Ministry of Higher Education
And scientific Research
Al Muthanna University
College of veterinary
medicine

Isolation and characterization of Oxytetracyclin resistance E. coli in Al Muthanna Veterinary hospital using Multiplex PCR

Entedhar kani jassim; Asraa Badi ; Rusul jawad

Year 5

Supervised by

Dr. Karima Al Salihi

Final year project submitted to College of veterinary medicine/ Al Muthanna University / Iraq, as partial fulfillment of the requirements of the Bachelor degree in Veterinary Medicine and Surgery

April 2018

Dedication

الاهداء

إلى معلم البشرية وهاديها ، إلى النور المبين ، إلى رسول الله صلى الله عليه وآله وسلم.....

وإلى من رضا الله برضاهما ، إلى أمي وأبي ، إلى سندي في شدتي ورخائي.....

إلى الذين ينظرون إلي بعين المحبة والاحترام ، إلى أخوتي وأخواتي

إلى من تابعني ونصحني ووجهني حتى أتممت بحثي ، إلى أستاذتي الفاضلة.....

إلى من هم لولاهم لما كنا نكمل حياتنا ... الحشد الشعبي المقدس

إلى بلدي الجريح العراق الحبيب .....

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

انتظار كاني
اسراء بادي
رسل جواد

Acknowledgement

شكر وتقدير

Dedication and Acknowledgement

الإهداء والشكر

إلى كل من علمني علما نافعا ولو حرفا، إلى كل من أنار لي الطريق إلى النجاح إلى من أرشدني وعلمني أتقدم بالشكر والعرفان الجزيل للدكتورة (كريمة ألصالحي) التي أفادتنا من علمها مما ساعدنا في أعداد هذا المشروع وإخراجه بهذه الصورة التي اجتهدنا ان تكون بأفضل صورة قدر المستطاع.....

والشكر موصول الى كل من :

الدكتور/ حسين جبار ، والدكتورة / فاطمة عطية

الذين أفادونا من علمهم وساعدونا على إظهار المشروع بالصورة الجيدة.

والشكر ايضا الى كل من يقرأ هذا البحث بغرض الإطلاع والاستفادة منه ومن ثم المقدرة على التحديث والتطوير والوصول الى الافضل بإذن الله والشكر الجزيل والامتنان الكبير الى الاب الغالي والام الغالية فهما اعز النعم التي انعم الله بها علينا فما كان لنا سندا وعونا لإعداد هذا البحث من خلال توفير الجو الملائم للدراسة والاستذكار.

ولابد لنا ونحن نخطو خطواتنا الأخيرة في الحياة الجامعية من وقفه نعود إلى الأعوام قضيناها في رحاب الجامعة مع أساتذتنا الكرام الذين قدموا لنا الكثير باذلين بذلك جهودا كبيرة في بناء جيل الغد لتبعث ألامه من جديد....

وقبل أن نمضي تقدم أسمى آيات الشكر و الامتنان والتقدير والمحبة إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة...

وإلى جميع أساتذتنا الأفاضل.. الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة.

Abstract

Different antibiotics have been used in the cure and control of many forms of infections in a variety of animal species. The non-prudent use of antibiotics in veterinary clinic can lead to develop of resistant forms of micro-organisms to antibiotics. This phenomenon is a natural and unavoidable and associated with routinely use of antibiotic in many species, including man. With amplified antibiotics usage over current decades, there has been an emerging alarm about the speeded development of antibiotics resistance in the environment. This study intends to investigate the antimicrobial resistance profile in different micro-organism for some antimicrobials agents that are frequently used to treat the animals in veterinary hospitals/ Al Muthanna province. Moreover, to determine the tetracycline and oxytetracycline resistance genes in *Escherichia coli* that revealed resistance for antibiotic disc diffusion test. A total of 53 clinical cases (sheep, goat, cow and cat) were presented to Al Muthanna veterinary hospital with different clinical signs. A sterile fecal and nasal swabs, milk samples and 4 pus samples were collected from these cases. All samples were cultured in preliminary culture media consequently, Gram stain and biochemical tests were done for identification. Antibiotic susceptibility analysis were done for all bacterial isolates by standardized disc diffusion method. The isolates were tested with a panel of 6 antibiotic discs (tetracycline (T30), and oxytetracycline (TE10), streptomycin (S25), penicillin (P10), trimethoprim-sulphamethoxazoles (SXT25) and Chloramphenicol (C10) discs. Totally 53samples including 9, 37,6 and 1 were collected from cow , sheep, goat and cat respectively. The total number of isolated bacteria were 53 isolates. Ten out of 53 bacterial isolates from different clinical cases (sheep, goat, cow) were identified using biochemical tests as *E. coli*. These *E. coli* were tested by disk diffusion method to determine resistance patterns to 6 antimicrobial agents. Later on, Tetracycline and oxytetracycline resistance *E.coli* in disk diffusion were tested by PCR to identified the presence of tet (A) resistance gene. Ten E.coli isolates was resistance for tetracycline and oxytetracycline , these isolates were tested for identify the prevalence of tetracycline resistance genes tet (A). Nine out ten 9/10 (90 %) of E. Coli isolates were carried tetA gene. The tet (A) gene of strains were amplified by PCR with two sets of primers targeting tetracycline efflux gene (tetA). In conclusion, this study approved the presence of antimicrobial resistant (AMR) bacteria that isolated from different clinical cases refereed to Al Muthanna veterinary hospital. Moreover, this study investigated the spread of resistant E. coli in Iraqi animals, with special emphasis on tetracycline and oxytetracycline resistant E. coli. This study also

approved the presence of tetA resistance gene that found in 90% of the tested resistance E.coli. The Authors recommend to do another future study that include high number of bacterial isolates and determine another antimicrobial genes responsible for transfer the resistance between other kind of bacteria. Besides, the authors recommend to use the antimicrobial wisely and prohibited providing this products without receipt.

Keywords: oxytetracycline, tetracycline, antibiotic resistance, resistance genes, PCR *Escherichia coli*.

الخلاصة

تم استخدام المضادات الحيوية المختلفة في علاج العديد من أشكال العدوى ومكافحتها في جميع انواع الحيوانات . يمكن أن يؤدي الاستخدام غير الحكيم للمضادات الحيوية في العيادات البيطرية إلى تطوير أشكال مقاومة من الكائنات الحية الدقيقة للمضادات الحيوية. هذه الظاهرة طبيعية ولا يمكن تفاديها وترتبط بالاستخدام الروتيني للمضاد الحيوي في العديد من الكائنات الحية ، بما في ذلك الإنسان. مع كثرة استخدام المضادات الحيوية على مدى العقود الحالية ، كان هناك إنذار ناشئ عن التطور السريع لمقاومة المضادات الحيوية في البيئة . تهدف هذه الدراسة إلى دراسة ملامح مقاومة مضادات الميكروبات الدقيقة المختلفة لبعض العوامل المضادة للجراثيم التي تستخدم في كثير من الأحيان لعلاج الحيوانات في المستشفيات البيطرية / محافظة المثنى. وعلاوة على ذلك ، لتحديد جينات مقاومة التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين في الإشريكية القولونية وباستخدام فحص المقاومة باستعمال اختبار انتشار قرص المضاد الحيوي. تم فحص ما مجموعه ٥٣ حالة سريرية (الأغنام والماعز والبقر والقط قادمة للمستشفى البيطري \ محافظة المثنى. تم جمع عينات من البراز ومسحات أنفية معقمة وعينات لبن وعينات من الصديد من هذه الحالات. تم استزراع جميع العينات في وسائل الأوساط الأولية ، وبالتالي تم عمل صبغة جرام والاختبارات البيوكيميائية لتحديد هوية الجرثومة . تم إجراء تحليل الحساسية للمضادات الحيوية لجميع العزلات البكتيرية بطريقة الأقراص القياسية. تم اختبار العزلات باستخدام مجموعة من ٦ أقراص مضاد حيوي

streptomycin (S25) و oxytetracycline (TE10) و (tetracycline (T30) و trimethoprim-sulphamethoxazoles (SXT25) و penicillin (P10) و Chloramphenicol (C10). وأقراص

تم فحص ٦،٣٧ و ١

من الأغنام و الابقار والماعز والقط على التوالي ، وكان العدد الإجمالي للبكتيريا المعزولة ٥٣ عزلة ، وتم التعرف على ١٠ عزلات من بين ٥٣ عزلة بكتيرية من الحالات سريرية المختلفة (الأغنام والماعز والبقرة) باستخدام الاختبارات البيوكيميائية. تم اختبار هذه الإشريكية القولونية بواسطة طريقة انتشار اقرص المضادات الجرثومية لتحديد وجود المقاومة للمضادات الحياتية. بعد ذلك تم استخلاص الحامض النوي للكشف عن وجود الجين الخاص بمقاومة المضادات الحياتية باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل

وقد اظهرت هذه الدراسة بوجود الجين الخاص بمقاومة المضادات الحياتية وبنسبة ٩٠%.

في الختام ، اظهرت هذه الدراسة وجود الجراثيم المقاومة للمضادات الحياتية مع وجود الجين الخاص بذلك في الجراثيم المعزولة من المستشفى البيطري في محافظة المثنى.

يوصي المؤلفون بإجراء دراسة مستقبلية أخرى تتضمن عددًا كبيرًا من العزلات البكتيرية وتحديد جينات أخرى مضادة للميكروبات مسؤولة عن نقل المقاومة بين أنواع أخرى من البكتيريا. إلى جانب ذلك ، يوصي المؤلفون باستخدام المضادات الميكرو بحكمة ويحظر صرفها بدون وصفة طبية.

CONTENTS

Introduction…… 1
Aim of Study …….. 3
Review of literature
- History of Antibiotic Development…… 4
- Tetracyclines…… 5
- Classification of tetracyclines…….. 6
- Typical tetracyclines…… 6
- Atypical tetracyclines……..... 7
- Tetracyclines and their uses in veterinary medicine…… 7
- Tetracycline as a feed additive of mastitis…….. 7
- Mode of action of tetracyclines ……
- General aspects of antimicrobial resistance…… 8
- Emergence and spread of antimicrobial resistance……. 8
- Emergence…… 8
- Spread…… 8
- Tetracycline Resistance…… 9
- Acquired tetracycline resistance……. 9
- Tetracycline resistance determinants…….. 10
- Types of tetracycline resistant genes…….. 10
- Identification of new tet genes…… 11
- Mechanism of tetracycline resistance……. 11
- Active efflux proteins……. 11
- Ribosomal protective proteins…… 12
- Enzymatic inactivation…… 12
- Multidrug-resistance mechanisms…… 13
- Permeability barriers…… 13
- Linkages of tet genes with mobile elements……. 15
- Methods of determining tetracycline resistance in microorganisms…… 16 17
- Genetic methods for the detection of antimicrobial resistance genes…… 17
- The Bacterium Escherichia coli……

Materials and methods ……. 17
Sample collection and preliminary bacterial culture …….. 18
Conventional biochemical test ……. 18
Determination of Antibiotic Susceptibility of E. coli Isolates…….. 22
Detection of Tetracycline (tet) Resistance Genes……. 23

Results
Microbiological observations..... 24
Results of Tetracycline (tet) Resistance Genes..... 28

Discussion…….. 28
Conclusions……. 30
References……... 31