Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Frequency of *bla*$_{TEM}$ ،*bla*$_{SHV}$, and *bla*$_{CTX-M}$ genes encoded extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates collected from groundwater in East Azerbaijan province in 2014.

Naeimeh Shabani lokarani, Jalal Shayegh, Javid Sadeghi*

[1]Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
[2]Department of Microbiology, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
[3]Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: sadeghij@tbzmed.ac.ir

Received: 15 November 2015 Accepted: 26 January 2016 First Published online: 29 April 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July; 40(2):57-63

Abstract

Background: *Escherichia coli* is considered as the indicator of microbial contamination of water all over the world. This bacterium is able to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) that is due to antibiotic resistance. Among them TEM, SHV and CTX-M are more abundant than others. The aim of this study was to determine the prevalence of beta-lactamase genes of *E. coli* isolated from qanats and springs.

Methods: Totally, 23 *E. coli* were isolated and identified by biochemical tests from 118 water sources in the East Azarbaijan province. In order to identify ESBLs by phenotypic methods, ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime clavulanic acid, cefotaxime clavulanic acid antibiotic disks were used. In the next step *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ and *bla*$_{CTX-M}$ genes were detected in the isolates by PCR method.

Results: Phenotypic methods showed only 2(9%) isolates were ESBL producer, while genotypic methods revealed that 9(39%), 10(43%) and 14(61%) isolates harbored *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ and *bla*$_{CTX-M}$, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the high prevalence of beta-lactamase resistance among *E. coli* strains isolated from ground water sources. This is due to the spread of antibiotic resistance among pathogenic strains of *E. coli* with water sources.

Keywords: *E. coli, groundwater, bla*$_{TEM}$ ،*bla*$_{SHV}$ ، *bla*$_{CTX-M}$

How to cite this article: Shabani lokarani N, Shayegh J, Sadeghi J. [Frequency of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes encoded extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolates collected from groundwater in East Azerbaijan province in 2014]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July;40(2):57-63. Persian.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

میزان فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری‌شده از آب‌های زیرزمینی استان آذربایجان‌شرقی در سال ۱۳۹۳

نعیمه شعبانی لکرانی[۱]، جلال شایق[۲]، جاوید صادقی[۳*]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، اهر، ایران
[۲]گروه میکروبیولوژی دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی شبستر، شبستر، ایران
[۳]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[*]نویسنده مسؤول؛ ایمیل: sadeghij@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۸ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۲/۹
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ خرداد و تیر؛ ۴۰(۲):۵۷-۶۳

چکیده

زمینه: باکتری *اشرشیاکلی* در سراسر جهان به عنوان شاخص میکروبی آب در نظر گرفته می‌شود. این باکتری قادر به تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف است که منجر به بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود و از میان ژن‌های مختلف دخیل در این نوع مقاومت، ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} فراوانی بیشتری دارند. هدف از این تحقیق تعیین میزان فراوانی مقاومت بتالاکتامازی باکتری‌های *اشرشیاکلی* جداشده از چشمه‌ها و قنات‌ها است.

روش‌کار: از تعداد ۱۱۸ منبع آب زیرزمینی آذربایجان‌شرقی ۲۳ ایزوله‌ی *اشرشیاکلی*، جداسازی و توسط آزمایش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی شد. جهت تعیین ESBLs به روش فنوتیپی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم، سفتازیدیم کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم، سفوتاکسیم کلاولانیک اسید استفاده شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از روش PCR حضور ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} در ژنوم هر یک از ایزوله‌ها تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج فنوتیپی حاصل از این مطالعه نشان داد که تنها ۲ (۹٪) ایزوله دارای مقاومت از نوع ESBL بودند، این در حالی است که در بررسی ژنوتیپی تعداد ۹ ایزوله (۳۹٪) دارای ژن bla_{TEM}، ۱۰ ایزوله (۴۳٪) حاوی ژن bla_{SHV} و ۱۴ ایزوله (۶۱٪) حاوی ژن bla_{CTX-M} در ژنوم خود بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه درصد بالای مقاومت بتالاکتامازی را در بین سویه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از منابع آبی زیرزمینی نشان می‌دهد. این مسئله می‌تواند منجر به گسترش این نوع مقاومت در میان سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* با منشاء منابع آبی گردد.

کلید واژه‌ها: *اشرشیاکلی*، آب‌های زیرزمینی، ژن bla_{TEM}، ژن bla_{SHV}، ژن bla_{CTX-M}

نحوه استناد به این مقاله: شعبانی لکرانی ن، شایق ج، صادقی ج. میزان فراوانی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری شده از آب‌های زیرزمینی استان آذربایجان‌شرقی در سال ۱۳۹۳. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۲):۵۷-۶۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

حضور باکتری *اشرشیاکلی* در آب‌ها عموماً به سطح شهرنشینی، عوامل انسانی و حیوانی، آب و هوایی و نیز میزان بارش باران بستگی دارد. در بررسی میکروبی، حضور *اشرشیاکلی* شاخص قابل‌اطمینان از آلودگی مدفوعی آب است و خطر ابتلا به بیماری‌های منتقله از راه آب را نشان می‌دهد (۱). *اشرشیاکلی* یک پاتوژن فرصت‌طلب از خانواده‌ی *انتروباکتریاسه* است و اغلب عفونت‌هایی مانند عفونت‌های کلیوی، مثانه، زخم، ریه و منژها را ایجاد می‌کند. بسیاری از سویه‌های *اشرشیاکلی* حدت پایینی دارند اما می‌توانند به‌صورت فرصت‌طلبانه در خارج از دستگاه گوارش موجب بروز بیماری‌های دستگاه ادراری و غدد پستانی گردند و در عفونت‌های زخم، پنومونی، منژیت و سپتی‌سمی شرکت کنند (۴، ۳، ۲). در میان جمعیت‌های *اشرشیاکلی* مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شایع بوده و در اثر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است (۶و۵). مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف است و یکی از این مکانیسم‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی در باکتری‌هاست. بتالاکتامازها، مهم‌ترین و وسیعترین آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ای هستند که به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حمله‌ور شده و باکتری را در برابر آن حفاظت می‌کنند (۷). در *اشرشیاکلی* آنزیم‌های بتالاکتامازی ضعیف به‌وسیله‌ی مهارکننده‌های بتالاکتامازی، مانند کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (۸). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های TEM, (Sulphydryl Variable) (Temoniera) SHV, CTX-M (Cefotaxime) اشاره کرد که اکثراً در گونه‌های *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده می‌شوند (۹). بروز جهش‌های نقطه‌ای در سکانس اسیدآمینه‌ای بتالاکتامازهای اولیه باعث پیدایش آنزیم‌های وسیع‌الطیف تحت عنوان extended spect rum beta lactamases (ESBLs) شده است. این آنزیم‌ها ابتدا در سال ۱۹۸۰ تشخیص داده شدند که بیشتر از نوع TEM و SHV بودند و از جهش‌های نقطه‌ای آنزیم‌های اصلی که وسیع‌الطیف نبودند ایجاد شده‌اند. ژن‌های تولیدکننده‌ی آنزیم TEM طیف اثر وسیعی بر روی پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها دارند (۱۰،۱۱). بتالاکتاماز CTX-M ارتباط ژنتیکی کمی با اعضاء بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند ولی نظریاتی دال بر مشتق بودن این آنزیم‌ها از یک گونه وجود دارد (۱۲،۱۳). گسترش افقی ژن‌های آنزیم‌های CTX-M در میان اعضای *انتروباکتریاسه* توسط پلاسمیدها صورت می‌گیرد (۱۴) و برخلاف TEM و SHV اثر تخریبی بیشتری بر روی سفوتاکسیم نسبت به سفتازیدیم دارند (۱۵). تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف باعث بروز و انتشار مقاومت‌های چندگانه شده و امکان استفاده از داروهای ضدمیکروبی مفید و مناسب را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهند. هدف این مطالعه، بررسی باکتری *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های زیرزمینی از نظر تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف که به‌عنوان بزرگ‌ترین فاکتور خطر در مخاطرات بهداشت عمومی است می‌باشد. بدین منظور برای دستیابی به میزان تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز تیپ TEM، SHV و CTX-M که از ژن‌های بتالاکتامازی شایع در *اشرشیاکلی*‌ها است مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌کار

در این مطالعه از ۱۱۸رشته چاه و قنات از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی نمونه برداری شده و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، حداکثر در عرض ۲۴ ساعت بر اساس تخمیر لاکتوز به روش سه لوله‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور از هر نمونه به مقدار ۱۰ و ۱ و ۰/۱ سی‌سی به ترتیب در لاکتوز براث ۱۰ و ۵ و ۵ سی‌سی تلقیح شده و به انکوباتور با دمای ۳۶/۵ °c به مدت ۲۴–۴۸ ساعت منتقل شد.تعداد ۵۷ نمونه لاکتوز مثبت پس از کشت بر روی محیط کشت EMB تحت مجموعه آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی، نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، MR /VP، SIM، لیزین دکربوکسیلاز آگار قرارگرفتند و با استفاده از جدول استاندارد و خصوصیات ظاهری، باکترهای *اشرشیاکلی* شناسایی شدند و در ادامه ایزوله‌های *اشرشیاکلی* شناسایی شده بر روی پلیت محیط کشت (BHI Brain Heart Infusion) آگار به صورت خطی کشت داده شدند. ایزوله‌های به دست آمده جهت انجام آزمایشات و تجزیه و تحلیل PCR در گلیسرول ۳۰٪ در دمای ۷۰ °c– نگهداری شد. جهت بررسی حضور آنزیم‌های ESBLs به روش فنوتیپی با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد از دیسک‌های ترکیبی استفاده شد، در این روش ایزوله‌هایی که دارای اختلاف قطر هاله‌ی عدم رشد پنج میلی‌متر و یا بیشتر در اطراف دیسک‌های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید و یا سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید هستند به عنوان باکتری‌های تولید کننده ESBL مشخص می‌شوند. در ایزوله‌های مقاوم به سفتازیدیم (۳۰µg)، دیسک ترکیبی سفتازیدیم کلاولانیک اسید (۳۰+۱۰ µg)، و در ایزوله‌های مقاوم به سفوتاکسیم (۳۰µg) دیسک ترکیبی سفوتاکسیم کلاولانیک اسید (۳۰+۱۰ µg) تهیه شده از شرکت Rosco دانمارک مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون، با استفاده از دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند از تمامی ایزوله‌ها تهیه و به وسیله‌ی سواپ پنبه‌دار در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید و سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید به فاصله ۲/۵ سانتیمتر (مرکز به مرکز) بر روی محیط کشت قرار داده شدند و به مدت ۲۰–۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °c انکوبه گردیدند. هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شدند (۱۶). در ادامه

جهت شناسایی ژن‌های *bla* $_{TEM}$، *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$ ایزوله‌ها پس از استخراج DNA از پرایمری‌هایی با مشخصات مطابق جدول (۱) PCR به عمل آمد واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به صورت مولتی پلکس در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۴ میکرومولار و DNA استخراج‌شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ی پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰دقیقه، ۳۵ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، طویل سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه‌ی طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. از ژل آگارز ۱٪ و سایز مار کر ۱۰۰جفت بازی برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده شد (۱۷). فراوانی هر یک از ژن‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۶ تعیین شد.

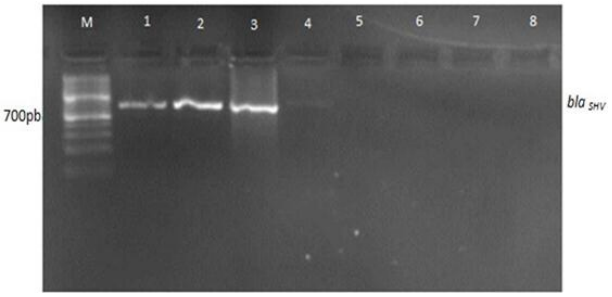
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی ژنهای *bla*$_{TEM}$ *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$

نام	اندازه محصول	توالی پرایمر (´۳– ´۵)	مسیر پرایمر	منبع
TEM	۸۰۰	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	Forward	۱۷
		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	Revers	
SHV	۷۱۳	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	Forward	۱۷
		ATCCCGCAGATAAATCACCAC	Revers	
CTX-M	۶۸۸	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	Forward	۱۷
		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	Revers	

جدول ۲: فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی *bla*$_{TEM}$ *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$ در ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری شده از چشمه‌ها و قنات‌ها

ژن ایجادکننده‌ی مقاومت	تعداد (درصد) آلودگی به تفکیک منبع آبی		
	چشمه	قنات	مجموع
bla$_{TEM}$	۳(۳۳٪)	۶(۶۷٪)	۹(۳۹٪)
bla$_{SHV}$	۲(۲۰٪)	۸(۸۰٪)	۱۰(۴۳٪)
bla$_{CTX-M}$	۴(۲۹٪)	۱۰(۷۱٪)	۱۴ (۶۱٪)
bla$_{TEM}$ و *bla* $_{CTX-M}$ و *bla*$_{SHV}$	۰(۰٪)	۳(۱۸٪)	۳(۱۸٪)

شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR ژن‌های *bla*$_{TEM}$ و *bla* $_{CTX-M}$ ، ستون M نشان دهنده‌ی مارکر ۱۰۰ جفت باز و شماره‌های۸ –۱ ردیف بالا متعلق به در ایزوله-های اشرشیاکلی است.



شکل(۲): الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR ژن blaSHV، ستون M نشان دهنده-ی مارکر ۱۰۰ جفت باز و شماره‌های ۳ –۱ نشانگر وجود ژن blaSHV و شماره‌های ۸– ۴ نشانگر عدم وجود ژن مذکور در ایزوله‌های *اشرشیاکلی* است.

یافته‌ها

مجموعه آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که از تعداد ۵۷ نمونه‌ی لاکتوز مثبت ۲۳ ایزوله، *اشرشیاکلی* بود. که تست‌های فنوتیپی انجام شده تنها ۲ ایزوله (۹٪) به‌عنوان بتالاکتاماز وسیع‌الطیف شناسایی شد که متعلق به قنات‌ها بودند. ولی در بررسی ژنوتیپی مطابق شکل‌های ۱ و۲ با استفاده از نرم افزارspss فراوانی و درصد حضور هر یک از ژن‌های *bla*$_{TEM}$ ، *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$ به تفکیک چشمه و قنات نشان داد که ۹ مورد (۳۹٪) از ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ژن *bla*$_{TEM}$ بودند که از این تعداد ۳ مورد (۳۳٪) متعلق به چشمه‌ها و۶ مورد (۶۷٪) مربوط به قنات‌ها بودند. ژن *bla*$_{SHV}$ در ۱۰ مورد (۴۳٪) از ایزوله‌های مورد مطالعه یافت شد که از این تعداد ۲ مورد (۲۰٪) متعلق به چشمه‌ها و ۸ مورد (۸۰٪) مربوط به قنات‌ها بودند. تعداد ۱۴ مورد (۶۱٪) از ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ژن *bla* $_{CTX-M}$ بودند که از این تعداد ۴ مورد (۲۹٪) متعلق به چشمه‌ها. و ۱۰ مورد (۷۱٪) مربوط به قنات‌ها بود. در هیچ‌کدام از ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از چشمه‌ها هر سه ژن *bla*$_{TEM}$ ، *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$ مشاهده نشدند اما ۳ مورد (۱۸٪) از ایزوله‌های جداشده از قنات‌ها، حاوی هر سه ژن *bla*$_{TEM}$ ، *bla*$_{SHV}$ و *bla*$_{CTX-M}$ بودند که به تفضیل در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

ژن‌های بتالاکتاماز در باکتری‌های تولیدکننده ESBL، یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ازجمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف هستند. ارگانیسم‌هایی که این ژن‌ها را در خود حمل می‌کنند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ‌ومیر در بین افراد می‌شوند (۱۸). تا اواخر سال ۱۹۹۹ اغلب ESBLهای جداشده از بیماران شامل SHV و TEM بودند اما در مطالعات اخیر، CTX-M بتالاکتاماز وسیع‌الطیف غالب جداشده از بیماران می‌باشد (۱۹). باکتری‌های مختلف به‌وسیله‌ی مکانیسم‌های متفاوت انواع مقاومت‌ها را کسب می‌کنند که مقاومت‌های

بتالاکتامازی ازجمله مقاومت‌های مهم به‌ویژه در باکترهای گرم منفی است و این مقاومت در باکتری *اشرشیاکلی* بر روی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و bla_{CTX-M} قرار دارد. باکتری‌هایی با مقاومت طیف گسترده در میان آلاینده‌های زیستی خطرناک‌ترند و *اشرشیاکلی* به‌عنوان فلور طبیعی روده می‌تواند انتشاردهنده‌ی مقاومت‌های دارویی با منشأ آب در محیط زیست گردد. به دلیل اهمیت باکتری *اشرشیاکلی* به‌عنوان شاخص آلودگی آب این باکتری ازنظر تولید ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و bla_{CTX-M} موردبررسی قرار گرفت (۲۰). در این مطالعه نتایج فنوتیپی ۲ نمونه (۹٪) مولد ESBL را نشان داد. بررسی‌های ژنوتیپی نشان داد که تعداد ۱۴ مورد (۶۱٪) از ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ژن bla_{CTX-M}، ۱۰مورد (۴۳٪) از ایزوله‌ها دارای ژن bla_{SHV} و تعداد ۹ مورد (۳۹٪) از ایزوله‌های موردمطالعه دارای ژن bla_{TEM} بودند. همچنین ۳ مورد (۱۸٪) از ایزوله‌های جداشده، حاوی هر سه ژن bla_{TEM}، bla_{SHV} و bla_{CTX-M} بودند. در تحقیقی که در سال ۱۳۸۶ از نمونه‌های بالینی در شهر تهران انجام گرفته‌است نیز از بین ۴۶ نمونه‌ی *اشرشیاکلی* تنها ۸ مورد در بررسی فنوتیپی مولد ESBL گزارش شدند در حالی که بررسی ژنوتیپی نشان داد که ۵۲/۵ ٪ از اشرشیاکلی‌ها دارای ژن‌های مولد ESBL هستند که ۲۴٪ از سویه‌ها واجد ژن bla_{TEM} و ۶۰٪ سویه‌ها حاوی ژن bla_{SHV} و ۳۷/۸٪ از ایزوله ها دارای ژن bla_{CTX-M} بودند (۲۱). در این مطالعه از میان ایزوله‌ها تنها ۹٪ از لحاظ فنوتیپی تولیدکننده ESBL بودند که مطالعات ژنتیکی چیزی فراتر از این رقم را نشان می‌دهد که دلیل آن را این‌گونه می‌توان توضیح داد که تشخیص فنوتیپی بتالاکتامازهای طیف وسیع (ESBLs) به دلایل مختلف به ویژه بیان همزمان Amp C بتالاکتامازها، به طور کامل میسر نمی‌شود (۲۲). در تحقیقی که در بیمارستان‌های تبریز توسط Dallal و همکاران انجام شده است از ۱۸۸ ایزوله‌ی *اشرشیاکلی*، ۴۷٪ مولد ESBL بودند و ۸۴٪ از ایزوله‌های مولد ESBL، تولیدکننده‌ی CTX-M بودند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی ۱۹ ایزوله از *اشرشیاکلی* جدا شده از آب‌های سطحی در کشور مالزی انجام شده است ۸۴٪ از ایزوله‌ها واجد مقاومت CTX-M بوده‌اند (۲۰). تصور می‌شود که ژن bla_{CTX-M} در میان جوامع بشری از گستردگی بالایی برخوردار است و گونه‌های bla_{SHV} نیز در میان جمعیت‌های انسانی به علت عفونت در برخی از موارد وجود دارد (۲۴). در این تحقیق نیز میزان مقاومت bla_{CTX-M} برابر با ۶۱٪ نسبت به ژن‌های مقاومتی bla_{SHV}، ۴۳٪ و bla_{TEM}، ۳۹٪ از فراوانی بالاتری برخوردار است. قابل توجه است که *اشرشیاکلی* علاوه بر شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح وسیع، به علت مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های مقاوم از طریق خوراک طیور به مرغهای گوشتی و نیز از طریق زباله و شیرابه‌های صنایع، کارخانه‌ها، خانگی و لاشه‌های دفعی مرغداری‌ها و همچنین بیمارستان‌ها و کشاورزی می‌تواند به محیط زیست و زنجیره‌ی غذایی راه پیدا کند و آب‌های زیرزمینی نیز به نوعی با هر یک از این آلاینده‌ها ممکن است اختلاط یا ارتباط پیدا کند (۲۰،۲۵،۲۶،۲۷،۲۸،۲۹). از طرفی برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها داری نیمه عمر نسبتاً بالا در خاک هستند و با حضور خود می‌توانند میکروب‌های خاک را تحت تأثیر قرار داده و به توسعه‌ی مقاومت در باکتری‌های خاک بپردازند. باکتری‌های مقاوم باعث تغییر فلور میکروبی خاک شده و داروهای استفاده‌شده به همراه ژن‌های مقاوم در خاک از طریق رواناب‌ها وارد آب‌های زیرسطحی شده و سبب آلودگی آب‌های زیرزمینی در نزدیکی سطح زمین و انتقال باکتری‌های مقاوم به این آب‌ها شود (۲۵،۲۷). در تحقیقی که در روستاهای چین از مخازن آب آشامیدنی انجام شده است از مخازنی که در نزدیکی مزارع مرغ بودند *انتروباکتریاسه‌های* تولیدکننده‌ی ESBL شناسایی‌شده است و مخازن دورتر از این مزارع عاری از چنین باکتری‌هایی بوده‌اند و از این تعداد ۳٪ از کل نمونه‌ها واجد TEM بوده‌اند (۳۰). مطالعاتی که بر روی آب‌های سطحی در کشور مالزی انجام‌گرفته است از ۱۹ ایزوله ۴۷٪ واجد ژن bla_{TEM} گزارش شده است (۲۰). در این مطالعه، رقم ۹ نمونه (۳۹٪) برای آب‌های زیرزمینی که کمتر از آب‌های سطحی در معرض آلودگی قرار دارند درصد قابل‌توجهی است. شایان ذکر است که باکتری‌های روده‌ای تولیدکننده ESBL از طریق آب آشامیدنی وارد روده‌ی حیوانات و انسان شده و باعث گسترش مقاومت و بروز عفونت‌های جدی می‌شوند (۳۰).

نتیجه‌گیری

شیوع این‌گونه مقاومت‌ها در منابع آبی با نتایج حاصل از نمونه‌های بالینی انطباق دارد و نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشانگر انتشار این مقاومت‌ها در محیط زیست و منابع آبی می‌باشد. نفوذ *اشرشیاکلی*‌های تولیدکننده ESBL احتمالاً از زباله‌های خانگی، بیمارستانی، کشاورزی، کارخانه‌ها، چاه‌های جاذب و یا مستقیماً از طریق فاضلاب‌ها به آب‌های زیرزمینی انجام می‌گیرد. لذا شناسایی انواع گونه‌ها و زیرگونه‌های آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف در آب‌های سطحی و زیرزمینی در این باکتری می‌تواند کمک زیادی به شناسایی چگونگی گسترش مقاومت این باکتری در آب‌ها نموده و در ارائه‌ی استراتژی‌های لازم جهت کنترل و جلوگیری از انتشار باکتری در آب‌ها نماید. در ایران فقدان اطلاعات در مورد شیوع باکتری‌های تولید کننده‌ی ESBL موجود در آب منعکس‌کننده عدم مطالعات کافی و وسیع آب‌های سطحی و زیرزمینی از دیدگاه میکروبیولوژیکی است. این مطالعات به‌عنوان مطالعات پایه میکروبیولوژی در مورد آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌تواند برای جلوگیری از وقوع هزینه‌های درمانی سنگین مورد توجه قرار گیرد.

References

1. Aragones L, López I, Palazon A, Lopez-Ubeda R, Garcia C. Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and Enterococcus. *Science of the Total Environment* 2016; 566-567: 288-297. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.106
2. Croxen M.A, Law R.J, Scholz R, Keeney K.M, Wlodarska M, Finlay B.B. Recent advances in understanding enteric oathogenic *Escherichia coli*. *CMR* 2013; **26**(4): 822-880. doi: 10.1128/CMR.00022-13
3. Jeong SH, Bae I, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a korean Nationwid Survey. *JCM* 2004; **42**(7): 2902-2906. doi: 10.1128/JCM.42.7.2902-2906.2004
4. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M β-lactamases produced by *Escherchia coli* and *Klebsiella* spp. *JCM* 2004; **42**(12): 5715-5721. doi: 10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004
5. Denton M. Corrigendum to "Enterobacteriaceae" [Int. J. Antimicrob. Agents 29 (2007) S9–S22]. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; **30**(6): 568-575. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.09.001
6. Pitout JD, Laupland KB. Extended spectrum lactamase producing Enterobacteriaceae an emerging public-health concern. *The Lancet Infect Dis* 2008; **8**(3): 159-166. doi: 10.1016/s1473-3099(08)70041-0
7. Willet J, Wilfert T. *Antimicrobial agents in zinsser microbiology*. 20th ed. Norwalk, Appleton and Lange, 1992: PP: 153-187. doi: 10.1016/0196-4399(92)90061-d
8. Hansen KH, Bortolaia V, Nielsen CA, Nielsen JB, Schønning K, et.al. Host-specific patterns of genetic diversity among IncI1-Iγ and IncK plasmids encoding CMY-2 β-lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry and dogs in Denmark. *AEM* 2016; **82**: 495-551. doi: 10.1128/aem.00495-16
9. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in the United Arab Emirates. *Med Princ Pract* 2008; **17**: 32-36. doi: 10.1159/000109587
10. Mockta C, Govinden U, Sturm AW, Es sa ck S. TEM-146bet a- lac tamases produced by *Escherichia coli* isolates from state hos pi ta l s Kwazulu- Natal, South Africa. *IJAA* 2007; **6**(5): 493-495. doi: 10.1080/10158782.2009.114 41359
11. Jacoby GA, Munoz Price LS. The new beta lactamases. *N Engl J Med* 2005; **352**(4): 380-391. doi: 10.1056/nejmra041359
12. Bush K. Classification of β-Lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother* 1989; **33**(3): 264-270. doi: 10.1128/aac.33.3.264
13. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum β lactamase (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Micr* 2005; **48**(1): 45-48.
14. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases the CTX-M enzymes. *AAC* 2004; **48**(1): 1-14. doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004
15. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *AAC* 2003; **47**(12): 3724-3732. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003
16. Cockerill F. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-third informational supplement. *CLSI* 2013; **33**(1): 100-123. doi: 10.1201/9781420014495.ch1
17. Dallenne C, DaCosta A, Dominique D, Favier Ch, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**(3): 490-495. doi: 10.1093/jac/dkp498
18. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *AAC* 2001; **45**(9): 2598-2603. doi: 10.1128/AAC.45.9.2598-2603.2001
19. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin microbiaol* 2006; **9**(5): 466-475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011
20. Shehani T, Sui Mae L. Isolation of extended spectrum ß-lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface waters in Malaysia. *Malays J Med Sci* 2013; **20**(3): 14-22.
21. Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. [Detection of bla TEM and bla SHVgenes among clinical isolates of *E. coli* from Tehran hospitals]. *Iran J Med Microbiol* 2007; **1**(3): 1-8. (Persian).
22. Thomson K. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. 7th ed. Omaha Nebraska USA Creighton, University School of Medicine 2001; **24**: 332-336.
23. Soltan Dallal MM, Azarsa M, Shirazi MH, Rastegar Lari A, Owlia P, Fallah Mehrabadi J, et.al. [The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing *Escherichia coli* in urine samples collected at Tabriz city Hospitals]. *Tehran Univ Med J* 2011; **69**(5): 273-278. (Persian).
24. Geenen PL, Koene MGJ, Blaak H, Havelaar AH. van de Giessen AW. Risk profile on antimicrobial resistance transmissible from food animals to humans. *RIVM* 2011; **3**: 59-69.
25. Rooklidge S.J. Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. *Sci*

Total Environ 2004; **325**(1-3): 1-13. doi: 10.1016/j.scitotenv.2003.11.007

26. Diarra M.S, Silversides F.G, Diarrasouba F, Pritchard J, Masson L, Brousseau R, et.al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and Enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *AEM* 2007; **73**: 6566-66576. doi: 10.1128/aem.01086-07
27. Chander Y, Kumar S.M, Goyal S.C. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *J Environ. Qual*ity Abstract - Ecological Risk Assessment 2005; **34**(6): 1952-1957. doi: 10.2134/jeq2005.0017
28. Smith J.L, Drum D.J.V, Dai Y, Kim J.M, Sanchez S, Maurer J.J, et.al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *AEM* 2007; **73**(5): 1404-1414. doi: 10.1128/AEM.01193-06
29. Ewers C, Antao E M, Diehl. Philipp H C, Wieler L H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential, *AEM* 2009; **75**: 184-192. doi: 10.1128/aem.01324-08
30. Zhang, H, Zhou Y, Guo S, Chang W. Multidrug resistance found in extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae from rural water reservoirs in Guantao, China. *Fmicb* 2015; **6**: 267.