Modares Journal of Biotechnology
Volume 11, Issue 1, Winter 2020
Pages: 109-118
Type: Original Research

Bioinformatic Analysis of Horizontal Transmission of Genes Related to Antibiotic Resistance Genes in Escherichia coli

Ghiasvand S.*[1] PhD, Vaseghi A.[2] MSc, Alavian F.[3] PhD

[1] Biology Department, Science Faculty, Malayer University, Malayer, Iran
[2] Nanobiotechnology Department, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Science Faculty, Farhangian University, Tehran, Iran

Abstract

Escherichia coli is a Gram-negative bacterium, the second most common bacteria in the intestine and the main indicator of urban water pollution, is the most common cause of urinary tract infection and also is one of the main factors in food poisoning and diarrhea. Drug resistance of this bacterium to antibiotics is a global challenge. Horizontal gene transfer (HGT) is the movement of genetic material between unicellular and other gene transfer pathways which is an important factor in the evolution of many organisms, antibiotic resistance in bacteria, gene function. Antibiotic resistance in E. coli can be transferred to another species of bacteria through HGT mechanisms. Today, Bioinformatics methods have been used to understand and detect genes transfer from HGT mechanism. In this study, bioinformatics tools such as PredictBias, ACLAME, Mobil Genetic Elements (MGEs), PAI-ID, and Alien_Hunter were used in order to genes analysis that related from antibiotic resistance in E. coli. Bioinformatics and MIC assays results showed horizontal transfer of resistance genes. Also, 26 of 30 genes showed transcription in all software. Most of the genes that identified show over 50% GC-content. put P gene with 178, blaCMY with 62, BlaTEM with 43, and aac-6 with 66 homologies in the PredictBias and ACLAME websites. mob (A-C) and rep (A-C) gene families are the highest numbers of horizontal gene transfer from infection bacteria strain. Those cluster genes are the highest resistant of laboratory tests that carries resistant genes such as blaSHV and blaCHV on the blaCMY plasmid.

Keywords
Horizontal Gene Transfer [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Horizontal+Gene+Transfer];
Bioinformatics [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Bioinformatics];
MIC [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68020128];
Antibiotic Resistance [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004352];
E. coli [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004926]

*Corresponding Author
Tel: -
Fax: +98 (81) 32355404
Post Address: Malayer University, 4km of Malayer-Arak Road, Malayer, Iran. Postal Code: 6571995863
s.ghiasvand@malayeru.ac.ir
Received: March 16, 2019 Accepted: September 30, 2019 ePublished: March 14, 2020

بررسی بیوانفورماتیکی انتقال افقی ژن‌های دخیل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *Escherichia coli*

سعیده قیاسوند* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
اکبر واثقی MSc
گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
فیروزه علویان PhD
دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

چکیده
Escherichia coli یک باکتری گرم منفی، دومین باکتری از نظر فراوانی در روده و شایع‌ترین عامل عفونت ادراری و از عوامل اصلی مسمومیت غذایی و اسهال است. همچنین به‌عنوان شاخص اصلی آلودگی آب شهری اهمیت ویژه‌ای دارد. مقاومت دارویی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک چالش جهانی مطرح می‌شود. به فرآیند انتقال ماده ژنتیکی در مسیری غیر از انتقال ژن‌ها به‌صورت رابطه والد- فرزندی انتقال افقی ژن (HGT) گفته می‌شود. این فرآیند می‌تواند روی عملکرد ژن‌ها از جمله ژن‌های ایجادکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها تغییر ایجاد کند. ایجاد مقاومت در باکتری *E. coli* می‌تواند از طریق ژن‌های متحرک به گونه‌های دیگر باکتری‌ها هم انتقال پیدا کند. امروزه از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای فهم و ردیابی ژن‌های انتقال‌یافته با مکانیزم انتقال افقی استفاده می‌شود. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مانند PredictBias، ACLAME، Mobil Genetic Elements (MGEs)، PAI-IDA و Alien-Hunter به بررسی برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *E. coli* پرداخته شد. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی و روش MIC انتقال افقی ژن‌های مقاومت را نشان داد. ۲۶ ژن از ۳۲ ژن در کلیه نرم‌افزارها انتقال را نشان دادند. بیشتر ژن‌های شناسایی‌شده دارای درصد بازهای GC بالای ۵۰% بودند. ژن‌هایی مانند *put P* با ۱۷۸ توالی، *blaCMY* با حدود ۶۲ توالی، *BlaTEM* با ۴۳ توالی و *aac-6* با ۶۶ توالی در سایت‌های PredictBias و ACLAME به دست آمدند. *mobC*، *mobA* و *mobB* و خانواده ژنی *rep* بیشترین احتمال انتقال افقی را بین سویه‌های بیماری‌زا نشان دادند. بیشترین مقاومت در تست‌های آزمایشگاهی را ژن‌های *blaSHV* و *blaCHV* روی پلاسمید blaCMY نشان دادند.
کلیدواژه‌ها: انتقال افقی ژن، بیوانفورماتیک، MIC، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اشریشیا کلی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۸
*نویسنده مسئول: s.ghiasvand@malayeru.ac.ir

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) یک باکتری گرم منفی به شکل باسیل و از خانواده انتروباکتریاسه است. این باکتری بی‌هوازی اختیاری، بدون اسپور و اغلب متحرک است. همچنین دومین باکتری از نظر فراوانی در روده و شاخص اصلی آلودگی آب شهری به فاضلاب محسوب می‌شود.گوشت، شیر، آب و ماهی در معرض آلودگی به این باکتری و سبزی خام و سالاد مهمترین منبع آن هستند. این باکتری از طریق تماس مستقیم در هنگام خردکردن گوشت و استفاده از فرآورده‌های لبنی غیرپاستوریزه و مصرف سبزیجات خام ضدعفونی‌نشده می‌تواند انتقال یابد. برخی سویه‌های آن موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند. این باکتری شایع‌ترین عامل عفونت ادراری است که حدود ۹۰% عفونت‌های ادراری در زنان را به خود اختصاص می‌دهد[1]. مقاومت دارویی *اشریشیا کلی* اهمیت زیادی به‌خصوص در بیماران بستری در بیمارستان‌ها دارد. مقاومت ضدمیکروبی در *E. coli* در سراسر جهان گزارش شده است و سرعت افزایش مقاومت آن، نگرانی‌های زیادی در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته ایجاد کرده است[2]. انتقال افقی ژن (HGT) به فرآیند انتقال ماده ژنتیکی بین ارگانیزم‌ها در مسیری غیر از انتقال عمودی ژن‌ها و یا بدون داشتن رابطه والد- فرزندی و یا رابطه سلول مادری سلول دختری گفته می‌شود. در انتقال عمودی ژن‌ها، ماده ژنتیکی از والد به فرزندان انتقال پیدا می‌کند[3]. انتقال افقی ژن‌ها یکی از مهمترین عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها است[4]. از انتقال افقی ژن‌ها در مهندسی ژنتیک نیز استفاده می‌شود. این مکانیزم یا پدیده در تکامل باکتری‌ها نقش دارد و در حدود ۱۰ تا ۱۷% ژنوم باکتری‌ها از طریق انتقال افقی ژن به دست آمده است. سازگاری باکتری‌ها در برابر استرس‌های محیطی از طریق انتقال افقی ژن ایجاد شده است[3, 5]. مواد ژنتیکی متحرک (MGE) شامل توالی‌هایی هستند که در ژنوم حرکت می‌کنند. این مواد دارای توالی‌های ساختاری و یا ژن‌هایی هستند که قابلیت جابه‌جاشدن را درون و بین ژنوم به آنها می‌دهد. در موجودات مختلف محدوده متفاوت انتقال گزارش شده است. عمدتاً منشا این توالی‌ها خارج ژنومی است[4]. MGE از طریق روش‌های مختلفی مانند استفاده از واسطه‌های عناصر القایی می‌تواند در انتقال افقی ژن دخالت داشته باشد و آن را تسهیل کند. این عناصر می‌توانند در عملکرد ژن‌ها تغییر ایجاد کنند و هنگامی که در نزدیکی محل ورود ژن در ژنوم میزبان قرار بگیرند با تخریب یا غیرفعال‌سازی ژن‌ها در محل ورود ژن موجب تغییر در عملکرد ژن‌ها می‌شوند. این عناصر می‌توانند مزایایی را برای میزبان داشته باشند که از جمله می‌توان ممانعت از تاثیر یک توالی تنظیمی، تعمیر شکست‌های DNA دورشته‌ای و یا حفظ تلومر در دروزوفیلا را نام برد. نمونه‌ای از این ژن‌ها، ژن گروه خونی ABO است که در مهره‌داران از طریق انتقال افقی ژن منتقل شده‌اند. اکثر ژن‌های دیگر به آنزیم‌های درگیر در متابولیزم مربوط بودند. در بررسی‌های انجام‌شده در انسان، حدود بیست ژن از طریق HGT منتقل شده‌اند و ۱۲۸۸ ژن خارجی اضافی در ژنوم انسان شناسایی شد که قبلاً گزارش نشده بود. بعضی از این ژن‌ها در متابولیزم لیپید درگیر هستند که شامل تجزیه اسیدهای چرب و ایجاد گلیکولیپیدها است[6]. سایر ژن‌ها شامل ژن‌های دخیل در واکنش التهابی، سیگنال‌دهی ایمنی سلول و واکنش‌های ضدمیکروبی سم هستند. هرچند ژن‌های دخیل در متابولیزم اسیدهای آمینه، تغییرات پروتئین‌ها و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نیز انتقال افقی نشان داده‌اند. باکتری‌ها و آغازیان میکروارگانیزم‌هایی هستند که بیشترین

انتقال افقی در آنها اتفاق افتاده است[7]. بررسی HGT روی ویروس‌ها ایجاد بیش از ۵۰ ژن در گونه‌های اولیه که از قارچ‌ها منشا گرفته‌اند را نشان داده است[8]. به نظر می‌رسد بیشتر HGT در نخستی‌ها از نیایی است که گاهی اوقات بین نیای مشترک مهره‌داران و نیای مشترک نخستین‌ها رخ داده است[5]. جزایر مقاومت میکروبی (REIs) و نیز جزایر بیماری‌زایی (PAIs) جایگاه‌های بسیار مهمی در ژنوم هستند که در مراحل مختلف انتقال افقی ژن‌ها و همچنین در تکامل باکتری‌ها نقش اساسی دارند[9]. مقاومت دارویی در باکتری *E. coli* به یک مشکل جهانی در حوزه‌های مختلف پزشکی و دامپزشکی تبدیل شده است[10]. ایزوله‌های مقاوم در باکتری *E. coli*، با مقاومت به تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک ایجاد شده‌اند. مقاومت در این باکتری بیشتر از طریق ژن‌های متحرک انجام می‌شود[11]. امروزه نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی متعددی برای پیش‌گویی ژن‌های انتقال‌یافته با مکانیزم انتقال افقی طراحی شده‌اند و استفاده از آنها در حال گسترش است[12]. از جمله این نرم‌افزارها می‌توان به SIGI-[13]، HMM، IslandPath[14]، PAI-IDA[15]، Centroid[16]، Alien_Hunter[17]، MibolomeFinder[18]، IslandPick[19]، EDIG[20]، GIST[21] و IslandViewer[22] اشاره کرد.

مطالعه‌ای در بررسی ژن‌های انتقالی از باکتری به آرکی‌ها نشان داد که حدود ۱۵% ژن‌ها بین باکتری‌ها و آرکی‌ها انتقال افقی پیدا کرده است[5]. *آریستوتلیس* روش و نرم‌افزار جدیدی براساس مرزهای کدون برای بررسی انتقال افقی ژن‌ها طراحی کرد[12]. در روش‌های سنتی بیشتر روش‌های فیلوژنتیکی برای بررسی و مطالعه انتقال افقی استفاده می‌شد. در این روش‌ها از پارامترهایی همچون مقدار GC برای بررسی و انتقال ژن‌ها استفاده می‌شود. در مورد باکتری *E. coli* نیز براساس قالب خوانش ژن (ORF) انتقال افقی ژن بررسی شده است[23]. همچنین از درخت فیلوژنتیکی برای پیش‌گویی و پیش‌بینی انتقال افقی ژن‌ها در این باکتری استفاده شده است[24, 25]. بعضی فاکتورهای مهم مانند عناصر همجوار توالی (IS elements)، همجواری با tRNA **بوده** و همچنین سایز عناصر متحرک در انتقال ژن‌ها بسیار تاثیرگذار هستند. بیشتر روش‌های شناسایی عناصر متحرک ژنی براساس مقایسه توالی ژنی و ژنومی انجام می‌شوند[26]. ژن‌های زیادی مانند بسیاری از ژن‌های فاکتورهای رونویسی در باکتری *E. coli* شناسایی شده‌اند که توسط سیستم انتقال افقی منتقل شده‌اند[27, 28]. در بررسی‌هایی روی باکتری *E. coli*، نشان داده شده است که حدود ۷۵۵ ژن توسط انتقال افقی انتقال یافته‌اند. با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *اشریشیا کلی*، با بررسی و شناسایی انواع ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بررسی مکانیزم اثرات آنها در ایجاد مقاومت، به نظر می‌رسد که مطالعه و بررسی این ژن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار باشد و از آنجایی که منجر به ایجاد راهکارهای درمانی جدید می‌شود، ارزشمند است. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی PredictBias، ACLAME، Mobile Genetic Elements (MGEs) و PAI-IDA و همچنین پایگاهای اطلاعاتی SeqWord Genome به بررسی ژن‌های دخیل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *E. coli* پرداخته شد. نتایج نشان داد که بین ژن‌های ایجاد مقاومت بیشتر ژن‌های *aceK*، *uvrD*، *mdh*، *mutS*، *crr*، *gnd*، *pabB*، *gapA*، *trpC*، *icd*، *putP*، *polB* و *polA* از طریق انتقال افقی منتقل می‌شوند[29]. در این نرم‌افزارها بیشتر از الگوریتم‌هایی که براساس روابط نیاکان، میزان و وجود توالی خاص در ابتدا و انتهای ژن‌ها، بررسی مقدار GC در ژن‌ها و نقاط داغ در انتقال ژن‌ها هستند، استفاده می‌شود. نتایج حاصل از مطالعات‌های بیوانفورماتیکی با داده‌های آزمایشگاهی تایید شد.

مواد و روش‌ها

ژن‌های دخیل در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری *Escherichia coli*

در مطالعه حاضر، توالی‌های مورد نظر با استفاده از پایگاهای اطلاعات ژنومی همچون NCBIRefSeq استخراج شدند. به همین منظور داده‌ها و توالی با استفاده از BLAST و BLAST+ مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی مراحل سایت‌ها و توالی‌های مورد استفاده شش فرم خوانش ORFs ارزیابی شدند. از سایت PredictBias (www.davvbiotech.res.in/PredictBias) برای بررسی پیش‌گویی انتقال افقی ژنوم باکتری *E. coli* استفاده شد. اساس کار این سایت براساس درصد GC است[30]. همچنین از سایت ACLAME (http://aclame.ulb.ac.be) برای بررسی MGEs استفاده شد[31]. در این سایت از هر دو توالی DNA و پروتئین برای بررسی توالی‌های متحرک استفاده می‌شود. همچنین از نرم‌افزار Alien_Hunter برای امکان انتقال افقی توالی‌های مورد بررسی استفاده شد. پس از بررسی متون و پایگاه‌های اطلاعاتی ژن‌های دارای ارجحیت در انتقال افقی شامل *paa*، *sep A*، *elt*، *est B*، *fae G*، *tet A*، *sul 1*، *aadA*، *str A*، *str B*، *aac(3)*، *ast*، *A*، *dac*، *aid A*، *slt*، *B B*، *yc*، *cpx P*، *yqau*، *spx*، *dsbA*، *rmf*، *fad 2*، *efe U*، *yole H*، *dct A*، *mzr A*، *rai A*، *flhc*، *ycc A*، *mgl B*، *nha B*، *omp F*، *put P*، *sbm A*، *ycc A*، *tpp B*، *spy*، *cpx P*، *flhc*، *dsb A*، *Rmf*، *yde H*، *tet A*، *aadA1*، *Rai A*، *bla*، *SHV*، *sul 1*، *aac3*، *qnr*، *dfr A1*، *tet B*، *cmlA*، *ereA*، *blaCMY*، *sul2*، *bla-Tem*، *cat A1*، *qnr S*، *acc(3)*، *sul 3*، *qnr D*، *qnr C*، *qnr B*، *qnr A*، *qep A* و *aac6* هستند. همچنین توالی مربوط به ژن‌های repB، mobA، repA، repC، linB، sulII، strA، mobB، cI، cro، cII، strB، ant، mobC، mobC، mobA، mob، repB، mobC، aph(3')-I، strB، strA، catIII، repCsulII، repA، cac، repB، mobB، mobA و mobC در سایت ACLAME مورد بررسی قرار گرفت.

کشت باکتری *Escherichia coli*

باکتری اشریشیا کلی از نمونه‌های آلوده بیمارستانی تهیه شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و کشت روی پلیت نوترینت آگار و مشاهده جلای فلزی تایید شد. باکتری‌های مقاوم بیمارستانی و نمونه استاندارد باکتری (*E. coli* ATCC 25229) در محیط نوترینت براث به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C کشت داده شد. وسایل و محیط‌های کشت مورد نیاز برای انجام آزمایشات بعدی تحت فشار و دمای اتوکلاو و به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

سنجش حداقل غلظت مهاری (MIC)

محلول سدیم‌کلرید ۰/۹% برای تهیه رقت‌های باکتری از نیم مک‌فارلند تهیه و استریل شد. سپس از پیش‌کشت نیم مک‌فارلند تهیه شد. در پلیت ۹۶ خانه استریل ابتدا به چاهک‌ها ۱۰۰میکرولیتر محیط کشت اضافه و سپس از غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها در چاهک‌ها ۱۰۰میکرولیتر اضافه و با پیپتاژ و اضافه‌کردن به چاهک‌های بعدی رقت‌های مختلف تهیه شد. در مرحله بعد ۱۰۰میکرولیتر از رقت تهیه‌شده از نیم مک‌فارلند به هر چاهک اضافه شد. در چاهک‌های کنترل منفی فقط محیط کشت و در چاهک کنترل مثبت محیط کشت و باکتری اضافه شد. بعد از کشت ۱۸ساعته در انکوباتور شیکردار سنجش اثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بر روند رشد باکتری‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (BioTek؛ ایالات متحده) در ۶۳۰نانومتر بررسی شد. همچنین کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شدند.

تست آنتی‌بیوگرام

پس از کشت چمنی سویه‌های استاندارد و مقاوم در محیط نوترینت آگار و قراردادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، اگزاسیلین، سفتریاکسون، کانامایسین، نیومایسین و استرپتومایسین کشت باکتری به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شد. هاله مهار رشد باکتری‌ها نشان‌دهنده اثر مهاری آنتی‌بیوتیک‌ها است.

یافته‌ها

نتایج به‌صورت کلی در جدول ۱ آورده شده است. در این مطالعه برای بررسی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از سایت‌های PAIDB، PredictBias، Alien_Hunter و ACLAME استفاده شد. نتایج که بیشتر براساس درصد بازهای GC در این سایت‌ها مورد بررسی قرار گرفته است، تقریباً مشابه هستند. طبق جدول ۱ بیشتر ژن‌های شناسایی‌شده مربوط به سایت PAIDB و حدود ۳۱ مورد هستند که با مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *E. coli* ارتباط دارند.

نتایج حاصل از سایت PAIDB

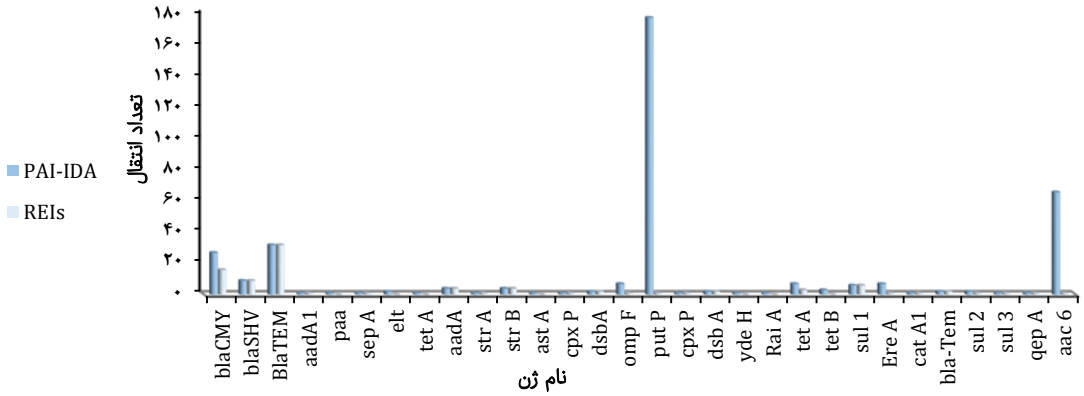
در بررسی انجام‌شده توسط نرم‌افزار PAIDB تعداد ۶۷ ژن مورد بررسی براساس جدول‌های مربوطه ارایه شد. نتایج مربوط به وجود و عدم وجود ژن‌های *PAIs* و *REIs* در نمونه‌های مطالعه بود[32]. در این سایت اطلاعات مربوط به ژن‌های مختلف از جمله جزایر بیماری‌زایی (*PAIs*) و جزایر مقاومت به آنتی‌بیوتیک (*REIs*) مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های *PAIs* شامل انواع مختلف ژن‌های موجود در باکتری‌های مختلف است که بیشتر می‌توان تیپ ۳ سیستم‌های ترشحی در باکتری *Pseudomonas syringae*، سوپر آنتی‌ژن در باکتری *Staphylococcus aureus*، فاکتورهای کلنی در *Vibrio cholerae* و توکسین‌های درونی در *E. coli* را نام برد. طبق نتایج، ژن *put P* با تعداد ۱۷۸ ژن مشابه احتمال انتقال بیشتری را نشان می‌دهد (نمودار ۱). ژن *aac 6* با ۶۶ توالی مشابه، دومین تعداد توالی مشابه را نشان می‌دهد که وجود این توالی‌های مشابه، دلیلی بر انتقال از گونه *E. coli* به گونه‌های دیگر و یا از گونه‌های دیگر به این باکتری است. در رده‌های دوم و سوم ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* که گاهی روی پلاسمید blaCMY قرار دارند را در دسته‌های ژنی *PAI* نشان داده است. در پلاسمید blaCMY در مجموع ۴۳ ژن شناسایی شده‌اند که قابلیت انتقال دارند. این در حالی است که در بررسی گروه‌های ژنی *REIs* در سایت PAIDB، ژن *blaTEM* بیشترین انتقال و blaCMY حدود ۱۶ ژن را نشان داد. ژن *put P* با بیشترین تعداد ژن در گروه ژنی *PAI* دارای میزان کمتری در گروه ژنی *REIs* است (جدول ۲).

نتایج بررسی سایت PredictBias

بررسی در PredictBias، تعدادی ژن مقاوم به آنتی‌فلاوین در باکتری *E. coli* را شناسایی کرد. پیش‌گویی توسط این نرم‌افزار نشان می‌دهد که بین ژن‌های *ECP-1340* تا *ECP-1346* احتمالاً نزدیک ۳ تا ۶ ژن وجود دارند. همچنین بین ژن‌های *ECP-2789* و *ECP-3458* نیز حدود ۲۹ ژن پیش‌گویی شد که محل دقیق این ژن‌ها برای مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیک مشخص نبود، اما با هومولوژی بالای ۸۰% احتمال اینکه مجموعه این ژن‌ها از یک جد مشترک باشند و یا اینکه در اثر انتقال افقی ایجاد شده باشند نیز وجود داشت.

جدول ۱) نتایج کلی مربوط به ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی در باکتری *E. coli* در سایت‌های مختلف

سایت	GC کل (درصد)	میزان GC مجموع ORF به کل GC ژنوم (درصد)	GC مجموع (درصد)	تعداد ژن‌های مورد بررسی	تعداد ژن‌های قابل شناسایی
PAIDB	۵۲/۶	۱۵/۳	۵۳/۲	۷۰	۳۲
PredictBias	۵۲/۴	۱۵/۵	۵۱	۶۶	۲۹
Alien-Hunter	۵۴	۱۶/۴	۵۳/۴	۵۷	۲۶
ACLAME	۵۱	۱۵/۴۵	۵۲/۱	۶۸	۲۹



نمودار ۱) آنالیز بیوانفورماتیکی انجام‌شده در سایت PAIDB روی ژن‌های جزایر بیماری‌زایی (PAIs) و جزایر مقاومت به آنتی‌بیوتیک (REIs) موجود در باکتری *E. coli* (با مشخصات ژنی جدول ۲)

جدول ۲) پیش‌گویی ژن‌های انتقال‌یافته در باکتری *Escherichia coli* در سایت PAIDB

اسامی ژن‌ها	*PAI*	*REIs*
blaCMY	۲۷	۱۶
blaSHV	۹	۹
BlaTEM	۳۲	۳۲
aadA1	۱	۱
paa	۱	صفر
sep A	۱	۱
elt	۲	صفر
tet A	۱	صفر
aadA	۴	۴
str A	۱	۱
str B	۴	۴
ast A	۱	صفر
cpx P	۱	۱
dsbA	۲	۲
omp F	۷	۱
put P	۱۷۸	۱
cpx P	۱	۱
dsb A	۲	۲
yde H	۱	صفر
Rai A	۱	صفر
tet A	۷	۳
tet B	۳	صفر
sul 1	۶	۶
Ere A	۷	۱
cat A1	۱	۱
bla-Tem	۲	۲
sul 2	۲	۱
sul 3	۱	۱
qep A	۱	۱
aac 6	۶۶	۱

بررسی در نرم‌افزار Alien-Hunter

در بررسی در نرم‌افزار Alien-Hunter نتایج حاصل حدود ۳۸۰ ژن از مجموع ۴۳۰۰ ژن *ORF* جزء *HGT* محسوب شدند که حدود ۱۰/۵% ژنوم است. ۱۵% این ژن‌های انتقال‌داده‌شده جزء ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. همچنین بررسی‌های بیشتر نشان داد که حدود ۵% ژن‌های منتقل‌شده در فرآیند مسیر انتقال پیام و اطلاعات ژنتیکی، ۸% در پروسه‌های سلولی، ۴/۸% در متابولیزم و ۶/۵% در مسیرهای مربوط به فرآیندهای تولید و انتشار نقش داشته‌اند.

نتایج سایت ACLAME

در این سایت بیشتر روی مدل‌های هم‌ردیفی همچون مدل‌های HMMER، NRDB-NCBI، Swiss-Prot و SCOP تمرکز می‌شود و بیش از ۱۶ توالی با عملکردهای مختلف که قابلیت انتقال دارند را شناسایی کرد. ۱۵ جایگاه ژنی که به‌عنوان پذیرنده ژن‌ها با قابلیت انتقال ژن‌های متحرک به‌صورت افقی که روی آنها وجود دارند و ۶ توالی MGE برای باکتری *E. coli* گزارش شده است که در ۴ گروه یا خانواده پروتئینی تقسیم‌بندی می‌شوند. در بررسی انجام‌شده روی MGE که در مقاومت دارویی در باکتری *E. coli* نقش دارد، میزان بالایی انتقال برای ژن‌های گروه *rep* دیده شد (جدول ۳ و شکل ۱). این ژن‌ها عمدتاً ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، استرپتومایسین، اگزاسیلین و سفتریاکسون هستند.

در این قسمت بیش از ۴۰۰ خانواده ژنی مختلف که در ارتباط با انتقال افقی ژنی بودند مورد بررسی قرار گرفت که از جمله می‌توان به ژن‌هایی که هم روی ژنوم باکتری و هم روی پلاسمید قرار دارند اشاره کرد (جدول ۳). خانواده مورد بررسی شامل پروتئین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سولفامیدها هستند. در جدول ۳ گروه‌های ژنی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مانند *rep* و *mob* ارایه شده‌اند که مقاومت بالایی دارند. نتایج حاصل از سایت ACLAME برای ژن‌های دارای قابلیت انتقال که مقاومت به آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهند در جدول ۳ آورده شده است. طبق نتایج، از ردیف ۱ تا ۱۹ بیشترین مقدار انتقال در خانواده‌های ژنی ۲۱۵، ۲۳۶ و ۶۷۹ وجود دارد. اندازه اکثر این ژن‌ها کمتر از ۱۰۰۰ نوکلئوتید است که براساس اصول احتمال انتقال افقی بیشتر برای توالی‌های با اندازه کوچکتر رخ می‌دهد (جدول‌های ۱ و ۳ و شکل ۱).

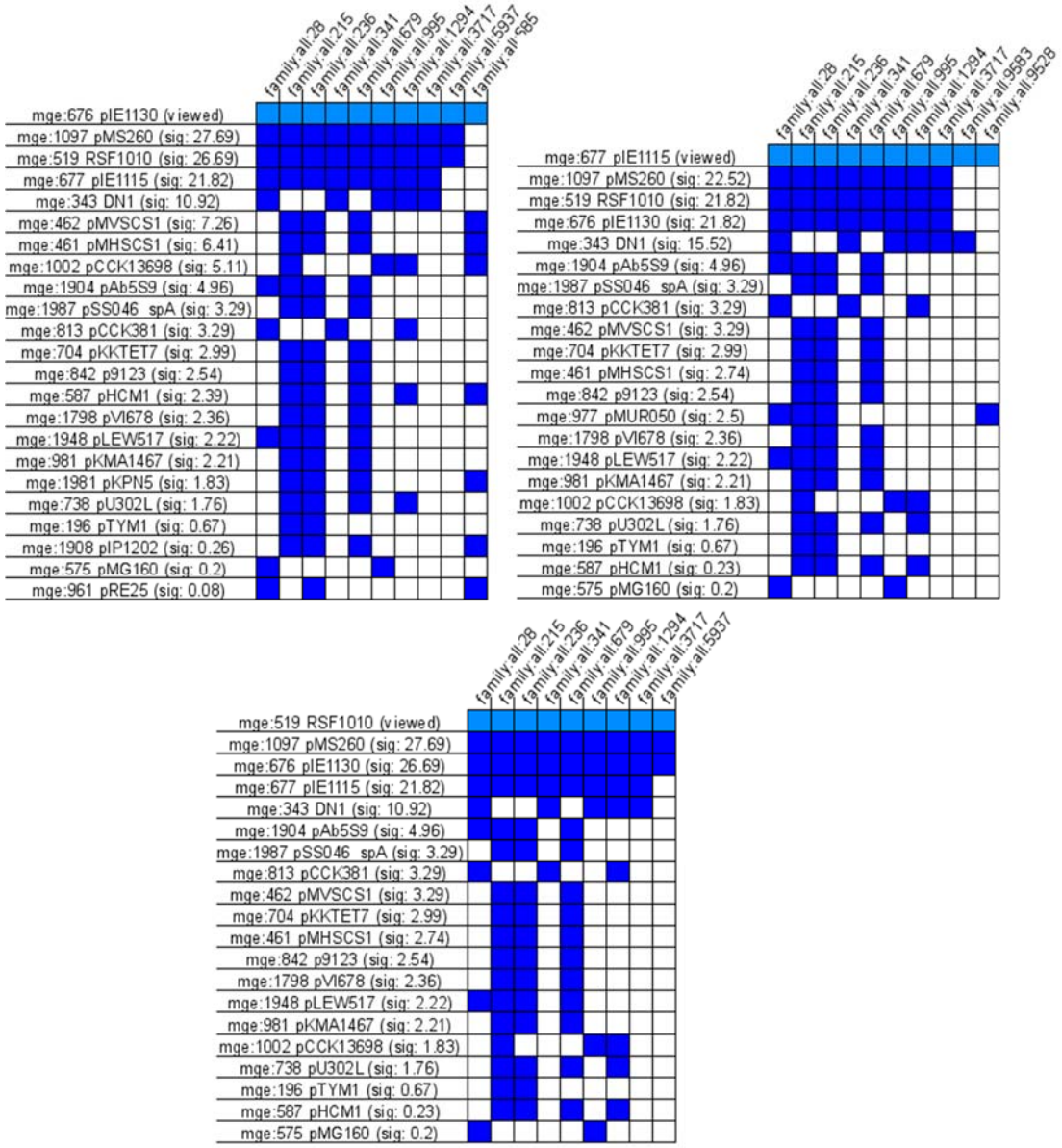
نتایج سنجش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های استاندارد و بیمارستانی

پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی و شناسایی ژن‌های ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها که با مکانیزم انتقال افقی انتقال پیدا می‌کنند، در شرایط آزمایشگاهی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها روی باکتری مقاوم بیمارستانی و استاندارد با دو روش سنجش قطر هاله برای آنتی‌بیوتیک‌های دیسکی و MIC برای آنتی‌بیوتیک‌های محلول سنجیده شد (شکل‌های ۲ و ۳). نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی نشانگر مقاومت بیشتر باکتری بیمارستانی نسبت به سویه استاندارد است (جدول‌های ۴ و ۵). همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دارای میزان بالای انتقال افقی بیشتر دیده شد. ژن‌های *blaSHV* و *blaTEM* که در بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیشترین ژن‌های انتقال‌یافته بودند در نتایج مقاومت‌سنجی در آزمایشگاه هم باعث مقاومت باکتری‌های مورد مطالعه شده‌اند.

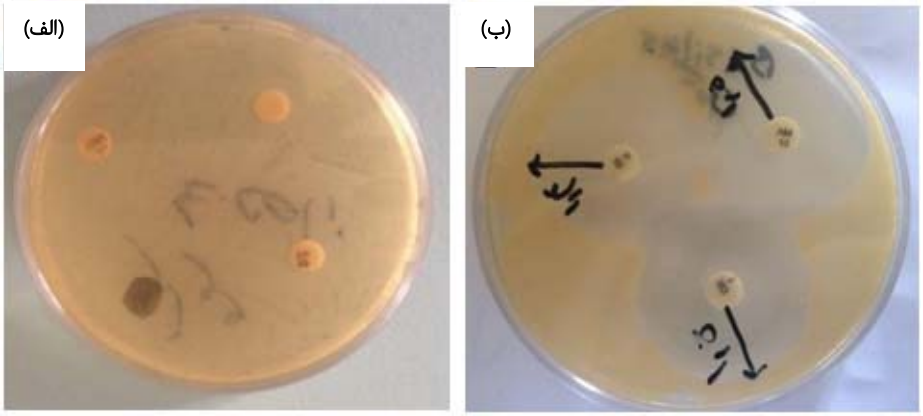
نتایج نمونه کشت‌شده نشان می‌دهد که در نمونه‌های بیمارستانی دارای ژن‌های *blaTEM* (که در آن ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین وجود داشت) میزان شعاع هاله مهار رشد باکتری استاندارد ۱/۴سانتی‌متر است (شکل ۲). در مورد آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و پنی‌سیلین مشاهده شد که این باکتری‌ها حامل ژن‌های مقاوم *blaSHV* و *blaCHV* روی پلاسمید blaCMY هستند (شکل ۳). در جدول ۴ آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های مسئول بروز مقاومت در برابر آنها ذکر شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود باکتری بیمارستانی در گذر زمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است. *blaCMY* حاوی تعداد زیادی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که در سایت‌های ACLAME و PredictBias با عنوان‌های *rep A* تا *C* گزارش شده است که در نتایج نمونه‌های آزمایشگاهی تست‌شده نیز وجود مقاومت می‌تواند دلیلی برای انتقال این ژن‌ها باشد (شکل ۲). همچنین شکل ۳ چهار نمونه مختلف باکتری *اشریشیا کلی* بیمارستانی را نشان می‌دهد که به همه آنتی‌بیوتیک‌ها به جز سفتریاکسون حساس بودند، هرچند برای سفتریاکسون نیز قطر هاله‌های متفاوتی نشان می‌دهند.

جدول ۳) نتایج حاصل از بررسی ژن‌های دخیل در مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *E. coli* در سایت ACLAME

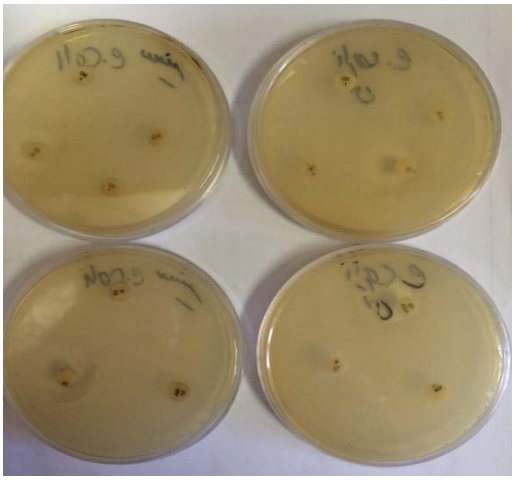
ردیف	نام ژن	اندازه	جایگاه ژنومی	نام در بانک ژن
۱	*mobC*	۲۷۳	458..730	**GenBank: GeneID:1449621**
۲	*mobA*	۲۱۱۲	913..3024	**GenBank: GeneID:1449619**
۳	*mobB*	۴۱۱	1661..2071	**GenBank: GeneID:1449620**
۴	*repB*	۹۷۸	2047..3024	**GenBank: GeneID:1449623**
۵	*cac*	۲۰۷	3080..3286	**GenBank: GeneID:1449629**
۶	*repA*	۸۴۰	3315..4154	**GenBank: GeneID:1449622**
۷	*repC*	۹۴۵	4042..4986	**GenBank: GeneID:1449624**
۸	*sulII*	۸۱۶	5875..6690	**GenBank: GeneID:1449627**
۹	*catIII*	۶۴۲	6757..7398	**GenBank: GeneID:1449618**
۱۰	*strA*	۸۰۴	7468..8271	**GenBank: GeneID:1449625**
۱۱	*strB*	۸۳۷	8271..9107	**GenBank: GeneID:1449626**
۱۲	*aph(3')-I*	۸۱۶	9443..10258	**GenBank: GeneID:1449628**
۱۳	*mobC*	۲۸۸	1..288	**GenBank: GeneID:874995**
۱۴	*mobA*	۲۱۱۲	470..2581	**GenBank: GeneID:874994**
۱۵	*mobB*	۴۱۱	1218..1628	**GenBank: GeneID:874998**
۱۶	*repB*	۹۵۷	1625..2581	**GenBank: GeneID:874996**
۱۷	*Undefined*	۲۳۷	2649..2885	**GenBank: GeneID:3251142**
۱۸	*repA*	۸۴۰	2951..3790	**GenBank: GeneID:874990**
۱۹	*repC*	۸۵۲	3777..4628	**GenBank: GeneID:874997**
۲۰	*linB-like*	۸۰۴	5161..5964	**GenBank: GeneID:874999**
۲۱	*sulII*	۸۱۶	7995..8810	**GenBank: GeneID:874991**
۲۲	*strA*	۸۰۴	8979..9782	**GenBank: GeneID:874993**
۲۳	*strB*	۸۳۷	9782..10618	**GenBank: GeneID:874992**
۲۴	*cI*	۷۰۷	10198..10902	**GenBank: GeneID:2641680**
۲۵	*cro*	۲۳۳	11016..11249	**GenBank: GeneID:2641656**
۲۶	*cII*	۲۹۶	11388..11684	**GenBank: GeneID:2641678**
۲۷	*ant*	۵۷۰	6060..6629	**GenBank: GeneID:4397465**
۲۸	*mobC*	۲۸۵	2767..3051	**GenBank: GeneID:2716948**
۲۹	*mobA*	۲۱۳۰	3250..5379	**GenBank: GeneID:2716949**
۳۰	*mobB*	۴۱۴	3998..4411	**GenBank: GeneID:2716942**
۳۱	*repB*	۹۷۲	4408..5379	**GenBank: GeneID:2716943**
۳۲	*mobC*	۲۸۵	2767..3051	**GenBank: GeneID:2716948**



شکل ۱) آنالیز انتقال ۴ گروه خانواده ژنی MGE در سایت ACLAME روی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری *E. coli* مانند آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، استرپتومایسین، اگزاسیلین و سفتریاکسون (براساس جدول ژنی شماره ۳)؛ نقاط آبی نشان‌دهنده شناسایی ژن‌های انتقال‌دهنده توسط نرم‌افزارهای سایت ACLAME که در زیر ستون گروه ژنی مشخص شده است، هستند.



شکل ۲) الف) باکتری بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اگزاسیلین و آمپی‌سیلین؛ ب) باکتری استاندارد *اشریشیا کلی* حساس به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اگزاسیلین و آمپی‌سیلین



شکل ۳) نمونه‌های بیمارستانی حساس به همه آنتی‌بیوتیک‌ها

جدول ۴) نتایج MIC برای آنتی‌بیوتیک‌های محلول

آنتی‌بیوتیک	مکانیزم	ژن‌های مقاومت	غلظت موثر در باکتری استاندارد (میکروگرم)	غلظت موثر در باکتری بیمارستانی
جنتامایسین	پروتئین‌سازی	*Acc(3)*	۵	مقاوم
آمیکاسین	پروتئین‌سازی	-	۰/۷۵	۷/۵
سیپروفلوکساسین	آسیب به DNA	*qnrB ،qnrS ،qnrD ،qnrC*	۰/۷۵	۰/۷۵
کوآموکسی‌کلاو	دیواره	*blaSHV* و *blaCMY*	۰/۷۵	۷/۵
اریترومایسین	پروتئین‌سازی	*Ere(A)*	۳۰	۴۰
سفتراکس	دیواره	*blaSHV ،blaCMY*	۰/۳۲۵	۷

جدول ۵) سنجش قطر هاله دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی

آنتی‌بیوتیک	مکانیزم	ژن‌های مقاومت	هاله در باکتری استاندارد	هاله در باکتری بیمارستانی
سفوتاکسیم	دیواره	*blaSHV ،blaCMY*	۱/۵	۱/۱
اگزاسیلین	دیواره	*blaCMY ،blaSHV*	۱	-
پنی‌سیلین	دیواره	*blaCMY ،blaCHV*	۱/۱	-
آمپی‌سیلین	دیواره	*BlaTEM*	۱/۴	-
نئومایسین	پروتئین‌سازی	-	۱/۳	۱
استرپتومایسین	پروتئین‌سازی	*aadA1*	۱	-
کاناماسین	پروتئین‌سازی	-	۱/۱	-
سفتریاکسون	دیواره	-	۱/۸	۱/۲

بحث

برآوردها نشان می‌دهند حدود ۱۷% ژنوم باکتری *E .coli* با استفاده از انتقال افقی انتقال پیدا کرده است[33]. بیشتر این ژن‌ها مربوط به متابولیزم، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و همزیستی هستند[34]. MGE از طریق عناصر القایی در عملکرد ژن‌ها تغییر ایجاد می‌کند. انتقال بیشتر مربوط به توالی‌هایی با درصد بیشتر بازهای GC و همچنین کدهای ژنتیکی ترجیحی، توالی‌های ترجیحی اسیدآمینه و جایگاه‌های خاص ژن‌ها روی ژنوم پیش‌گویی می‌شود[35]. از نرم‌افزارهای مختلف برای پیش‌گویی براساس میزان بازهای GC استفاده می‌شود که می‌توان به SIGI-HMM[13]، IslandPath[14]، PAI-IDA[15]، Centroid[16]، Alien_Hunter[17]، MibolomeFinder[18]، IslandPick[19]، EDIG[20]، GIST[21] و IslandViewer[22] اشاره کرد.

REIs و *PAIs* جایگاه‌های بسیار مهمی روی ژنوم هستند که در مراحل مختلف انتقال افقی ژن‌ها و همچنین تکامل باکتری‌ها نقشی اساسی دارند[9]. ژن‌های زیادی مانند ژن‌های فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های انتقال‌دهنده اسیدآمینه‌ها همچون *putp* در باکتری *E. coli* شناسایی شده‌اند که توسط سیستم انتقال افقی منتقل شده‌اند[27, 28]. در بررسی‌هایی روی این باکتری، نشان داده شده است که حدود ۷۵۵ ژن توسط انتقال افقی انتقال یافته‌اند. نتایج انتقال افقی برای بعضی ژن‌های مقاومت در باکتری *E. coli* می تواند نقش مهمی در متابولیزم میزبان و باکتری‌های پذیرنده ژن‌ها داشته باشد. پروتئین put P که به‌عنوان عامل انتقال‌دهنده پرولین در دیواره سلولی باکتری *E. coli* است[36]، بیشترین میزان انتقال را به خود اختصاص داده است. ژن *aac 6* یکی از ژن‌های مهم در ارتباط با آنتی‌بیوتیک کینولون در این باکتری است که با

انتقال به ۶۶ گروه ژنی نقش بسیار زیادی در مقاومت سایر گونه‌ها داشته است. عمدتاً ژن *aac 6* به‌صورت گروه‌های ژنی (کلاسترهای ژنی) و از طریق ژن‌های Ib-cr، qepA، qnrS1، qnrB6 و qnrB4 می‌تواند نقش مقاومت به آنتی‌بیوتیک را ایفا کنند[37]. وجود ژن‌های *blaTEM* در ۸۸% ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌خصوص آمپی‌سیلین در باکتری‌های *E. coli* گزارش شده است. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی مطالعه حاضر نیز در تایید این موضوع نشان داد که حدود ۳۵ گروه ژنی *REIs* و *PAI*، با ژن *blaTEM* در سایت PAIDB مشابهت دارند. حدود ۲۵ سویه *E. coli* دارای مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین هستند[38, 39]. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *put P* با بیشترین تعداد ژن در گروه ژنی *PAI* میزان کمتری را در گروه ژنی *REIs* دارد. همچنین در این بررسی در سایت PredictBias تعدادی ژن مقاوم به آنتی‌فلاوین در باکتری *E. coli* بین ژن‌های *ECP-1340* تا *ECP-1346* و همچنین بین ژن‌های *ECP-2789* و *ECP-3458* پیش‌گویی شد که با بررسی نتایج همولوژی بالای ۸۰% در این جایگاه احتمال اینکه مجموعه این ژن‌ها از یک جد مشترک باشند و یا اینکه در اثر انتقال افقی ایجاد شده باشند نیز وجود دارد. استفاده از نرم‌افزارهای مختلف به‌منظور تایید انتقال افقی یک ژن یا مجموعه‌ای از ژن‌ها بسیار مفید است. امر قابل توجه این است که با وجود اینکه هر نرم‌افزار با استفاده از پارامترهای مختلفی داده‌ها را آنالیز می‌کند، اما نتایج می‌توانند یکسان باشند. یکی از نرم‌افزارهای دیگری که مورد مطالعه قرار گرفت Alien-Hunter بود که حدود ۳۸۰ ژن (حدود ۱۰/۵% ژنوم) به جز *HGT* را محاسبه کرد که می‌تواند به‌دلیل حساسیت بالای این نرم‌افزار و همچنین بررسی و محاسبه بیش از پنج پارامتر باشد. نتایج نشان داد که مقدار قابل ملاحظه‌ای از مجموع این ژن‌ها مربوط به ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. همچنین در مجموع ۲۴/۳% موارد انتقالی مربوط به پروسه‌های انتقال پیام و اطلاعات ژنتیکی، پروسه‌های سلولی، متابولیزم، فرآیندهای تولید و انتشار و مکانیزم اساسی سلولی هستند که می‌توانند در فرآیندهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مهمان و میزبان نقش بیشتری داشته باشند. بررسی‌های سایت ACLAME که بیشتر روی مدل‌های هم‌ردیفی مانند HMMER، NRDB-NCBI، Swiss-Prot و SCOP تمرکز دارد و شناسایی توالی‌های مشابه را در گونه‌های مختلف در نظر می‌گیرد، بیش از ۱۶ توالی را شناسایی کرد. ۶ توالی MGE در میزبان‌های مختلف که جزء ۴ گروه پروتئینی و عمدتاً ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند و همچنین امکان انتقال انواع ژن‌ها به‌صورت افقی را دارند برای باکتری *E. coli* مشاهده شد. با توجه به بررسی‌های بیشتر در سایت ACLAME می‌توان بیش از چندین خانواده ژنی مختلف که در ارتباط با انتقال افقی ژنی بودند را مشاهده کرد. از جمله می‌توان به ژن‌هایی که هم روی ژنوم باکتری و هم روی پلاسمید قرار دارند اشاره کرد. ژن‌های روی پلاسمیدها مانند *blaCMY* در سایت PredictBias با بیش از ۶۶ مورد از ژن‌های قابل انتقال شناسایی شدند. بررسی ژن‌ها در ACLAME برای ژن‌های ردیف ۱ تا ۱۹ بیشترین مقدار انتقال را نشان می‌دهد که عمدتاً اندازه این ژن‌ها کمتر از ۱۰۰۰ نوکلئوتید است و براساس اصول احتمال امکان انتقال افقی بیشتری را نشان می‌دهد. در هر دو سایت ACLAME و PredictBias تعداد زیادی ژن repA، repB و repC روی پلاسمیدهای blaCMY مشاهده شد[39] که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است و در نتایج پیش‌گویی مطالعه حاضر نیز تایید شد. همچنین نتایج سنجش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری استاندارد و بیمارستانی بعد از بررسی‌های بیوانفورماتیکی و شناسایی ژن‌های ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها که با مکانیزم انتقال افقی انتقال پیدا می‌کنند نشانگر مقاومت بیشتر باکتری بیمارستانی نسبت به سویه استاندارد بود و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که میزان بالایی انتقال افقی را نشان می‌دهند بیشتر دیده شد. ژن‌های*blaSHV*، *blaCMY* و *blaTEM* که در بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیشترین ژن‌های انتقال‌یافته بودند عمدتاً ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی هستند که از تخریب دیواره جلوگیری می‌کنند. نهایتاً می‌توان ادعا کرد که از آنجایی که درصد انتقال ژن‌های دخیل در مقاومت در سایت‌های بیوانفورماتیکی قابل توجه است، باکتری *E. coli* در گذر زمان از طریق روش‌های مختلفی شامل انتقال افقی و جهش، مقاومت کسب کرده و روز به روز به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم شده است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ملایر به‌دلیل حمایت از طرح تحقیقاتی اعلام می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: نویسندگان نهایت تلاش خود در ارایه صحیح داده‌ها در جهت اخلاق حرفه‌ای علمی را کرده‌اند.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سعیده قیاسوند (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ اکبر واثقی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰%)؛ فیروزه علویان (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰%)

منابع مالی: معاونت پژوهشی دانشگاه ملایر حمایت مالی این طرح تحقیقاتی را بر عهده داشته است.

منابع

1- Levine MM. Escherichia coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis. 1987;155(3):377-89.

2- Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN, Sentry APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: Regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-99). Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;42(3):193-8.

3- Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol. 2000;54(1):641-79.

4- Crisp A, Boschetti C, Perry M, Tunnacliffe A, Micklem G. Expression of multiple horizontally acquired genes is a

hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes. Genome Biol. 2015;16(1):50.
5- Garcia-Vallvé S, Romeu A, Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. Genome Res. 2000;10(11):1719-25.
6- Whitaker JW, McConkey GA, Westhead DR. The transferome of metabolic genes explored: Analysis of the horizontal transfer of enzyme encoding genes in unicellular eukaryotes. Genome Biol. 2009;10(4):R36.
7- Moran Y, Fredman D, Szczesny P, Grynberg M, Technau U. Recurrent horizontal transfer of bacterial toxin genes to eukaryotes. Mol Biol Evol. 2012;29(9):2223-30.
8- Coelho MA, Gonçalves C, Sampaio JP, Gonçalves P. Extensive intra-kingdom horizontal gene transfer converging on a fungal fructose transporter gene. PLos Genet. 2013;9(6):e1003587.
9- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417-33.
10- Čižman M. The use and resistance to antibiotics in the community. Int J Antimicrob Agents. 2003;21(4):297-307.
11- Sáenz Y, Brinas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(10):3996-4001.
12- Tsirigos A, Rigoutsos I. A new computational method for the detection of horizontal gene transfer events. Nucleic Acids Res. 2005;33(3):922-33.
13- Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C, Fricke WF, et al. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. BMC Bioinform. 2006;7(1):142.
14- Hsiao W, Wan I, Jones SJ, Brinkman FS. IslandPath: Aiding detection of genomic islands in prokaryotes. Bioinformatics. 2003;19(3):418-20.
15- Tu Q, Ding D. Detecting pathogenicity islands and anomalous gene clusters by iterative discriminant analysis. FEMS Microbiol Lett. 2003;221(2):269-75.
16- Rajan I, Aravamuthan S, Mande SS. Identification of compositionally distinct regions in genomes using the centroid method. Bioinformatics. 2007;23(20):2672-7.
17- Vernikos GS, Parkhill J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: Revisiting the Salmonella pathogenicity islands. Bioinformatics. 2006;22(18):2196-203.
18- Ou HY, He X, Harrison EM, Kulasekara BR, Thani AB, Kadioglu A, et al. MobilomeFINDER: Web-based tools for in silico and experimental discovery of bacterial genomic islands. Nucleic Acids Res. 2007;35(suppl-2):W97-104.
19- Langille MG, Hsiao WW, Brinkman FS. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. BMC Bioinform. 2008;9(1):329.
20- Che D, Hasan MS, Wang H, Fazekas J, Huang J, Liu Q. EGID: An ensemble algorithm for improved genomic island detection in genomic sequences. Bioinformation. 2011;7(6):311.
21- Hasan MS, Liu Q, Wang H, Fazekas J, Chen B, Che D. GIST: Genomic island suite of tools for predicting genomic islands in genomic sequences. Bioinformation. 2012;8(4):203.
22- Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, et al. IslandViewer 3: More flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res. 2015;43(W1):W104-8.
23- Ragan MA. On surrogate methods for detecting lateral gene transfer. FEMS Microbiol Lett. 2001;201(2):187-91.
24- Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. Mol Biol Evol. 2002;19(12):2226-38.
25- Olendzenski L, Zhaxybayeva O, Gogarten JP. What's in a tree? Does horizontal gene transfer determine microbial taxonomy?. In: Seckbach J, editor. Symbiosis: Mechanisms and model systems. Dordrecht: Springer; 2001. pp. 65-79.
26- Langille MG, Hsiao WW, Brinkman FS. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):373-82.
27- Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol. 2005;3(9):711-21.
28- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in Escherichia coli. Genome Biol. 2008;9(1):R4.
29- Taoka M, Yamauchi Y, Shinkawa T, Kaji H, Motohashi W, Nakayama H, et al. Only a small subset of the horizontally transferred chromosomal genes in Escherichia coli are translated into proteins. Mol Cell Proteom. 2004;3(8):780-7.
30- Pundhir S, Vijayvargiya H, Kumar A. PredictBias: A server for the identification of genomic and pathogenicity islands in prokaryotes. Silico Biol. 2008;8(3,4):223-34.
31- Leplae R, Hebrant A, Wodak SJ, Toussaint A. ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements. Nucleic Acids Res. 2004;32(suppl-1):D45-9.
32- Yoon SH, Park YK, Kim JF. PAIDB v2.0: Exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. Nucleic Acids Res. 2015;43(D1):D624-30.
33- Zhang R, Zhang CT. A systematic method to identify genomic islands and its applications in analyzing the genomes of Corynebacterium glutamicum and Vibrio vulnificus CMCP6 chromosome I. Bioinformatics. 2004;20(5):612-22.
34- De Brito DM, Maracaja-Coutinho V, De Farias ST, Batista LV, Do Rêgo TG. A novel method to predict genomic islands based on mean shift clustering algorithm. PLos One. 2016;11(1):e0146352.
35- Greub G, Collyn F, Guy L, Roten CA. A genomic island present along the bacterial chromosome of the Parachlamydiaceae UWE25, an obligate amoebal endosymbiont, encodes a potentially functional F-like conjugative DNA transfer system. BMC Microbiol. 2004;4(1):48.
36- Bracher S, Schmidt CC, Dittmer SI, Jung H. Core transmembrane domain 6 plays a pivotal role in the transport cycle of the sodium/proline symporter PutP. J Biol Chem. 2016;291(50):26208-15.
37- Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. qnr, aac (6)-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and Klebsiella spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):886-97.
38- Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of the bla TEM gene and bla TEM-containing transposons in commensal Escherichia coli. J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):745-51.
39- Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C, Fricke WF, et al. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. BMC Bioinform. 2006;7(1):142.