy* 58: 1133-1138.

4. Bissonnette, L. and P.H. Roy. 1992. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 174: 1248-1257.

FINAL

5. Cavicchio, L., G. Dotto, M. Giacomelli, D. Giovanardi, G. Grilli, M.P. Franciosini, A. Trocino and A. Piccirillo. 2015. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy. *Poultry Science* 94: 1202-1208.

6. Doosti Irani, M., M. Faghani and N. Zia-Jahromi. 2016. Study of class 1 and 2 integrons and antimicrobial resistance in Salmonella isolated from broiler chicks in Chaharmahal va Bakhtiari province. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 10: 38-44.

7. Hammerum, A.M. and O.E. Heuer. 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases* 48: 916-921.

8. Harada, K. and T. Asai. 2010. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animal in Japan. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 10: 1-12.

9. Harisberger, M., S. Gobeli, R. Hoop, J. Dewulf, V. Perreten and G. Regula. 2011. Antimicrobial resistance in Swiss laying hens, prevalence and risk factors. *Zoonoses and Public Health* 58: 377-387.

10. Jahantigh, M. and R.E. Dizaji. 2015. Antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from chickens farms with colibacillosis infection. *Open Journal of Medical Microbiology* 5: 159-162.

11. Kaper, J.B., J.P. Nataro and H.L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2: 123-140.

12. Kargar, M., Z. Mohammadalipour, A. Doosti, S. Lorzadeh and A. Japoni-Nejad. 2014. High prevalence of class 1 to 3 integrons among multidrug-resistant diarrheagenic Escherichia coli in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives* 5: 193-198.

13. Kohansal, M. 2018. Isolation charactirization and molecular evaluation of genetic factors of antibiotic resistance in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research and Biological Products* 120: 10-19.

14. Landers, T.F., B. Cohen, T.E. Wittum and E.L. Larson. 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports* 127: 4-22.

15. Levesque, C., L. Piche, C. Larose and P.H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 185-191.

16. Lutful Kabir, S.M. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 89-114.

17. Nogrady, N., J. Paszti, H. Piko and B. Nagy. 2006. Class 1 integrons and their conjugal transfer with and without virulence-associated genes in extra-intestinal and intestinal *Escherichia coli* of poultry. *Avian pathology* 35: 349-356.

18. Oh, J.Y., M.S. Kang, J.M. Kim, B.K. An, E.A. Song, J.Y. Kim, E.G. Shin, M.J. Kim, J.H. Kwon and Y.K. Kwon. 2011. Characterization of *Escherichia coli* isolates from laying hens with colibacillosis on 2 commercial egg-producing farms in Korea. *Poultry Science* 90: 1948-1954.

19. Roe, M.T., J.A. Byrd, D.P. Smith and S.D. Pillai. 2003. Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *Journal of Food Protection* 66: 1426-1431.

20. Rowe-Magnus, D.A. and D. Mazel. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 115-125.

21. Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, F. Haesebrouck and P. Butaye. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1238-1243.

22. Staji, H., A. Tonelli, T. Zahraei Salehi, A. Mahdavi, E. Shahroozian, M. Salimi Bejestani, S. Mahdizade Mood, M. Keywanloo, M. Ahmadi Hamedani, H. Emadi Chashmi, I. Ashrafi Tamai and E. Atefi Tabar. 2018. Distribution of antibiotic resistance genes among the phylogroups of *Escherichia coli* in diarrheic calves and chickens affected by colibacillosis in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute* 73: 131-137.

23. van den Bogaard, A.E., N. London, C. Driessen and E.E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 763-771.

24. Vandemaele, F., M. Vereecken, J. Derijcke and B.M. Goddeeris. 2002. Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Veterinary Record* 151: 355-356.

25. White, P.A., C.H.J. Mciver and W. Rawlinson. 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and Cheomtherapy* 45: 2658-2661.

FINAL