سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی در اصفهان۱۳۹۷

فاطمه السادات زرکش اصفهانی[۱]، نسرین امین[۲]، فاتح رحیمی[۳]*

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی ، دانشگاه اصفهان

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی ، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد نود ونه پذیرش برای چاپ: آبان نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین باعث ایجاد طیف وسیعی از عفونتها در بیمارستان و جامعه می شوند. فاضلاب بیمارستانی و شهری از مهمترین مخازن این باکتریها محسوب می شوند و ناکارآمدی سیستمهای تصفیه فاضلاب منجر به راه یافتن این باکتریها به آبهای زیرزمینی، آبهای سطحی و آب شرب جامعه می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی وجود استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی در شهر اصفهان است.*

روش کار: *در مجموع ۲ مرتبه نمونه گیری در بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر اصفهان انجام گرفت. نمونه های فاضلاب رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از فاضلاب رقیق شده بر روی محیطهای کشت ژلوز Baird-parker حاوی آنتی بیوتیک اگزاسیلین با غلظت ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر و ژلوز m-Enterococcus حاوی آنتی بیوتیک ونکومایسین با غلظت ۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر پخش شده و پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. کلنیهای سیاه رنگ واجد هاله بر روی محیط ژلوز Baird-parker و کلنیهای قرمز رنگ بر روی محیط ژلوز m-Enterococcus با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. تمامی کلنیهای جداسازی شده بر روی محیطهای ژلوز Baird-parker و ژلوز m-Enterococcus به ترتیب جهت سنجش مقاومت نسبت به متی سیلین و ونکومایسین با استفاده از آزمون انتشار از دیسک و بر اساس دستورالعملهای Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *در مجموع ۱۸۵ و ۱۱۰ کلنی به ترتیب بر روی محیطهای ژلوز Baird-parker و ژلوز m-Enterococcus جمع آوری شدند. نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که هیچکدام از کلنیهای سیاه رنگ بر روی محیط ژلوز Baird-parker استافیلوکوکوس اورئوس نبودند و تنها ۳ سویه (۳ درصد) انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در میان تمامی کلنیهای قرمز رنگ محیط ژلوز m-Enterococcus شناسایی شدند.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده عدم حضور سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و حضور نسبتا پایین انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب خروجی بیمارستان مورد نظر در شهر اصفهان است که مؤید کیفیت بالا و کارآیی سیستم ضدعفونی این بیمارستان جهت حذف کامل سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و حذف نسبتا بالای سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب بیمارستانی و ممانعت از ورود آنها به فاضلاب شهری می باشد. به نظر می رسد که این سیستم قادر به حذف سایر باکتریها از جمله استافیلوکوکهای کواگولاز منفی و لوکونوستوک و لاکتوکوکوس نمی باشد که این امر می تواند یک تهدید جدی برای سلامت جامعه محسوب شود.*

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین، فاضلاب بیمارستانی، اصفهان

مقدمه

پیدایش باکتریهای بیماری‌زای مقاوم نسبت به اغلب آنتی بیوتیک های در دسترس، یک مسئله مهم در پزشکی مدرن است. سازمان بهداشت جهانی ظهور و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی را به عنوان یکی از سه خطر بزرگ تهدیدکننده سلامت عمومی جامعه در قرن ۲۱ گزارش نموده است. مطالعات پیشین بیشتر در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی نمونه های بالینی متمرکز بوده است اما در بررسی های اخیر به اهمیت و تأثیر میکروب های محیطی به عنوان مخازن عوامل مقاومت و تأثیر آزادسازی باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط، توجه فراوانی شده است(۱, ۲). امروزه مشخص شده است که باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک و ژنهای مقاومت، در همه جای طبیعت و به ویژه در غلظتهای بالا در فاضلابهای بیمارستانی، خانگی، صنعتی و کشاورزی یافت می شوند(۳, ۴).

این محیطها اغلب واجد مقادیر بالای آنتی بیوتیک و سایر داروها بوده و به عنوان عامل مهمی در انتخاب مقاومت میکروبی مطرح می باشند. حضور باکتریهای مقاوم و نیز ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی باعث ماندگاری این باکتریها و همچنین انتشار آنها در طبیعت می شود که منجر به افزایش میزان عفونت با این عوامل بیماریزا، گسترش مخازن ژنهای مقاومت دارویی و انتقال ژنهای مقاومت در محیط می گردد(۵, ۶). در مطالعات مختلف، انتشار باکتریهای مقاوم به چند آنتی بیوتیک از فاضلابهای بیمارستانی به سیستم فاضلاب شهری گزارش شده است. به عنوان مثال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین می توانند از طریق فاضلاب بیمارستانی و شهری در محیط انتشار پیدا کنند (۷, ۸). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از باکتریهای بیماریزای بسیار مهم شناخته می شود که عامل ایجاد عفونتهای مختلفی نظیر عفونت پوست و بافتهای نرم، برونشیت، باکتریمی و عفونتهای مرتبط با استفاده از سوندهای ادراری می باشد. سازوکار اصلی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از حضور ژن mecA است که به عنوان بخشی از کاست کروموزومی استافیلوکوکی ژن mec (SCCmec) شناخته می شود و مسئول تولید پروتئین PBP2a است که از میل ترکیبی پایینی با آنتی بیوتیکهای بتالاکتام برخوردار می باشد (۹).

انتروکوکها باکتریهای همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات بوده و از عوامل مهم و شناخته شده ایجاد اندوکاردیت، عفونتهای ادراری و عفونتهای دستگاه تنفسی محسوب می شوند. این باکتریها به طور مستقیم یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می‌توانند به مدت طولانی در آنجا باقی بمانند (۷, ۸, ۱۰, ۱۱). گونه های مختلفی از انتروکوکها (بالغ بر ۵۰ گونه) تاکنون مورد شناسایی قرار گرفته اند که در این میان ۲ گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم از اهمیت بالینی بیشتری برخوردار می باشند. از دلایل اصلی بقای این ارگانیسمها در محیط بیمارستان؛ وجود مقاومت ذاتی این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج و توانایی کسب مقاومت نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای موجود می باشد. پیدایش این مقاومت می تواند ناشی از جهش و یا دریافت اجزاء ژنتیکی از طریق عوامل ژنتیکی متحرک از قبیل پلاسمیدها، ترانسپوزونها، اینتگرونها و باکتریوفاژها باشد (۷). ونکومایسین به عنوان آخرین سلاح درمانی جهت درمان عفونتهای ناشی از استافیلوکوکهای مقاوم به متی سیلین و همچنین انتروکوکهای مقاوم به سایر آنتی بیوتیکها شناخته می شود (۱۱). اولین مقاومت نسبت به ونکومایسین در سال ۱۹۸۸ در انگلستان گزارش شد و پس از آن با سرعتی غیرقابل پیش بینی در تمام جهان گسترش پیدا کرد. تاکنون هشت ژنوتایپ مقاومت به ونکومایسین در جهان گزارش شده است (vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM, vanN). در انتروکوکها پیش سازهای طبیعی پپتیدوگلیکان دارای انتهای D-ALa-D-ALa هستند که به ونکومایسین اتصال پیدا می کنند، درحالیکه در انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین، واجد انتهای D-ALa-D-Lac یا D-ALa-D-Ser می باشند که از اتصال ضعیفی (یا بدون اتصال) نسبت ونکومایسین برخوردار هستند (۱۲-۱۴).

این مطالعه با هدف تعیین حضور سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۷ به انجام رسیده است.

روش کار

جهت انجام این مطالعه، در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ در مجموع دو مرتبه نمونه گیری از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر اصفهان انجام گرفت. این بیمارستان فاقد سیستم تصفیه فاضلاب بود و هیچگونه تصفیه ای جهت حذف میکروارگانیسمها بر روی نمونه های فاضلابی انجام نمی گرفت

نمونه های فاضلاب خروجی توسط کارکنان بیمارستان در ظروف استریل ۱ لیتری جمع آوری شده و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و در کمتر از ۱ ساعت مورد بررسیهای بیشتر قرار گرفتند (۱۵). برای این منظور از نمونه های فاضلاب سریال رقت تهیه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده بر روی محیط اختصاصی ژلوز Baird-parker (Merck, Germany) واجد ۲ میکروگرم/میلی لیتر آنتی بیوتیک اگزاسیلین (Sigma, Germany) و محیط ژلوز m-Enterococcus (Merck, Germany) واجد ۴ میکروگرم/میلی لیتر آنتی بیوتیک ونکومایسین (Sigma, Germany) منتقل و پخش شدند. پس از جذب نمونه ها به سطح محیط کشت، پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت کلنیهای سیاه رنگ واجد هاله در اطراف کلنیها بر روی محیط ژلوز Baird-parker به عنوان جدایه های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و کلنیهای قرمز رنگ بر روی محیط ژلوز m-Enterococcus به عنوان جدایه های مشکوک به گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین انتخاب شده و بر روی محیط ژلوز مغذی (Biolife, Italy) خالص سازی شدند و با استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفتند (۹, ۱۱).

جهت بررسی کلنیهای قرمز رنگ مشکوک به انتروکوکوس بر روی محیط ژلوز m-Enterococcus پیش از انجام آزمون PCR از آزمونهای بیوشیمیایی بایل اسکولین و رشد در محیط NaCl ۶/۵ درصد استفاده گردید و جدایه هایی که قادر به هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا بودند و در محیط نمک رشد کردند جهت انجام آزمون PCR انتخاب شدند (۱۱).

به منظور تعیین مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین و مقاومت سویه های انتروکوکوس از روش انتشار از دیسک آنتی بیوتیکهای سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) و ونکومایسین (۳۰ میکروگرم) بر اساس دستورالعملهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده گردید (۱۶).

به منظور استخراج DNA جدایه های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از روش جوشاندن و بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید. برای این منظور چند کلنی از کشت باکتریها در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوبها به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت به عنوان الگوی DNA مورد استفاده قرار گرفت (۱۷).

جهت تأیید شناسایی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس از آزمون PCR به ترتیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nucA بر اساس دستورالعمل و چرخه حرارتی معرفی شده پیشین استفاده گردید (۹). علاوه بر این، جهت تأیید شناسایی جدایه های انتروکوکوس نیز از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای Ent و بر اساس دستورالعمل و چرخه حرارتی که پیشتر منتشر شده بود استفاده گردید (۱۸). همچنین، جهت شناسایی گونه های مختلف انتروکوکوس شناسایی شده در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۱).

یافته ها

در این مطالعه در طی ۲ مرتبه نمونه گیری در ماه های بهار و تابستان ۱۳۹۷ از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در اصفهان، در مجموع ۱۸۵ کلنی مقاوم به متی سیلین بر روی محیط اختصاصی ژلوز Baird-parker جداسازی گردید. این کلنیها سیاه براق نبوده و بیشتر به رنگ سیاه کمرنگ و قهوه ای تیره بودند اما هیچکدام واجد هاله در اطراف کلنیها نبودند. نتایج حاصل از آزمون PCR ژن nucA نشان داد که هیچکدام از ۱۸۵ جدایه مورد بررسی استافیلوکوکوس اورئوس نبودند و احتمالا متعلق به سایر گونه های جنس استافیلوکوکوس از قبیل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بودند. همچنین، نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این جدایه ها نشان داد که همه سویه ها مقاوم به سفوکسیتین بودند و به عنوان استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین مورد شناسایی قرار گرفتند.

علاوه بر این، در مجموع ۱۱۰ کلنی قرمز رنگ مشکوک به جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین بر روی محیط ژلوز m-Enterococcus جمع آوری شد و با استفاده از آزمونهای فنوتایپی تنها ۳ سویه (۳ درصد) به عنوان گونه های انتروکوکوس مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون PCR نیز تمامی نتایج حاصل از آزمونهای فنوتایپی مورد تأیید قرار گرفتند. به دنبال انجام آزمون PCR جهت

شناسایی گونه های مختلف انتروکوکوس مشخص گردید که هر ۳ سویه جداسازی شده متعلق به گونه فیسیوم بودند. تمامی سویه های انتروکوکوس فیسیوم جداسازی شده نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند و مابقی ۱۰۷ جدایه مقاوم به ونکومایسین نیز احتمالا متعلق به جنسهای لوکونوستوک و لاکتوکوکوس بودند.

بحث

مصرف بیش از حد و نادرست آنتی بیوتیکها در محیط بیمارستانها و مراکز درمانی و همچنین عدم رعایت اصول بهداشتی از عوامل گسترش باکتریهای مقاوم می باشد. ظهور و گسترش روزافزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین واجد ژنهای مقاومت چندگانه، تهدید جدی را در ارتباط با سلامت و بهداشت جوامع به وجود آورده است. تشخیص به موقع و صحیح این سویه ها به ویژه در محیطهای بیمارستانی بسیار ضروری و حائز اهمیت است. ظهور و بقای سویه های مقاوم به انواع آنتی بیوتیکها ناشی از کاربرد نادرست آنها در درمان و پیشگیری از بیماریها، استفاده نادرست آنتی بیوتیکها در بیماریهایی با عوامل غیرباکتریایی و همچنین کامل نشدن دوره درمان آنتی بیوتیکی پس از بهبود علائم، در دسترس بودن بیش از اندازهٔ آنتی بیوتیکها و خود درمانی غیرضروری بیماران با انواع آنتی بیوتیکها است. به دلیل شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی، درمان عفونتهای حاصل از باکتریهای مقاوم به ویژه سویه هایی با مقاومت چندگانه به یک معضل مهم در پزشکی تبدیل شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و گونه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از مهمترین عوامل ایجادکننده عفونتهای بیمارستانی به شمار می روند که باعث ایجاد عفونتهای شایع پوست و بافتهای نرم، خون، برونشیت و عفونتهای ادراری و اندوکاردیت می شوند (۱۹). این باکتریها از نمونه های بالینی، محیطی و فاضلابی سراسر جهان جداسازی می شوند (۲۰-۲۴). فاضلاب به عنوان یک مخزن برای ایجاد باکتریهایی با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی بیوتیکها شناخته می شود. عوامل مقاومت از طریق اجزای ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، اینتگرونها و ترانسپوزونها و نیز ژنوم باکتریایی منتقل می شود. به دلیل عدم حذف برخی از باکتریهای مقاوم مانند سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین، امکان ورود این باکتریها به طبیعت نیز وجود دارد که باعث انتشار سویه ها و ایجاد عفونتهای ناشی از این باکتریهای مقاوم به درمان می شوند. بنابراین بررسی و مطالعه شیوع این سویه ها در فاضلاب از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۱۱, ۱۵).

تاکنون در ایران گزارشات مختلفی در مورد شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در نمونه های بالینی و در بیمارستانهای مختلف و همچنین سایر منابع گزارش شده است که نشان دهنده شیوع نسبتا بالای این باکتریها در کشور است (۳۲-۲۵). بنابراین با توجه به ظهور و گسترش سریع سویه های مقاوم در بیمارستانها، مطالعه و بررسی آنها و یافتن منبع انتشار آنها از اهمیت بالایی برخوردار می باشد.

در این مطالعه و با بررسی فاضلاب خروجی یک بیمارستان در اصفهان در سال ۱۳۹۷ هیچ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی نشد. تاکنون در ایران در مطالعات انجام گرفته توسط رحیمی و همکاران گزارشاتی از شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در فاضلاب بیمارستانی، فاضلاب شهری، آبهای سطحی و رودخانه ها در شهرهای تهران، اصفهان و کرج در اختیار است (۱۵, ۳۵-۳۳). در مطالعه ترابی و رحیمی در طی ۲ مرتبه نمونه گیری در سال ۱۳۹۴ از فاضلاب بیمارستانی در شهر تهران، در مجموع ۷۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شد (۳۵). رحیمی و بوذری در مطالعه دیگری بر روی فاضلاب شهری تهران، شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در فاضلاب را ۲۰ درصد گزارش دادند (۱۵). نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با نتایج به دست آمده از فاضلاب بیمارستان شهر تهران نشان دهنده روند بسیار مطلوب کنترل عفونت در بیمارستان مورد مطالعه در اصفهان است که علیرغم عدم وجود سیستم تصفیه فاضلاب در بیمارستان مورد مطالعه، هیچ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در فاضلاب خروجی جداسازی نشد. همچنین، در شهر اصفهان رحیمی و کریمی موفق به جداسازی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آب رودخانه زاینده رود شدند (۳۴). شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در رودخانه زاینده رود که از نظر تایپ مشابه سویه های جداسازی از بیمارستانهای مختلف در

شهر اصفهان بودند نشان دهنده ضعف سیستمهای کنترل عفونت و عدم کارآیی روند تصفیه فاضلاب در بیمارستانهای مختلف است که منجر به انتشار سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در شهر و در رودخانه زاینده رود شده است. اما در مطالعه حاضر، این بیمارستان از نظر جغرافیایی مسافت زیادی با رودخانه زاینده رود دارد و فاضلاب خروجی بیمارستان ابتدا وارد فاضلاب شهری شده و سپس جهت تصفیه فاضلاب شهری وارد تصفیه خانه فاضلاب می شود. با توجه به اینکه در برخی از مزارع شرق اصفهان از آب فاضلاب جهت آبیاری مزارع استفاده می شود بنابراین کاهش آلودگی ورودی به فاضلاب شهری می تواند منجر به کاهش آلودگی زمینهای زراعی و محصولات کشاورزی (صیفی جات و سبزیجات) شود.
در نقاط مختلف جهان نیز آمارهای مختلفی از شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین گزارش شده است. در مطالعه Goldstein و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آمریکا، تقریباً نیمی از سویه های جداسازی شده از ۲ تصفیه فاضلاب استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بودند (۳۶). Gómez و همکاران در سال ۲۰۱۶ شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در ۸ تصفیه خانه فاضلاب در اسپانیا را مورد مطالعه قرار دادند و تنها موفق به جداسازی یک سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در طی ۱۶ مرحله نمونه گیری از تصفیه خانه ها شدند (۳۷). Börjesson و همکاران در سال ۲۰۱۰ در سوئد توانستند ۱۸۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را از نمونه های فاضلاب جداسازی نمایند (۳۸). در سایر مطالعات در سراسر جهان، محققان موفق به جداسازی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه های فاضلاب نشدند و یا شیوع بسیار اندکی گزارش گردید (۴۲-۳۹). بنابراین با توجه به این یافته ها می توان اذعان داشت که شیوع متفاوت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در نقاط مختلف جهان می تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی مورد بررسی، جمعیت حاضر در منطقه، نحوه نمونه گیری از فاضلاب، تجهیزات مورد استفاده در سیستم تصفیه فاضلاب در بیمارستانها و تصفیه خانه های فاضلاب شهری و همچنین شیوع سویه هایی با مقاومتهای مختلف در مناطق مورد مطالعه باشد.
گونه های مختلف انتروکوکوس نیز از جمله باکتریهای بسیار مهم موجود در فاضلاب هستند که می توانند ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی را به راحتی کسب کنند و همچنین قادر به انتقال ژنهای مقاومت به سایر جنسها و گونه های باکتریایی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس نیز می باشند. در ایران تاکنون در مطالعات مختلف گزارشهایی از جداسازی گونه های انتروکوکوس از فاضلاب شهری و بیمارستانی ارائه شده است. طالبی و همکاران و رحیمی و همکاران حضور سویه های انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس گالیناروم مقاوم به ونکومایسین را در فاضلاب شهری تهران نشان دادند (۷, ۸, ۱۱). در مطالعه مرادی و همکاران در سال ۱۳۹۴ بر روی فاضلاب بیمارستانی در بندرعباس، شیوع سویه های انتروکوکوس ۲۴ درصد گزارش شد (۴۳). حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که از ۱۵۵ سویه انتروکوکوس جداسازی شده از نمونه های فاضلاب بیمارستانی و آبهای سطحی جنوب استان فارس، حدود ۳۰ درصد از سویه ها نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند (۴۴). نتایج این مطالعه منطبق بر یافته های کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ از فاضلاب خروجی بیمارستانی در همدان بود؛ هرچند که تعداد نمونه ها در مطالعه همدان بیشتر بود، اما فراوانی سویه های مقاوم به ونکومایسین نسبت به سایر پژوهشهای انجام شده در ایران کمتر بود (۴۵).
در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۲ در سوئد انجام گرفت، ۳۵ سویه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین جداسازی شد (۲۰). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۵ در آفریقای جنوبی ۶۲ سویه انتروکوکوس از فاضلاب یک بیمارستان و پساب خروجی تصفیه خانه شهری جداسازی شدند که ۳۳ سویه متعلق به فاضلاب بیمارستانی و ۲۹ سویه متعلق به پساب خروجی تصفیه خانه شهری بود (۴۶). به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر مانند بسیاری از پژوهشهای دیگر نشان داد که فاضلاب بیمارستانی می تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی گسترش و انتشار باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک محسوب شود هرچند که تعداد باکتریها در آن کم باشد. از این رو بررسی همزمان نمونه های محیطی و بالینی به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی ضرورت دارد. همچنین ضرورت اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیک در نمونه های فاضلاب و ارزیابی ارتباط آنها با میزان مقاومت نیز می تواند بسیار حائز اهمیت باشد.
با توجه به اهمیت فاضلاب بیمارستانی در انتقال و انتشار باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک و ژنهای مقاومت و یکی شدن آن با فاضلاب شهری و راه یافتن به آبهای زیرزمینی و

آبهای جاری، حتی وجود درصد پایین این باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک تهدید جدی برای سلامت و بهداشت محیط می باشد که باید برای حذف کامل این گونه های مقاوم تدبیر جدی اندیشیده شود. در پایان با توجه به اینکه مطالعه حاضر مقطعی بوده و محدود به یک بیمارستان بوده است، نمی توان با قطعیت در مورد میزان شیوع سویه های استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین صحبت کرد و اعلام میزان دقیق نیازمند مطالعات بیشتر و گسترده تر در شهر اصفهان می باشد. علاوه بر این، هرچند که در بیمارستان مورد بررسی فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس بسیار محدود بود، اما در مقابل سایر جنسها و گونه های باکتریایی مانند استافیلوکوکوس اپیدرمیس، لاکتوکوکوس و لوکونستوک از فراوانی بالایی برخوردار بودند که نشان دهنده عدم کارآیی سیاستهای کنترل عفونت در مقابل باکتریهای مذکور در بیمارستان مورد نظر می باشد.

REFERENCES

1. Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environmental Microbiology. 2009;11(12):2970-88.
2. Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science. 2008;321(5887):365-7.
3. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology. 2008;19(3):260-5.
4. Heuer H, Focks A, Lamshöft M, Smalla K, Matthies M, Spiteller M. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. Soil Biology and Biochemistry. 2008;40(7):1892-900.
5. Chitnis V, Chitnis S, Vaidya K, Ravikant S, Patil S, Chitnis D. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. Water Research. 2004;38(2):441-7.
6. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators. 2008;8(1):1-13
7. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kühn I, Möllby R, Eshraghi S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. Water, Air, and Soil Pollution. 2007;185(1-4):111.
8. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Current Microbiology. 2008;56(5):468-73.
9. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(Pt 6):796-804.

10. Hayes JR, McIntosh AC, Qaiyumi S, Johnson JA, English LL, Carr LE, et al. High-frequency recovery of quinupristin-dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* Isolates from the poultry production environment. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(6):2298-9.

11. Rahimi F, Talebi M, Seifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iranian Biomedical Journal. 2007;11(3):161-7.

12. Arthur M, Quintiliani R. Regulation of VanA-and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001;45(2):375-81.

13. Flores RM, Haley JA, Ross TW. Vancomycin-resistant enterococci: Approach to treatment and control. Cancer Control. 1996;3(1):66-72.

14. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerging Infectious Diseases. 1998;4(1):37.

15. Rahimi F, Bouzari M. Biochemical fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from sewage and hospital in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19760.

16. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.

17. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

18. Rahimi F, Talebi M, Barahoei N. Isolation of vancomycin resistant enterococci from hospital sewage in Tehran, 2016. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;23(83):47-53.

19. Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardova V, et al. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. Archives of Virology. 2004;149(9):1689-703.

20. Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. Applied and Environmental Microbiology. 2002;68(6):2838-42.

21. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Molecular and Cellular Probes. 2005;19(1):27-34.

22. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(9):5383-90.

23. Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. Journal of Clinical Microbiology. 1998;36(7):1853-8.

24. Manson JM, Smith JM, Cook GM. Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. Applied and Environmental Microbiology. 2004;70(10):5764-8.

25. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-1811.

26. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.

27. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.

28. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.

29. Rahimi F, Qasemi A. Epidemiological link between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 2 different cities in Iran. Infectious Diseases in Clinical Practice. 2019;27(3):163-9.

30. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4):389-98.

31. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.

32. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(5):e59385.

33. Rahimi F, Emami H, Arabestani MR, Parshad B. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in surface water in Karaj. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015;19(67):53-60.

34. Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Zayanderud river in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2016;21(72):55-60.

35. Torabi M, Rahimi F. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from hospital sewage in Tehran in 2015 .Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2018;23(80):25-32.

36. Goldstein RER, Micallef SA, Gibbs SG, Davis JA, He X, George A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four US wastewater treatment plants. Environmental Health Perspectives. 2012;120(11):1551-8.

37. Gómez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M, et al. Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. Environmental Pollution. 2016;212:71-6.

38. Börjesson S, Matussek A, Melin S, Löfgren S, Lindgren P-E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? Journal of Applied Microbiology. 2010;108(4):1244-51.

39. Savichtcheva O, Okayama N, Okabe S. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. Water Research. 2007;41(16):3615-28.

40. Schwartz T ,Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology. 2003;43(3):325-35.

41. Shannon K, Lee D-Y, Trevors J, Beaudette L. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. Science of the Total Environment. 2007;382(1):121-9.

42. Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). Journal of Microbiological Methods. 2004;56(2):277-86.

43. Moradi N, Zarei T, Shamsi S, Bahreyni F. The pattern antibiotic resistance of coliforms and entrococcuses isolated from hospital wastewater. Journal of Preventive Medicine. 2018;5(1):20-7.

44. Hosseini F, Kargar M. Antibiotic resistance pattern and identification of vancomycin resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in southern Fars province. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2017;17(2):164-73.

45. Karimi F, Samarghandi MR, Shokoohi R, Godini K, Arabestani MR. Prevalence and removal efficiency of enterococcal species and vancomycin-resistant enterococci of a hospital wastewater treatment plant. Avicenna Journal of Environmental Health Engineering. 2016;3(2):8623.

Iweriebor BC, Gaqavu S, Obi LC, Nwodo UU, Okoh AI. Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, Eastern Cape Province of South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2015;12(4):4231-46.