

ИНТЕГРОН-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ШТАММОВ *Escherichia coli*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ В ДВУХ ПРОВИНЦИЯХ ИРАНА

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.07
УДК 576.89:615.015.8:615.33[254]
Поступила 27.06.2018 г.



Reza Ranjbar, PhD, Professor, Head¹;
Hamed Moradi, MSc, Researcher²;
Naser Harzandi, PhD, Assistant Professor²;
Roohollah Kheiri, MSc, Researcher³;
Faham Khamesipour, DVM, MSc, MPH, PhD, Researcher⁴

¹Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

²Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran;

³Water Quality Control Office, Alborz Province Water and Wastewater Company, Karaj, Iran;

⁴Students Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Бактерия *Escherichia coli* (кишечная палочка) считается основным пищевым патогеном, широко распространенным среди людей и животных. Штаммы *E. coli* становятся все более устойчивыми к антибиотикам, частично благодаря генам, находящимся в составе интегронов.

Цель исследования — установить связь между наличием интегронов и резистентностью к антибиотикам у штаммов *E. coli*, выделенных у человека и животных в провинциях Альборз и Исфахан в Иране.

Материалы и методы. Собрано по 20 биологических образцов от крупного рогатого скота и овец в провинции Исфахан, а также от домашней птицы и людей — в провинции Альборз. Кишечную палочку выделяли с использованием стандартных биохимических и бактериологических методов. Чувствительность к антибиотикам определяли методом диффузии в агаре с использованием дисков по Кирби–Бауэру. Для амплификации генов классов 1 и 2 интегронов — *Int1* и *Int2* — использовали дуплексную полимеразную цепную реакцию.

Результаты. В общей сложности 33 из 80 изолятов (41,25%) содержали интегронные гены. Среди них у 25 изолятов (31,25%) обнаружены интегроны класса 1, у 8 изолятов (10,0%) — интегроны класса 2. Интегрон-положительные штаммы оказались резистентными более чем к 6 антибиотикам.

Заключение. Выявленное широкое распространение интегронов среди изолятов *E. coli*, выделенных в провинции Альборз, свидетельствует о необходимости проведения регулярного надзора и мониторинга устойчивости бактерий, выделенных у людей и животных в Иране, к противомикробным препаратам, включая молекулярный скрининг интегронов.

Ключевые слова: интегроны; устойчивость к антибиотикам; *Escherichia coli*.

Как цитировать: Reza Ranjbar, Hamed Moradi, Naser Harzandi, Roohollah Kheiri, Faham Khamesipour. Integron-associated antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources in two provinces of Iran. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 64–73, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.07>

English

Integron-Associated Antibiotic Resistance Patterns in *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Animal Sources in Two Provinces of Iran

Reza Ranjbar, PhD, Professor, Head¹;
Hamed Moradi, MSc, Researcher²;

Для контактов: Dr_Faham@yahoo.com; F.Khamesipour@iaushk.ac.ir

Naser Harzandi, PhD, Assistant Professor²;
Roohollah Kheiri, MSc, Researcher³;
Faham Khamesipour, DVM, MSc, MPH, PhD, Researcher⁴

¹Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

²Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran;

³Water Quality Control Office, Alborz Province Water and Wastewater Company, Karaj, Iran;

⁴Students Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Escherichia coli is recognized as a major food-borne pathogen of humans and animals world-wide. The strains of *E. coli* have become increasingly resistant to antibiotics, partly as a result of genes carried on integrons.

The aim of the study was to investigate the association between the existence of integrons and antibiotic resistance in *E. coli* strains isolated from human and animal sources in the Alborz and Isfahan provinces of Iran.

Materials and Methods. Twenty samples were collected from cattle and sheep at Isfahan province and poultry and humans at Alborz province. *E. coli* was isolated from these samples using standard biochemical and bacteriological techniques. Antibiotic resistance and sensitivity were determined using the Kirby–Bauer disk diffusion method. A duplex polymerase chain reaction was used to amplify the *Int1* and *Int2* genes of class 1 and 2 integrons.

Results. A total of 33 from 80 isolates (41.25%) contained integron-associated genes. Among these, 25 isolates (31.25%) harbored class 1 integrons; while 8 isolates (10.0%) contained class 2 integrons. Resistance to more than 6 antimicrobial agents was observed among the integron-positive strains.

Conclusion. Our findings showed that integrons were widely spread among *E. coli* isolated in the Alborz province. Thus, regular surveillance and monitoring of antimicrobial drug resistance in humans and animals in Iran should be performed and should include molecular screening for integrons.

Key words: integrons; antibiotic resistance; *Escherichia coli*.

Введение

Escherichia coli — это бактерия, которая существует как симбионт либо как патоген у человека и различных видов животных [1–5]. Известно, что именно этот микроорганизм является причиной частых ветеринарных, медицинских и социально-экономических проблем во многих странах мира [6–8]. В течение десятилетий неизбирательное, несанкционированное и неконтролируемое применение противомикробных препаратов для лекарственной терапии человека и животных привело к распространению генов лекарственной устойчивости у бактерий. Это послужило причиной развития резистентности к антибиотикам, что представляет серьезную угрозу здоровью людей и животных [8–9].

Лекарственная резистентность бактерий детерминруется главным образом генетическими компонентами, такими как плазмиды, транспозоны и интегроны. Некоторые авторы считают, что именно интегроны и конъюгативные плазмиды осуществляют перенос генов резистентности [9–12]. Интегроны — это генетические структуры, содержащие сайт-специфический механизм рекомбинации, позволяющий бактериям приобретать и экспрессировать кассеты генов, определяющих резистентность к антибиотикам [13–15]. Интегроны не обладают механизмом транспозиции, однако могут переноситься в сочетании с функциональными транспозонами и/или конъюгативными

плазмидами [13]. Кроме того, они содержат сайт-специфическую систему рекомбинации, способную захватывать и экспрессировать гены в форме кассет генов [16, 17]. Важнейшие компоненты интегронов класса 1 включают: а) 5'-консервативный сегмент (5'-CS), на котором находится ген интегразы (*intI*), который кодирует сайт-специфическую рекомбиназу; б) соседний сайт *attI*, который распознается интегразой и действует как рецептор для генных кассет; в) общую область (области) промотора, P_{ant}(P₁) и/или P_{ant}(P₂), из которых экспрессируются интегрированные кассеты генов [18, 19]. Консервативный сегмент 3'-CS, расположенный по ходу транскрипции ниже встроенных кассет генов, обычно содержит комбинацию из трех генов: *qacE1*, отвечающего за антибиотикорезистентность; *sull*, играющего роль в резистентности к сульфонидам; *orf5* — открытой рамки считывания, функция которой в настоящее время не ясна [20].

В ряде исследований показано, что существуют клональное распространение резистентных штаммов, перенос резистентных генов между бактериями, обитающими у людей и животных, и обмен филогенетическими и генотипическими характеристиками [21]. Экспоненциальное увеличение и распространение бактерий, резистентных к противомикробным препаратам, вызывает огромную озабоченность в связи с трудностями лечения таких инфекций.

Установлено, что в быстром распространении резистентных бактерий большую роль играют гены,

детерминирующие резистентность к антибиотикам, переносимые плазидами, транспозонами и интегронами [17, 22–24]. Показано широкое распространение интегронных среди клинических изолятов [25–28]. Следовательно, высокий уровень лекарственной устойчивости клинических изолятов может объясняться селективным давлением антибиотиков и широко распространенным присутствием интегронных.

Насколько нам известно, существует недостаток информации о наличии интегронных в изолятах *E. coli* и их участии в развитии лекарственной резистентности. Поэтому **целью настоящего исследования** было изучение связи между наличием интегронных и резистентностью к противомикробным препаратам у штаммов *E. coli*, выделенных от человека и животных в провинциях Альборз и Исфахан (Иран).

Материалы и методы

Место проведения исследования. Исследование проводили в двух городах: Карадж, расположенном в провинции Альборз, и Заваре, расположенном в провинции Исфахан. Население провинции Альборз — 2,4 млн. человек, провинции Исфахан — 1,6 млн. человек.

Настоящее исследование было одобрено Комитетом по этике филиала Исламского университета Азад (Карадж).

Всего было собрано 80 образцов фекалий: от крупного рогатого скота (n=20), овец (n=20), домашней птицы (n=20) и людей (n=20). Фекалии были взяты у внешне здоровых людей, образцы отправили в медицинскую лабораторию Амини (провинция Альборз). Фекальные образцы были собраны у кур, выведенных на частной ферме в городе Карадж, у крупного рогатого скота и овец, содержащихся в частном животноводческом хозяйстве в городе Заваре. Ни одно животное не пострадало во время сбора проб в этом исследовании.

Выделение *E. coli* из образцов. Образцы фекалий помещали в питательную среду LST (Merck, Германия), а затем — в среду ЕС (Merck) при 44,5°C, после чего высевали на агар EMB (Merck). Колонии с металлическим блеском — вероятные изоляты *E. coli* — были проверены методом IMViC для подтверждения [29].

Тест на чувствительность к антибиотикам. Фенотипическую устойчивость *E. coli* к антибиотикам измеряли методом диффузии в агаре по

Кирби–Бауэру с использованием коммерческих дисков. Диски Padtan-Teb (Иран) помещали на агаровые пластины Мюллера–Хинтона в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов. Использовали 11 дисков, содержащих следующие антибиотики: ампициллин (AM) 10 мкг, пиперациллин (PIP) 100 мкг, цефазолин (CZ) 30 мкг, стрептомицин (SM) 10 мкг, канамицин (K) 30 мкг, гентамицин (GM) 10 мкг, неомицин (N) 30 мкг, тобрамицин (TOB) 10 мкг, амикацин (AN) 30 мкг, налидиксовая кислота (NA) 30 мкг и сульфаметоксазол/триметоприм (SXT) 23,75/1,25 мкг. Для определения чувствительности к антибиотикам культуру *E. coli* гомогенизировали в стерильном солевом растворе (0,85% NaCl) и доводили до мутности в соответствии со стандартами МакФарланда 0,5 ед. Затем это равномерно наносили на агаровые пластины Мюллера–Хинтона. Пластины переворачивали, а затем инкубировали при 35°C в течение 18 ч. После этого измеряли диаметры зон ингибирования роста и сравнивали со стандартом, а также с *E. coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 в качестве положительного контроля. Изоляты с промежуточной лекарственной устойчивостью считались чувствительными, а изоляты, устойчивые к трем и более классам антибиотиков, считались мультирезистентными [30–32].

Аmplификация интегронных с помощью ПЦР

Экстракция ДНК. Две колонии каждого бактериального изолята помещали в пробирки, содержащие 100 мкл дистиллированной воды. Пробирки нагревали при 100°C в течение 10 мин, а затем осаждали клетки путем центрифугирования. Супернатант, содержащий ДНК, отбирали и хранили при –20°C [29].

Дуплексная реакция ПЦР для индикации изолятов *E. coli*. Все изоляты *E. coli* тестировали с помощью множественной ПЦР с применением ранее описанных условий и протоколов [33]. Для амплификации фрагментов 287 и 789 п.н. генов *int1* и *int2* были использованы два набора праймеров соответственно (табл. 1). Дуплексную реакцию ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР-буфер (10 mM Трис-HCl, 50 mM KCl и 1,5 mM MgCl₂, pH=8,7), dNTP (200 мкМ), каждый праймер (0,4 мкМ), ДНК-полимеразу Taq (1 ME) и матричную ДНК (2 мкл). Для проведения реакции использовали ДНК-термоциклер (CP2-003, Corbett, Австралия) и следующий режим: начальная денатурация при 94°C в течение 4 мин; 30 циклов денатурации при 94°C в течение 5 с; отжиг

Таблица 1

Два набора праймеров, использованных в реакции мультиплексной ПЦР

Ген	Прямой (5'→3') праймер	Обратный (5'→3') праймер	Размер, п.н.
<i>Int1</i>	TCTCGGGTAACATCAAGG	GTTCTTCTACGGCAAGGT	287
<i>Int2</i>	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	789

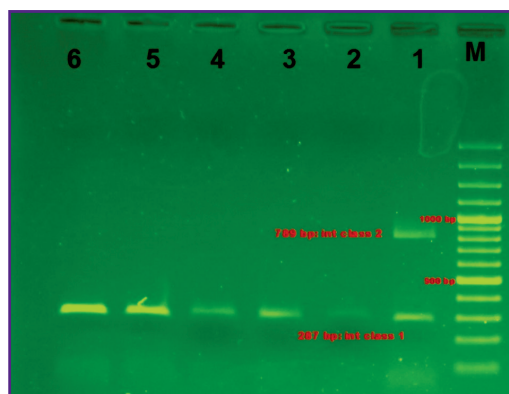
при 59°C в течение 10 с; удлинение при 72°C в течение 30 с и конечная стадия расширения в течение 5 мин при 72°C с последующим выдерживанием при 4°C. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле, содержащем бромид этидия, при напряжении 80 В в течение 1 ч.

Результаты

Гены интегров были обнаружены в 33 из 80 изолятов *E. coli* (41,25%). Среди них 25 изолятов (31,25%) содержали интегроны класса 1, включая штаммы, изолированные у овец (n=4), кур (n=12), коров (n=1) и людей (n=8). Восемь изолятов (10,0%) содержали комплексы класса 2, включая штаммы, полученные от овец (n=1), кур (n=6) и человека (n=1) (см. рисунок). Большинство штаммов *E. coli*, выделенных у овец, кур, коров и людей, были устойчивы к пиперациллину, тобрамицину, амикацину и гентамицину, тогда как меньшее число штаммов были устойчивы к цефазолину и налидиксовой кислоте (табл. 2).

У овец интегрон класса 1 был обнаружен в четырех изолятах *E. coli*, устойчивых к сульфаметоксазолу/триметоприму; а интегрон класса 2 — только в одном изоляте, устойчивом к сульфаметоксазолу/триметоприму (табл. 3). С другой стороны, интегроны классов 1 и 2 были обнаружены соответственно в 12 и 6 изолятах *E. coli*, характеризующихся мультирезистентностью, выделенных в пробах от домашней птицы (табл. 4). В пробах, полученных от коров, был обнаружен только один интегрон класса 1 в одном изоляте *E. coli*, устойчивом к стрептомицину и сульфаметоксазолу/триметоприму (табл. 5). В одном из 8 изолятов *E. coli*, полученных от человека, присутствовали интегроны класса 1 и класса 2. Множественная лекарственная устойчивость была обнаружена у большинства изолятов *E. coli*, выделенных от человека (табл. 6).

У интегрон-положительных штаммов *E. coli* наблюдалась устойчивость более чем к шести противомикробным препаратам (табл. 7). Наши результаты показали, что интегроны широко распространены среди



Обнаружение гена *int1* и *int2* среди штаммов *E. coli*. Дорожка М — маркеры 100 п.н.; дорожки 1–6 — положительные штаммы

Таблица 2

Варианты резистентности *E. coli* к антибиотикам

Антибиотики; концентрация на диске, мкг	Источники			
	овцы (n=20)	куры (n=20)	коровы (n=20)	люди (n=20)
CZ; 30	6	9	0	8
AM; 10	5	12	7	7
PIP; 100	0	1	0	0
SM; 10	9	13	17	19
TOB; 10	0	5	0	0
SXT; 23,75/1,25	4	11	2	9
AN; 30	0	0	0	0
NA; 30	0	15	2	6
GM; 10	0	5	0	0
K; 30	2	3	1	2
N; 30	3	5	1	2

Здесь: CZ — цефазолин, AM — ампициллин, PIP — пиперациллин, SM — стрептомицин, TOB — тобрамицин, SXT — сульфаметоксазол/триметоприм, AN — амикацин, NA — налидиксовая кислота, GM — гентамицин, K — канамицин, N — неомицин.

Таблица 3

Типы лекарственной устойчивости *E. coli* у овец

Источник — овцы	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
1	—	—	I	I	S	R	I	S	I	S	I	I	I	SM
2	+	—	R	I	S	I	I	R	I	S	I	I	I	CZ, SXT
3	+	—	R	R	I	I	S	R	I	S	S	I	I	CZ, AM, SXT
4	—	—	I	S	S	R	I	S	I	S	I	I	I	SM
5	—	—	I	I	S	I	I	S	I	S	I	I	I	—
6	—	—	I	I	S	R	I	S	I	S	I	R	R	SM, K, N
7	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
8	—	—	I	I	S	I	I	S	I	S	I	I	I	—
9	+	+	I	I	S	I	I	R	I	S	I	I	I	SXT

Источник — овцы	Int1	Int2	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
10	—	—	R	I	S	R	I	S	I	S	S	S	S	CZ, SM
11	—	—	I	S	S	I	I	S	I	S	I	I	I	—
12	—	—	R	R	S	R	S	S	I	I	I	I	I	CZ, AM, SM
13	—	—	I	I	S	I	I	S	I	S	S	I	R	N
14	—	—	R	R	I	R	I	I	S	S	S	S	S	CZ, AM, SM
15	—	—	I	I	S	I	I	S	I	S	S	S	I	—
16	—	—	I	S	S	R	I	S	I	S	S	I	I	SM
17	—	—	I	S	I	I	I	S	I	S	S	I	I	—
18	—	—	I	R	S	R	S	S	I	S	I	I	I	AM, SM
19	—	—	R	R	I	I	I	S	I	S	I	R	R	CZ, AM, K, N
20	+	—	I	I	S	I	I	R	I	I	I	I	I	SXT
Всего	4	1	R	6	5	0	9	0	4	0	0	0	2	3
			S	0	4	16	0	4	15	2	18	8	4	2
			I	14	11	4	11	16	1	18	2	12	14	15

З д е с ь: R — резистентный; I — частично-резистентный; S — чувствительный. Обозначения см. в табл. 2.

Т а б л и ц а 4

Типы лекарственной устойчивости *E. coli* у кур

Источник — куры	Int1	Int2	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
1	+	+	R	R	I	R	R	R	I	R	R	I	I	CZ, AM, SM, TOB, SXT, NA, GM
2	+	—	R	R	S	R	I	R	I	R	R	I	I	CZ, AM, SM, SXT, NA, GM
3	+	+	I	S	S	I	I	R	S	R	I	I	I	SXT, NA
4	+	—	I	I	S	I	I	S	I	S	I	I	R	N
5	—	+	I	R	S	R	I	I	S	S	S	I	S	AM, SM
6	+	—	I	R	S	R	R	R	S	R	R	I	R	AM, SM, TOB, SXT, NA, GM, N
7	+	—	R	R	S	R	I	R	S	R	S	I	I	CZ, AM, SM, SXT, NA
8	—	+	I	I	S	I	S	R	S	R	S	I	I	SXT, NA
9	—	—	R	R	R	R	S	S	S	R	I	S	I	CZ, AM, PIP, SM, NA
10	—	—	I	I	S	I	I	S	I	R	S	I	I	NA
11	+	—	R	R	I	I	R	R	I	R	R	R	I	CZ, AM, TOB, SXT, NA, GM, K
12	+	—	I	R	S	R	R	R	S	R	R	I	I	AM, SM, TOB, SXT, NA, GM
13	+	+	R	R	S	R	R	R	S	R	I	I	R	CZ, AM, SM, SXT, NA, K, N
14	—	—	I	S	S	R	I	S	I	R	I	I	I	SM, NA
15	+	—	I	S	I	R	I	S	I	R	I	I	I	SM, NA
16	+	—	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	CZ, AM, SM, SXT, NA, K, N
17	—	—	I	I	S	R	S	S	I	R	I	I	I	SM, NA
18	+	+	R	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	CZ, AM, SM, SXT
19	—	—	R	R	S	I	I	S	I	S	I	R	R	CZ, AM, K, N
20	—	—	I	I	S	I	S	S	I	R	I	S	S	NA
Всего	12	6	R	9	12	1	13	5	11	0	16	5	3	5
			S	0	3	16	0	6	8	10	4	6	2	3
			I	11	5	3	7	9	1	10	0	9	15	12

З д е с ь: R — резистентный; I — частично-резистентный; S — чувствительный. Обозначения см. в табл. 2.

Таблица 5

Типы лекарственной устойчивости *E. coli* у коров

Источник — коровы	Int1	Int2	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
1	—	—	S	I	S	R	S	R	S	R	I	I	S	SM, SXT, NA
2	—	—	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	AM, SM
3	—	—	S	I	S	R	S	S	I	S	S	I	I	SM
4	—	—	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
5	—	—	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	AM, SM, N
6	—	—	S	I	S	R	S	S	S	S	S	I	R	SM, K
7	—	—	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	AM, SM
8	—	—	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
9	—	—	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
10	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
11	—	—	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	AM, SM
12	—	—	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	I	AM
13	—	—	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	AM, SM
14	—	—	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	—
15	—	—	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	NA
16	+	—	I	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	SM, SXT
17	—	—	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
18	—	—	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	AM, SM
19	—	—	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
20	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	R	SM
Всего	1	0	R	0	7	0	17	0	2	0	2	0	0	3
			S	15	2	20	0	20	18	19	18	19	17	8
			I	5	11	0	3	0	0	1	0	1	3	9

З д е с ь: R — резистентный; I — частично-резистентный; S — чувствительный. Обозначения см. в табл. 2.

Таблица 6

Типы лекарственной устойчивости *E. coli* у людей

Источник — люди	Int1	Int2	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
1	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
2	+	—	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	CZ, AM, SM, SXT
3	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
4	—	—	R	I	S	R	S	S	I	S	S	S	I	CZ, SM
5	+	—	I	S	S	R	I	R	S	R	I	I	I	SM, SXT, NA
6	—	—	I	I	S	R	I	S	S	S	S	S	I	SM
7	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
8	—	+	R	R	S	I	I	R	S	S	S	S	S	CZ, AM, SXT
9	+	—	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	CZ, AM, SM, SXT, NA
10	—	—	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
11	+	—	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	CZ, AM, SM
12	+	—	I	S	S	R	S	R	S	R	I	R	S	SM, SXT, NA, K
13	+	—	I	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	AM, SM, SXT, NA, N
14	—	—	I	I	S	R	I	R	S	S	S	S	I	SM, SXT

Источник — люди	Int1	Int2	CZ	AM	PIP	SM	TOB	SXT	AN	NA	GM	K	N	Устойчивость к препарату
15	—	—	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	CZ, SM
16	+	—	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	CZ, AM, SM, SXT, NA
17	+	—	I	I	S	R	S	R	S	R	S	R	R	SM, SXT, NA, K, N
18	—	—	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	CZ, AM, SM
19	—	—	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SM
20	—	—	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	SM
Всего	8	1	R	8	7	0	19	0	9	0	6	0	2	2
			S	0	4	20	0	16	11	19	14	18	17	12
			I	12	9	0	1	4	0	1	0	2	1	6

Здесь: R — резистентный; I — частично-резистентный; S — чувствительный. Обозначения см. в табл. 2.

Таблица 7

Устойчивость к антибиотикам изолятов *E. coli* с интегронами и без интегров, %

Антибиотики; концентрация на диске, мкг	Всего резистентных изолятов (n=80), %/абс.число	Без интегров (n=52)			С интегронами (n=28)			p	
		R	I	S	R	I	S	Int1	Int2
CZ; 30	28,75/23	17,4	51,9	30,7	50	50	0	S	NS
AM; 10	38,75/31	28,2	54	17,8	60,7	25	14,3	NS	NS
PIP; 100	1,25/1	1,9	5,7	92,4	0	14,2	85,8	NS	NS
SM; 10	72,5/58	75	25	0	67,8	32,2	0	NS	SS
TOB; 10	6,25/5	0	32,6	67,4	17,8	39,3	42,9	NS	NS
SXT; 23,75/1,25	32,5/26	5,7	3	91,3	82,3	3,5	14,2	SS	SS
AN; 30	0/0	0	40,3	59,7	0	32,2	67,9	NS	NS
NA; 30	30/24	13,4	1,9	84,7	60,7	3,5	35,8	SS	NS
GM; 10	6,25/5	0	30,8	69,2	18,8	29,5	51,7	SS	NS
K; 30	10/8	7,6	28,9	63,5	14,2	60,8	25	SS	SS
N; 30	13,75/11	9,6	53,8	36,6	22,9	54,5	22,6	NS	NS

Здесь: R — резистентный; I — частично-резистентный; S — чувствительный; NS — не достоверно; SS — статистически достоверно. Обозначения см. в табл. 2.

изолятов *E. coli*, выделенных в провинции Альборз; при этом интегроны класса 1 более распространены, чем интегроны класса 2.

Обсуждение

Устойчивость энтеробактерий к антибиотикам может быть вызвана мутацией или наличием в бактериальной клетке подвижных ДНК-элементов, таких как плазмиды, транспозоны и интегроны [34]. Интегроны обладают способностью захватывать гены устойчивости к антибиотикам с помощью механизма рекомбинации. На сегодня известны пять классов интегров, классифицированных по типу гена интегразы [35, 36].

Об эпидемиологическом распространении интегро-

нов среди различных микроорганизмов информации пока недостаточно. В нашем исследовании 41,25% штаммов *E. coli*, выделенных у овец, кур, коров и людей, содержали один или два интегронных гена. Эти результаты попадают в диапазон значений (22–59%), сообщаемых различными авторами [27, 37]. В некоторых из этих изолятов был обнаружен только один класс интегров, хотя в основном отмечалось несколько. Это наблюдение означает, что интегроны присутствуют в геноме энтеробактерий и могут быть связаны с распространением генетической информации, необходимой для развития устойчивости к антибиотикам.

Результаты нашего исследования показали, что 31,25% изолятов *E. coli* имеют интегроны класса 1. Это значение выше, чем в сообщении T. Tennstedt

с соавт. [38], которые обнаружили присутствие интегронов класса 1 в 12,4% резистентных плазмид, полученных из образцов сточных вод. Вместе с тем этот показатель (12,4%) ниже, чем в Норвегии [39], Западной и Центральной Европе [27], Нидерландах [40], Франции [26], Корее [41] и Китае [42].

Спектры резистентности к антибиотикам, обнаруженные в нашем исследовании, показали, что у домашних животных высеваются бактерии, устойчивые к стрептомицину, что можно объяснить использованием стрептомицина и спектиномицина в животноводстве [43–47]. Не исключено, что кишечные палочки, устойчивые к стрептомицину, могут попадать к человеку алиментарным путем, связанным с употреблением контаминированных продуктов [48–50]. Кроме того, интегроны кишечной палочки животных могут передаваться *E. coli* человека в процессе прохождения через кишечник.

Те спектры резистентности к антибиотикам, которые мы наблюдали в изолятах *E. coli* животных и человека в настоящем исследовании, соответствуют выводам другого исследования, проведенного в Ирландии, показавшего, что множественная лекарственная устойчивость *E. coli* из почвы и фекалий крупного рогатого скота связана с интегронами класса 1 [51]. В некоторых работах сообщалось о присутствии интегронов в уропатогенной кишечной палочке [52, 53]. Авторы этих сообщений полагают, что наличие интегронов обуславливает моно- и множественную резистентность к противомикробным препаратам штаммов *E. coli*. В настоящем исследовании интегроны классов 1 и 2 обнаружены соответственно в 12 и 6 изолятах *E. coli* с множественной лекарственной резистентностью, полученных от домашней птицы. Эти результаты аналогичны данным из Европы и Канады, в которых сообщалось об устойчивости уропатогенной *E. coli* к противомикробным препаратам [52].

Заключение

Результаты исследования показали, что интегроны широко распространены среди штаммов *E. coli*, выделенных в провинции Альборз (Иран). Это свидетельствует о необходимости усиления эпиднадзора, тщательного изучения многообразия факторов, действующих в этих условиях, и разработки адекватных стратегий профилактики.

Вклад авторов. RR планировал и проводил молекулярно-генетические исследования. НМ выполнял биохимическое исследование. НН участвовал в разработке исследования и проводил статистический анализ. РК собирал образцы и проводил молекулярно-генетические исследования. FK предложил идею исследования, координировал его и подготовил проект статьи. Все авторы внесли одинаковый вклад в эту работу. Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант статьи.

Финансирование исследования. Работа была поддержана грантом Karaj Branch. Islamic Azad University данного Hamed Moradi для получения степени магистра наук.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Rahimi E., Khamesipour F., Yazdi F., Momtaz H. Isolation and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and EHEC O157:NM from raw bovine, camel, water buffalo, caprine and ovine milk in Iran. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18(4): 559–564, <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5738>.
2. Raissy M., Khamesipour F., Rahimi E., Khodadoostan A. Occurrence of *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in crayfish (*Astacus leptodactylus*) from Iran. *IJFS* 2014; 13(4): 944–954.
3. Hemmatinezhad B., Khamesipour F., Mohammadi M., Safarpour Dehkordi F., Mashak Z. Microbiological investigation of O-serogroups, virulence factors and antimicrobial resistance properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ostrich, turkey and quail meats. *Journal of Food Safety* 2015; 35(4): 491–500, <https://doi.org/10.1111/jfs.12199>.
4. Ranjbar R., Hosseini S., Zahraei-Salehi T., Kheiri R., Khamesipour F. Investigation on prevalence of *Escherichia coli* strains carrying virulence genes *ipaH*, *estA*, *eaeA* and *bfpA* isolated from different water sources. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; 6(4): 278–283, [https://doi.org/10.1016/s2222-1808\(15\)61031-3](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(15)61031-3).
5. Tajbakhsh E., Ahmadi P., Abedpour-Dehkordi E., Arbab-Soleimani N., Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5(1): 11, <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0109-4>.
6. Ranjbar R., Pezeshknejad P., Khamesipour F., Amini K., Kheiri R. Genomic fingerprints of *Escherichia coli* strains isolated from surface water in Alborz province, Iran. *BMC Research Notes* 2017; 10(1): 295, <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2575-z>.
7. Ranjbar R., Haghi-Ashtiani M.T., Jafari N.J., Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iranian Journal of Public Health* 2009; 38(2): 134–138.
8. Afkhami Ardakani M., Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electron Physician* 2016; 8(4): 2291–2295, <https://doi.org/10.19082/2291>.
9. Nagachinta S., Chen J. Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot* 2009; 72(1): 21–27, <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.1.21>.
10. Ranjbar R., Giammanco G.M., Farshad S., Owlia P., Aleo A., Mamma C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in *Salmonella* isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(4): 547–553, <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0736>.
11. Farshad S., Ranjbar R., Japoni A., Hosseini M., Anvarinejad M., Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic

Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Arch Iran Med* 2012; 15(5): 312–316.

12. Talebayan R., Kheradmand M., Khamesipour F., Rabiee-Faradonbeh M. Multiple antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in Iran. *Vet Med Int* 2014; 2014: 491418, <https://doi.org/10.1155/2014/491418>.

13. Cambay G., Guerout A.-M., Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010; 44(1): 141–166, <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>.

14. Tajbakhsh E., Khamesipour F., Ranjbar R., Ugwu I.C. Prevalence of class 1 and 2 integrons in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from aquaculture water in Chaharmahal Va Bakhtiari province, Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14(1): 37, <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0096-y>.

15. Kheiri R., Ranjbar R., Khamesipour F., Akhtari L. Role of antibiotic in drug resistance and integrons prevalence in *Escherichia coli* isolated from human and animal specimens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22(6): 953–959, <https://doi.org/10.9775/kvfd.2016.15684>.

16. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43(1): 1–4, <https://doi.org/10.1093/jac/43.1.1>.

17. Hall R.M., Collis C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 2006; 15(4): 593–600, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>.

18. Collis C.M., Hall R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 155–162, <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.155>.

19. Recchia G.D., Hall R.M. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 141(12): 3015–3027, <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3015>.

20. Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Rådström P., Sundström L., Sköld O., Swedberg G., Skurray R.A. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(4): 761–768.

21. Van den Bogaard A. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14(4): 327–335, [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00145-x).

22. Normark B.H., Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 2002; 252(2): 91–106.

23. Momtaz H., Karimian A., Madani M., Safarpour Dehkordi F., Ranjbar R., Sarshar M., Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12: 1–12.

24. Torkan S., Bahadoranian M., Khamesipour F., Anyanwu M. Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic dogs in Iran. *Archivos de medicina veterinaria* 2016; 48(2): 181–190, <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2016000200008>.

25. Gonzalez G., Sossa K., Bello H., Dominguez M., Mella S., Zemelman R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 161(1): 125–128, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12937.x>.

26. Hamada K., Oshima K., Tsuji H. Drug resistance genes encoded in integrons and in extra-integrons: their distribution and lateral transfer among pathogenic enterobacteriaceae

including enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovars typhimurium and infantis. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56(3): 123–126.

27. Martinez-Freijo P., Fluit A.C., Schmitz F.J., Grek V.S., Verhoef J., Jones M.E. Class I integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(6): 689–696, <https://doi.org/10.1093/jac/42.6.689>.

28. Martinez-Freijo P., Fluit A.C., Schmitz F.-J., Verhoef J., Jones M.E. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(3): 686–689, <https://doi.org/10.1128/aac.43.3.686>.

29. Obeng A.S., Rickard H., Ndi O., Sexton M., Barton M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Vet Microbiol* 2012; 154(3–4): 305–315, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.010>.

30. Bukh A.S., Schönheyder H.C., Emmersen J.M.G., Søgaard M., Bastholm S., Roslev P. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(1): 163–168, <https://doi.org/10.1093/jac/dkp156>.

31. Blanco J., Mora A., Mamani R., López C., Blanco M., Dahbi G., Herrera A., Blanco J.E., Alonso M.P., García-Garrote F., Chaves F., Orellana M.Á., Martínez-Martínez L., Calvo J., Prats G., Larrosa M.N., González-López J.J., López-Cerero L., Rodríguez-Baño J., Pascual A. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(9): 2011–2021, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr235>.

32. Bashir S., Sarwar Y., Ali A., Mohsin M., Saeed M.A., Tariq A., Haque A. Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of uropathogenic *E. coli* isolated from Faisalabad region of Pakistan. *Braz J Microbiol* 2011; 42(4): 1278–1283, <https://doi.org/10.1590/s1517-83822011000400005>.

33. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(10): 4555–4558, <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>.

34. Zhao S., White D.G., Ge B., Ayers S., Friedman S., English L., Wagner D., Gaines S., Meng J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(4): 1558–1564, <https://doi.org/10.1128/aem.67.4.1558-1564.2001>.

35. Collis C.M., Kim M.-J., Partridge S.R., Stokes H.W., Hall R.M. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 2002; 184(11): 3017–3026, <https://doi.org/10.1128/jb.184.11.3017-3026.2002>.

36. Sallen B., Rajoharison A., Desvarenne S., Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1995; 1(3): 195–202, <https://doi.org/10.1089/mdr.1995.1.195>.

37. Fluit A.C., Schmitz F.J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(11): 761–770, <https://doi.org/10.1007/s100960050398>.
38. Tennstedt T., Szczepanowski R., Braun S., Pühler A., Schlüter A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 45(3): 239–252, [https://doi.org/10.1016/s0168-6496\(03\)00164-8](https://doi.org/10.1016/s0168-6496(03)00164-8).
39. Heir E., Lindstedt B.A., Leegaard T.M., Gjernes E., Kapperud G. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal Escherichia coli in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 12.
40. Jones M.E., Peters E., Weersink A.-M., Fluit A., Verhoef J. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 1997; 349(9067): 1742–1743, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)62954-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)62954-6).
41. Yu H.S., Lee J.C., Kang H.Y., Ro D.W., Chung J.Y., Jeong Y.S., Tae S.H., Choi C.H., Lee E.Y., Seol S.Y., Lee Y.C., Cho D.T. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among Escherichia coli isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5429–5433, <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5429-5433.2003>.
42. Su J., Shi L., Yang L., Xiao Z., Li X., Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254(1): 75–80, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00025.x>.
43. Ridley A., Threlfall E.J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic Salmonella typhimurium DT 104. *Microb Drug Resist* 1998; 4(2): 113–118.
44. McDonald L.C., Chen M.T., Lauderdale T.L., Ho M. The use of antibiotics critical to human medicine in food-producing animals in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34(2): 97–102.
45. Lindstedt B.-A. Characterization of class I integrons in clinical strains of Salmonella enterica subsp. enterica serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol* 2003; 52(2): 141–149, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.04958-0>.
46. Du X., Shen Z., Wu B., Xia S., Shen J. Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245(2): 295–298, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.021>.
47. Kang H.Y., Jeong Y.S., Oh J.Y., Tae S.H., Choi C.H., Moon D.C., Lee W.K., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Lee J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(5): 639–644, <https://doi.org/10.1093/jac/dki076>.
48. Wegener H.C., Aarestrup F.M., Jensen L.B., Hammerum A.M., Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(3): 329–335, <https://doi.org/10.3201/eid0503.990303>.
49. Sanchez S., McCrackin Stevenson M.A., Hudson C.R., Maier M., Buffington T., Dam Q., Maurer J.J. Characterization of multidrug-resistant Escherichia coli isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3586–3595, <https://doi.org/10.1128/jcm.40.10.3586-3595.2002>.
50. Guerra B. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(3): 489–492, <https://doi.org/10.1093/jac/dkg362>.
51. Scott L., McGee P., Walsh C., Fanning S., Sweeney T., Blanco J., Karczmarczyk M., Earley B., Leonard N., Sheridan J.J. Detection of numerous verotoxigenic E. coli serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet Microbiol* 2009; 134(3–4): 288–293, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.008>.
52. Blahna M.T., Zalewski C.A., Reuer J., Kahlmeter G., Foxman B., Marrs C.F. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(4): 666–672, <https://doi.org/10.1093/jac/dkl020>.
53. Rao A.N., Barlow M., Clark L.A., Boring J.R. 3rd, Tenover F.C., McGowan J.E. Jr. Class 1 integrons in resistant Escherichia coli and Klebsiella spp., US hospitals. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(6): 1011–1014.