

## مطالعه فراوانی و نقش اینتگرون کلاس ۱ /شریشیا کلی های جدا شده از طیور در القای مقاومت باکتری به ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم

فرزاد حسین‌زاده<sup>۱</sup>، حسن شریفی یزدی<sup>۲</sup>، مهران قائمی بافقی<sup>۳\*</sup>، بهمن عبدی هاچه سو<sup>۴</sup>

(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 ضدعفونی کننده‌های پر کاربرد در صنعت طیور کشور، هیپوکلریت سدیم می‌باشد. باکتری *شریشیا کلی* (*E. coli*) یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌هایی است که توسط این ضدعفونی کننده کنترل می‌شود. امروزه، از باکتری *E. coli* به عنوان باکتری مهمی در نگهداری و انتقال مقاومت‌های چندگانه‌ی دارویی و ضدعفونی کننده‌ها یاد می‌شود که می‌تواند 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 کلاس ۱ علاوه بر ژن‌های مقاومت به داروها و مواد ضدعفونی کننده ترکیبات چهارتایی آمونیوم (ژن‌های *qacE*)، توالی‌هایی با قالب خواندن باز (ORF)، شناسایی شده‌اند. تاکنون چندین ORF که ژن‌هایی با عملکرد ناشناخته هستند، در کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ شناسایی شده‌اند.

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

در این مطالعه فراوانی اینتگرون کلاس ۱، ۶۱ درصد به دست آمد. فراوانی حضور اینتگرون کلاس ۱ در میان جدایه‌های حاصل از نمونه‌های مدفوع و یا پریکارد تفاوت معناداری نداشتند. همچنین هیچ گونه ارتباط معنی داری بین فراوانی حضور اینتگرون کلاس ۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد ( $P > 0.05$ ). فراوانی ژن *orfF* نیز ۸ درصد بود که ارتباط آماری معنی داری با حضور اینتگرون کلاس ۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد ( $P > 0.05$ ).

علی‌رغم وجود فراوانی بسیار بالای اینتگرون کلاس ۱ در میان جدایه‌های مورد آزمایش، با توجه به عدم وجود ارتباط آماری بین اینتگرون کلاس ۱ و مقاومت به هیپوکلریت سدیم می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های مقاومت به این ضدعفونی کننده از طریق کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ منتقل نمی‌شوند و نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه درک مقاومت به این ضدعفونی کننده وجود دارد.

**کلمات کلیدی:** *شریشیا کلی*، اینتگرون کلاس ۱، 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

## مقدمه:

امروزه جنبه‌های مختلف امنیت زیستی، نقش مهمی در صنعت طیور دارند که استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها برای مقابله با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای طیور یکی از مهمترین جنبه‌های آن است. اگر ضدعفونی‌کننده‌ها در غلظت‌های مناسب مورد استفاده قرار گیرند، مقاومت میکروارگانیزم‌ها نسبت به آنها گسترده نخواهد بود اما با این وجود، نگرانی‌های زیادی در ارتباط با امکان ایجاد مقاومت علیه ضدعفونی‌کننده‌ها در میکروارگانیزم‌ها 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 می‌رود، هیپوکلریت سدیم است که در این مطالعه مقاومت به آن در باکتری‌های *E. coli* بررسی گردید.

هیپوکلریت سدیم از ترکیب هیپوکلریت ( $\text{ClO}^-$ ) با سدیم تری هیدراته ( $\text{Na}^+$ ) به صورت مایع تولید می‌شود که محلول رقیق شده آن به عنوان سفیدکننده مورد استفاده قرار می‌گیرد. قدرت هیپوکلریت سدیم در کشندگی اجرام بیماری‌زا به درصد کلر فعال آن، pH محلول و نیز دما بستگی دارد. افزایش درصد کلر فعال، کاهش pH و افزایش دما باعث افزایش اثر ضدعفونی‌کنندگی آن می‌شود. اسید هیپوکلریت یک اسید ضعیف است و pH محلول حاصل از آن به میزان یون  $\text{ClO}^-$  و  $\text{H}^+$  وابسته است. به طور کلی، HClO ترکیب فعال در عمل ضدعفونی به حساب می‌آید (۶). هیپوکلریت سدیم کاربردهای فراوانی در صنعت طیور دارد. از این ضدعفونی‌کننده برای ضد عفونی کردن مخازن آب، آب‌خوری‌ها و آب مصرفی مرغداری‌ها (۱۲)، کاهش بار میکروبی لاشه‌های کشتارگاهی طیور و همچنین

ضدعفونی کردن تاسیساتی مانند ماشین‌های جوجه‌کشی، گاری‌های مخصوص ستر و هچر و دیگر فضاها، مجاور هچر، به علاوه ضدعفونی کردن سطوح صاف سیمانی استفاده می‌شود (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 تازه‌ی هیپوکلریت سدیم استفاده گردد (۱).

از مهمترین میکروارگانیزم‌هایی که توسط این ضدعفونی‌کننده‌ها کنترل می‌شود *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 اشیشیا متعلق به خانواده‌ی اتروباکتریاسه، میله‌ای، گرم‌منفی، غیراسپورزا، چندشکلی و غیراسیدفست می‌باشد. بیشتر وارته‌های مربوط به این باکتری به علت داشتن تاژک پیرامونی، متحرک هستند. *E. coli* معمولاً در دستگاه گوارش انسان و حیوانات مختلف یافت شده و در طیور عامل ایجادکننده‌ی بیماری کلی باسیلوز است که شایع‌ترین بیماری باکتریایی در طیور بوده و یکی از خسارت‌بارترین عوامل بیماری‌زای طیور محسوب می‌شود. کلی باسیلوز در پرندگان به دو شکل موضعی و عمومی می‌تواند ایجاد شود (۱۴).

امروزه، از باکتری *E. coli* به عنوان باکتری شاخصی در نگهداری و انتقال مقاومت‌های چندگانه‌ی دارویی و ضدعفونی‌کننده‌ها یاد می‌شود که می‌تواند این مقاومت را به سایر باکتری‌ها نیز منتقل کند و باعث انتشار مقاومت در سایر باکتری‌ها گردد. بنابراین مقابله با آن، به مقابله با

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 باکتری های *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 باکتری های جداشده از باکتری های *E. coli* انسان انجام شد، با تعیین توالی اینتگرون های کلاس ۱، *orf* با عملکرد ناشناخته شناسائی گردید (۱۵). در مطالعه دیگری که توسط کنگ و همکاران بر روی اینتگرون های کلاس ۱ باکتری های *E. coli* انسان و حیوانات انجام گردید نیز ژن ناشناخته *orfF* ردیابی گردید (۹).

در مطالعه حاضر، وضعیت مقاومت نسبت به ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم در جدایه های *E. coli* طیور بررسی و ارتباط این مقاومت با حضور اینتگرون های 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 کاملاً ناشناخته مانده بود لذا کسب اطلاعات بیشتر درباره فراوانی این ژن ناشناخته و نیز ارتباط آن با کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱، 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 جایی که هیچ شاهدهی درباره عملکرد این ژن

مقاومت های باکتریایی در سایر باکتری ها نیز کمک می کند (۱۰). در حقیقت سویه های باکتری *E. coli* به عنوان منابع بالقوهی پلاسمیدها و ژن های کدکنندهی فاکتورهای حدت و همچنین مقاومت چندگانهی باکتریایی هستند (۱۳). مقاومت در برابر دارو و ضدعفونی کننده ها اغلب توسط کاست های ژنی بین باکتری ها منتقل می شوند. انواع کاست های ژنی حامل ژن های مقاومت دارویی، پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و اینتگرون ها هستند. گسترش باکتری های دارای این کاست های ژنی در سطح جهان باعث گسترش مقاومت ها و در پی آن ایجاد مشکل در نابودی میکروارگانیسم ها با استفاده از ضدعفونی کننده ها و نیز درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها و ایجاد معضلات جدی در مسالهی بهداشت عمومی می شود (۲).

اینتگرون ها از جمله قطعات ژنی مهمی هستند که از طریق پذیرش و بیان ژن های مقاومت در انتقال و بروز مقاومت در باکتری های مختلف نقش دارند. تاکنون، کاست ژنی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته، اینتگرون کلاس ۱ بوده و بیشترین ژن های مقاومت در برابر دارو و ضدعفونی کننده ها در این کاست ژنی شناسائی شده اند (۱۵). همه اینتگرون های کلاس ۱ دارای یک قسمت ثابت در انتهای ۵' (CS5-5) هستند که این قسمت شامل سه توالی به نام های ژن *int1*، پروموتور PC و جایگاه اتصال *att1* می باشد. برخی نیز بخش ثابتی در انتهای ۳' دارد که معمولاً ۲۳۸۴ جفت باز طول داشته و ۴ ژن رمزکننده را شامل می شود (۲۲).

در مطالعات گذشته، در کاست ژنی اینتگرون ۱ علاوه بر ژن های مقاومت به داروها و مواد ضدعفونی کننده، توالی هایی با قالب خواندن باز (ORF) که قادر به

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 فارم های 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 پریکارڈ قلب جوجه های گوشتی مبتلا به کلی باسیلوز بالینی جداسازی باکتری انجام شد. نمونه های مدفوع و پریکارڈ بر روی محیط جامد اتوزین 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 دستورالعمل های ارائه شده توسط موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI) صورت گرفت. به طور خلاصه، از روی محیط های مک کانکی یک کلنی برداشته و به لوله آزمایش استریل درب دار محتوی محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) انتقال داده شد و به مدت ۲ تا ۸ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  تا زمان مشاهده کدورتی منطبق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (معادل  $10^8$  CFU/mL) گرمخانه گذاری شد.

در این روش، تعداد نهایی باکتری در هر یک از چاهک های میکروپلت می بایست در حدود  $5 \times 10^5$  CFU/ml باشد. بدین منظور در ابتدا لوله حاوی باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند با اضافه کردن محیط مایع TSB به میزان ۱ به ۱۰۰ رقیق شد ( $1 \times 10^6$  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 میکروپلت تهیه شده و به همان میزان (۱۰۰ میکرولیتر) محیط کشت حاوی باکتری ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) به تمامی چاهک ها اضافه گردید تا تعداد نهایی  $5 \times 10^5$  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  $35^{\circ}\text{C}$  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 رقت های بالاتر از ۰/۷۵ درصد کلر فعال (رقت چهارم) به عنوان حد آستانه (cut off) مقاومت به هیپوکلریت سدیم 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  $\mu\text{l}$  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



(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 بین ۵۰°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°C، ۱۰ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس میکروتیوب های حاوی باکتری های جوشیده شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۵۰۰× سانتیفریور 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 پلیمرز (PCR) در فریزر ۲۰°C- نگهداری شدند.

### PCR:

با توجه به اینکه هدف ما بررسی وجود دو قطعه ی ژنی اینتگرون کلاس ۱ و *orfF* 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

جدول ۱) مشخصات پرایمرها:

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر	نام توالی هدف
۲۳	۵۶۵	5'-ACGAGCGCAAGGTTTCGGT-3'	اینتگرون کلاس ۱ (intI)
		5'-GAAAGGTCTGGTCATACATG-3'	
طراحی شده در این مطالعه	۱۶۷	5'-GCAGGTTTTTCAGTCTTTT-3'	<i>orfF</i>
		5'-CTTGACCGAAATGTTAGAA-3'	

### آنالیز آماری:

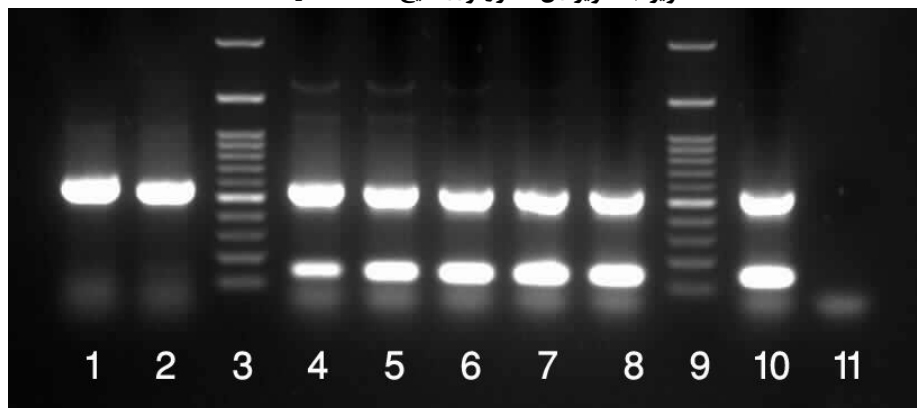
استفاده از آزمون آماری مربع کای محاسبه گردید. عدد P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج:

در این مطالعه، وجود کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ و نیز ژن *orfF* به روش Multiplex PCR تعیین گردید.

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (SPSS Version 22, SPSS Inc., USA) نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی حضور کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ 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

تصویر (۱) تصویر ژل الکتروفورز نتایج Multiplex PCR



چاهک های ۱ و ۲ حاوی نمونه های دارای اینتگرئون کلاس ۱ ولی فاقد *orfF* هستند. در چاهک ۳ و ۹ شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی مشاهده می شود. چاهک های ۴ تا ۸ نمونه های دارای هر دو توالی اینتگرئون کلاس ۱ 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 جدایه ها مقاوم و ۴۸ درصد در

گروه حساس به هیپوکلریت سدیم بودند. در گروه حساس، ۲۶/۱ درصد مربوط به نمونه های پریکارد و ۵۹/۷ درصد از نمونه های مدفوعی بود و اختلاف آماری معناداری بین منشا باکتری و مقاومت به هیپوکلریت سدیم در این مطالعه مشاهده گردید، به نحوی که میزان مقاومت به هیپوکلریت در جدایه های مدفوعی به طور معنی داری بیشتر از جدایه های پریکارد بود ( $P=0/008$ ).

جدول (۲) مقایسه فراوانی حضور مقاومت به ضد عفونی کننده های هیپوکلریت سدیم در جدایه های باکتریایی با منشا مختلف

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

\* حروف لاتین نامتشابه (a,b) نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در هر ردیف می باشد ( $P<0/05$ ).

معناداری نداشتند (جدول ۳). همچنین هیچگونه ارتباط معنی داری بین فراوانی حضور اینتگرئون کلاس ۱ و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم دیده نشد ( $P>0/05$ ).

همچنین در این مطالعه فراوانی اینتگرئون کلاس ۱، ۶۱ درصد به دست آمد. فراوانی حضور اینتگرئون در میان جدایه های حاصل از مدفوع و یا پریکارد تفاوت

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

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

\* حروف لاتین نامشابه (a,b) نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در هر ردیف می باشد ( $P < 0.05$ ).

اولین مطالعه ای است که به تعیین عملکرد احتمالی ژن *orfF* توجه دارد.

شناخت کمی در رابطه با مقاومت باکتری *E. coli* در برابر ضد عفونی کننده ها در دسترس می باشد. فقط مقاومت در برابر ترکیبات چهارتائی آمونیوم توصیف شده که این مقاومت توسط ژن های *qacE* موجود در اینتگرون کلاس ۱ رمز می شود (۵). در مطالعه آموس و همکاران (۲۰۱۸) در ۷۵ درصد باکتری های *E. coli* حاوی کاست ژنی اینتگرون ۱، 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 کلاس ۱ را نشان دادند (۷).

فراوانی کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است، در مطالعه حاضر میزان فراوانی کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ در باکتری های *E. coli* جدا شده از طیور ۶۱ درصد بوده است که اندکی بیشتر از نتایج سایر مطالعات در این زمینه بیشتر می باشد. به طور مثال در ۱۶۶ نمونه *E. coli* جدا شده از طیور گوشتی در کشور تونس، مشاهده شد که ۵۲ درصد جدایه ها، اینتگرون کلاس ۱ و ۲ در ژنوم خود داشته اند و این مطالعه به توانایی بالقوه *E. coli* به عنوان مخزنی برای انتشار اینتگرون ها و فاکتورهای

فراوانی ژن *orfF* در میان نمونه های مورد مطالعه، ۸ درصد بود، به نحوی که ۲ درصد موارد مثبت *orfF* مربوط به نمونه های پریکارد و ۶ درصد مربوط به نمونه های با منشا مدفوع بودند. فراوانی ژن *orfF* در میان جدایه های مدفوعی (۷/۸ درصد) کمتر از فراوانی موارد مثبت *orfF* در نمونه های پریکارد (۸/۷ درصد) بود اما از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). از طرف دیگر، ارتباط معنی داری بین حضور ژن *orfF* و القای مقاومت به هیپوکلریت سدیم در میان جدایه ها دیده نشد ( $P > 0.05$ ). همچنین اختلاف آماری معنی داری میان حضور ژن *orfF* و اینتگرون کلاس ۱ نیز مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ).

### بحث و نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر میزان فراوانی کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ و نیز ژن *orfF* در باکتری های *E. coli* جدا شده از طیور و همچنین وضعیت مقاومت به ضد عفونی کننده هیپوکلریت سدیم در آن ها اندازه گیری شد و ارتباط حضور این کاست ژنی با مقاومت به این ضد عفونی کننده بررسی گردید. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات مربوط به کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ در ارتباط با مقاومت به آنتی بیوتیک ها بوده است. مطالعه حاضر اولین تحقیقی است که به بررسی ارتباط کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ و ضد عفونی کننده هیپوکلریت سدیم می پردازد. همچنین

مقاومت به دارو تاکید دارد (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر روی باکتری‌های گرم منفی دستگاه گوارش نمونه‌های انسانی نشان داده شد که ۵۹ درصد آن‌ها حاوی اینتگرئون کلاس ۱ بودند (۱۸). گلدشتان و همکاران (۲۰۰۱) متوجه شدند که ۴۶ درصد باکتری‌های جدا شده از دام‌های اهلی و انسان حاوی اینتگرئون کلاس ۱ بوده‌اند (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* جدا شده، اینتگرئون کلاس ۱ داشتند که اکثر آنها دارای ژن مقاوم به تری‌متوپریم و استرپتومایسین بودند (۲۴). همچنین در مطالعه دیگری، اینتگرئون کلاس ۱ در باکتری‌های *E. coli* و *سالمونلای* جدا شده از طیور مورد بررسی گردید که از جدایه‌های ۳۸۲۴ مرغ گوشتی، تعداد ۱۷۳۲ باکتری دارای اینتگرئون کلاس ۱ بودند که نشان‌دهنده فراوانی ۴۵ درصدی این کاست ژنی می‌باشد (۱۱).

در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که این کاست ژنی، 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* جدا شده از ماکیان بیمار، مقاومت چندگانه‌ی دارویی را نشان دادند و سپس این جدایه‌ها از جهت داشتن اینتگرئون کلاس ۱ ارزیابی شدند. ۶۳ درصد از نمونه‌هایی که مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی داشتند، حاوی اینتگرئون کلاس ۱ نیز بودند (۴). اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر تجویز سه داروی اکسی‌تراسایکلین، سالافلوکساسین و انروفلوکساسین را بر روی توزیع مقاومت بر روی سویه‌های مختلف *E. coli*

جدا شده از فارم‌های جوجه‌های گوشتی بررسی کردند. شیوع بالای اینتگرئون کلاس ۱ در میان سویه‌ها مشاهده شد که اکثراً حاوی کاست مقاوم به استرپتومایسین بودند (۲۰).

از آن جایی که معمولاً این کاست ژنی همراه با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی‌کننده‌ها می‌باشد می‌توان انتظار داشت که سویه‌های مقاوم به دارو و مواد ضد عفونی‌کننده (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 دارویی در منطقه محل جداسازی باکتری‌ها را نشان می‌دهد 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 کاست ژنی بین باکتری‌های *E. coli* با میزان‌های مختلف نیز وجود دارد. اگر چه مطالعه حاضر بر روی طیور انجام شده است، از نتایج این مطالعه می‌توان انتظار داشت که باکتری‌های *E. coli* مقاوم به دارو و ضد عفونی‌کننده در افراد و دام‌های مختلف نیز وجود داشته باشد. در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *orfF* در باکتری‌های جدا شده از طیور ۸ درصد بوده است. از آن جایی که این مطالعه اولین مطالعه شیوع این ژن در جدایه‌های باکتریایی است، گزارشی درباره فراوانی آن در باکتری‌ها برای مقایسه وجود ندارد. حضور این ژن با حضور کاست ژنی اینتگرئون ۱ ارتباط آماری نداشت که نشان می‌دهد پراکندگی و انتشار آن مستقل از کاست ژنی



- Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, **128**: 1037-1050.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fucuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, **11**: 147-157.
- Gaze, W. H., Abdousslam, 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.
- 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.
- 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

اینتگرون ۱ می باشد. از طرف دیگر، از آن جایی که از نظر آماری حضور ژن *ofrF* و میزان مقاومت به ضدعفونی کننده های هیپوکلریت سدیم معنی دار نبود، می توان نتیجه گرفت که ژن *orfF* در ایجاد مقاومت به این ضدعفونی کننده نقشی ندارد و تعیین عملکرد این ژن، نیازمند انجام تحقیقات گسترده تر و بیشتر می باشد. میزان مقاومت به هیپوکلریت در جدایه های مدفوعی به طور معنی داری بیشتر از جدایه های پریکارد بود ( $P=0/008$ ) که علت این ارتباط آماری را می توان احتمالاً به ورود باکتری های *E. coli* مقاوم محیطی از طریق دهانی-مدفوعی به دستگاه گوارش طیور دانست. در مطالعه حاضر بین وجود کاست ژنی اینتگرون های کلاس ۱ و ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم ارتباط آماری وجود نداشت ولی تاثیر سایر کاست های ژنی شناخته شده و یا کاست های ژنی با عملکردهای ناشناخته بر روی القای مقاومت در سویه های باکتری *E. coli* در برابر ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم دور از ذهن نمی باشد و امید است که در مطالعات آتی بر روی آن ها تحقیقات بیشتری انجام گردد. در نهایت می توان گفت که مقاومت فزاینده در باکتری ها به ضدعفونی کننده ها و آنتی بیوتیک ها 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:

- صدرزاده، ا. (۱۳۸۷). مدیریت و پیشگیری از بیماریهای طیور (جوجه های گوشتی). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی (گرمسار)، صفحات ۴۰ تا ۵۲.

- 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, 13<sup>th</sup> 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*

## **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<sup>1</sup>, Hasan Sharifiyazdi<sup>2</sup>, Mehran Ghaemi\*<sup>3</sup>, Bahman Abdi Hachesoo<sup>4</sup>**

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