

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن مقاومت بتالاکتاماز (TEM-1) در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از آب های آشامیدنی

Determination of antibiotic resistance pattern and TEM-1 gene prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water

معصومه اطهری نیا^۱، شایلا صفائیان^{۱*}، ناهید رحیمی فرد^{۱،۲}، رضوان موسوی ندوشن^۱، بابک پوراکبری^۳

Masomeh Atharinia¹, Shila Safaiaian^{*1}, Nahid, RahimiFard^{1 and 2}, Rezvan Mosavi Nadoshen¹, Babak Porakbari^{1 and 3}

۱- گروه صنایع غذایی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

1. Department of Food Industry, North Tehran Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Faculty of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences

3. Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: shila2462462@yahoo.co.in

shila2462462@yahoo.co.in

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳)

چکیده

واژه های کلیدی

آب آشامیدنی،

ژن TEM-1،

سودوموناس آئروژینوزا،

کیفیت آب،

مقاومت آنتی بیوتیکی

کیفیت میکروبی آب آشامیدنی اهمیت اساسی و جدی برای سلامت عمومی دارد. با توجه به کمبود اطلاعات جامع در خصوص میزان آلودگی آب آشامیدنی در سطح استان تهران این پژوهش به منظور ارزیابی میزان آلودگی آب آشامیدنی به باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی ژن TEM-1 در سودوموناس آئروژینوزا های مولد بتالاکتامازهای با طیف اثر گسترده (ESBL) و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیک این سویه ها اطلاعات مفیدی در مورد این باکتری بیماری زای فرصت طلب فراهم می آورد. در این پژوهش ۳۰۰ نمونه آب آشامیدنی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به چهار آنتی بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. از نظر ژنوتیپی وجود ژن بتالاکتاماز TEM-1 با روش PCR بررسی گردید. در این بررسی ۱۷ نمونه (۵/۶۷ درصد) از آب های آشامیدنی به سودوموناس آئروژینوزا آلوده بودند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم/رلباکتام (۱۱/۷۶ درصد) و سفنازیدیم/آویباکتام (۱۰۰٪) در آب های آشامیدنی مشاهده شد. در بررسی ژنوتیپی با انجام آزمون PCR از ۱۷ سویه فنوتیپ مثبت، ۱۶ نمونه (۹۴/۱ درصد) شامل ژن TEM-1 بودند. نتایج مشخص کرد که آب های آشامیدنی در برخی موارد دارای آلودگی با باکتری سودوموناس آئروژینوزا هستند. اغلب سویه های جدا شده مقاوم به آنتی بیوتیک هستند و در میان سویه های تولید کننده ESBL، ژن TEM-1 دارای فراوانی بیشتری می باشد. نتایج بیانگر این است که ژن TEM-1 در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه های جدا شده نقش بسزایی دارد. داده های حاصل از این پژوهش به توسعه اقدامات پیشگیرانه در برابر شیوع سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک کمک می کند.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

The microbial quality of drinking water is fundamental and has serious importance for public health. Regarding to the clinical significance, *Pseudomonas aeruginosa* was surveyed to evaluate the degree of the contamination of drinking water and the bacterial resistance to antibiotics. Isolation of the TEM-1 gene in ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* and the pattern of antibiotic resistance provide useful information about this opportunistic pathogen. In this study, the prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas* species distributed in drinking water were investigated. 300 samples of drinking water were examined. Determination of antibiotic susceptibility of strains to four antibiotics was performed by disk diffusion method. The ESBL-producing *P. aeruginosa* containing TEM-1 gene were detected by PCR using TEM-1 specific primers, 17 samples (5.67%) in drinking water showed *P. aeruginosa* contamination. The highest resistance to imipenem/relebactam (11.76%) and ceftazidime/avibactam antibiotics (100%) was observed in drinking water. According to PCR results of 17 positive phenotype strains, 16 isolates (94.11%) carried TEM-1 gene. Results indicated the contamination of drinking water with *P. aeruginosa*. Most isolated strains are resistant to antibiotics and TEM-1 gene is more abundant among ESBL-producing strains. The results indicate that TEM-1 gene plays an important role in antibiotic resistance in isolated strains.

Keywords: Drinking water, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, TEM-1 gene, Water quality

مقدمه

سودوموناس‌ها گروه بزرگی از باکتری‌ها هستند که عمدتاً در خاک، آب دریا و آب‌های شیرین زندگی می‌کنند و بر روی گیاهان، حیوانات و محیط‌های بالینی نیز یافت می‌شوند (Palleroni 2010). سودوموناس‌ها بسیار متنوع هستند و می‌توانند با طیف وسیعی از زیستگاه‌ها سازگار شده و حتی می‌توانند در آب مقطر نیز رشد کنند. این سازگاری دلیل حضور دائمی آنها در محیط است (Kristina et al. 2009). ویژگی پروتوتروفیک و تطبیق‌پذیری متابولیک، انعطاف‌پذیری ژنوم و توانایی مقابله با انواع مختلف استرس (ترکیبات فیزیکی، شیمیایی و ضدباکتریایی) از ویژگی‌های قابل توجه اعضای این جنس است (Vaz-Moreira et al. 2012). سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل بیماری‌های منتقله از راه غذا و آب است و شیوع عفونت ناشی از این باکتری بسیار گسترده می‌باشد (Trautmann et al. 2005). این باکتری، بیماری‌زای فرصت طلب است و می‌تواند دستگاه ریوی، مجاری ادراری، محل سوختگی و زخم را آلوده کند و همچنین باعث ایجاد سایر عفونت‌های خونی در افراد دارای نقص ایمنی می‌شود (Vachee and Leclerc 1995). این گونه قابلیت رشد در آب‌هایی که فاقد مواد

مغذی هستند را نیز دارد و می‌تواند آب‌های بسته‌بندی‌شده را آلوده کرده و برای مدت طولانی زنده بماند (Moreira et al. 1994). سودوموناس آئروژینوزا عضو گروه باکتری‌های گاما پروتوباکتریا، مسئول ۱۰٪-۲۰٪ عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه در بیماران با سوختگی شدید و بیماران مبتلا به سرطان و ایدز است (Trautmann et al. 2001). سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان مهمترین عامل آلودگی در آب‌های آشامیدنی در نظر گرفته می‌شود. طبق پژوهش‌هایی که توسط آلن و گلدریچ در سال ۱۹۷۵ انجام گرفت، مشخص شد که سه درصد از نمونه‌های آب آشامیدنی دارای سودوموناس آئروژینوزا با تعداد CFU/ml ۱ تا ۲۳۰۰ CFU/ml هستند (Allen and Geldreich 1975). همچنین کدکس بین‌المللی مواد غذایی این میگرورگانیزم را به‌عنوان شاخص باکتریایی کیفیت آب معرفی کرده است (CAC RCP 33- 1985). سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن مقاومت در برابر مواد ضدعفونی‌کننده است و به‌علت توانایی تولید بیوفیلم این باکتری به‌عنوان رایج‌ترین آلاینده در تولید آب آشامیدنی شناخته می‌شود (Guerin-Mechin et al. 2000; Mah et al. 2003; Mena and)

از بتالاکتامازهای کلاس A هستند. بیشتر این آنزیم‌ها مشتقات بتالاکتامازهای TEM-1 و SHV با یک یا چند تغییر در اسیدهای آمینه آنها می‌باشند (Bradford 2001; Howard *et al.* 2002). تولید بتالاکتاماز Ampc کروموزومی با مکانیسم‌های غیر آنزیمی، مثل تغییر در نفوذپذیری غشاهای خارجی، می‌تواند باعث مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها در سودوموناس آئروژینوزا شود. براساس طبقه بندی مولکولی Ambler، چهار کلاس آنزیمی A-D شناخته شده است که این طبقه بندی براساس توالی نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه در این آنزیم‌ها می‌باشد. آنزیم‌های کلاس A, C, D از طریق مکانیسم برپایه سرین عمل می‌کنند. درحالی که کلاس B یا متالوبتالاکتامازها برای فعالیت خود به فلز روی نیاز دارند. اکثر ESBL‌ها در کلاس مولکولی A قرار دارند، ESBL‌های مشتق از TEM-1, SHV مربوط به آنزیم‌های کلاس A می‌باشند. اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی شناخته شده در باکتری‌های گرم منفی، TEM-1 بود. این آنزیم امروزه به عنوان شایع ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی به حساب می‌آید (Shojapour *et al.* 2011). بتالاکتاماز TEM-1 اولین بتالاکتامازی بود که به وسیله پلاسمید آنتروباکتریاسه‌ها کد شد و سودوموناس آئروژینوزا نیز قادر به تولید آن می‌باشد (Ashbolt 2004). سویه‌های تولید کننده ESBL به طور فزاینده‌ای به داروهای ضد میکروبی بتالاکتام مقاوم شده‌اند که باعث ایجاد مشکل در درمان بیماران سرپایی می‌شود. (2008 Bennett 2004; Pongpeach *et al.*). با توجه به این که آب جزء لاینفک زندگی تمام انسان‌ها در تمام سنین می‌باشد و انتقال آلودگی‌های مختلف می‌تواند خطر بزرگی برای سلامتی اقشار مختلف به شمار رود، کسب دانسته‌های بیشتر در خصوص میزان و فراوانی باکتری‌های دارای جهش‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها به خصوص سودوموناس‌ها ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به عدم مطالعه کافی روی سودوموناس‌های آلوده کننده آب‌های آشامیدنی و انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک از آنها لازم است این موضوع مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

Gerba 2009. آلودگی آب‌های تفریحی و آب لوله کشی با شیوع سودوموناس همراه بوده است، با این حال، نقش نسبی آب در انتقال این باکتری به انسان هنوز مشخص نیست (Kristina *et al.* 2009). برخی منابع معتقدند که منبع اصلی سودوموناس آئروژینوزا در آب-های سطحی فاضلاب خانگی است (Vachee *et al.* 2018; Le *et al.* 1995). ولی میزان آلودگی روده‌ای سودوموناس در انسان کم است. این موضوع نشان می‌دهد که وجود این باکتری در آب لزوماً ناشی از آلودگی فاضلاب نیست. تصور می‌شود که سایر منابع آلوده کننده آب با سودوموناس، آب ناشی از خاک‌های کشاورزی، زهکشی و روان آب‌های شهری می‌تواند باشد (Mena *et al.* 2009). مصرف بی رویه یا نداشتن الگوی مصرف درست آنتی بیوتیک یکی از چالش‌های اساسی در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی تلقی می‌شود (Tenover 2006). مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زا نشان دهنده یک مشکل بهداشتی جهانی است که نیاز به درک بهتر از سرنوشت باکتری مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی و گسترش آنها در سیستم تامین آب دارد. استفاده گسترده و بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها باعث آلودگی منابع سطح زمین و منابع آب زیرزمینی توسط آنتی بیوتیک‌ها و ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک شده است. فرایند تصفیه آب فعلی نمی‌تواند به طور کامل آنتی بیوتیک‌های موجود در آب آشامیدنی را از بین ببرد. علاوه بر این انتقال افقی ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک میان میکروب‌ها، در سیستم تامین آب می‌تواند باعث ظهور و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها در آب آشامیدنی شود و بر سلامت انسان تاثیر گذارد (Bai *et al.* 2015). ردیابی آنتی بیوتیک‌ها در آب منبع و فاضلاب نیز می‌تواند تا حد زیادی بر بهداشت عمومی تأثیر بگذارد و این مسئله برای صنعت آب آشامیدنی حائز اهمیت است (Bergeron *et al.* 2015). آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام درصد بالایی از آنتی بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص داده‌اند. بتالاکتامازها با طیف اثر گسترده (Extended Spectrum Beta-Lactamase)، گروهی از آنزیم‌ها با منشاء پلاسمیدی هستند که قادر به تخریب سفالوسپورین‌های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم هستند (Knothe *et al.* 1991; Jacoby 1983). ESBL‌ها عمدتاً توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. این آنزیم‌ها

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آزمون: در این پژوهش، ناهمگونی، انتشار و مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های سودوموناس توزیع شده در آب‌های آشامیدنی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌برداری از اوایل بهار تا اواخر تابستان سال ۱۳۹۸ از مناطق مختلف استان تهران انجام شد. جمع‌آوری نمونه‌های آب طبق روش ISO 19458، 2006 انجام گرفت. برای جمع‌آوری نمونه‌های آب آشامیدنی از بطری‌های شیشه‌ای (۵۰۰ ml) سترون دارای ۰/۱ ml تیوسولفات سدیم به ازای هر ۱۰۰ ml گنجایش بطری برای خنثی‌سازی ماده‌گندزدا استفاده شد. نمونه‌ها در ظرف دربسته دارای یخ خشک به-منظور جلوگیری از بین رفتن میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود به آزمایشگاه تحویل داده شد. طی ۲۴ ساعت پس از نمونه‌گیری آزمون میکروبیولوژی برای جداسازی گونه‌های سودوموناس احتمالی موجود در آب انجام شد. برای جستجوی سودوموناس طبق روش ISO 16266، 2006، مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر آب روی فیلترهای غشایی سترون ۰/۴۵ میکرون بوسیله دستگاه میلی‌پور (مدل CHMLAB اسپانیا) فیلتر شد. برای تشخیص سودوموناس *آئروژینوزا* در نمونه‌های مختلف آب، فیلترها روی محیط ستریماید آگار غنی شده با ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید نالیدیسیک ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد (مشاهده رشد) و ۴ درجه سانتیگراد (عدم رشد) گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های سبز آبی دارای فلورسانس زیر نور UV (۳۶۴ nm) به‌عنوان سودوموناس *آئروژینوزا* احتمالی در نظر گرفته شدند. برای انجام آزمون تائیدی کلنی‌های تیپیک و غیرتیپیک جهت انجام آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی روی محیط کشت آگار مغذی به‌صورت خطی کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از کلنی‌های منفرد رشد یافته برای انجام آزمون‌های تاییدی اکسیداز و استامید استفاده شد. سویه‌های تایید شده سودوموناس *آئروژینوزا* در محیط کشت TSB دارای ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش کربی-بایر (Hudzicki 2016; Andrews 2001; Kirby et al. 1959) بر طبق

استانداردهای CLSI 2021 استفاده شد. برای این منظور سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس با استفاده از سوآپ سترون از سوسپانسیون میکروبی برداشته و روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اندازه‌هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شده شامل: امپینم/رلباکتام (IMI, 10 µg/ 25 µg)، جنتامایسین (GM, 10 µg)، آمیکاسین (AK, 30 µg)، سفتازیدیم/آویباکتام (CAZ, 30/20 µg) بودند. از سویه (P. aeruginosa ATCC 27853) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA و روش ژنوتیپی تعیین ESLB: از روش فنل کلفرم بهینه شده برای استخراج دی‌ان‌ای باکتریایی استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. سلول‌های ته‌نشین وارد دستورالعمل شدند. ابتدا فرایند هضم سلولی در ۴۰۰ میکرولیتر بافر استاندارد STE، SDS (۲ درصد) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. تفکیک اسیدهای نوکلئیک به کمک محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکلی (۱-۲۴-۲۵) و سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. در پایان دی‌ان‌ای در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از هرگونه دی‌ان‌ای آز حل شده و روی آگاروز یک درصد الکتروفورز شده و مقدار آن به‌وسیله نانودراپ (Thermo2000c, USA) تعیین شد. فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس دارای آنزیم Taq دی‌ان‌ای پلیمرز (Ampliqon 2x Red)، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها و ۲۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای استخراج شده در دستگاه ترموسایکلر (PeQlab, germany) انجام شد. برنامه دمایی استفاده شده شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. در پایان دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز بررسی شد. جایگاه TEM-1 محصول PCR با اندازه ۸۶۷

جفت باز تولید می‌کند. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین ژن TEM-1 در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. Sequence of primers used

Primers	Nucleotide Sequences	Product
TEM-F	5'ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	867
TEM-R	5'CTGACAGTTACCAATGCTTA-3	bp

جدول ۲- محدوده مقاومت و حساسیت سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک‌ها در تست آنتی بیوگرام برحسب میلی لیتر

Table 2. Range of resistance and susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics in antibiogram test in ml

Antibiotics name	Symbol	Zone Diameter breakpoints (mm)		
		Resistance	Semi sensitive	Sensitive
Gentamicin	GM	12 _≤	13-14	≥15
Amikacin	AK	14 _≤	15-16	≥17
Imipenem /relebactam	IMI	19 _≤	20-22	≥23
Ceftazidime/avibactam	CAZ	20 _≤	---	≥21

نتایج و بحث

مطابق نتایج، از مجموع ۳۰۰ نمونه آب آشامیدنی مورد آزمایش، ۱۷ نمونه (۵٫۶۷٪) از نظر وجود سودوموناس آئروژینوزا مثبت شدند. همچنین نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به جنتامایسین (۱۰۰٪)، آمیکاسین (۱۰۰٪) و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمپنم/رلباکتام (۱۱٫۷۶ درصد) و سفتازیدیم/آویباکتام (۱۰۰٪) بود (جدول ۲). بررسی ژنوتیپی با انجام آزمون PCR از ۱۷ سویه فنوتیپ مثبت، ۱۶ نمونه با فراوانی (۹۴/۱۱ درصد) داری ژن TEM-1 بودند (شکل ۱).

با مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در تست آنتی بیوگرام با جدول شماره ۲، درصد مقاومت و حساسیت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه مشخص گردید. مقادیر منطقه عدم رشد آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن برای سودوموناس آئروژینوزا/های جدا شده از نمونه‌های آب آشامیدنی (۱۷ نمونه از ۳۰۰ نمونه) در جدول ۳ ارائه شده است. در جدول ۴ نتایج آنتی بیوگرام ایزوله‌ها برای آب آشامیدنی آورده شده است.

جدول ۳- توزیع فراوانی هاله عدم رشد آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه در ۱۷ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از آب آشامیدنی

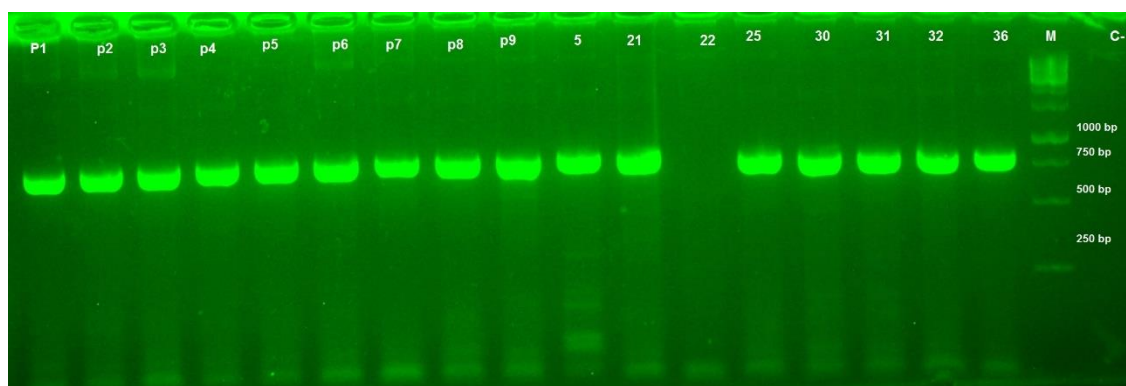
Table 3. Frequency distribution of stunted growth halo of studied antibiotics in 17 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water

Antibiotics name	Symbol	Zone Diameter breakpoints (mm) and frequently distribution				
		Resistance	Number (percent)	Semi sensitive	Number (percent)	Sensitive
Gentamicin	GM	12 _≤	(0) 0	14-13	(0) 0	15 _≤
Amikacin	AK	14 _≤	(0) 0	16-15	(0) 0	17 _≤
Imipenem /relebactam	IMI	19 _≤	(11.76) 0	20-22	(11.76) 2	23 _≤
Ceftazidime/avibactam	IMI	20 _≤	(100) 17	-	(0) 0	21 _≤

جدول ۴- فراوانی درصد موارد حساس، نیمه حساس و مقاوم سودوموناس آئروژینوزا/های جدا شده از آب‌های آشامیدنی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

Table 4. Frequency of percentage of sensitive, semi-sensitive and resistant cases of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water to antibiotics used

Antibiotics name	Symbol	The result of the antibiogram test		
		Sensitive (%)	Semi sensitive (%)	Resistance (%)
Gentamicin	GM	(100%) 17	0	0
Amikacin	AK	(100%) 17	0	0
Imipenem /relebactam	IMI	(76.47%) 13	(11.76%) 2	(11.76%) 2
Ceftazidime/avibactam	CAZ	0	0	(100%) 17



شکل ۱- ژل الکتروفورز ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی کدکننده بتالاکتاماز TEM-1، اندازه باند های TEM-1، ۸۶۷ جفت باز می باشد که در تمام جدایه ها به جز جدایه ۲۲ قابل مشاهده می باشد.

Figure 1. Gel electrophoresis of antibiotic resistance genes encoding TEM-1 beta-lactamase, TEM-1 band size is 867 bp, which can be seen in all isolates except 22 isolates.

(et al. 2006). منابع آب آشامیدنی به دلیل ارتباط با آلودگی حاصل از خاک آغشته به کود (Han et al. 2018; Udikovic et al. 2014) فاضلاب های شهری و بیمارستانی (Le et al. 2018; Manaia et al. 2018) می توانند میزبان عوامل بیماری زای متنوعی باشند. پژوهش ها مشخص کردند که ممکن است در طول تصفیه آب و در آب لوله کشی مقاومت به برخی از آنتی بیوتیک ها بوجود آید، تصفیه آب می تواند باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری هایی که در طول مسیر تصفیه زنده مانده اند، شود و سیستم های توزیع آب ممکن است به عنوان مخزنی مهم برای گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی به عوامل بیماری زای فرصت طلب عمل کنند (Xi et al. 2008; Baquero et al. 2009). مطالعات مشخص کرده است که استفاده از کلر برای ضد عفونی آب آشامیدنی می تواند باعث افزایش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک به خصوص سودوموناس در محیط های آبی شود (Jia et al. 2015). با توجه به دستورالعمل های توصیه شده مربوط به کیفیت آب (EC/۹۸/۸۳)، آب در نظر گرفته شده برای مصرف انسان باید فاقد سودوموناس آئروژینوزا باشد. بر اساس این یافته ها، پژوهشگران استفاده از سودوموناس آئروژینوزا را به عنوان شاخص رشد مجدد میکروبی در سیستم های توزیع آب پیشنهاد داده اند (Ribas et al. 2000). سودوموناس به عنوان یک ارگانیسم شاخص در آلودگی آب استفاده می شود و به عنوان یک جانشین برای حضور سایر عوامل بیماری زا فرصت طلب پیشنهاد شده است (Herath et al. 2014). در حال حاضر استفاده بیش از حد و خودسرانه از آنتی بیوتیک ها یکی از دلایل مهم شیوع مقاومت

شماره دسترسی سویه های جدید سودوموناس آئروژینوزا به دست آمده از نمونه های آزمون شده در جدول ۵ ارائه شده است، همچنین در پایگاه NCBI ثبت و از طریق لینک زیر قابل دسترسی می باشند. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Atharinia>

جدول ۵- شماره دسترسی سویه های جدید سودوموناس آئروژینوزا

Table 5. Accession Sequence ID of new *Pseudomonas aeruginosa* strains

Accession	Sequence ID
MZ076518	Clone21
MZ076519	Clone22
MZ076520	Clone25
MZ076521	Clone30
MZ076522	Clone31
MZ076523	Clone32
MZ076524	Clone36
MZ076525	CloneP1
MZ076526	CloneP2
MZ076527	CloneP3
MZ076528	CloneP4
MZ076529	CloneP6
MZ076530	CloneP7
MZ076531	CloneP9

بحث و نتیجه گیری

بررسی کیفیت و سلامت آب آشامیدنی همواره یکی از موضوعات مهم در بهداشت عمومی بوده است. کیفیت آب آشامیدنی توسط آزمون های شیمیایی، آلی و بیولوژیکی ارزیابی می شود (Petraccia

آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف می باشد. افزایش بی رویه داروهای بتالاکتام با طیف اثر وسیع سبب انتشار باکتری های تولید کننده متالوبتالاکتاماز می شوند (Fernando et al. 2016). مطالعات نشان می دهد که سطوح مختلف خطر مقاومت های آنتی بیوتیکی در منابع آب آشامیدنی نیاز به استراتژی های مختلف درمانی برای بهبود ایمنی زیستی آب آشامیدنی دارند (Han et al. 2020). در تحقیق حاضر مشخص شد که ۵/۶۷٪ از نمونه های آب آشامیدنی دارای آلودگی با سودوموناس آئروژینوزا هستند. میزان آلودگی به سودوموناس در آب آشامیدنی نشان دهنده آلوده بودن منابع تولید آب به این باکتری و تاثیر کم مواد ضد عفونی کننده مانند کلر برای از بین بردن باکتری در طی مراحل تصفیه و همچنین مقاوم شدن این باکتری نسبت به مواد ضد عفونی کننده می باشد که مطابق با مطالعات انجام شده بر اساس میزان افزایش باکتری و تغییر جامعه باکتری بعد از کلرزنی در آب آشامیدنی می باشد (Jia et al. Ribas et al. 2000; 2015). پژوهش های متعددی در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس ها در سویه های بالینی نیز انجام شده است که نشان می دهد عامل شایع ترین عفونت بیمارستانی در بیماران سوختگی سودوموناس آئروژینوزا می باشد (Adabi et al. Lari et al. 2000; 2011; 2015; Zolfaghari et al.). این آلودگی ممکن است همراه با فاضلاب بیمارستانی به آب های زیر زمینی منتقل و باعث گسترش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، توزیع و مخازن آنها در محیط زیست شود و همچنین وارد سیستم شبکه آب رسانی شده و باعث بروز مشکلاتی ناشی از مقاومت این میکروارگانیسم نسبت به مواد ضد عفونی در آب آشامیدنی شود. طی بررسی های انجام شده بر روی فاضلاب بیمارستانی بیشترین مقاومت سودوموناس نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفتریزوکسیم و تری متوپریم/سولفامتوکسازول ۲۶/۴۷ درصد بود (Hadi et al. 2011). در پژوهشی که روی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا در محیط های آبی در مناطق گرمسیری و معتدل انجام شد مشخص گردید که ۱۵٪ و ۳۳٪ سویه های جدا شده از ناحیه سویس و هند به ترتیب در برابر ایمی پنم مقاوم بودند (Devarajan et al. 2017). همچنین در بررسی که روی مقاومت به آنتی بیوتیک در سودوموناس های جدا شده از رودخانه دانوب انجام دادند مشخص شد که ۱/۲٪ از سویه های جدا شده به ایمی پنم مقاوم بودند.

همچنین مشخص کردند که مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها بسیار نادر بوده و فقط دو سویه به ترتیب نسبت به آمیکاسین و جنتامایسین مقاوم بودند (Kittinger et al. 2016). مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به ایمی پنم در تحقیقی که توسط Olga بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از محیط های آبی یونان انجام شد نیز، تایید شد (Olag et al. 2016). در مطالعه Camiade و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص شد که از میان ۳۱۶ سویه جدا شده سودوموناس از زباله های مدفوعی، محیطی و آب های سطحی، مقاومت زیاد به آموکسی سیلین و تیکارسیلین، سفوتاکسیم، کلرامفنیکل، تری متوپریم/سولفامتوکسازول و فسفومایسین تشخیص داده شد (Camiade et al. 2020). در مطالعه Vaz-Moreira و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های سودوموناس در آب آشامیدنی مشخص شد فنوتیپ های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها درصد بالایی از مقاومت را در برابر برخی بتالاکتام ها نشان دادند که بیش از ۸۰٪ سویه ها به سفالوتین (۱۰۰٪)، تیکارسیلین (۸۴٪) و تیکارسیلین با اسید کلاولانیک (۸۰٪) مقاوم هستند، مقادیر بالای شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی نیز برای سولفونامید کوتریموکسازول (۷۸٪) و برای اپوکسید فسفومایسین (۶۹٪) مشاهده شد (Vaz-Moreira et al. 2012). در مطالعه ای که در سال های گذشته در ایران بر روی سودوموناس آئروژینوزا مولد بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع انجام شده است، نتایج به شرح زیر می باشد: در سال ۲۰۰۸ شکیبایی و همکاران از ۱۲۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۴۱ مورد (۳۴٪) و میر صالحیان در سال ۲۰۰۸ نیز ۴۰ سویه (۴۰٪) را مولد ESBL مثبت و شاه چراغی و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۶۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۲۳۴ سویه (۳۹٪) را مولد بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع گزارش کردند (Shakibaie et al. 2008; Mirsalehian et al. 2008; Shahcheraghi et al. 2009). موارد مطرح شده مربوط به سویه های جدا شده از نمونه های بالینی بوده است و تاکنون بررسی بر روی نمونه های محیطی در ایران به صورت پژوهش حاضر صورت نگرفته است. در پژوهش حاضر مشخص شد که از بین آنتی بیوتیک های استفاده شده، این باکتری نسبت به دو آنتی بیوتیک جنتامایسین، آمیکاسین کاملاً حساس می باشد. بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های

باشند و یا به زودی قابل کاربرد نخواهند بود. اگرچه اصلی ترین علت مقاومت دارویی را به ژن های قابل انتقال مقاوم نسبت به آنتی-بیوتیک ها نسبت داده اند، اما باید در نظر داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها به گزینش باکتری هایی با مقاومت دارویی می انجامد. بنابراین انتخاب آنتی بیوتیک مناسب بر اساس آنتی بیوگرام دقیق و به موقع نقش مهمی در جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی خواهد داشت. لازم به ذکر است به-دلیل پیچیدگی عوامل موثر در پدیده مقاومت دارویی در محیط های آبی، انجام پژوهش های مکرر برای پایش توسعه مقاومت آنتی-بیوتیکی در باکتری های پاتوژن برای حفظ سلامتی انسان ها لازم و ضروری می باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری گروه میکروبیولوژی و بیولوژی پژوهشگاه صنایع غذایی و فرآورده های کشاورزی پژوهشگاه استاندارد در انجام آزمون های میکروبیولوژی و آزمایشگاه میکروبیولوژی کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی جهت جمع آوری نمونه ها تشکر و قدردانی می-شود.

منابع

- Adabi M, Talebi TM, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, Moghadam MN, Majidpour A. 2015. Determination of antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with burn wounds. *Journal of Ardabil University of Medical Science (JAUMS)*. 15.1: 66-74. (In Farsi with English abstract)
- Allen MJ, Geldreich EE 1975. Bacteriological criteria for groundwater quality. *Ground Water* 13: 45-52.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 48: 5-16.
- Ashbolt N.J. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 198: 229-238.
- Bai X, Ma X, Xu F, Li J, Zhang H, Xiao X. 2015. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. *Science of the Total Environment*. 15: 24-31.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*. 19: 260-265.
- Bauer AW, Perry DM, Kirby WM. 1959. Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results. *AMA archives of internal medicine*. 104: 208-216.
- Bergeron S, Boopathy R, Nathaniel R, Corbin A, LaFleur G. 2015. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking

- water. International Biodeterioration & Biodegradation. 102: 370-374.
- Bonnet R. 2004.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 48: 1-4.
- Bradford PA. 2001.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical microbiology reviews. 14: 933-951.
- Camiade M, Bodilis J, Chaftar N, Riah-Anglet W, Gardères J, Buquet S, Ribeiro AF, Pawlak B. 2020.** Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water. FEMS microbiology ecology. 96: fiae008.
- CLSI, 2021.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-ED 31. Publication, Wayne, Pa, USA.
- Codex alimentarius, 2019.** Standard for natural mineral waters. CXT 108-1981. Adopted in 1981, Revised in 1997, 2008. Amended in 2019.
- Devarajan N, Köhler T, Sivalingam P, Van Delden C, Mulaji CK, Mpiana PT, Ibelings BW, Poté J. 2017.** Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: a prevalence study under tropical and TEM-1perate climate conditions. Water Research. 115: 256-265.
- Farshchian MR, Roshani M, Reihani RD. 2015.** Determination of antibiotic resistance pattern in bacteria isolated from municipal wastewater treatment plant. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 126: 11-21. (In Farsi with English abstract)
- Fernando DM, Tun HM, Poole J, Patidar R, Li R, Mi R, Amarawansa GE, Fernando WD, Khafipour E, Farenhorst A, Kumar A. 2016.** Detection of antibiotic resistance genes in source and drinking water samples from a first nations community in Canada. Applied and environmental microbiology. 15: 4767-4775.
- Guerin-Mechin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B., and Leveau J. 2000.** Quaternary ammonium compound stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. Intern. J. Food Microbiol. 55: 157-159.
- Hadi M, Shokoohi R, Namvar AE, Karimi M, Aminabad MS. 2011.** Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan City. Iranian Journal of Health and Environment. 4:105-14. (In Farsi with English abstract)
- Han XM, Hu HW, Chen QL, Yang LY, Li HL, Zhu YG, Li XZ, Ma YB. 2018.** Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. Soil Biology and Biochemistry. 126: 91-102.
- Han Z, Zhang Y, An W, Lu J, Hu J, Yang M. 2020.** Antibiotic resistomes in drinking water sources across a large geographical scale: Multiple drivers and co-occurrence with opportunistic bacterial pathogens. Water Research. 183: 116088.
- Herath AT, Abayasekara CL, Chandrajith R, Adikaram NK. 2014.** *Pseudomonas aeruginosa* in bottled drinking water in Sri Lanka: a potential health hazard. Water Science and Technology: Water Supply. 6: 1045-1050.
- Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. 2002.** Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -Lactamases in nosocomial infection associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents and Chemother. 3: 659-664.
- Hudzicki J. 2009.** Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American society for microbiology. 15: 55-63.
- ISO 16266. 2006.** Water quality, Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*, Method by membrane filtration.
- ISO 19458. 2006.** Water quality - Sampling for microbiological analysis.
- Jacoby GA, Medeiros AA. 1991.** More extended spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 9: 97-1704.
- Jia S, Shi P, Hu Q, Li B, Zhang T, Zhang XX. 2015.** Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination. Environmental science & technology. 20: 12271-12279.
- Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Topitsch D, Liebmann A, Grisold AJ, Farnleitner AH, Kirschner A, Zarfel G. 2016.** Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. Frontiers in microbiology. 7: 586.
- Knothe H, Shah P, Kremery V. 1983.** Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 6: 315-317.
- Lari AR, Alaghebandan R, Nikui R. 2000.** Epidemiological study of 3341 burns patients during three years in Tehran, Iran. Burns. 1: 49-53. (In Farsi with English abstract)
- Larsson DJ, Andremon A, Bengtsson-Palme J, Brandt KK, de Roda Husman AM, Fagerstedt P, Fick J, Flach CF, Gaze WH, Kuroda M, Kvint K. 2018.** Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. Environment international. 117: 132-138.
- Le TH, Ng C, Tran NH, Chen H, Gin KY. 2018.** Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor sysTEM-1s. Water research. 145: 498-508.
- Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS and O'toole GA. 2003.** A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. 426: 306-310.
- Manaiá CM, Rocha J, Scaccia N, Marano R, Radu E, Biancullo F, Cerqueira F, Fortunato G, Iakovides IC, Zammit I, Kampouris I. 2018.** Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. Environment international. 115: 312-324.
- Mena KD, Gerba CP. 2009.** Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Reviews of environmental contamination and toxicology. 201: 71-115.
- Mirsalehian A, Feisabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal ameli F, Goli H. 2008.** Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal. 66: 333-337. (In Farsi with English abstract)
- Moreira L, Agostinho P, Morais PV, Da Costa MS. 1994.** Survival of allochthonous bacteria in still mineral water

- bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. Journal of Applied Bacteriology. 3: 334-339.
- Olga P, Apostolos V, Alexis G, George V, Athena M. 2016.** Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. FEMS Microbiology Ecology. 92: 5.
- Palleroni NJ. 2010.** The pseudomonas story. Environmental microbiology. 6: 1377-1383.
- Petraccia L, Liberati G, Masciullo SG, Grassi M, Fraioli A. 2006.** Water, mineral waters and health. Clinical nutrition. 3: 377-385.
- Pongpech P, Naenna P, Taipobsakul Y, Tribuddharat C, Srifuengfung S. 2008.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and class 1 integron integrase gene *intI1* in *Escherichia coli* from Thai patients and healthy adults. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 3: 425.
- Ribas F, Perramon J, Terradillos A, Frias J, Lucena F. 2000.** The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution sysTEM-1s. Journal of applied microbiology. 4: 704-710.
- Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. 2009.** The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam antibiotics. IJBMS. 1: 230-237. (In Farsi with English abstract)
- Shakibaie M, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N. 2008.** Detection of TEM-1, SHV and PER Type extendedspectrum β -lactamas gene among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burnt Patients at Shafa-Haspital, Kerman, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2: 104-111. (In Farsi with English abstract)
- Shojapour M, Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. 2011.** Prevalence of TEM-1-1 type beta-lactmase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn infections using Duplex PCR in Shahrekord, 2008. J Arak Univ Med Sci. 14: 1. (In Farsi with English abstract)
- Tenover FC. 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine. 6: S3- S10.
- Trautmann M, Lepper PM, Haller M. 2005.** Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. American journal of infection control. 5: S41- S49
- Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V, Ruhnke M. 2001.** Tap Water Colonization With *Psmdomonas aeruginosa* in a Surgical Intensive Care Unit (ICU) and Relation to *Psmdomonas* Infections of ICU Patients. Infection Control & Hospital Epidemiology. 1: 49-52.
- Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, Handelsman J. 2014.** Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 42: 15202-15207.
- Vachee A, Leclerc H. 1995.** Antagonistic effect of autochthonous flora of mineral water on *Pseudomonas aeruginosa* [virulence factors]. Journal European d'Hydrologie 26:327-338.
- Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. 2012.** Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. Science of the Total Environment. 426: 366-374.
- Xi C, Zhang Y, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J. 2009.** Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution sysTEM-1s. Applied and environmental microbiology. 17: 5714-5718.
- Zhang XX, Zhang T, Fang HH. 2009.** Antibiotic resistance genes in water environment. Applied microbiology and biotechnology. 3: 397-414.
- Zolfaghari M. 2011.** Bacterial elements affecting infections after burn in nequiee-hedaiati Burn hospital, Qom University of Medical Sciences Journal. 3: 23-29. (In Farsi with English abstract)