مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۴، شماره ۴، زمستان ۹۳، صفحات ۲۳۵ تا ۲۴۱

Original Article

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی و الگوی پلاسمیدی سویه‌های مقاوم به چند دارو

مریم قانع[۱]، راضیه خانپور زارنجی[۲]

[۱] استادیار دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر
[۲] کارشناس ارشد محیط زیست، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: *فاضلاب‌های بیمارستانی حاوی تعداد زیادی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. در میان باکتری‌های مقاوم، باسیل‌های گرم منفی قادرند برای مدت طولانی در محیط باقی مانده و به عنوان مخازن ژن‌های مقاومت عمل کنند. هدف از این مطالعه ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باسیل‌های گرم منفی فاضلاب‌های بیمارستانی و بررسی الگوی پلاسمیدی در باکتری‌های مقاوم به چند دارو بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. سویه‌های جدا شده مطابق با روش برگی (Bergey) شناسایی شدند و استخراج پلا سمید با روش لیز قلیایی انجام شد.*

یافته‌ها: *در مجموع، ۳۲۰ سویه برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدا شدند. بیشترین فراوانی مربوط به باسیل‌های گرم منفی (۶۲/۵٪) و پس از آن باسیل‌های گرم مثبت (۳۴/۴٪) و کوکسی‌های گرم مثبت (۳/۱٪) بود. بیشترین سویه‌های جدا شده مربوط به E. coli (۳۳٪) و پس از آن Pseudomonas aeruginosa (۱۷٪) بود. از بین باکتری‌های جدا شده، ۲۰۰ باکتری میله‌ای گرم منفی از لحاظ الگوی مقاومت نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک، مورد بررسی قرار گرفتند. جنتامیسین و سفتریاکسون موثرترین آنتی‌بیوتیک و آمپی‌سیلین کمترین تاثیر را بر باکتری‌ها داشتند. در تمام سویه‌ها مقاومت چند دارویی مشاهده شد و ۶٪ سویه‌ها نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. الکتروفورز DNA پلاسمیدی سویه‌های فوق نشان داد که همه آنها دارای پلاسمید با اندازه ۲۴/۵ Kb - ۱/۵ بودند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌هایی با مقاومت چند دارویی در فاضلاب‌های بیمارستانی وجود دارند و تهدیدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شوند.*

واژگان کلیدی: *مقاومت چند دارویی، فاضلاب بیمارستانی، پلاسمید.*

مقدمه

ظهور باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم نسبت به اغلب آنتی بیوتیک‌های در دسترس، یک مسئله بحرانی در پزشکی مدرن است. سازمان بهداشت جهانی هشدار داده است که در حال حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی یک تهدید جدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود (۱). اغلب گزارشات در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی نمونه‌های بالینی متمرکز است و مطالعات بر روی تاثیر میکروب‌های محیطی به عنوان مخازن فاکتورهای مقاومت و تاثیر آزاد سازی باکتری‌های مقاوم آنتی بیوتیک در محیط، همین اواخر مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر مشخص شده که باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و ژن‌های مقاومت، در همه جای طبیعت وجود دارند (۳،۲) و در غلظت‌های بالا در فاضلاب‌های بیمارستانی، خانگی، صنعتی و کشاورزی یافت می‌شوند (۵،۴). این

آدرس نویسنده مسئول: اسلامشهر، میدان نماز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، دکتر مریم قانع (**email**: ghane@iiau.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۶/۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۷/۱۴

محیط‌ها اغلب دارای مقادیر زیادی آنتی بیوتیک و سایر داروها هستند و به عنوان عاملی در انتخاب مقاومت میکروبی مطرح می‌باشند (۷،۶). حضور باکتری‌های مقاوم و نیز ژن‌های مقاومت از دو جنبه قابل ملاحظه است. اولا ماندگاری این باکتری‌ها و انتشار آن‌ها در طبیعت، منجر به افزایش عفونت با این پاتوژن‌ها می‌شود و ثانیا انتشار باکتری‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت ممکن است منجر به افزایش مخزن ژن‌های مقاومت دارویی در محیط شده که این امر انتقال ژن‌های مقاومت را به پاتوژن‌های رایج امکان پذیر می‌کند. عناصر خارج کروموزومی قابل انتقال مانند پلاسمیدها قادرند ژن‌های مقاومت را در میان جنس‌های باکتریایی و حتی خانواده‌ها انتقال دهند. مطالعات متعددی نشان داده که DNA رمز کننده مقاومت آنتی بیوتیکی می‌تواند از طریق هم یوغی به ارگانیسم‌های حساس پذیرنده در محیط منتقل شود (۸). پساب‌های بیمارستانی با محتوای بالای پلاسمیدهای دارای مقاومت چند دارویی می‌توانند مسئله اصلی برای جامعه باشند (۹). مطالعات، انتشار باکتری‌های مقاوم چند دارویی را از فاضلاب‌های بیمارستانی به سیستم فاضلاب شهری اثبات نموده است (۹). Diab و همکاران الگوی مقاومت وابسته به پلاسمید را در ۱۳ ایزوله گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی کردند. در ۶ تای آنها مشخص شد پلاسمید مسئول مقاومت به بتالاکتامازها است (۱۰). مقاومت وابسته به پلاسمید به ویژه در باکتری‌های پاتوژن از لحاظ بالینی با اهمیت است (۱۱،۱۰). Resende و همکاران مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که باکتری‌های *E. coli* جدا شده اکثرا به آنتی بیوتیک‌های Aztreonam، Ampicillin و Piperacillin مقاوم بودند (۱۲). برهانی و همکاران انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین را از فاضلاب‌های شهر تهران جدا کرده و مشاهده کردند که ۱۰۰% سویه‌های جدا شده دارای ژن van A و ۱۳% سویه‌ها دارای ژن van A و van B بودند(۱۳). با توجه به اهمیت فاضلاب‌های بیمارستانی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل انتشار باکتری‌های مقاوم و نیز ژن‌های مقاومت و با توجه به این که اغلب باکتری‌های گرم منفی توانایی بقاء در طبیعت را داشته و می‌توانند در انتقال ژن‌های مقاومت نقش مهمی داشته باشند، هدف اصلی این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم منفی مقاوم آنتی بیوتیک موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی و بررسی الگوی پلاسمیدی باکتری‌های با مقاومت چند دارویی بود.

مواد و روشها

جهت انجام این بررسی از فاضلاب دو بیمارستان شهرستان اسلامشهر نمونه گیری انجام شد. نمونه برداری در طی ۱۰ روز متوالی و در هر روز از هر بیمارستان یک نمونه تهیه شد. نمونه‌ها در بطری‌های استریل ml ۱۰۰ جمع آوری شده و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل و در کمتر از ۲ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. از نمونه‌ها رقت‌های متوالی در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. µl ۱۰۰ از رقت 10^{-2} در پلیت حاوی محیط کشت Plate-Count agar(PCA) (Merk, Germany) پخش شد و پس از گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۲۰ کلنی که از لحاظ ظاهری با هم تفاوت داشتند، انتخاب شدند. از کلنی‌های منتخب، کشت خالص تهیه شد و سپس مطابق با روش برگی (Bergey) مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۴). سنجش حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک، به روش دیسک دیفیوژن (۱۵) و مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام شد (۱۶). برای انجام آزمایش از ۸ آنتی بیوتیک به عنوان نماینده از گروه‌های اصلی شامل آمپی‌سیلین (پنی سیلین‌ها)، سفتریاکسون، سفالوتین (سفالوسپورین‌ها)، آمیکاسین، جنتامایسین (آمینوگلیکوزیدها)، نالیدیکسیک اسید (کینولون‌ها)، تتراسایکلین (تتراسایکلین‌ها) و کلرامفنیکل (فنیکل‌ها) که به طور روزمره در بیمارستان‌ها استفاده می‌شدند، استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق آمپی‌سیلین(µg/ml ۱۰)، تتراساکلین (µg/ml ۳۰)، سفالوتین (µg/ml ۳۰)، جنتامیسین (µg/ml ۱۰)، سفتریاکسون (µg/ml ۳۰)، آمیکاسین (µg/ml ۳۰)، نالیدیکسیک اسید (µg/ml ۳۰) و کلرامفنیکل (µg/ml ۳۰) بودند که از شرکت Mast خریداری شد (Mast Diagnostics Ltd, UK). آزمون آنتی بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با نیم مک فارلند انجام شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار(Merk, Germany) به صورت متراکم کشت داده شد و پس از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط کش میلیمتری اندازه گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردید. سویه استاندارد *P. aeruginosa* PTCC 1430 به عنوان سویه رفرنس استفاده

جدول ۱. سویه‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

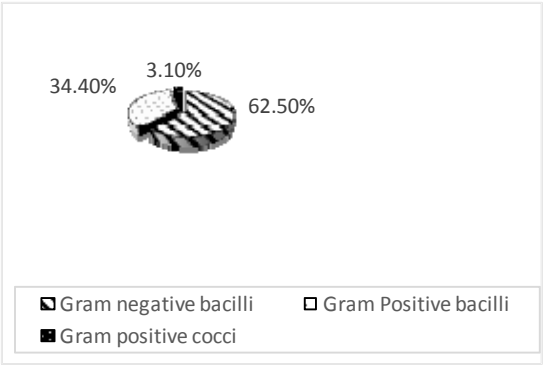
سویه‌های جدا شده	تعداد کل ایزوله ها	تعداد (٪) سویه‌های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف							
		Am	Te	Cf	Gm	Cro	AN	NA	C
Escherichia coli	۶۶	۶۰(۹۰٪)	۴۰(۶۰٪)	۲۶(۷۸/۸٪)	۶(۹٪)	۸(۱۲٪)	۱۶(۲۴٪)	۳۶(۵۴/۵٪)	۴۲(۶۳/۶٪)
Klebsiella pneumonia	۸	۷(۸۷/۵٪)	۴(۵۰٪)	۶ (۷۵٪)	–	–	۲(۲۵٪)	۴ (۵۰٪)	۲ (۲۵٪)
Klebsiella oxytoca	۴	۳(۷۵٪)	۲(۵۰٪)	–	–	–	۲ (۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)
Proteus vulgaris	۴	۴(۱۰۰٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	–	–	–	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)
Salmonella sp.	۱۰	۸(۸۰٪)	۸(۸۰٪)	۶(۶۰٪)	–	–	۴(۴۰٪)	۴(۴۰٪)	۴(۴۰٪)
Pseudomonas fluorescens	۱۶	۱۲(۷۵٪)	۸(۵۰٪)	۴(۲۵٪)	۴(۲۵٪)	۴(۲۵٪)	–	۲(۱۲/۵٪)	–
Pseudomonas aeruginosa	۳۴	۳۰(۸۸/۲٪)	۲۴(۷۰/۶٪)	۲۰(۵۸/۸٪)	۸(۲۳/۵٪)	۶(۱۷/۶٪)	۱۰(۲۹/۴٪)	۲۲(۶۴/۷٪)	۲۲(۶۴/۷٪)
Enterobacter cloacae	۲۰	۱۶(۸۰٪)	۱۲(۶۰٪)	۱۲(۶۰٪)	۲(۱۰٪)	۲(۱۰٪)	۸(۴۰٪)	۱۰(۵۰٪)	۱۶(۸۰٪)
Serratia liquefaciens	۱۰	۲(۲۰٪)	۲(۲۰٪)	–	–	–	–	–	–
Serratia marcescens	۶	۴(۶۶/۶٪)	۲(۳۳/۳٪)	–	–	–	۲(۳۳/۳٪)	۴(۶۶/۶٪)	۴(۶۶/۶٪)
Erwinia sp.	۱۰	۴(۴۰٪)	–	–	–	–	–	–	۲(۲۰٪)
Citrobacter koseri	۸	۶(۷۵٪)	۲(۲۵٪)	–	–	–	–	۲(۲۵٪)	۴(۵۰٪)
Acinetobacter sp.	۴	۳(۷۵٪)	۳(۷۵٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۳(۷۵٪)
تعداد کل	۲۰۰								

Am: آمپی سیلین، Te: تتراساکلین، Cf: سفالوتین، Gm: جنتامیسین، Cro: سفتریاکسون، AN: آمیکاسین، NA: نالیدیکسیک اسید، C: کلرامفنیکل؛ تفسیر نتایج بر اساس جداول CLSI صورت گرفت.

شد. استخراج پلاسمید سویه‌های جدا شده به روش لیز قلیایی انجام شد (۱۷). در این روش، یک کلنی از باکتری در ۵ mL محیط Luria Bertani (LB) (Merk, Germany) به مدت ۱ شب در انکوباتور شیکر دار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس سلول‌ها با افزودن SDS و هیدروکسید پتاسیم متلاشی و پروتئین‌ها با افزودن فنل کلروفرم رسوب داده شد. DNA پلاسمیدی در اتانل مطلق و سپس اتانل ۷۰٪ رسوب داده شد و در بافر TE حل شد. برای مشاهده نوارهای پلاسمیدی، DNA استخراج شده در آگارز ۱٪الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از gel doc مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

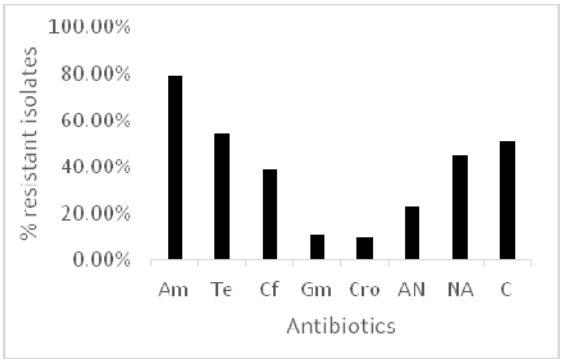
در مجموع، ۳۲۰ سویه از ۲ بیمارستان شهرستان اسلامشهر برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی جدا شد. شکل سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم تعیین گردید. نمودار ۱، در صد فراوانی هریک از باکتری‌ها را بر اساس واکنش گرم و مورفولوژی سلولی نشان می‌دهد. همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود بیشترین فراوانی مربوط به باسیل‌های گرم منفی (۶۲/۵٪) و پس از آن باسیل‌های گرم مثبت (۳۴/۴٪) بود. کوکسی‌های گرم مثبت نسبت به دو گروه یاد شده فراوانی پایین‌تری داشتند (۳/۱ ٪). باسیل‌های گرم منفی مطابق با روش برگی (Bergey) مورد شناسایی قرار گرفتند.



نمودار ۱. فراوانی سویه‌های جدا شده بر اساس واکنش گرم و مورفولوژی سلولی

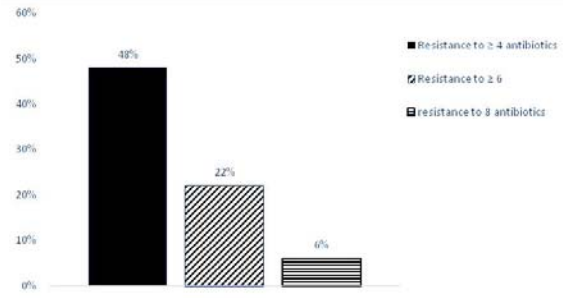
نتایج حاصل از شناسایی و نیز الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده در جدول ۱ آمده است. همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، در بین باکتری‌های جدا شده، بیشترین فراوانی مربوط به *E. coli* (۳۳٪) و پس از آن *Pseudomonas aeruginosa* (۱۷٪) بود. مطالعه آنتی بیوگرام باسیل‌های گرم منفی جدا شده نشان داد که سویه‌های جدا

شده بیشترین مقاومت را به آمپی‌سیلین (۷۶٪) و پس از آن تتراسایلین (۴۸/۵٪) و کمترین مقاومت را نسبت به جنتامیسین (۷/۲٪) و سفتریاکسون (۶/۷٪) داشتند (نمودار ۲).



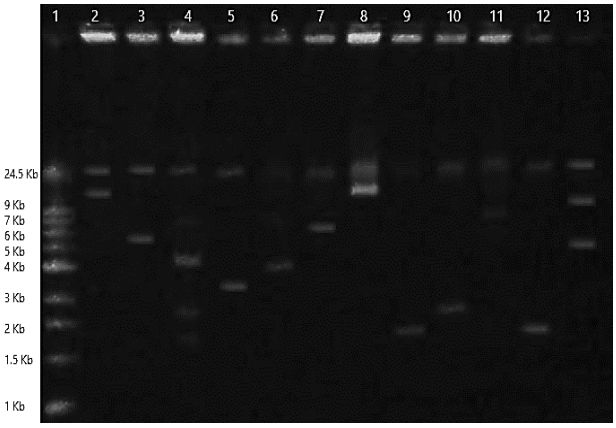
نمودار ۲. درصد سویه‌های مقاوم نسبت به هر یک از آنتی بیوتیک‌ها (Am آمپی‌سیلین، Te تتراساکلین، Cf سفالوتین، Gm جنتامیسین، Cro سفتریاکسون، AN آمیکاسین، NA نالیدیکسیک اسید، C کلرامفنیکل)

مطالعات سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که مقاومت چند دارویی در اغلب سویه‌های جدا شده وجود دارد. نمودار ۳ مقایسه درصد باکتری‌هایی را که به بیش از ۴ و بیش از ۶ و ۸ آنتی بیوتیک مقاوم بودند را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل نشان داده شده است، ۴۸٪ باکتری‌های جدا شده به ۴ یا بیش از ۴ آنتی بیوتیک، ۲۲٪ به ۶ یا بیش از ۶ آنتی بیوتیک و ۶٪ باکتری‌های جدا شده نسبت به هر ۸ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه مقاوم بودند.



نمودار ۳. درصد سویه‌های مقاوم به بیش از ۴، ۶ و یا ۸ آنتی‌بیوتیک

پلاسمید سویه‌هایی که به هر ۸ آنتی بیوتیک مقاوم بودند با استفاده از روش لیز قلیایی استخراج شد. شکل ۱ الگوی پلاسمیدی سویه‌های مقاوم را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از استخراج پلاسمید نشان داد که همه سویه‌های فوق دارای پلاسمیدهایی با اندازه‌های متفاوت (۱/۵ Kb تا ۲۴) بودند و برخی چندین پلاسمید داشتند.



شکل ۴. الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید روی ژل آگاروز ۱٪. ستون ۱ مارکر DNA، ستون ۲ تا ۱۳ مربوط به پلاسمیدهای باکتری‌های دارای مقاومت به ۸ آنتی بیوتیک مورد آزمایش. ستون ۲ و ۳ مربوط به ۲ سویه *Enterobacter cloacae* ستون ۴ مربوط به سویه *Acinetobacter* sp.، ستون ۵ تا ۱۱ مربوط به ۷ سویه *E. coli*، ستون ۱۱ تا ۱۳ مربوط به ۳ سویه *Psudomonas aeruginosa*.

بحث

فاضلاب‌های بیمارستانی مکانی مناسب برای حیات عوامل عفونی مضر مانند پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های دارای ژن‌های مقاومت نسبت به چند دارو هستند و پراکنده شدن آنها در طبیعت سلامت جامعه را به خطر می‌اندازد. با توجه به اهمیت باکتری‌های گرم منفی در انتشار ژن‌های مقاومت، در این تحقیق به ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی پرداخته شد و مقاومت چند دارویی در اغلب سویه‌ها مشاهده شد. همچنین الگوی پلاسمیدی باکتری‌های دارای مقاومت چند دارویی مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق به منظور مطالعه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، ۳۲۰ باکتری از فاضلاب‌های بیمارستانی مورد بررسی قرار گرفت که باسیل‌های گرم منفی اکثریت را تشکیل می‌دادند (نمودار ۱). در مطالعات انجام شده توسط Diab و همکاران نیز باسیل‌های گرم منفی اکثریت را تشکیل می‌دادند (۷۰٪ سویه های جدا شده) و پس از آن، باسیل‌های گرم مثبت بودند. در مطالعات آنان کوکسی‌های گرم مثبت ۲٪ و کوکسی‌های گرم منفی ۱٪ سویه های جدا شده را تشکیل

می‌دادند (۱۰). در تحقیق حاضر کوکسی گرم منفی جدا نشد. به طور معمول کوکسی‌های گرم منفی به دلیل داشتن نیازهای غذایی پیچیده، توانایی پایینی برای بقاء در طبیعت را دارند و به همین دلیل امکان جدا سازی آنها بسیار پایین است. Usha و همکاران ۱۲۱ باسیل گرم منفی را از فاضلاب‌های بیمارستانی شناسایی کردند و مشاهده نمودند که بیشترین سویه‌های جدا شده مربوط به *E. coli* (۳۷/۱۹٪) و پس از آن *Psudomonas* spp. (۲۲/۳۱٪) بود (۱۹). این مشاهدات با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. اغلب باکتری‌های جدا شده در این پژوهش دارای پتانسیل بیماری‌زایی بوده و تهدیدی برای سلامت محسوب می‌شوند چرا که می‌توانند برای مدت طولانی در محیط باقی بمانند که خود نیاز برای کنترل آن‌ها در فاضلاب‌ها را می‌طلبد.Reinthaler و همکاران الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *E. coli* را در فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری استرالیا را بررسی کردند و مشاهده نمودند که در بین عوامل ضد میکروبی، بالاترین میزان مقاومت در گروه پنی سیلین‌ها، مربوط به آمپی سیلین و پیپراسیلین بود. آنان همچنین مقاومت به تتراسایکلین را نیز مشاهده نمودند و گزارش کردند که ۵۷٪ سویه‌های جدا شده به تتراسایکلین مقاوم بودند (۲۰). در این مطالعه نیز بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۷۶٪) و پس از آن تتراسایکلین (۴۶/۵٪) مشاهده شد. مقاومت چند دارویی در باکتری‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی به دفعات گزارش شده است (۲۲،۲۱) در این تحقیق نیز تمام سویه‌های جدا شده مقاومت چند دارویی داشتند. مطالعات انجام شده توسط Elmanama و همکاران نشان داد که اکثریت سویه‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی حداقل به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. وی همچنین سویه‌هایی را جدا کرد که به ۴ آنتی بیوتیک یا بیشتر مقاوم بودند (۲۲). در این تحقیق، ۴۸٪ سویه‌ها به ۴ یا بیش از ۴ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. Czekalski و همکاران سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی را از فاضلاب‌های سوئیس مورد بررسی قرار دادند. آنان سویه‌هایی را که به ۶ یا بیش از ۶ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند را سویه‌های با مقاومت زیاد و سویه‌هایی که به ۸ یا بیش از ۸ آنتی بیوتیک مقاوم بودند را سویه‌های به شدت مقاوم نامیدند (۲۳). مطابق دسته بندی انجام شده توسط Czekalski ، ۲۲٪ سویه‌های جدا شده در این تحقیق، دارای مقاومت زیاد و ۶٪ سویه‌های جدا شده به شدت مقاوم بودند.در مطالعه‌ای که توسط Olayemi و همکاران صورت گرفت، تمام سویه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی و شهری حداقل به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم بودند و مقاومت به آمپی سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بسیار بالا بود. آنان گزارش کردند که ۲۰٪ از سویه‌های جدا شده به ۶ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. نتایج تحقیقات آنان با نتایج به دست آمده در این تحقیق که ۲۲ ٪ سویه‌ها به ۶ یا بیش از ۶ آنتی بیوتیک مقاومت داشتند، مطابقت دارد (۲۴). در این تحقیق نیز مقاومت بالا به آمپی سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مشاهده شد، اما سویه‌های جدا شده در این تحقیق به سفالوتین از گروه سفالوسپورین‌ها و نالیدیکسیک اسید از گروه کینولون‌ها نیز مقاومت بالایی نشان دادند. مطالعات اخیر افزایش سطح مقاومت به بتالاکتام‌ها به ویژه در باکتری‌های میله‌ای گرم منفی را نشان داده است (۲۵،۱۹). در این تحقیق نیز سویه‌های جدا شده به بتالاکتام‌ها از قبیل آمپی سیلین، سفالوتین و حتی سفتریاکسون (۶/۷ ٪) مقاومت نشان دادند. گرم منفی‌ها به سرعت با به دست آوردن پلاسمیدهای رمز کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) یا سایر مکانیسم‌ها به این آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند (۲۵). نتایج حاصل از استخراج پلاسمید، حضور پلاسمید را در همه‌ی سویه‌ها با مقاومت چندداروییی ثابت کرد؛ برخی از سویه‌ها نیز چندین پلاسمید داشتند. پلاسمیدهای جدا شده از سویه‌های مختلف Kb ۲۴/۵-۱/۵ اندازه داشتند، اما در هیچ یک از سویه‌های جدا شده، پلاسمیدهای R قابل انتقال مشاهده نشد. با این وجود، پلاسمیدهای جدا شده در این تحقیق نیز می‌توانند در انتشار ژن‌های مقاومت نقش داشته باشند و گزارشات زیادی مبنی بر حضور ژن‌های مقاومت بر روی پلاسمیدهای کوچک‌تر وجود دارد (۲۷،۲۶). نکته حائز اهمیت در بررسی الگوی پلاسمیدی سویه‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک این بود که سویه‌های مختلف مربوط به یک گونه، پلاسمیدهایی با اندازه‌های مختلف داشتند. این موضوع در مورد سویه‌های مختلف *E. coli* و *Psudomonas aeruginosa* به خوبی مشاهده می‌شد. علیرغم حضور پلاسمید در تمام باکتری‌های مورد مطالعه، هیچ ارتباط منطقی بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و الگوی پلاسمیدی وجود نداشت. این امر دور از انتظار نیست چرا که الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی مشابه می‌توانند توسط عواملی غیر از پلاسمید، مانند ترانسپوزون، فاژ و ژن‌های کروموزومی نیز رمز شوند.

نتایج حاصل از این تحقیق حضور باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو را در فاضلاب‌های بیمارستانی اثبات می‌کند. اغلب باکتری‌های جدا شده در این تحقیق، پتانسیل بیماری‌زایی

داشته و انتشار آن‌ها در محیط زیست می‌تواند خسارات جبران ناپذیری بر سلامت جامعه وارد آورد. همچنین اغلب باکتری‌های جدا شده در این تحقیق می‌توانند به مدت طولانی در محیط باقی مانده و به عنوان مخازن بالقوه ژن‌های مقاومت دارویی، باعث انتقال ژن‌های مقاومت شوند؛ لذا لازم است با احداث سیستم‌های تصفیه کاملا مجهز و مجزا این فاضلاب‌ها را تصفیه نمود تا از انتقال باکتری‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت به محیط جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر به انجام رسیده است. نگارنده از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر برای پشتیبانی و تامین مالی بسیار سپاسگزار است.

REFERENCES

1. WHO. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health.New WHO report provides the most comprehensive picture of antibiotic resistance to date, with data from 114 countries. Geneva: World Health Organozation; 2014.
2. Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science 2008; 321: 365–67.
3. Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environ Microbiol 2009; 11: 2970–88.
4. Kümmerer K. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 311–20.
5. Heuer H, Focks A, Lamshöft M, Smalla K, Matthies M , Spiteller M. Fate of sulfa- diazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. Soil Biol Biochem 2008; 40: 1892–900.
6. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol 2008; 19: 260–65.
7. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol Indic 2008; 8: 1–13.
8. Merz LR, Warren DK, Kollef MH, Fraser VJ. Effects of an Antibiotic Cycling Program on Antibiotic Prescribing Practices in an Intensive Care Unit. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2861-65.
9. Chitnis V, Chitnis S, Vaidya K, Ravikant S, Patil S, Chitnis DS. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. Water Res 2004; 38: 441–47.
10. Diab AM, Al-Turk I, Ibrahim MK, Al-Zhrany KD. Tracing of gram-negative antibiotic resistant bacteria in hospitals final effluent at Al-Madinah Al- Mounwwarah. J Taibah University Sci 2008; 1: 23-34.
11. Gilbert P, McBain AJ. Potential Impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 189-208.
12. Resende AC, Soares RB, Santos DB, Montalvao ER. Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. O Mundo da Saúde, São Paulo 2009**;** 4: 385-91.
13. Borhani K, Ahmadi A, Rahimi F, Pourshafie MR, Talebi M. Determination of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* diversity in Tehran sewage using plasmid profile, biochemical fingerprinting and antibiotic resistance. Jundishapur J Microbiol 2014; 7:e8951.
14. Holt GJ, Krieg RN, Sneath AHP, Staley T, Williams TS, eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed. London: Williams and Willkins; 1993.
15. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol 1996; 45: 493-96.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement. M100-S17, USA; 2007.
17. Sambrok J, Russell DW, Maniatis T, eds. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
18. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol . 1996; 45: 493-6.
19. Usha K, Kumar E, Sal Gopal DVR. Occurrence of various beta-lactamase producing Gram negative bacilli in the hospital effluent. Asian J Pharm Clin Res 2013; 6, (3): 42-6.

20. Reinthaler FF, Posch G, Feierl G, Wust D, Haas G, Ruckenbauer F, Marth E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Res 2003; 37:1685-90.

21. Ferreira AE, Marchetti DP, De Oliveira LM, Gusatti CS, Fuentefria DB, Corcao G. Presence of OXA-23-Producing Isolates of Acinetobacter baumannii in wastewater from hospitals in southern Brazil. Microbial Drug Res 2011; 17(2): 221-7.

22. Elmanama AA, ElKichaoui AY, Mohsin M. Contribution of hospital wastewater to the spread of antibiotic resistance in comparison to non-health Institution. J. Al-Aqsa Univ 2006; 10:108-21.

23. Czeklski, N. Brrthold, T. Caucci, S. Egli, A. Bugman, H. Increased level of multiresistant bacteria and resistance gene after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. Frontiers in Microbiol 2012;3: 1-6.

24. Olayemi AB, Opaleye FI. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from hospital and urban wastewater. World J Microbiol Biotechnol 2012; 6: 285-88.

25. Ibrahim MK, Galal MA, Al- Turk IM, Al- Zhrany KD. Antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria in hospitals' drain in Al-Madina Al-Munnawara. J Taibah University Sci 2010; 3:14–22.

26. Nigro SJ, Post V, Hall RM. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii belonging to global clone 2 from Australian hospitals. J Antimicrob Chemother 2011; 66:1504- 2011.

27. Ghane M, Bandehpour M. Isolation and molecular Identification of an antibiotic resistant *Acinetobacter* sp. From hospital sewage and its plasmid profile. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2013; 23: 127-33. [In Persian]