

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

نعیمه شعبانی لکرانی<sup>۱\*</sup>، جلال شایق<sup>۲</sup>، جاوید صادقی<sup>۳</sup>، زهره موسوی<sup>۴</sup>

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 میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، ایران

۴. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: n.t.shabani@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۴/۱۲/۲۴ پذیرش نهایی: ۹۵/۴/۵)

### 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، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، ایمپینم، سفوتاکسیم و سفنازیدیم آنتی‌بیوگرام استفاده شد طبق نتایج مطالعه. ۴۸٪ از نمونه‌ها توسط multiplex PCR از نظر کلی‌فرمی مثبت ارزیابی شدند که ۴۰٪ اشریشیا کولای و ۱۹٪ کلبسیلا تشخیص داده شد. تعلق ۲۳ جدایه به گونه باکتری اشریشیا کولای تأیید شد. به استناد تعیین گروه‌های فیلوژنی ۴۴٪ از سویه‌های مورد آزمایش متعلق به گروه B<sub>2</sub> و D و ۵۶٪ از سویه‌ها متعلق به گروه A و B<sub>1</sub> بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام، مقاومت مربوط به آموکسی‌سیلین را معادل ۹۲٪ نشان داد. همه سویه‌ها نسبت به ایمپینم 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 راه آب 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، مننژیت و سپتی‌سمی شرکت کنند. سویه‌های بیماری‌زای آن از علل مهم بیماری و مرگ‌ومیر در دنیا، به‌ویژه کودکان کشورهای در حال 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<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> و D طبقه‌بندی می‌کند (Gordon, 2010; Renato *et al.*, 2007). در این طبقه‌بندی معمولاً سویه‌های کومنسال در گروه فیلوژنتیک A و B<sub>1</sub> قرار می‌گیرند، در حالی که سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای اغلب در گروه B<sub>2</sub> 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* و *viaA* و نیز یک قطعه DNA بنام TspE4.C2 طراحی شد. در ادامه ارزیابی‌ها و با هدف بهبود این روش تغییراتی در پرایمرهای سه قطعه‌تعال گردید و روش ژنوتیپی نظیر استفاده از ژن *gad* (*gadA*, *gadB*) را برای تشخیص قطعه *اشریشیا کولای* به‌کار برده شد (Doumith *et al.*, 2012; Clerment *et al.*, 2000).

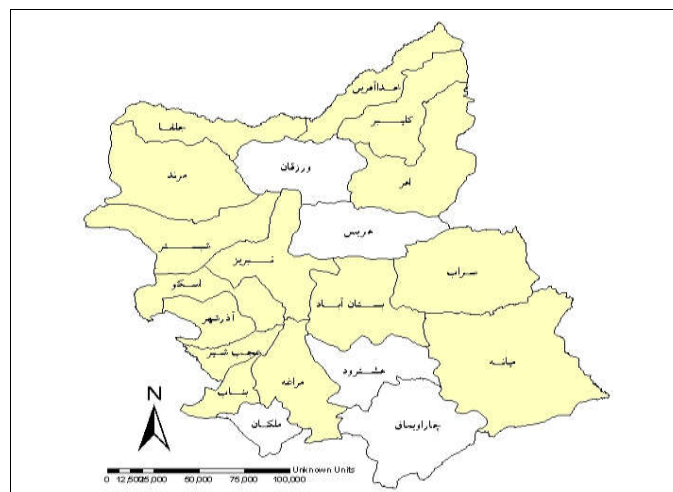
مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از معضلات عصر حاضر است. با رواج استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی، مقاومت در سویه‌های باکتری *اشریشیا کولای* نیز به وجود آمده است، به‌طوری‌که روزبه‌روز بر تعداد باکتری‌های مقاوم افزوده می‌شود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به‌طور ذاتی وابسته به استفاده از عوامل ضد میکروبی یا آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که مورد توجه 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* جدا شده از آب‌ها به‌عنوان بزرگ‌ترین فاکتور خطر در مخاطرات بهداشت عمومی است. برای این منظور آلودگی منابع مذکور شامل تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی A، B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> 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 /شریشیا کولای

در این مطالعه مطابق شکل (۱) از ۱۱۸ رشته چاه و قنات از شهرستان‌های مختلف استان آذربایجان شرقی، نمونه‌های آب در ظرف استریل جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شد. حداکثر در عرض ۲۴ 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 به ترتیب در لاکتوز برانث ۱۰ و ۵ و ۵ سی‌سی تلقیح شده و به انکوباتور با دمای  $36/5^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴-۴۸ ساعت منتقل شد و سپس نمونه‌های لاکتوز مثبت به محیط EC broth برای سنجش میزان کلی‌فرم مدفوعی منتقل شده و تحت حرارت  $44/5^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد (Eaton and Franson, 2005) برای تشخیص /شریشیا کولای نمونه‌ها پس از کشت بر روی محیط کشت EMB تحت مجموعه آزمایش‌ها

بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، VP، MR، SIM، لیزین دکربوکسیلاز آگار قرار گرفت و با استفاده از جدول استاندارد و خصوصیات ظاهری باکتری /شریشیا کولای‌ها شناسایی شد و در ادامه بر روی پلیت محیط کشت BHI تک کلنی خالص شده به صورت خطی کشت داده شد. ایزوله‌های به دست آمده جهت انجام آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل PCR در گلیسرول ۳۰٪ در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. پرگنه جدایه‌هایی با جلای فلزی که تقریباً منحصر به باکتری /شریشیا کولای است به منظور خالص‌سازی به محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar) منتقل و برای تشخیص هویت باکتری به‌عنوان /شریشیا کولای مجموعه آزمایش‌های بیوشیمیایی تحت عنوان IMViC انجام گرفت. جدایه‌هایی که نتایج آزمون IMViC انجام داده شده -- ++ را حاصل نمودند، /شریشیا کولای تشخیص داده شد (Cowan, 1979)



شکل (۱)- محل‌های نمونه‌برداری بر روی نقشه استان آذربایجان شرقی، شهرستان‌هایی که به صورت رنگی مشخص شده‌اند نمایشگر محل‌های نمونه‌برداری هستند.

- شناسایی ژنوتیپی /شریشیا 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 به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۹۵ قرار داده و در ادامه آن را به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژن نموده و به آن ۱۸۰ μl آب دیونیزه افزوده شد ( van Soolingen *et al.*, 1994) برای شناسایی /شریشیا کولای، به صورت 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<sub>1</sub>- B<sub>2</sub>-D می‌باشد. برای انجام این واکنش تکثیر، تعداد سه جفت پرایمر (۱/۵ μl از هرکدام) با ۱ μl DNA و ۲۵ μl ماستر میکس را باهم مخلوط کرده و حجم آن با آب مقطر به ۵۰ μl رسید. واکنش PCR با چرخه‌های واسرشت اولیه در دمای °C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه، با یک مرحله واسرشت سازی در °C ۹۴ در ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در درجه‌ی °C ۶۵ به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی در °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً یک چرخه طویل‌سازی نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. از محصولات حاصله در آگار ۲٪ Gel Document عکس‌برداری گردید ( Doumith *et al.*, 2012)

جدول (۱)- مشخصات پرایمرهای استفاده شده

نام	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر (۳' - ۵')	منبع
<i>gadA</i>	373	F-GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG R-GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	(Doumith <i>et al.</i> , 2012)
<i>chuA</i>	281	F-ATGATCATCGCGCGTGC R-AAACGCGCTCGCGCCTAAT	(Doumith <i>et al.</i> , 2012)
<i>yjaA</i>	216	F-TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACG R-ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	(Doumith <i>et al.</i> , 2012)
TSPE4.C2	152	F-GCGGGTGAGACAGAAACG R-TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	(Doumith <i>et al.</i> , 2012)

جدول (۲) - طبقه‌بندی باکتری *اشریشیا کولای* به چهار گروه فیلوژنی A، B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> و D بر اساس وجود و یا عدم وجود نشانگرهای *chuA*، *yjaA*، *TSPE4.C2*

نشانگر	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	D
<i>TSPE4.C2</i>	-	+	+	+
<i>yjaA</i>	-	+	+	-
<i>chuA</i>	-	-	+	+

#### - بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کولای* توسط آزمون آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) و براساس دستورالعمل انستیتو ملی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی آمریکا (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. برای این منظور جدایه‌ها سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند از تمامی ایزوله‌ها تهیه و در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پاتن طب) شامل سفنازیدیم (۳۰ μg)، سفوناکسیم (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، کوتریماکسازول (۱/۲۵ μg)، آموکسی‌سیلین (۳۰ μg)، جنتامایسین (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، کلرامفنیکل (۱۰ μg)، ایمپینم (۳۰ μg) استفاده شد و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸-۲۴ 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 SPSS ۱۶ آزمون‌های *kruskal-wallis* 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

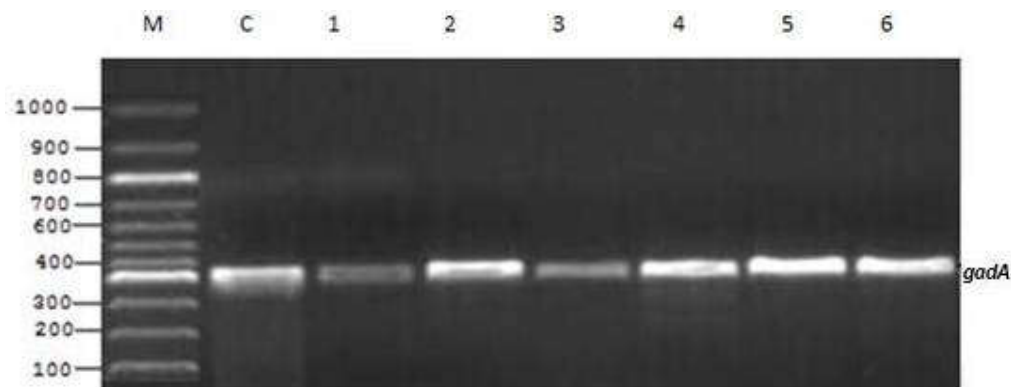
از ۵۷ ایزوله مثبت کلیفرمی پس از کشت در محیط EMB و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی *اشریشیا کولای* و *کلبسیلا* مطابق جدول (۳) تشخیص داده شد.

جدول (۳) - درصد آلودگی و دامنه تغییرات تعداد کلیفرم‌ها 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	کلپسیلا
چشمه	۳-۲۴۰	۱۶ (٪۱۳)	۵ (٪۹)	۵ (٪۸)
قنات	۳-۱۱۰۰	۴۱ (٪۳۵)	۱۸ (٪۳۱)	۷ (٪۱۱)
مجموع	۳-۱۱۰۰	۵۷ (٪۴۸)	۲۳ (٪۴۰)	۱۲ (٪۱۹)

مطابق جدول (۴) از ۲۳ جدایه حاصل ۱۳٪ به‌عنوان B<sub>۱</sub>، ۳۵٪ به‌عنوان B<sub>۲</sub>، ۴۳٪ به‌عنوان A و ۹٪ به‌عنوان D تشخیص داده شدند.

- شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی اشریشیا کولای و تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی باکتری اشریشیا کولای از ۲۳ جدایه‌ی اشریشیا کولای به روش PCR با استفاده از ژن *gadA* ۱۰۰٪ به‌عنوان اشریشیا کولای تشخیص داده شد. مشاهده باندها در شکل (۲) دلیل بر وجود اشریشیا کولای است.



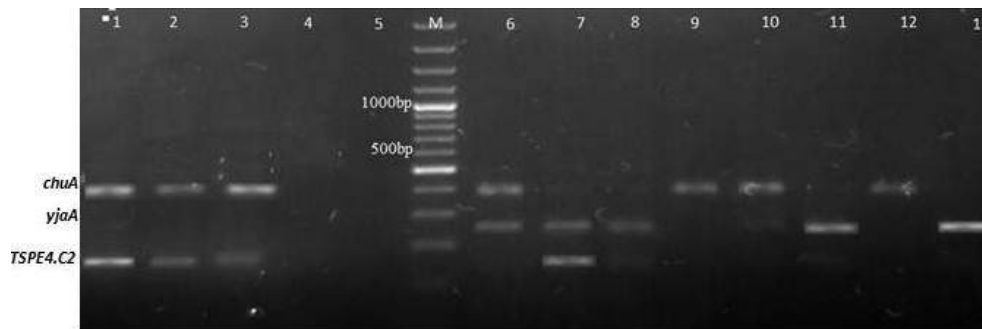
شکل (۲) - الکتروفورز ژل آگارز ایزوله‌های اشریشیا کولای با ژن *gadA* با طول ۳۷۳ pb و ستون C به‌عنوان کنترل مثبت و ستون M به‌عنوان نشانگر با ۱۰۰ جفت باز

جدول (۴) - توزیع ایزوله‌های اشریشیا کولای به تفکیک چشمه و قنات در گروه‌های فیلوژنی B<sub>۱</sub>، A، B<sub>۲</sub> و D.

منبع	تعداد	A	B <sub>۱</sub>	B <sub>۲</sub>	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)

فیلوژنی در شکل با توجه به حضور یا عدم حضور باندها مشخص می‌باشد.

نتایج حاصل از الکتروفورز multiplex PCR در شکل (۳) به تصویر کشیده شده است و انواع گروه‌های

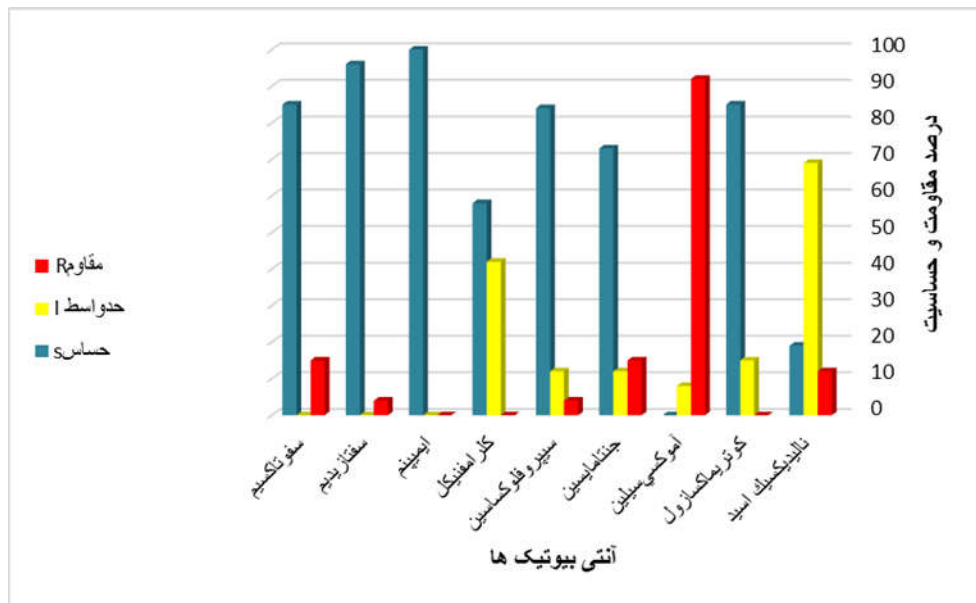


شکل (۳) - الکتروفورز ژل آگارز و تعیین گروه‌های فیلوژنی با استفاده از ژن *chuA*، *yjaA* و *TSPE4.C2* در ایزوله‌های *اشریشیا کولای*، ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۹، ۱۰، ۱۲ گروه D، ستون ۶ در گروه B<sub>2</sub>، ستون ۷ در گروه B<sub>1</sub> و ستون ۱۳ در گروه A قرار دارد. ستون M نشان‌دهنده نشانگر می‌باشد.

اساس میزان مقاوم، حد واسط و حساس ایزوله‌های *اشریشیا کولای* در نمودار (۱) مشخص شده است. نتایج حاصل نشان داد که با احتمال ۹۵٪ بین انواع گروه‌های فیلوژنی باکتری *اشریشیا کولای* از لحاظ حساسیت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

#### - مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کولای*

بیشترین حساسیت مربوط به ایمپینیم 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 ۴٪ و نالیدیکسیکاسید ۱۲٪ و سفتازیدیم ۴٪ و سفوتاکسیم ۱۵٪ ارزیابی شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر



نمودار (۱)- مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کولای*

## بحث و نتیجه‌گیری

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 ۴۸٪ نمونه‌ها از لحاظ کلیفرمی مثبت ارزیابی شدند و از این تعداد، فراوانی ۴۰٪ ایزوله *اشریشیا کولای* و ۱۹٪ *کلبسیلا* توسط آزمایش‌های فنوتیپی به اثبات رسید.

نتایج مطالعه اخیر نشان از آلودگی بالای کلی‌فرمی (۴۸٪) 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 انجام گرفته و ۱۸ درصد از منابع آبی را آلوده نشان داده است، درصد بالایی است

از سال ۱۹۷۱ تا ۲۰۰۲، ۷۶۴ مورد شیوع بیماری‌های منتقله از راه آب ثبت شده است که با آب آشامیدنی مرتبط بوده است که تعداد ۵۷۵۴۵۷ مورد بیماری و ۷۹ مورد مرگ را موجب شده است. عفونت منتقله از راه آب و خطرات بیماری در ایالات متحده 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 ۵/۴ 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



(Renato *et al.*, 2007; Lecointre *et al.*, 2007). در انسان، گروه‌های فیلوژنی جدا شده بیشتر تحت تأثیر محیط‌اند. مطالعه انجام‌شده در برزیل نشان داد که سویه‌های متعلق به B<sub>2</sub> و D با فراوانی کمتری از گروه‌های A و B<sub>1</sub> از محیط و آب‌ها جدا شده‌اند و در روده پستانداران B<sub>2</sub> نسبت به سایر گونه‌ها به فراوانی جدا شده است. این سویه مدت زمان زیادی را می‌تواند در بدن میزبان دوام بیاورد (Renato *et al.*, 2007). در این مطالعه فراوانی گروه‌های A و B<sub>1</sub> در چشمه‌ها و قنات‌ها (۵۶٪) 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<sub>2</sub> در مجموع 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<sub>2</sub> (۱۷/۵٪) D (۴/۵٪) است. مدفوع حیوانات خانگی و اهلی منشأ اصلی سویه‌ی D است و حضور سویه‌های B<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> از حدت بالایی برخوردار است. در این مطالعه نشان داده شده است که ۴۴٪ از کل نمونه‌های متعلق به سویه‌های B<sub>2</sub> و D است که عمدتاً از سویه‌های خارج روده‌ای بیماری‌زا هستند. در نتیجه آلودگی با این سویه‌ها خطر ایجاد بیماری‌های /شیریشیا کولای منتقله توسط آب‌های زیرزمینی که در برخی مناطق به‌عنوان

(Renato *et al.*, 2007). در این تحقیق از ۱۱۸ منبع انتخاب شده در ۲۳ منبع نمونه /شیریشیا کولای شناسایی شد این امر نشان از میزان آلودگی بسیار بالا در منابع آب‌های زیرزمینی ۴۸٪ (۱۶٪ 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 مورد مطالعه می‌باشد.

در این مطالعه جهت شفاف‌تر شدن خطر آلودگی کلیفرمی مطالعه فیلوژنتیکی بر روی /شیریشیا کولای‌های جدا شده انجام پذیرفت. چرا که از میان جمعیت‌های /شیریشیا کولای آلاینده تنها دسته‌ی 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، /شیریشیا کولای به‌تازگی بر پایه بررسی‌های با تکنیک‌های MLEE و MLST به حداقل چهار گروه فیلوژنی A و B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> 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 /شیریشیا کولای‌های بیماری‌زا موفق باشد. در این روش برای صرفه‌جویی زمان و وقت و هزینه چند PCR توأم با هم انجام می‌گیرد (Doumith *et al.*, 2012). معمولاً سویه‌های کومنسال و پاتوژن روده‌ای اغلب به گروه‌های A و B<sub>1</sub> اختصاص داده می‌شوند و سویه‌های بیماری‌زای خارج‌روده‌ای اغلب در گروه B<sub>2</sub> و به میزان کمی در گروه D قرار می‌گیرند. گونه‌ی B<sub>2</sub> نسبت به D و سایر گونه‌ها از حدت بیشتری برخوردار است (1998)

Smith *et al.*, 2007; Chander *et al.*, 2008; Rooklidge, 2008).

در این مطالعه مشخص شد که بیشترین حساسیت مربوط به ایمپینم ۱۰۰٪ است که مصرف آن به صورت 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 جتتامایسین و سفوتاکسیم در باکتری‌های /شیریشیا کولای جدا شده 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 به گونه‌ای 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 با مطالعه مذکور بسیار مشابهت دارد. به‌علاوه، مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید، جتتامایسین و سیپروفلوکساسین 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 مورد توجه قرار گیرد. /شیریشیا کولای‌ها به‌خصوص گروه‌های

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

در خصوص باکتری /شیریشیا کولای، مقاومت آن در برابر داروها پتانسیل این باکتری را در بیماری‌زایی بالا می‌برد. در حال حاضر استفاده بیش از حد 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 /شیریشیا 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.*, 2007; Diarra *et al.*, 2009; *al.*). 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 پردازند. باکتری‌های مقاوم باعث تغییر فلور میکروبی خاک شده و کودهای استفاده شده به‌همراه 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; )

فیلوژنی بیماری‌زا به‌طور فراوان از آب‌های زیرزمینی و خصوصاً قنات‌ها جدا شده است. علاوه بر مورد فوق داشتن مقاومت بالای باکتری‌های /شریشیا کولای جدا شده به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً

آموکسی‌سیلین قابل‌توجه است. لذا ضرورت کنترل انتشار آلاینده‌ها به آب‌های زیرزمینی برای جلوگیری از شیوع آن‌ها امری ضروری است.

## منابع

- Aragonés, 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., 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 Cambridge 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 multilocus 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., Stoppe, M. (2007). Identification of *Escherichia coli* from groups A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 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, 2<sup>nd</sup> 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

Shaban Lokarani, N.<sup>1\*</sup>, Shayegh, J.<sup>2</sup>, Sadeghi, J.<sup>3</sup>, Mousavi, Z.<sup>4</sup>

1. M.Sc 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<sub>2</sub> and 56% belonged to A and B<sub>1</sub> 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.

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