تشخیص باکتری‌های کلی‌فرمی، تعیین گروه‌های فیلوژنی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کولای* در چشمه‌ها و قنات‌های آلوده استان آذربایجان شرقی

نعیمه شعبانی لکرانی[1*]، جلال شایق[2]، جاوید صادقی[3]، زهره موسوی[4]

۱. کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. استادیار گروه میکروبیولوژی دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
۳. استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، ایران
٤. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: n.t.shabani@gmail.com
(دریافت مقاله: ۹٤/۱۲/۲٤ پذیرش نهایی: ۹۵/٤/۵)

چکیده

اشریشیا کولای به‌عنوان باکتری شاخص آلودگی مدفوعی آب حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه تعیین نوع و فراوانی باکتری‌های کلی‌فرمی و تنوع باکتری‌های *اشریشیا کولای* و تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کولای* جداشده از منابع قنات‌ها و چشمه‌های آذربایجان شرقی می‌باشد. بدین منظور ۱۱۸ چشمه و قنات انتخاب و به روش MPN مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کلی‌فرم مثبت به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی شدند؛ در مرحله بعد جهت تعیین تنوع ژنتیکی *اشریشیا کولای‌های* جداشده از روش تعیین تیپ فیلوژنی به روش multiplex PCR استفاده شد. جهت تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نالیدیکسیک‌اسید، کوتریماکسازول، آموکسی‌سیلین، جنتامایسین، سیپیروفلوکساسین، کلرامفنیکل، ایمیپنم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم آنتی‌بیوگرام استفاده شد طبق نتایج مطالعه. ٤۸٪ از نمونه‌ها توسط multiplex PCR از نظر کلی‌فرمی مثبت ارزیابی شدند که ٤۰٪ *اشریشیا کولای* و ۱۹٪ *کلبسیلا* تشخیص داده شد. تعلق ۲۳ جدایه به گونه باکتری *اشریشیا کولای* تأیید شد. به استناد تعیین گروه‌های فیلوژنی ٤٤٪ از سویه‌های مورد آزمایش متعلق به گروه B_2 و D و ۵٦٪ از سویه‌ها متعلق به گروه A و B_1 بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام، مقاومت مربوط به آموکسی‌سیلین را معادل ۹۲٪ نشان داد. همه سویه‌ها نسبت به ایمیپنم حساسیت داشتند. حضور سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کولای* با مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی در منابع آبی می‌تواند به‌عنوان یک مخاطره بهداشتی برای انسان مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کولای*، چشمه، قنات، گروه‌های فیلوژنی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

حضور باکتری *اشریشیا کولای* در آب‌ها عموماً به سطح شهرنشینی، عوامل انسانی و حیوانی، آب و هوایی و نیز میزان بارش باران بستگی دارد. در بررسی میکروبی، حضور *اشریشیا کولای* شاخص قابل اطمینان از آلودگی مدفوعی آب است و خطر ابتلا به بیماری‌های منتقله از راه‌آب را نشان می‌دهد (Aragones *et al.*, 2016; Chiueh and Shiang, 2001). سازمان بهداشت جهانی بر این عقیده است که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حضور حتی یک باکتری آن را برای شرب غیرقابل استفاده می‌نماید (WHO, 1996) بسیاری از سویه‌های *اشریشیا کولای* 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، منتژیت و سپتی‌سمی شرکت کنند. سویه‌های بیماری‌زای آن از علل مهم بیماری و مرگ‌ومیر در دنیا، به‌ویژه کودکان کشورهای درحال توسعه محسوب می‌شوند (Matthew *et al.*, 2013; Jawetz and Adelbergs, 2013; Malekzadeh, 2004).

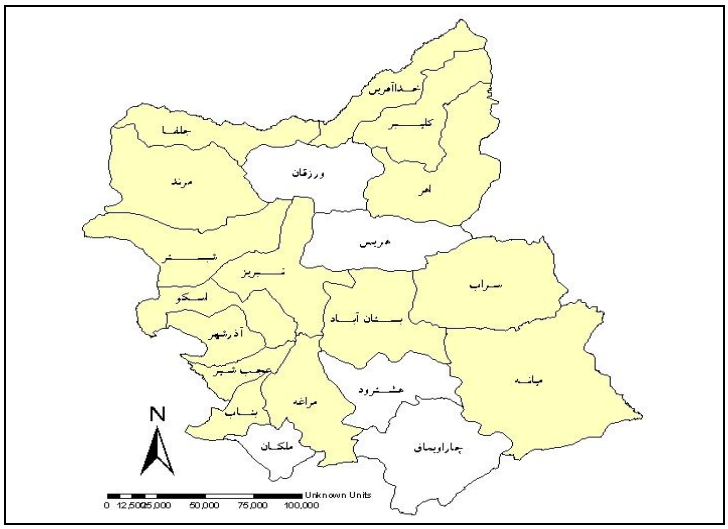
جهت تعیین منبع آلودگی *اشریشیا کولای* ایزوله شده از منابع آبی از ساختار زیرگونه‌ای *اشریشیا کولای* استفاده می‌شود. این باکتری را در چهار گروه A، B_1، B_2 و D طبقه‌بندی می‌کند (Gordon, 2010; Renato *et al.*, 2007) در این طبقه‌بندی معمولاً سویه‌های کومنسال در گروه فیلوژنتیک A و B_1 قرار می‌گیرند، درحالی‌که سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای اغلب در گروه B_2 و D قرار دارند (Lecointre *et al.*, 1998) برای دست‌یابی به این تفکیک پروتکلی از multiplex PCR بر پایه حضور و یا عدم حضور دو ژن *chuA*، *yiaA* و نیز یک قطعه DNA بنام TspE4.C2 طراحی شد. در ادامه ارزیابی‌ها و باهدف بهبود این روش تغییراتی در پرایمرهای سه قطعه اعمال گردید و روش ژنوتیپی نظیر استفاده از ژن *gad* (*gadA, gadB*) را برای تشخیص قطعه *اشریشیا کولای* به‌کاربرده شد (Doumith *et al.*, 2012; Clerment *et al.*, 2000).

مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از معضلات عصر حاضر است. با رواج استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی، مقاومت در سویه‌های باکتری *اشریشیا کولای* نیز به وجود آمده است، به‌طوری‌که روزبه‌روز بر تعداد باکتری‌های مقاوم افزوده می‌شود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به‌طور ذاتی وابسته به استفاده از عوامل ضدمیکروبی یا آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که موردتوجه دنیا بوده و موجبات نگرانی میکروبیولوژیست‌ها و پزشک‌ها و متخصصان صنایع دارویی را فراهم نموده است (Pitout and Laupland, 2008; Tenover, 2006). هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی منابع آب‌های محیطی و نیز خصوصیات باکتری *اشریشیا کولای* جداشده از آب‌ها به‌عنوان بزرگ‌ترین فاکتور خطر در مخاطرات بهداشت عمومی است. برای این منظور آلودگی منابع مذکور شامل تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی A، B_1، B_2 و D باکتری‌های *اشریشیا کولای* جداسازی شد و ارزیابی حضور بالقوه سویه‌های بیماری‌زا و همچنین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن در منابع قنات‌ها و چشمه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- شناسایی فنوتیپی *اشریشیا کولای*

در این مطالعه مطابق شکل (۱) از ۱۱۸ رشته چاه و قنات از شهرستان‌های مختلف استان آذربایجان شرقی، نمونه‌های آب در ظرف استریل جمع‌آوری‌شده و به آزمایشگاه منتقل شد. حداکثر در عرض ٢٤ ساعت بر اساس تخمیر لاکتوز به روش سه لوله‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت برای این منظور از هر نمونه به مقدار ۱۰ و ۱ و ۰/۱ سی‌سی به‌ترتیب در لاکتوز براث ۱۰ و ۵ و ۵ سی‌سی تلقیح شده و به انکوباتور با دمای ٣٦/٥ °C به مدت ٢٤-٤٨ ساعت منتقل شد و سپس نمونه‌های لاکتوز مثبت به محیط EC broth برای سنجش میزان کلی‌فرم مدفوعی منتقل‌شده و تحت حرارت ٤٤/٥ °C گرمخانه گذاری شد (Eaton and Franson, 2005) برای تشخیص *اشریشیا کولای* نمونه‌ها پس از کشت بر روی محیط کشت EMB تحت مجموعه آزمایش‌ها بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، VP، MR، SIM، لیزین‌دکربوکسیلاز آگار قرار گرفت و با استفاده از جدول استاندارد و خصوصیات ظاهری باکتری *اشریشیاکولای*ها شناسایی شد و در ادامه بر روی پلیت محیط کشت BHI تک کلنی خالص‌شده به‌صورت خطی کشت داده شد. ایزوله‌های به‌دست‌آمده جهت انجام آزمایش‌ها و تجزیه‌وتحلیل PCR در گلیسرول ۳۰٪ در دمای ۷۰ °C- نگهداری شد. پرگنه جدایه‌هایی با جلای فلزی که تقریباً منحصر به باکتری *اشریشیاکولای* است به‌منظور خالص‌سازی به محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar) منتقل و برای تشخیص هویت باکتری به‌عنوان *اشریشیاکولای* مجموعه آزمایش‌های بیوشیمیایی تحت عنوان IMViC انجام گرفت. جدایه‌هایی که نتایج آزمون IMViC انجام داده‌شده - - + + را حاصل نمودند، *اشریشیاکولای* تشخیص داده شد (Cowan,1979)



شکل (۱)- محل‌های نمونه‌برداری بر روی نقشه استان آذربایجان شرقی، شهرستان‌هایی که به‌صورت رنگی مشخص‌شده‌اند نمایشگر محل‌های نمونه‌برداری هستند.

- شناسایی ژنوتیپی *اشریشیا کولای* و تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی به روش multiplex PCR-

برای استخراج DNA مقدار ۲۰ میکرولیتر از بافر تیشو را در لوله اپندورف ریخته و مقداری از کلنی باکتریایی را در درون آن حل شد و در بن‌ماری به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C قرار داده و در ادامه آن را به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده و به آن ۱۸۰ µl آب دیونیزه افزوده شد (van Soolingen *et al.*, 1994) برای شناسایی *اشریشیا کولای*، به‌صورت مستقل از تکثیر ژن *gadA* با پرایمرهای نوکلئوتیدی محصول PCR با قطعه‌ای به طول ۳۷۳ جفت باز مطابق جدول (۱) استفاده شد و برای تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی از سه نشانگر *chuA*، *yjaA* و قطعه TSPE4.*C2* به روش multiplex PCR استفاده شد. مطابق جدول (۲) حضور یا عدم حضور هرکدام از آن‌ها مشخص‌کننده گروه‌های فیلوژنتیکی A- B_1- B_2-D می‌باشد. برای انجام این واکنش تکثیر، تعداد سه جفت پرایمر (۱/۵ µl از هرکدام) با ۱ µl DNA و ۲۵ µl مستر میکس را باهم مخلوط کرده و حجم آن با آب مقطر به ۵۰ µl رسید. واکنش PCR با چرخه‌های واسرشت اولیه در دمای ۹٤ °C به‌مدت ٤ دقیقه، ۳۰ چرخه، با یک مرحله واسرشت سازی در ۹٤ °C در ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در درجه ٦٥ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی در ۷۲ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً یک چرخه طویل سازی نهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. از محصولات حاصله در آگار ۲٪ الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از دستگاه Gel Document عکس‌برداری گردید (Doumith *et al.*, 2012).

جدول (۱)- مشخصات پرایمرهای استفاده شده

نام	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر (´۳- ´۵)	منبع
gadA	373	F-GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG R-GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	(Doumith *et al*., 2012)
chuA	281	F-ATGATCATCGCGGCGTGC R-AAACGCGCTCGCGCCTAAT	(Doumith *et al*., 2012)
yjaA	216	F-TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACG R-ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	(Doumith *et al*., 2012)
TSPE4.C2	152	F-GCGGGTGAGACAGAAACG R-TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	(Doumith *et al*., 2012)

جدول (۲)- طبقه‌بندی باکتری *اشریشیا کولای* به چهار گروه فیلوژنی A، B_1، B_2 و D بر اساس وجود و یا عدم وجود نشانگرهای *chuA*، *yjaA*، *TSPE4*.C2

نشانگر	A	B_1	B_2	D
TSPE4.C2	-	+	+	+
	-	+	-	-
yjaA	+	-	+	-
	-	+	+	-
chuA	-	-	+	+
	-	-	+	+

- بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کولای* توسط آزمون آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) و بر اساس دستورالعمل انستیتو ملی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی آمریکا CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. برای این منظور جدایه‌ها سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند از تمامی ایزوله‌ها تهیه و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پاتن طب) شامل سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰ µg)، کوتریماکسازول (۱/۲۵ µg)، آموکسی‌سیلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، کلرامفنیکل (۱۰ µg)، ایمیپنم (۳۰ µg) استفاده شد و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردیدند و قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد. برحسب میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به سه گروه حساس، حد متوسط و مقاوم تقسیم‌بندی شدند (Cheesbrough, 2010).

- تحلیل و تحلیل داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۶ آزمون‌های Kruskal-Waliss و Chi-squared ارتباط بین انواع گروه‌های فیلوژنی باکتری *اشریشیا کولای* از لحاظ حساسیت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

- جمعیت کلی‌فرم‌ها و تنوع جدایه‌ها

از ۵۷ ایزوله مثبت کلی‌فرمی پس از کشت در محیط EMB و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی *اشریشیا کولای* و *کلبسیلا* مطابق جدول (۳) تشخیص داده شد.

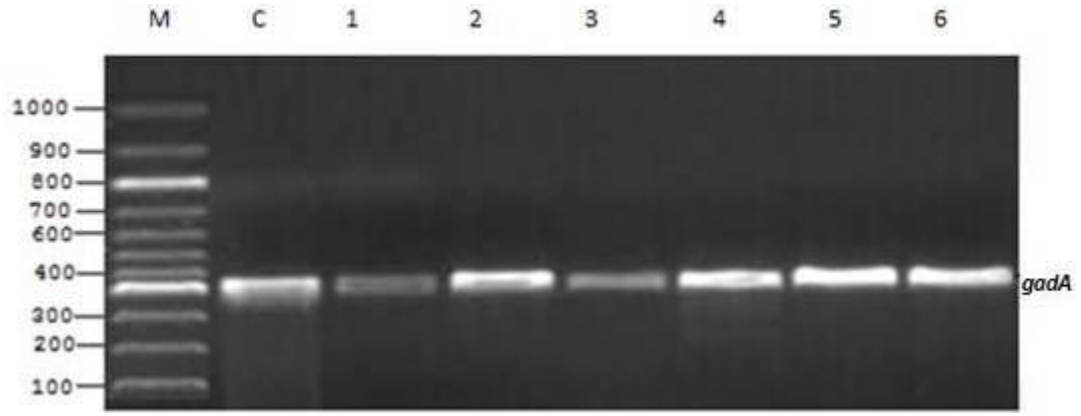
جدول (۳)- درصد آلودگی و دامنه تغییرات تعداد کلی فرم‌ها در نمونه‌های آب چشمه و قنات و سهم (تعداد و درصد) گونه‌های مختلف در نمونه‌های مثبت

منبع	دامنه تغییرات جمعیت کلی‌فرم (MPN/۱۰۰ml)	تعداد (درصد) آلودگی		
		کلی‌فرم (+)	*اشریشیا کولای*	*کلبسیلا*
چشمه	۲۴۰-۳	۱۶ (۱۳٪)	۵ (۹٪)	۵ (۸٪)
قنات	۱۱۰۰-۳	۴۱ (۳۵٪)	۱۸ (۳۱٪)	۷ (۱۱٪)
مجموع	۱۱۰۰-۳	۵۷ (۴۸٪)	۲۳ (۴۰٪)	۱۲ (۱۹٪)

- شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی *اشریشیاکولای* و تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی باکتری *اشریشیاکولای*

از ۲۳ جدایه‌ی *اشریشیا کولای* به روش PCR با استفاده از ژن *gadA*، ۱۰۰٪ به‌عنوان *اشریشیا کولای* تشخیص داده شد. مشاهده باند *gadA* در شکل (۲) دلیل بر وجود *اشریشیا کولای* است.

مطابق جدول (۴) از ۲۳ جدایه حاصل ۱۳٪ به‌عنوان B_1، ۳۵٪ به‌عنوان B_2، ۴۳٪ به‌عنوان A و ۹٪ به‌عنوان D تشخیص داده شدند.

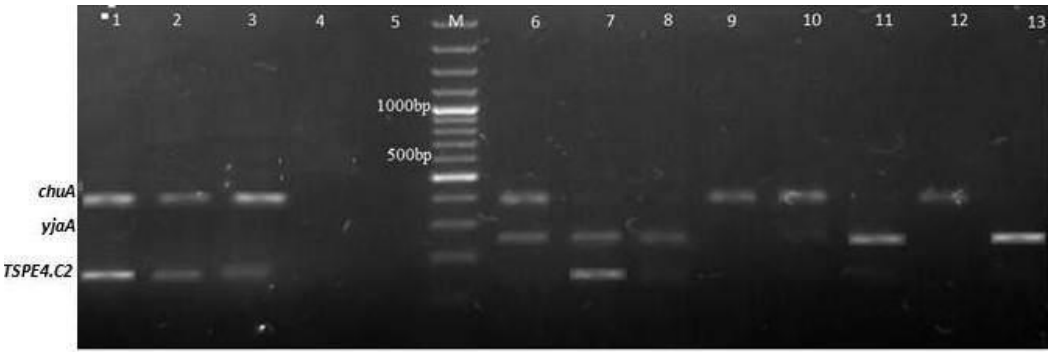


شکل (۲)- الکتروفورز ژل آگارز ایزوله‌های *اشریشیاکولای* با ژن gadA با طول pb ۳۷۳ و ستون C به‌عنوان کنترل مثبت و ستون M به‌عنوان نشانگر با ۱۰۰ جفت باز

جدول (۴)- توزیع ایزوله‌های *اشریشیا کولای* به تفکیک چشمه و قنات در گروه‌های فیلوژنی A، B_1، B_2 و D.

منبع	تعداد	A	B_1	B_2	D
چشمه	۵	۱ (۴٪)	۰ (۰٪)	۴ (۱۷/۵٪)	۱(۴٪)
قنات	۱۸	۹ (۳۹٪)	۳ (۱۳٪)	۴ (۱۷/۵٪)	۱(۴٪)
جمع	۲۳	۱۰ (۴۳٪)	۳ (۱۳٪)	۸ (۳۵٪)	۲ (۹٪)

نتایج حاصل از الکتروفورز multiplex PCR در شکل (۳) به تصویر کشیده شده است و انواع گروه‌های فیلوژنی در شکل با توجه به حضور یا عدم حضور باندها مشخص می‌باشد.

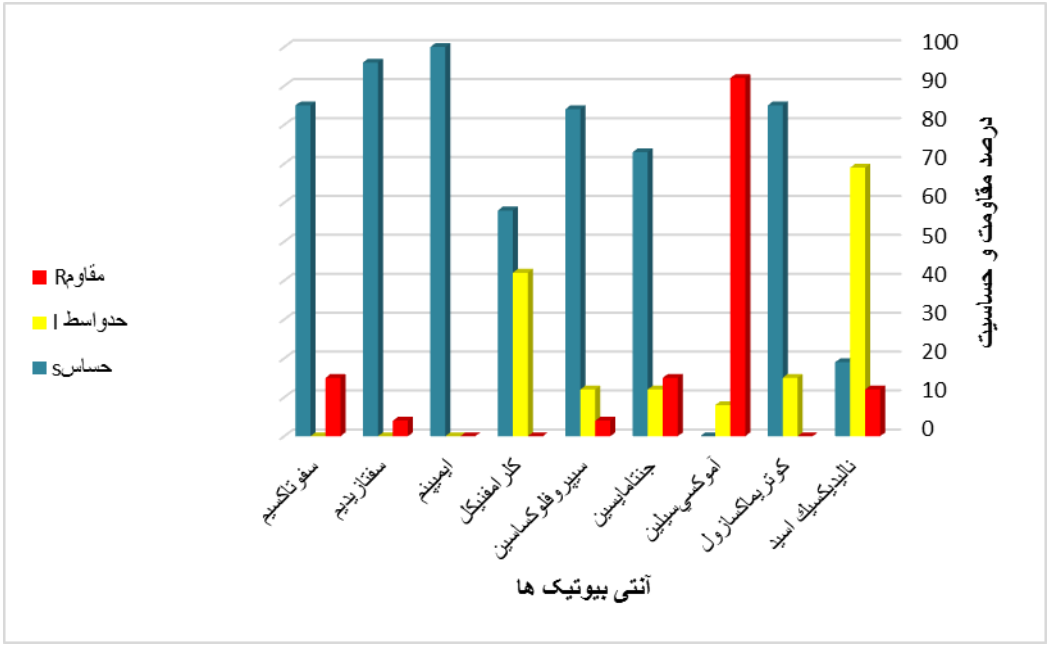


شکل (۳)- الکتروفورز ژل آگارز و تعیین گروه‌های فیلوژنی با استفاده از ژن *yjaA*، *chuA* و *TSPE4.C2* در ایزوله‌های *اشریشیا کولای*، ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۹، ۱۰، ۱۲ گروه D، ستون ٦ در گروه B_2، ستون ۷ در گروه B_1 و ستون ۱۳ در گروه A قرار دارد. ستون M نشان‌دهنده نشانگر می‌باشد.

- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کولای*

بیشترین حساسیت مربوط به ایمیپینم ۱۰۰٪ و بیشترین مقاومت مربوط به آموکسی‌سیلین ۹۲٪ می‌باشد که این مقاومت بالا در تمام جدایه‌های چشمه‌ها و قنات‌های شهرها وجود دارد. همچنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین ۱۵٪، سیپروفلوکساسین ٤٪ و نالیدیکسیک‌اسید ۱۲٪ و سفتازیدیم ٤٪ و سفوتاکسیم ۱۵٪ ارزیابی شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس میزان مقاوم، حد واسط و حساس ایزوله‌های *اشریشیا کولای* در نمودار (۱) مشخص‌شده است.

نتایج حاصل نشان داد که با احتمال ۹۵٪ بین انواع گروه‌های فیلوژنی باکتری *اشریشیا کولای* ازلحاظ حساسیت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.



نمودار (۱)- مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکولای*

بحث و نتیجه‌گیری

از سال ۱۹۷۱ تا ۲۰۰۲، ۷٦٤ مورد شیوع بیماری‌های منتقله از راه‌آب ثبت شده است که با آب آشامیدنی مرتبط بوده است که تعداد ۵۷۵٤۵۷ مورد بیماری و ۷۹ مورد مرگ را موجب شده است. عفونت منتقله از راه‌آب و خطرات بیماری در ایالات‌متحده آمریکا بر اساس تعداد کل سیستم‌های آب، نوع منبع آب و کل جمعیت در معرض آلودگی و همه بیماری‌های ممکن و در ارتباط با عفونت‌های میکروبی و نه فقط اسهال و استفراغ مورد بررسی قرار گرفته است نتایج نشان می‌دهد که ۱۰/۷ میلیون عفونت و ۵/٤ میلیون بیماری در سال در جمعیت‌هایی که از سیستم آب‌های زیرزمینی استفاده می‌نمایند رخ می‌دهد (Kelly *et al.*, 2008).

اشریشیا کولای به‌عنوان فلور طبیعی در مدفوع انسان و حیوانات خونگرم می‌تواند موجب آلودگی آب و انتقال بیماری با منشأ منابع آبی گردد. سازمان بهداشت جهانی بر این عقیده است که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حضور حتی یک باکتری آن را برای شرب غیرقابل استفاده می‌نماید (WHO, 1996) در این تحقیق از ۱۱۸ رشته چشمه و قنات نمونه‌برداری گردید که ٤۸٪ نمونه‌ها ازلحاظ کلی فرمی مثبت ارزیابی شدند و از این تعداد، فراوانی ٤۰٪ ایزوله *اشریشیا کولای* و ۱۹٪ *کلبسیلا* توسط آزمایش‌های فنوتیپی به اثبات رسید.

نتایج مطالعه اخیر نشان از آلودگی بالای کلی‌فرمی (٤۸٪) در چشمه‌ها و قنات‌های سطح استان و به‌خصوص قنات‌های سطح شهرستان تبریز و حومه که برای مصارف شرب و شستشوی ظروف برای ساکنان مجاور می‌رسد، دارد. این امر در مقایسه با تنها مطالعه مشابهی که در کشور برزیل انجام‌گرفته و ۱۸ درصد از منابع آبی را آلوده نشان داده است، درصد بالایی است

(Renato *et al*., 2007). در این تحقیق از ۱۱۸ منبع انتخاب شده در ۲۳ منبع نمونه *اشریشیا کولای* شناسایی شد این امر نشان از میزان آلودگی بسیار بالا در منابع آب‌های زیرزمینی ٤٨٪ (١٦٪ چشمه و ۳۵٪ قنات) دارد. مقایسه نتایج این مطالعه نشان می‌دهد برخلاف مطالعه مشابه در کشور برزیل که چشمه‌ها را به‌عنوان منابع با بیشترین آلودگی معرفی کرده است قنات (۳۵٪) به‌عنوان آلوده‌ترین منابع در ناحیه موردمطالعه می‌باشد.

در این مطالعه جهت شفاف‌تر شدن خطر آلودگی کلی‌فرمی مطالعه فیلوژنتیکی بر روی *اشریشیا کولای*‌های جدا شده انجام پذیرفت. چراکه از میان جمعیت‌های *اشریشیا کولای* آلاینده تنها دسته محدودی در ایجاد بیماری نقش دارند. مضاف بر این‌که استفاده از روش تعیین گروه‌های فیلوژنی تا درجاتی در ردیابی منشأ آلودگی منابع آبی نیز کارآمد می‌باشد. به‌صورت خلاصه بر اساس روش فیلوژنی پیشنهادی، *اشریشیا کولای بفلتت* بر پایه بررسی‌های با تکنیک‌های MLEE و MLST به حداقل چهار گروه فیلوژنی A و B_1 و B_2 و D تقسیم می‌شوند (Noller *et al*., 2003; Arbeit, 1999; Bouchet *et al*., 2008). روش multiplex PCR بر پایه بررسی فیلوژنی می‌تواند تا حدودی در تفریق *اشریشیاکولای*‌های بیماری‌زا موفق باشد. در این روش برای صرفه‌جوئی زمان و وقت و هزینه چند PCR توأماً باهم انجام می‌گیرد (Doumith *et al*., 2012). معمولاً سویه‌های کومنسال و پاتوژن روده‌ای اغلب به گروه‌های A و B_1 اختصاص داده می‌شوند و سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای اغلب در گروه B_2 و به میزان کمی در گروه D قرار می‌گیرند. گونه‌ی B_2 نسبت به D و سایر گونه‌ها از حدت بیشتری برخوردار است (1998 Renato *et al*., 2007; Lecointre *et al*., 2007). در انسان گروه‌های فیلوژنی جدا شده بیشتر تحت تأثیر محیط‌اند. مطالعه انجام شده در برزیل نشان داد که سویه‌های متعلق به B_2 و D با فراوانی کمتری از گروه‌های A و B_1 از محیط و آب‌ها جدا شده‌اند و در روده پستانداران B_2 نسبت به سایر گونه‌ها به فراوانی جدا شده است. این سویه مدت‌زمان زیادی را می‌تواند در بدن میزبان دوام بیاورد (Renato *et al*., 2007). در این مطالعه فراوانی گروه‌های A و B_1 در چشمه‌ها و قنات‌ها (٥٦٪) که عمدتاً فلور طبیعی روده‌اند، نشان‌دهنده آلودگی آب به مدفوع انسانی و حیوانی و اختلاط فاضلاب با آب قنات‌ها است. به‌رغم بالا بودن سویه‌های کومنسال روده‌ای، سویه بیماری‌زای B_2 درمجموع چشمه‌ها و قنات‌ها (۳۵٪) در مقایسه با مطالعات مشابه (۷٪) که در کشور برزیل انجام گرفته است، بسیار بالاست و این امر می‌تواند به‌عنوان هشدار جدی در این خصوص مطرح باشد. برخلاف قنات‌ها، چشمه‌های آلوده عاری از کومنسال روده‌ای بوده و فراوانی سویه‌های B_2 (۱۷/۵٪) D (٤/٥٪) است. مدفوع حیوانات خانگی و اهلی منشأ اصلی سویه‌ی D است و حضور سویه‌های B_2 و D در آب چشمه‌ها نشانگر آلودگی چشمه‌ها از منابع مختلف است (Gordon, 2010). مطالعات نشان داده‌اند که گروه‌های فیلوژنی بیماری‌زای روده‌ای و خصوصاً گروه B_2 از حدت بالایی برخوردار است. در این مطالعه نشان داده شده است که ٤٤٪ از کل نمونه‌های متعلق به سویه‌های B_2 و D است که عمدتاً از سویه‌های خارج روده‌ای بیماری‌زا هستند. درنتیجه آلودگی با این سویه‌ها خطر ایجاد بیماری‌های *اشریشیا کولای* منتقله توسط آب‌های زیرزمینی که در برخی مناطق به‌عنوان منبع آب

آشامیدنی و نیز جهت شستشوی ظروف غذا استفاده می‌شوند را به همراه دارد.

در خصوص باکتری *اشریشیا کولای*، مقاومت آن در برابر داروها پتانسیل این باکتری را در بیماری‌زایی بالا می‌برد. در حال حاضر استفاده بیش‌ازحد و خودسرانه از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از دلایل مهم شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف است(Tenover, 2006).

این تحقیق نشان می‌دهد که بیشترین مقاومت مربوط به آموکسی‌سیلین ۹۲٪ می‌باشد که این مقاومت بالا در تمام جدایه‌های چشمه‌ها و قنات‌های شهرها به چشم می‌خورد. از طرفی روده پرندگان و طیور نیز به‌عنوان یک مخزن بالقوه به *اشریشیا کولای* می‌باشد و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک طیور می‌تواند از طریق لاشه دفعی مرغداری‌ها و شیرابه و مصرف گوشت آن‌ها به محیط‌زیست و زنجیره غذایی راه پیدا کند (Ewers *et al*., 2009; Diarra *et al*., 2007). همچنین مدفوع حاصل به‌عنوان کود در مزارع کشاورزی استفاده می‌شود و برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها داری نیمه‌عمر نسبتاً بالا در خاک هستند و با حضور خود می‌توانند میکروب‌های خاک را تحت تأثیر قرار داده و به توسعه مقاومت در باکتری‌های خاک بپردازند. باکتری‌های مقاوم باعث تغییر فلور میکروبی خاک شده و کودهای استفاده شده 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 (Chander *et al*., 2005; Smith *et al*., 2007; Chander *et al*., 2008; Rooklidge, 2008).

در این مطالعه مشخص شد که بیشترین حساسیت مربوط به ایمیپینم ۱۰۰٪ است که مصرف آن به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم کم بوده و حتی کمتر تجویز می‌شود. این تحقیق نشان‌دهنده این واقعیت است که مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک‌اسید و سیپروفلوکساسین و جنتامایسین و سفوتاکسیم در باکتری‌های *اشریشیا کولای* جداشده در آب‌های چشمه‌ها و قنات‌های استان در حال شکل‌گیری است. این آنتی‌بیوگرام تقریباً مشابه با پروفایل مقاومتی است که در مطالعات مشابه در منطقه در خصوص نمونه‌های بیمارستانی انجام داده‌اند به‌گونه‌ای که در مطالعه‌ای در تبریز و خوی درصد مقاومت به آموکسی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید را بالاتر گزارش کرده‌اند (Soltan Dallal, 2012). نتایج حاصل از این مطالعه به‌ویژه در خصوص آموکسی‌سیلین بامطالعه مذکور بسیار مشابهت دارد. به‌علاوه، مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید، جنتامایسین و سیپروفلاکسین اگرچه در این مطالعه نسبت به مطالعات نمونه‌های بالینی کمتر است اما نشان از وجود این مقاومت در جدایه‌های محیطی و احتمال انتقال آن به جمعیت‌های انسانی دارد. به‌طوری‌که می‌توان نتیجه گرفت نمونه‌های حاوی چنین مقاومتی بیشتر در ایجاد بیماری نقش دارند و وجود این مقاومت‌ها را بایستی بر حدت باکتری افزود.

این مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک مطالعه میکروبیولوژی در مورد آب‌های سطحی و زیرزمینی برای جلوگیری از وقوع هزینه‌های درمانی سنگین موردتوجه قرار گیرد. *اشریشیا کولای*‌ها به‌خصوص گروه‌های فیلوژنی بیماری‌زا به‌طور فراوان از آب‌های زیرزمینی و خصوصاً قنات‌ها جداشده است. علاوه‌بر

مورد فوق داشتن مقاومت بالای باکتری‌های *اشریشیا کولای* جداشده به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً آموکسی‌سیلین قابل‌توجه است. لذا ضرورت کنترل انتشار آلاینده‌ها به آب‌های زیرزمینی برای جلوگیری از شیوع آن‌ها امری ضروری است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Aragones, L., López, I., Palazon, A., Lopez-Ubeda, R. and Garcia, C. (2016). Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and Enterococcus. Applied and Environmental Microbiology, 82: 288-297.
- Arbeit, R.D. (1999). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 116–137.
- Bouchet, V., Huot, H. and Goldstein, R. (2008). Molecular Genetic Basis of Ribotyping. Comprehensive Microbial Resource, 21: 262–273.
- Chander Y., Gupta, S.C., Kumar, K., Goyal, S.M. and Murray, H. (2008). Antibiotic use and the prevalence of antibiotic resistant bacteria on turkey farms. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 714–719.
- Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M. and Gupta, S.C. (2005). Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. Journal of Environmental Quality. 34:1952- 1957.
- Cheesbrough, M. (2005). District laboratory practice in tropical countries (part 2). Second edition, The Edinburgh Building Cambridg United Kingdom, pp. 136-142.
- Chiueh, L.C and Shiang, W.H. (2001). Characterization of *Escherichia coli* serotype O157 strains isolated in Taiwan by PCR and moltilocus enzyme analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 9(1): 12-19.
- Clerment, O., Constantinou, N. and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Journals Gut Microbes, 3(2): 71–87.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. Applied and Environmental Microbiology Journal, 66(10): 4555-4558.
- Cowan, S.T. (1979). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Third Edition, London, Public Health Laboratory Service England and Wales, pp.134-137.
- Diarra, M.S., Silversides, F.G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R. *et al*., (2007). 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. Applied and Environmental Microbiology, 73: 6566–6576.
- Doumith, A.D., Hope, R., Wai, J. and Woodford, N. (2012). Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major Escherichia coli phylogenetic groups. Journal of Clinical Microbiology, 50(9): 3108-3110.
- Eaton, AD and Franson, M.A. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC, American Public Health Association, pp.1809-1810.
- Ewers, C,. Antao, E.M,. Diehl, I., Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2009). Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Applied and Environmental Microbiology, 75: 184–192.

- Gordon, D. (2010). Strain typing and the ecological structure of *Escherichia coli*. Association of Analytical Communities International, 93(3): 974-984.
- Jawetz, M and Adelbergs, M. (2013). Medical Microbiology. Review of Medical Microbiology and Immunology, Lange Medical Books, pp. 68-72.
- Kelly, A., Reynolds, K. and Charles, P. (2008). Reviews of Enviromental Contamination and Toxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 192: 124-150.
- Lecointre, G., Rachdi, F., Darlu, P. and Denamur, E. (1998) *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, 155: 1685-1695.
- Malekzadeh, F. (2004). Microbiology. Tehran University. pp. 218-251
- Matthew, A., Croxen R.J.L., Roland, S., Kristie, M., Keeney, M. and Wlodarska, B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 26(4): 822–880.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Stine, O.C., Morris, J.G. and Boxrud, D.J. (2003). Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 41(2): 675–679.
- Pitout, J.D and Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Diseases, 8(3):159-166.
- Renato, H., Orsi, N.C. and Stoppe, M. (2007). Identification of *Escherichia coli* from groups A, B_1, B_2 and D in drinking water in Brazil. Journal of Water and Health, 05(2): 323-327.
- Rooklidge, S.J. (2004). Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. Science of the Total Environment, 325: 1–13.
- Smith, J.L., Drum, Y., Dai, J.M., Kim, S. and Sanchez, J. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology, 73(5): 1404-1414.
- Soltan Dallal, M.M. and Shmkani, F. (2012). Detection of ESBLs (type TEM) of *E. coli* by using phenotypic and genotypic tests in clinical isolates. Medical Journal of Tabriz University, 34(1): 62-56.
- Souza, V., Rocha M., Valera, A., and Eguiarte, L. (1999). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. Applied and Environmental Microbiology, 65(8): 3373-3385.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. American Journal of Medicine, 119 (6): 62–70.
- Van Soolingen, D., de Haas P.E., Hermans, P.W. and van Embden, J.D. (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods in Enzymology, 235: 196-205.
- World Health Organization. (1996). Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information, 2nd Edition. WHO, Geneva.

Detection of coliform bacteria, determination of phylogenetic typing and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* in qanats and springs of East-Azerbaijan province

Shabani Lokarani, N.[1*], Shayegh, J.[2], Sadeghi, J.[3], Mousavi, Z.[4]

1. M.Sc Graduate of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Assistant Professor of Department of Microbiology, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
3. Assistant Professor of Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. M.Sc of Genetic, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

[*]Corresponding author's email: n.t.shabani@gmail.com

(Received: 2016/3/14 Accepted: 2016/6/25)

Abstract

Escherichia coli as a fecal contamination and is considered as an index in water. The aim of this study was to determine the phenotypic and genotypic characteristics of *E. coli* and antibiotic resistance of the isolates collected from qanats and springs in East-Azerbaijan province. For this purpose, 118 samples were selected from above mentioned area and examined by MPN method. The positive coliform samples were identified by phenotypic and genotypic methods. Afterwards, to determine the genetic diversity of *E. coli* isolates, phylogenetic typing we conducted by means of multiplex PCR. To determine the antibiotic resistance profile, antibiotic discs of Nalidixic Acid, Co-trimoxazol, Amoxicillin, Gentamaicin Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Imipenem, Cefotaxime and Ceftazidime antibiogram were used. Based on results, 48% of the samples were evaluated as positive for coliform including 40% for *E. coli* and 19% for *Klebsiella*. Amongst 23 isolates confirmed as *E. coli* by PCR. Phylogenetic typing revealed that 44% of *E. coli* strains belonged to type D and B_2 and 56% belonged to A and B_1 phylotypes. Antimicrobial susceptibility pattern showed that 92% of *E. coli* isolates were resistant to Amoxicillin. All *E. coli* isolates were sensitive to Imipenem. It was concluded that presence of pathogenic *E. coli* with high rate of antibacterial resistance in waters source could be considered as a human health hazard.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Escherichia coli,* Springe, Qanats, Phylogeny group, Antibiotic Resistance