Journal of Microbial World
Volume 16, No. 1, June 2023

Original Article

Frequency of cas genes in the CRISPR/Cas system in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection

Neda Merikhi[1], Jamileh Nowroozi[2], Ali Nazemi[3], Mehrdad Hashemi[4], Robab Rafiei Tabatabaei[5]

[1]Phd student, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran [3]Assistant Professor,Department Department of Biology. Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. [4]Professor, Department of genetics, Faculty of advanced sciences and technology, Islamic Azad University, Tehran medical sciences branch, Tehran, Iran. [5]Associate Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: CRISPR system (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and Cas portions is a part of the immune system in microorganisms. The cas genes could be involved in reducing antibiotic resistance in bacteria. The aim of the study was to investigate the frequency of cas genes of the CRISPR/Cas system in Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) producing Escherichia coli isolated from urine culture of patients with urinary tract infection.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 437 positive urine culture samples were collected from Chalus hospitals. Escherichia coli strains were isolated based on standard biochemical tests and Enterobacteriaceae commercial diagnostic kit, as well as antibiotic sensitivity using disc diffusion method (Kerby Baer). Combined disk test was conducted for isolates that were resistant to at least one of the third-generation cephalosporins in the foregoing antibiotic susceptibility test. Molecular identification of cas1,cas2,cas3,cas7 and cas5 genes was performed using the PCR method.

Results: Out of 437 urin culture samples, 106 samples (24.3%) had E.coli infection. The highest antibiotic resistance was associated with ampicillin (99%). Among the resistant isolates, thirty isolates (88.3%) were ESBL producing. cas1 gene had the highest frequency (96.2%) and other cas genes had almost the same frequency.

Conclusion: The results of the present study showed that a significant percentage of E. coli isolates had ESBL phenotype, which may be due to the presence of broad-spectrum beta-lactamase genes in these samples. Besides, it was shown that there is no relationship between the presence of ESBL phenotype and the distribution of cas genes.

Keywords: Escherichia coli, Urinary tract infections, CRISPR/Cas system, ESBL.

Received: 29 November 2022 Revised: 11 March 2023 Accepted: 6 May 2023

Correspondence to: Jamileh Nowroozi
Tel: +98 2121190430
E-mail: nowroozij@yahoo.com

Journal of Microbial World 2023, 16(1): 6-17
DOI:10.30495/jmw.2022.1934160.1987

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره اول (پیاپی ٥٤) بهار ١٤٠٢
صفحات ١٧-٦

Original Article

فراوانی ژن‌های cas سیستم CRISPR/Cas در سویه‌های اشریشیا کلی تولید کننده ESBL، جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری

ندا مریخی[١]، جمیله نوروزی[٢*]، علی ناظمی[٣]، مهرداد هاشمی[٤]، رباب رفیعی طباطبایی[٥]

[١]دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [٢]استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [٣]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. [٤]استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های پیشرفته، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [٥]دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سیستم CRISPR (تکرارهای پالیندرومیک کوتاه فاصله‌دار منظم خوشه‌ای) و پروتین‌های Cas، بخشی از سیستم ایمنی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. ژن‌های cas می‌توانند در کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها مشارکت کنند. هدف از این مطالعه ارزیابی فراوانی ژن‌های cas سیستم CRISPR/Cas در سویه‌های اشریشیا کلی تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs)، جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ٤٣٧ نمونه کشت ادرار، از بیمارستان‌های چالوس جمع‌آوری شد. جداسازی سویه‌های اشریشیا کلی، براساس تست‌های بیوشیمیایی استاندارد و کیت تشخیص تجاری انتروباکتریاسهآ و همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی بائر) انجام شدند. آزمون دیسک ترکیبی (CDT) نیز برای جدایه‌هایی که در آزمون قبلی حداقل در برابر یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم بودند، انجام شد. شناسایی مولکولی ژن‌های cas1، cas2، cas3، cas7 و cas5 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد.

یافته‌ها: از میان ٤٣٧ نمونه کشت ادرار ١٠٦ نمونه (٢٤/٣ درصد) مبتلا به عفونت اشریشیا کلی بودند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط با آمپی‌سیلین (٩٩ درصد) بود. در میان جدایه‌های مقاوم، ٣٠ جدایه (٨٨/٣ درصد) تولید کننده ESBL بودند. ژن cas1 بیشترین فراوانی (٩٦/٢ درصد) را داشت و دیگر ژن‌های cas تقریباً فراوانی یکسانی داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از جدایه‌های اشریشیا کلی دارای فنوتیپ ESBL بودند که می‌تواند دلیل بر حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در این نمونه‌ها باشد. همچنین، نشان داده شد که رابطه‌ای بین حضور فنوتیپ ESBL و توزیع ژن‌های cas وجود ندارد.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، عفونت دستگاه ادراری، سیستم CRISPR/Cas، ESBL.

دریافت مقاله: ١٤٠١/٩/٨ ویرایش مقاله: ١٤٠١/١٢/٢٠ پذیرش مقاله: ١٤٠٢/٢/١٦

مقدمه

از اواخر دهه ١٩٨٠، دانشمندان تکرارهای کوتاه پالیندرومیک به صورت منظم و متقاطع را در ژنوم *اشریشیا کلی* کشف کرده‌اند، که بعداً با نام CRISPR شناخته شد (١). در سال ٢٠٠٢، نام تکرارهای پالیدرومیک کوتاه فاصله‌دار منظم خوشه‌ای را CRISPR (Clustered regularly interspaced

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران.
تلفن: ٠٢١٢١١٩٠٤٣٠ پست الکترونیک: nowroozij@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

short palindromic repeats) و ژن‌های وابسته به آن را cas (CRISPR associated sequence) پیشنهاد کردند که در حال حاضر به عنوان سیستم CRISPR/Cas شناخته می‌شود (۲). این سیستم نوعی سیستم ایمنی در برابر حمله عناصر ژنتیکی مانند ویروس‌ها و پلاسمیدها هستند که توسط اکثر آرکئوباکترها (۸۷ درصد) و بسیاری از باکتری‌ها (۵۰ درصد) کدگذاری می‌شوند (۳). در حال حاضر، بر اساس محتوای ژن cas، این سیستم شامل ۲ کلاس، ۵ تیپ و ۱۶ زیرتیپ می‌باشد (٤). آرایه CRISPR، شامل توالی‌های تکراری کوتاه (Repeat) است که توسط توالی منحصر به فردی به نام فاصله‌انداز (spacer) که غالبا از عناصر ژنتیکی متحرک (Mobile genetic elements، MGE) مانند پلاسمیدها و ویروس‌ها (باکتریوفاژها/ فاژها) مشتق می‌شوند، از هم فاصله می‌گیرند. مکانیسم‌های درگیر در ایمنی، متکی بر RNAهای کوچک CRISPR (crRNAs) هستند که پروتین‌های Cas را هدایت می‌کنند تا اسیدهای نوکلئیک خارجی مکمل را به شیوه‌ای اختصاصی، برش دهند. ژن‌های cas که بیشتر در نزدیکی آرایه CRISPR واقع شده‌اند، پروتین‌های Cas را کدگذاری می‌کنند که در مراحل مختلف ایمنی نقش دارند (۵و٦). در سال‌های اخیر به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترش یافته است. ژن‌های مقاومت ضد میکروبی ممکن است بر روی کروموزوم باکتری و عناصر متحرک ژنتیکی مانند پلاسمیدها و ترنسپوزون‌ها انتقال یابند. در مطالعات اخیر نیز نشان داده شده است که با هدف قرار دادن ژن‌های مقاومت دارویی، از سیستم CRISPR برای تغییر مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده نموده‌اند (۷-۹).

از زمان معرفی پنی سیلین در دهه ۱۹٤۰، که دوران استفاده ازآنتی‌بیوتیک‌ها آغاز شد، این عوامل ضد میکروبی به عنوان یکی از بزرگترین پیشرفت‌ها در پزشکی مدرن شناخته شدند. در سال ۱۹۰۰ بیماری‌های عفونی عامل اصلی مرگ و میر بود ند. در حالی که، در سال ۲۰۰۰، بیماری‌های عفونی مسئول تنها درصد کمی از مرگ و میرها در کشورهای پیشرفته بودند (۱۰). متأسفانه باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی سبب ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شده‌اند، تا جایی که مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی به تهدیدی جهانی برای سیستم‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱۱).

اشریشیا کلی، یک باکتری گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسهآ است که به طور مکرر از عفونت‌های نواحی مختلف بدن به‌دست آمده و با میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان مرتبط بوده است (۱۲). *اشریشیا کلی*، شایع‌ترین علت عفونت ادراری در انسان شناخته شده است و تقریبا در تمام بخش‌های بدن انسان می‌تواند به عنوان عامل بیماری عمل کند (۱۳).

به دلیل سهولت در انتقال *اشریشیا کلی* بین جمعیت‌های انسانی، این میکروارگانیسم به عامل مهم ایجاد پاندمی‌های ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهان تبدیل شده است. همچنین، توانایی این میکروارگانیسم در ایجاد کلونیزاسیون در روده انسان و حیوانات باعث شده است که با تعداد زیادی از باکتری‌های مختلف در تعامل نزدیک باشد، تعاملی که به *اشریشیا کلی* این توانایی را می‌دهد که به عنوان اهدا کننده مواد ژنتیکی به باکتری‌های دیگر و گیرنده ژن‌های مقاومت از سایر میکروارگانیسم‌ها معرفی گردد (۱۱).

تولید بتالاکتامازهای مختلف در باکتری‌های گرم منفی توسعه یافته است. در مورد *اشریشیا کلی*، مهمترین موارد از نظر پزشکی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL، Extended Spectrum Beta-Lactamase)، بتالاکتامازهای AmpC و کاربانمازها هستند. در بین خانواده بتالاکتامازها، طی دهه‌های گذشته، ESBL، مورد توجه بیشتر محققان بوده است، زیرا شیوع آن‌ها به عنوان عامل عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در سراسر جهان در حال افزایش بوده است. این آنزیم‌ها توسط هر یک از اعضای خانواده انتروباکتریاسهآ تولید می‌شود، اما گونه‌های *کلبسیلا* و *اشریشیا کلی*، جنس غالب تولید کننده ESBL هستند (۱۱و۱٤). هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های cas (۱-۵،۳و۷) و اثر حضور آن‌ها بر

روی فنوتیپ مقاومت ESBL در جدایه‌های *اشریشیا کلی* در بیماران مبتلا به عفونت ادراری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه: این مطالعه مقطعی، بر روی نمونه‌های کشت مثبت بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد که در فاصله زمانی (خرداد ۱۳۹۷ تا اسفند ۱۳۹۸)، برای نمونه‌گیری به آزمایشگاه‌های شهرستان چالوس مراجعه کرده بودند. کشت‌های ادراری که *اشریشیا کلی* تشخیص داده شدند، وارد این مطالعه شدند و کشت‌هایی که مربوط به سایر عفونت‌های باکتریایی بودند از این مطالعه خارج شدند. پلیت‌های کشت مثبت ادراری با رعایت اصول بهداشتی، برای بررسی‌های بیشتر به آزمایشگاه پارس چالوس انتقال داده شدند.

ب) شناسایی بیوشیمیایی باکتری: برای تأیید تشخیص باکتری *اشریشیا کلی*، کشت‌های مثبت جمع‌آوری شده، مجددا بر روی محیط ائوزین متیلن بلو (EMB) (مرک، آلمان) کشت (۱۵) و در دمای ۳۵-۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. محیط‌های کشت EMB که شمارش کلنی‌های آن‌ها بیش از 1×10^5 CFU/ml و کلنی‌های آن‌ها دارای جلای سبز فلزی بودند، از نظر تست‌های بیوشیمیایی همانند آزمون IMViC، SIM، سیمون سیترات آگار و MR-VP و TSI (مرک، آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند. تأیید نهایی کلنی‌ها از روش API و با استفاده از کیت تشخیصی تجاری انتروباکتریاسه (پادتن طب، تهران، ایران) انجام شد. پس از انجام مراحل کشت باکتری، شناسایی *اشریشیا کلی* بر مبنای تغییر رنگ محیط‌های کشت موجود در پنل بعد از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت و افزودن معرف‌های مربوطه (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) صورت گرفت (شکل ۱).

شکل ۱: روش API برای تشخیص *اشریشیا کلی*.

ج) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی هر جدایه *اشریشیا کلی* با استفاده از دیسک دیفیوژن به روش کربی بائر (Kirby-Bauer disk diffusion method) برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، تهران، ایران) شامل: دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (CFM، ۵ میکروگرم)، سفتریاکسون (CRO، ۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (CAZ، ۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (CTX، ۳۰ میکروگرم)، سفپیم (FEP، ۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CP، ۵ میکروگرم)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (SXT، به ترتیب ۱/۲۵ و ۲۳/۷۵ میکروگرم)، جنتامایسین (GM، ۱۰ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (NA، ۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (FM، ۳۰۰ میکروگرم) و آمپی‌سیلین (Amp، ۱۰میکروگرم) انجام شد. *E. coli* ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل کیفیت آزمون استفاده شد. نتایج حساسیت طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI، Clinical and Laboratory Standards Institute) تفسیر شد (۱۶).

د) شناسایی فنوتیپی آنزیم‌های بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL): از آزمایش دیسک ترکیبی (CDT، Combined disk test)، برای شناسایی فنوتیپی ESBL در جدایه‌هایی که حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم مقاوم بودند، استفاده شد (۱۷). برای این منظور، جدایه‌ها بر روی محیط مولر-هینتون آگار (MHA، Mueller-Hinton agar) کشت داده شدند و دیسک‌های سفوتاکسیم (CTX، ۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم (CAZ، ۳۰ میکروگرم) همراه با ترکیب این دیسک‌ها با اسید کلاولانیک ۱۰ میکروگرم در فاصله ۲۰ میلی‌متر (مرکز تا مرکز) هر دیسک بر روی محیط MHA قرار داده شد. اختلاف قطر منطقه مهار عدم رشد ≤۵ میلی متر، به عنوان ESBL مثبت در نظر گرفته شد. *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *کلبسیلا نومونیه* ATCC 700603 به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت به کار

برده شد (۱۶).

ه) شناسایی مولکولی ژن‌های cas (۱-۳،۵و۷): از روش واکنش زنجیره پلیمراز (Polymerase Chain Reaction ،PCR) برای شناسایی ژن‌های cas استفاده شد. برای این منظور، استخراج DNA تمام جدایه‌های *اشریشیا کلی*، با استفاده از کیت تجاری (PZP، دانش‌بنیان، ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده و با جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های cas (ماکروژن، کره) انجام شد (جدول ۱). ترکیب مواد PCR به شرح زیر بود: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix Red (آمپلیکون)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ٤ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول) در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر (جدول ۱). شرایط PCR برای ژن‌های cas1 و cas3 حاوی سه مرحله‌ی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دوره سی و پنج گانه که شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. همچنین شرایط برای ژن‌های cas2، cas5 و cas7 شامل مرحله‌ی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دوره سی و پنج گانه که شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۰ ثانیه، ٥٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٤٥ ثانیه و در آخر مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از ترکیب محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز (۵ میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر رنگ (RedSafe PZP، دانش‌بنیان، ایران) و مشاهده باند محصولات PCR توسط (transilluminator LED Bio Intellectica، کانادا) انجام شد. برای تعیین سکانس ژن‌های مورد بررسی برای هر ژن ۲۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۵ میکرولیتر (غلظت ۰/۱) آغازگر فوروارد (Forward primer) به شرکت ماکروژن، کره جنوبی ارسال شد. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Chromas نسخه ۱/٤٥ ارزیابی شدند. سرانجام، توالی‌های بدست آمده در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) بررسی شد.

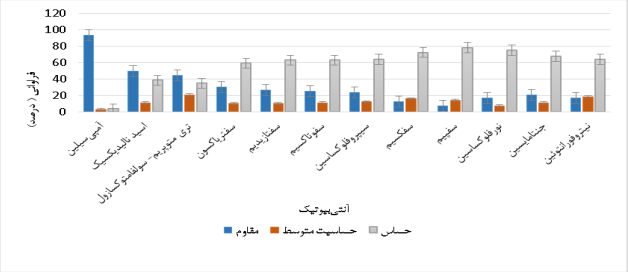
جدول ۱: آغازگرها و شرایط دمایی واکنش زنجیره پلی‌مراز ژن‌های *cas*.

پرایمر	الیگونوکلئوتید	توالی ('۵-'۳)	طول (bp)	رفرنس
Cas1-F	*cas1*	CCA TCT GGC CCC AGT GCT GC	۱۹۸	شرکت ماکروژن کره
Cas1-R		GCT CAC CCA GAA ACG CTG GT		
Cas3-F	*cas3*	SCVATGTGCAGYACCAGTAA	۳۸۷	
Cas3-R		ACCAGAAYVAGCGGBGC		
Cas5-F	*cas5*	ACC GCC ACC ATC CAC CAG	۲۹۷	
Cas5-R		GCG TCA TAC CCA TGA ACT GCC TTC		
Cas7-F	*cas7*	CGT CCT TCA TGC TTC CCT GTT TG	۲٤۳	
Cas7-R		CAA CCG GCA AAC AGA ACA GCT		
Cas2-F	*cas2*	CAT GCTCGCCGGSGTATCCC	۱۵۷	
Cas2-R		CCCGCAGCCGCTTGAGCAAA		

و) آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز داده‌ها با نرم افزار stata نسخه ١٤ انجام شد. برای ارزیابی متغییرهای طبقه‌بندی از آزمون مجذور کای (χ^2) و در جای مناسب از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. سطح معنی‌داری، ≥۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

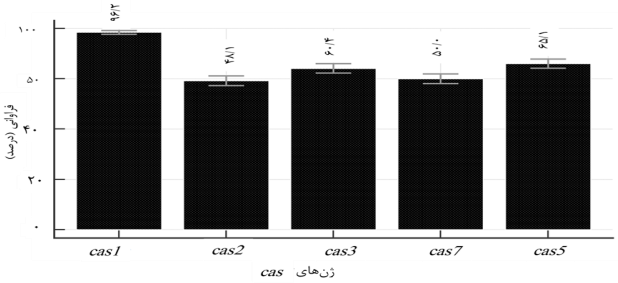
در فاصله زمانی یک و نیم سال، ٤۳۷ نمونه کشت اداری مثبت جمع‌آوری شد که از این تعداد، ۱۰٦ نمونه (۲٤/۳ درصد)، به عنوان عفونت *اشریشیا کلی* تشخیص داده شدند. میانگین سنی بیماران در حدود ۳۹/۵ ± ۱۹/۵ سال بود. تقریباً ۷٦/٤ درصد نمونه‌ها مربوط به بیماران زن بود. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام نشان داد که از بین ۱۰٦ جدایه *اشریشیا کلی* ادراری، تعداد ۷۰ نمونه (٦٦/۰٤٪) حساس به آنتی‌بیوتیک (حساس به سفالوسپورین‌های نسل سوم) و تعداد ۳٦ نمونه (۳۳/۹٦٪) مقاوم به آنتی‌بیوتیک (مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم) بودند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط با آمپی‌سیلین تقریبا (۹۹ درصد) بود وکمترین مقاومت مرتبط با آنتی‌بیوتیک سفپیم (۸ درصد) بود. همچنین مقاومت جدایه‌های *اشریشیا کلی* نسبت به سفتریاکسون (۳۲ درصد)، سفتازیدیم (۲۸ درصد)، سفوتاکسیم (۲۷ درصد) و سفکسیم (۱۳ درصد) بود (شکل ۲).



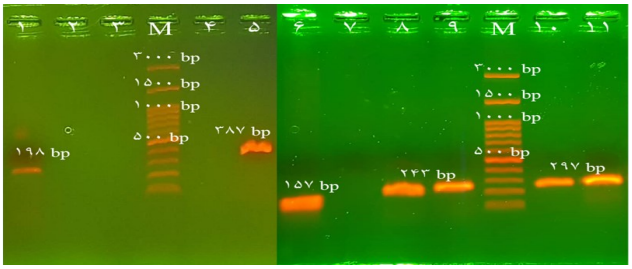
شکل ۲: درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* در نمونه‌ها.

شناسایی فنوتیپی تولید ESBL توسط CDT نشان داد که از میان ۳۶ جدایه مقاوم به یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم، ۳۰ جدایه (۸۸/۳ درصد) ESBL مثبت بودند.

فراوانی ژن *cas1*، *cas2*، *cas3*، *cas7* و *cas5* به ترتیب در ۹۶/۲ درصد، ۴۸/۱ درصد، ۶۰/۴ درصد، ۵۰ درصد و ۶۵/۱ درصد جدایه‌ها مثبت بود (شکل ۳ و ۴). مقایسه توزیع فراوانی ژن‌های *cas* در میان جدایه‌های *اشریشیا کلی* ESBL مثبت و منفی نشان داد که در هیچکدام از موارد رابطه معنی‌داری بین حضور ژن‌های *cas* با تولید ESBL در میان جدایه‌های *اشریشیا کلی* وجود نداشت ($P \geq ۰/۰۵$) (جدول ۲).



شکل ۳: فراوانی ژن‌های *cas* در نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به عفونت *اشریشیا کلی*.



شکل ٤: الکتروفورز واکنش زنجیره پلی‌مراز ژن‌های *cas* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری. M، 100+ bp الگو DNA k3، چاهک‌های ۲، ۳ و ۷ کنترل منفی، چاهک ۱ (198bp) cas1، چاهک ۵ (387 bp) *cas3*، چاهک ٦ (157 bp) *cas2*، چاهک ۸ و ۹ *cas7* (243 bp)، چاهک ۱۰ و ۱۱ *cas5* (297 bp).

جدول ۲: توزیع ژن‌های *cas* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده ESBL (مثبت) و غیر تولید کننده ESBL (منفی).

ژن		ESBL منفی	ESBL مثبت	P-value
cas1	مثبت	(۷۱/٦) ۷۳	(۲۸/٤) ۲۹	۱
	منفی	(۷۵) ۳	(۲۵) ۱	
cas2	مثبت	(٦۸/٦) ۳۵	(۳۱/٤) ۱٦	۰/٤۹
	منفی	(۷٤/۵) ٤۱	(۲۵/۵)۱٤	
cas3	مثبت	(۷۱/۹) ٤٦	(۲۸/۱) ۱۸	۰/۹٦
	منفی	(۷۱/٤) ۳۰	(۲۸/٦) ۱۲	
cas7	مثبت	(۷۹/۳) ٤۲	(۲۰/۷) ۱۱	۰/۰۸
	منفی	(٦۵/۲) ۳٤	(۳۵/۸) ۱۹	
cas5	مثبت	(۷۳/۹) ۵۱	(۲٦/۱) ۱۸	۰/٤۸
	منفی	(٦۷/٦) ۲۵	(۳۲/٤) ۱۲	

همچنین بررسی توزیع حضور همزمان ژن‌های *cas* در جدایه‌های *اشرشیا کلی* تولید کننده ESBL و غیر تولید کننده ESBL جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری از نظر آماری ارتباط معنی‌داری ($P \geq ۰/۰۵$) را نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳: توزیع حضور همزمان ژن‌های *cas* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده ESBL (مثبت) و غیر تولید کننده ESBL (منفی).

حضور همزمان ژن‌های *cas*		ESBL منفی	ESBL مثبت	P-value
دو ژن *cas*	مثبت	(۷۲/۳) ۷۳	(۲۷/۷) ۲۸	۰/٦۲
	منفی	(٦۰) ۳	(٤۰) ۲	
سه ژن *cas*	مثبت	(۷۵/٦) ٦۲	(۲٤/٤) ۲۰	۰/۰۱
	منفی	(۵۸/۳) ۱٤	(٤۱/۷) ۱۰	
چهار ژن *cas*	مثبت	(۷٦/۳) ۲۹	(۲۳/۷) ۹	۰/٤۳
	منفی	(٦۹/۱) ٤۷	(۳۰/۹) ۲۱	
پنج ژن *cas*	مثبت	(۵۰) ٦	(۵۰) ٦	۰/۰۸
	منفی	(۷٤/۵) ۷۰	(۲۵/۵) ۲٤	

مقایسه توزیع ژن‌های cas در میان جدایه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم نشان داده که توزیع این ژن‌ها در میان جدایه‌های *اشریشیا کلی* حساس و مقاوم به

آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P \geq ۰/۰۵$) (جدول ٤).

جدول ٤: توزیع حضور(مثبت) وعدم حضور(منفی) ژن‌های *cas* در جدایه‌های *اشریشیا کلی* حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم.

ژن		مقاوم*	حساس**	P-value
cas1	منفی	۲ (۵۰/۰)	۲ (۵۰/۰)	۰/۴۹
	مثبت	۳۴ (۳/۳۳)	۶۸ (۶۶/۷)	
cas2	منفی	۱۶ (۲۹/۰)	۳۹ (۷۱/۰)	۰/۴۹
	مثبت	۲۰ (۳۹/۲)	۳۱ (۶۰/۸)	
cas3	منفی	۱۴ (۳/۳۳)	۲۸ (۶۶/۷)	۰/۷۶
	مثبت	۲۲ (۳۴/۴)	۴۲ (۶۵/۶)	
cas7	منفی	۲۱ (۳۹/۶)	۳۲ (۶۰/۴)	۰/۲۲
	مثبت	۱۵ (۲۸/۳)	۳۸ (۷۱/۷)	
cas5	منفی	۱۳ (۳۵/۱)	۲۴ (۶۴/۹)	۰/۸۵
	مثبت	۲۳ (۳/۳۳)	۴۶ (۶۶/۷)	

* مقاوم: مقاوم به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم

** حساس: حساس به همه آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم

بحث

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف که توسط بتالاکتامازها ایجاد می‌شود، مشکل جهانی رو به افزایش است. آنزیم‌های ESBL، بتالاکتامازهایی هستند که توسط کروموزوم و یا پلاسمیدهای باکتریایی کد می‌شوند که در این میان، *اشریشیا کلی* به‌عنوان یکی از برجسته‌ترین باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز مطرح می‌باشد. همچنین، این باکتری به عنوان مهمترین عامل عفونت‌های دستگاه ادراری شناخته شده است (۱۳و۱۸).

توالی‌های تکراری کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای با فواصل منظم (CRISPR) و پروتین‌های Cas مرتبط با آن، سیستم ایمنی اکتسابی را در پروکاریوت‌ها تشکیل می‌دهند. فعالیت CRISPR، نیاز به حضور مجموعه‌ای از ژن‌های *cas* دارد که معمولا در مجاورت آرایه CRISPR قرار دارند و برای پاسخ ایمنی ضروری هستند (٦).

بر این اساس، در مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌های *cas*۱، *cas*۲، *cas*۳، *cas*۵ و *cas*۷ سیستم CRISPR و ارتباط آن‌ها با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بتالاکتامازی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری (UPEC) بررسی شد.

در این مطالعه، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (AM)، بالاترین مقاومت (۹۹ درصد) را در میان سایر آنتی‌بیوتیک‌ها داشت که با نتایج Lesani و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در قم (۱۹)، Khaledi و همکارانش در سال ۲۰۱٦ در قزوین (۲۰)، که آمپی‌سیلین را به ترتیب (۹٦ درصد) و (۹۹ درصد) به‌عنوان مقاوم‌ترین آنتی‌بیوتیک در مطالعاتشان گزارش کردند، هم سو بود ولی با نتایج Rezaie Kahkhaie و همکارانش در سال ۲۰۱۸ (۲۱)، در زابل که آمپی‌سیلین را به عنوان حساس‌ترین آنتی‌بیوتیک (٦٤/۲۸ درصد)، نشان دادند مغایرت داشت. ممکن است تفاوت مناطق جغرافیایی، همچنین میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها عامل ایجاد این تفاوت‌ها باشد.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت در بین سفالوسپورین‌های نسل سوم به سفتریاکسون (۳۲ درصد) و سفتازیدیم (۲۸ درصد) بود که تقریباً با نتایج مطالعه Jahandizi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در بناب (۲۲)، هم راستا بود. همچنین در مطالعه حاضر، اکثر جدایه‌های مورد بررسی دارای حساسیت بالا به سفالوسپورین‌های نسل سوم بودند. در مطالعات دیگری که در مناطق مختلف ایران انجام شده است میزان مقاومت بالاتری به سفالوسپورین‌های نسل سوم گزارش شده است (۲۳-۲۵)، ولی در مواردی نیز درصد کمتری از مقاومت گزارش شده است (۲٦و۲۷).

داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که ۸۸/۳ درصد از جدایه‌های *اشریشیا کلی* مقاوم، از نظر فنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یا ESBL مثبت بودند. ظهور ESBL ها چالش تشخیصی و درمانی قابل توجهی را در مدیریت عفونت ایجاد می‌کند (۲۸). عامل خطر کلونیزاسیون یا عفونت با این میکروارگانیسم‌ها به

دلیل بستری طولانی مدت در بیمارستان، بستری شدن در بخش مراقبت‌های ویژه، کاتتریزاسیون ادراری و شریانی و قرار گرفتن در معرض آنتی بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های طیف گسترده است (۲۹). بروز ESBL در مطالعات مختلف گزارش شده در ایران از ۲ درصد تا ۸۰ درصد متفاوت بوده است (۳۰-۳۲). طیف وسیع تفاوت در فراوانی ESBL در ایران، وجود تفاوت بالا در گسترش این نوع از مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر، با استفاده از آزمایش PCR، نشان داده شد که جدایه‌های *اشریشیا کلی* دارای ژن‌های *cas*۱، *cas*۲، *cas*۳، *cas*۷ و *cas*۵ می‌باشند. چهار CRISPR loci در *اشریشیا کلی* وجود دارد که شامل CRISPR1، CRISPR2، CRISPR3 و CRISPR4 است و هر کدام نوع متفاوتی از ژن *cas* را دارند (۳۳و۳٤). نشان داده شده است که همه ژنوم‌های *اشریشیا کلی* که دارای CRISPR1 هستند فاقد CRISPR4 هستند (۳٤). کلیه جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه، حداقل یکی از ژن‌های *cas* را داشتند. همچنین ۷٦/٦۱ درصد از جدایه‌ها به‌طور همزمان دارای ژن *cas*1 و *cas*3 بودند که در مطالعه Wang و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۰، تقریبا تمامی جدایه‌ها به‌طور همزمان دارای ژن *cas*1 و ژن *cas*3 بودند (۳۵).

همچنین داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که بین فنوتیپ ESBL و حضور ژن‌های *cas* ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. Touchon و همکاران (۳٦)، نشان داده‌اند که وجود CRISPR loci *اشریشیا کلی* و تعداد کل تکرارها با حضور اینتگرون‌ها، پلاسمیدها یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط ندارند. علاوه بر این، آن‌ها شباهت‌های توالی بین توالی‌های پلاسمید موجود و فاصله دهنده‌ها را ارزیابی کردند و هیچ مدرکی پیدا نکردند که فاصله دهنده‌ها با عناصر درگیر در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک مانند Tn3، intI، ISEcp1 یا ژن مقاومت آنتی بیوتیکی، تولید ESBL یا نوع ESBL مرتبط باشد، که همراستا با مطالعه حاضر بود.

در مطالعه حاضر، توزیع ژن‌های *cas* با مقاومت و حساسیت جدایه‌ها به سفالوسپورین‌های نسل سوم از نظر آماری معنی‌دار نبود و نشان می‌داد که احتمالاً حضور ژن‌های *cas* در کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *اشریشیا کلی* تاثیرگذار نیستند. در حالی که در برخی از مطالعات و برخی از گونه‌ها مانند انتروکوک، رابطه معنی‌دار معکوسی بین سیستم CRISPR-Cas و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شده است (۳۷و۳۸)، اما در مطالعات دیگری همانند بررسی حاضر در *اشریشیا کلی* هیچ رابطه معنی‌داری بین حضور سیستم CRISPR-Cas و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشده است (۳۹). علاوه بر این، Touchon و همکاران (۳۹) اثر محدودی از عناصر CRISPR را در اپیدمیولوژی پلاسمیدهای *اشریشیا کلی* یا گسترش ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک یافتند. بر اساس این داده‌ها، سیستم‌های CRISPR-Cas ممکن است تأثیر متفاوتی بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین گونه‌های مختلف داشته باشد، که ممکن است به دلیل تاریخچه‌های تکاملی مختلف سیستم CRISPR-Cas، تولید لوکوس CRISPR با حذف جزئی یا کلی در خوشه ژن‌های *cas*، و وجود پروتین‌های ضد CRISPR، یا سیستم‌های محدودیت و اصلاح که برای رقابت بین پلاسمیدها استفاده می‌شود، باشد (۳٤و٤۰).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از جدایه‌های *اشریشیا کلی* دارای فنوتیپ ESBL هستند که می‌تواند به دلیل حضور ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در این نمونه‌ها باشد. این نتایج از یک طرف، نیاز به بررسی مولکولی این ژن‌ها را ضروری نشان می‌دهد و از طرف دیگر لزوم شناسایی مداوم ESBL را در کنترل گسترش این نوع از مقاومت مهم می‌داند. همچنین، مطالعه حاضر نشان داد که رابطه‌ای بین حضور فنوتیپ ESBL و توزیع ژن‌های *cas* وجود ندارد. ولی، تأیید این نکته، نیاز به بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تر از جمله مطالعاتی با حجم نمونه بالاتر و با وسعت جغرافیایی بیشتر دارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار

دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکترای تخصصی در دانشگاه آزاد واحد تهران شمال می‌باشد و بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، جهت بررسی و تصویب پروژه پژوهشی حاضر تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. Journal of bacteriology. 1987;169(12):5429-33.
2. Louwen R, Staals RH, Endtz HP, van Baarlen P, van der Oost J. The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2014;78(1):74-88.
3. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature reviews Microbiology. 2011;9(6): 467-77.
4. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology. 2015;13 (11):722-36.
5. Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, Qimron U. Adaptation in CRISPR-Cas systems. Molecular cell. 2016;61(6):797-808.
6. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. Biochimie. 2015;117:119-28.
7. Goren M, Yosef I, Qimron U. Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2017;30:1-6.
8. Gholizadeh P, Aghazadeh M, Asgharzadeh M, Kafil HS. Suppressing the CRISPR/Cas adaptive immune system in bacterial infections. 2017;36(11):2043-51.

9. Tao S, Chen H, Li N, & Liang. The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance. Infection and Drug Resistance. 2022, 15: 4155.

10. Mohr KI. History of antibiotics research. How to Overcome the Antibiotic Crisis. 2016: 237-72.

11. Galindo-Méndez M. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. E. coli Infection: IntechOpen; 2020.

12. Lynch JP, 3rd, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β-lactamases and carbapenemases). Expert Opin Pharmacother. 2013;14(2):199-210.

13. Yang JH, Han SJ, Yoon EK, Lee WS. Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. Nucleic acids research. 2006;34(6):1892-9.

14. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989;33(8):1131.

15. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. Frontiers in microbiology. 2017;8:1566.

16. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021.

17. Livermore DM, Brown DF. Detection of β-lactamase-mediated resistance. Journal of antimicrobial Chemotherapy. 2001;48(suppl_1):59-64.

18. Davari K, Nowroozi J, Hosseini F, Akhavan Sepahy A, Mirzaie S. Inhibitor discovery against beta lactamase CTX-M-9 from *E. coli* by molecular docking, MM/PBSA and molecular dynamics studies. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 2019;32(1):33-46.

19. Lesani SS, Soleimani M, Shakib P, Zolfaghari MR. Prevalence of bla CTX-M, bla SHV, and bla TEM Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated From Urinary Tract Infection Samples of Patients in the Intensive Care Unit in Qom, Iran. Gene, Cell and Tissue. 2020;7(2).

20. Khaledi A, Esmaeili D, Barzegar KEF, Ghamari N, Razipour H, Rostami H. Prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates among uropathogensin a pediatrics hospital. Der Pharma Chemica. 2016;8(3):161-5.

21. Rezaie Kahkhaie K, Rezaie Kehkhaie A, Rezaie Kahkhaie L, Koochakzai M, Rezaie Keikhaie K, Nakhaee Moghaddam M. Isolation of Beta-Lactamase Producing Genes (shv, ctx-M1, ctx-M2, ctx-M3) in *Escherichia Coli* Isolated from Pregnant Woman Patients. World Journal of Peri and Neonatology. 2018;1(1):21-9.

22. Masoomi Jahandizi R, Aletaha M, Moosavi M. Evaluation of the Frequency of TEM beta-lactamase gene in patients with urinary tract infections in Bonab County. Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology). 2019;32(3):438-48.

23. Hemmati TB, Mehdipour Moghaddam MJ, Salehi Z, Habibzadeh SM. Prevalence of CTX-M-Type β-lactamases in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran, Rasht. Biological Journal of Microorganism. 2015;3(12).

24. Mohajeri P, Darfarin G, Farahani A. Genotyping of ESBL producing Uropathogenic Escherichia coli in west of Iran. International journal of microbiology. 2014;2014.

25. Shams F, Hasani A, Pormohammad A, Rezaee MA, Reza M, Nahaie AH, et al. qnrA implicated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a University Teaching Hospital. Life Sci J. 2014;11(12s):1032-5.

26. Khoshvaght H, Haghi F, Zeighami H. Extended spectrum betalactamase producing Enteroaggregative *Escherichia coli* from young children in Iran. Gastroenterology and Hepatology from bed to bench. 2014;7(2):131.

27. Shayan S, Bokaeian M, Shahraki S. Prevalence and molecular characterization of AmpC-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from southeastern Iran. Microbial Drug Resistance. 2014;20(2):104-7.

28. Wong-Beringer A. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacotherapy. 2001;21(5):583-92.

29. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum -lactamases (ESBL) - an emerging threat to clinical therapeutics. Indian journal of medical microbiology. 2004;22(2):75-80.

30. Alizade H. Escherichia coli in Iran: An Overview of Antibiotic Resistance: A Review Article. Iran J Public Health. 2018;47(1):1-12.

31. Haghighatpanah M, Nejad ASM, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and plasmid-borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. Journal of global antimicrobial resistance. 2016;7:110-3.

32. Yousefipour M, Rasoulinejad M, Hadadi A, Esmailpour N, Abdollahi A, Jafari S, et al. Bacteria producing extended spectrum β-lactamases (ESBLs) in hospitalized patients: Prevalence, antimicrobial resistance pattern and its main determinants. Iranian journal of pathology. 2019;14(1):61.

33. Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJ. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. Microbiology (Reading, England). 2010;156(5):1351-61.

34. Touchon M, Rocha EP. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of Escherichia and Salmonella. PloS one. 2010;5(6):e11126.

35. Wang G, Song G, Xu Y. Association of CRISPR/Cas system with the drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Drug Resistance. 2020;13:1929.

36. Touchon M, Charpentier S, Pognard D, Picard B, Arlet G, Rocha EP, et al. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. Microbiology (Reading, England). 2012;158(12):2997-3004.

37. Burley KM, Sedgley CM. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis*. Journal of endodontics. 2012;38(11):1511-5.

38. Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. mBio. 2010;1(4).

39. Touchon M, Charpentier S, Pognard D, Picard B, Arlet G, Rocha EP, et al. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. Microbiology (Reading). 2012;158(Pt 12):2997-3004.

40. Pawluk A, Staals RH. Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. 2016;1(8):16085.