فراوانی جدایه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین در تصفیه خانه های فاضلاب اصفهان در سال ۱۳۹۷

نسرین امین[۱]، فاتح رحیمی[۲]*

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- 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: **تیر چهارصد** پذیرش برای چاپ: **مهر چهارصد**

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوکها از اعضای نرمال بایوتا روده انسان محسوب می شوند که از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند به مدت طولانی در محیط باقی بمانند. این باکتریها قادر به کسب مقاومت نسبت به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکها هستند و نقش بسیار مهمی در انتشار مقاومت به ونکومایسین در میان کوکسیهای گرم مثبت ایفا می کنند. این مطالعه با هدف بررسی حضور گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب شهری اصفهان به انجام رسیده است.*

روش کار: *در طی سال ۱۳۹۷ نمونه گیری از فاضلاب ورودی، لجن و پساب خروجی دو تصفیه خانه فاضلاب در شهر اصفهان انجام گرفت. نمونه ها پس از آماده سازی بر روی محیط کشت M-Enterococcus agar واجد ونکومایسین و ۲و۳و۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید کشت داده شدند و کلنیهای انتخاب شده با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمایی به عنوان جنس انتروکوکوس و همچنین آزمون multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، ریفامپین، تتراسایکلین، نیتروفورانتوئین، کلرامفنیکل، لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید. جهت بررسی حضور ژنهای vanA-vanG در میان سویه ها نیز از آزمون multiplex-PCR استفاده شد.*

یافته‌ها: *در مجموع در این مطالعه ۸۰ سویه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین مورد شناسایی قرار گرفتند که ۹۶ درصد انتروکوکوس فیسیوم و ۴ درصد انتروکوکوس فکالیس بودند. تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند و هیچکدام از سویه ها نیز مقاوم به لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین نبودند. علاوه بر این، ۵ الگوی مقاومتی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید و تمامی سویه ها حداقل نسبت به ۴ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. تمامی سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین تنها واجد ژن vanA بودند و هیچکدام از ژنهای مقاومت دیگر در میان سویه ها شناسایی نشد.*

نتیجه‌گیری: *شیوع بالای سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین واجد مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه در پساب خروجی تصفیه خانه های فاضلاب شهر اصفهان نشان دهنده راندمان پایین سیستمهای تصفیه جهت حذف باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک است.*

واژگان کلیدی: واژگان کلیدی: انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین، فاضلاب، vanA، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، اصفهان

مقدمه

انتروکوکها سالها است که به عنوان باکتریهای بیماریزا جداسازی شده از بیمارستان شناخته می شوند و جدایه های *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* از جمله باکتریهای شایع ایجاد کننده عفونت اکتسابی از بیمارستان در کل جهان محسوب می شوند(۱). نکته مهم و نگران کننده در مورد انتروکوکها افزایش روز افزون مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، اعضای خانواده آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها است که هر روز از تعداد داروهای مؤثر علیه این باکتری کاسته می شود. راهکارهای درمانی برای انتروکوکوکهای واجد مقاومت چند دارویی و انتروکوکوکهای مقاوم به ونکومایسین استفاده از آنتی بیوتیکهای کینوپریستین-دالفوپریستین، لینزولاید، داپتومایسین و نسل پنجم خانواده سفالوسپورینها می باشند که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها نیز در حال گسترش است. از لحاظ بالینی همانگونه که مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک مقاومت کلیدی شناخته می شود، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی (از آنها به عنوان آخرین سلاح درمانی عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم مثبت نام برده می شود) نیز به عنوان یک مقاومت کلیدی در میان انتروکوکها شناخته می‌شود(۲, ۳).

جدایه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین (VRE)، به یک معضل بزرگ در بیمارستانهای سراسر جهان تبدیل شده اند، که این امر ناشی از توانایی این میکروارگانیسم برای زنده مانی بر روی سطوح بی جان مانند تختها، دستگاه ها و ابزارهای پزشکی، سیستم های تهویه و ... است که کنترل عفونت را با مشکل اساسی مواجه می کند. جدایه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین منجر به بروز طیف وسیعی از عفونتها شامل باکتریمی، اندوکاردیت، عفونتهای دستگاه ادراری، عفونتهای داخل شکمی و لگنی، عفونتهای پوستی و ... می شوند(۴). تعیین میزان مرگ و میر ناشی از این باکتریها به دلیل دخیل بودن بیماریهای زمینه ای در بروز مرگ و میر دشوار است. میزان مرگ و میر در بیماران سرطانی و دریافت کنندگان بافت بسیار شدیدتر از سایر افراد است؛ همچنین عفونتهای انتروکوکی بیشتر از دستگاه گوارش آغاز می شوند و بنابراین از دست دادن میکروبیوتای دستگاه گوارش در بروز این عفونتها می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. استفاده بی مورد و مکرر از آنتی بیوتیکها، به علت اثر مخرب بر میکروبیوتای دستگاه گوارش، می تواند منجر به افزایش احتمال بروز عفونت گوارشی با این باکتری شود. همچنین، در بیماران سرطانی که در حال شیمی درمانی هستند و افراد دارای نقص ایمنی این حالت تشدید می شود. علاوه بر موارد پیشین، عواملی از قبیل بستری طولانی مدت در بیمارستان و استفاده از ابزارهای مداخله ای (مانند سوند) باعث شکسته شدن سد محافظ ورودی در مقابل این باکتری می گردد که متعاقبا منجر به انتقال و مواجهه بیمار با عامل ایجاد عفونت خواهد شد(۴).

انتروکوکها باکتریهای غالب مدفوع انسان هستند و در انواع فاضلابهای شهری و بیمارستانی به فراوانی یافت می شوند و می توانند به مدت طولانی در محیط باقی بمانند. این باکتریها از جمله عوامل ایجاد کننده عفونتهای بیمارستانی به شمار می روند که از توانایی بالایی جهت کسب و انتقال ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی برخوردار می باشند. بنابراین بررسی و آزمایش فاضلابهای شهری و بیمارستانی از نظر وجود جدایه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین، به منظور بررسی حضور این باکتری و میزان خطرات ناشی از آن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی گونه های مختلف *انتروکوکوس* مقاوم به ونکوماسین در تصفیه خانه های فاضلاب شهری اصفهان به انجام رسیده است.

روش کار

به منظور جداسازی سویه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب شهری، در مجموع ۳ مرتبه نمونه گیری در فاصله زمانی مهر لغایت اسفند ۱۳۹۷ از تصفیه خانه جنوب اصفهان و ۱ مرتبه نمونه گیری در بهمن ۱۳۹۷ از تصفیه خانه بهارستان انجام گرفت. نمونه ها از ورودی، لجن و خروجی (پیش از تیمار) در شیشه های استریل جمع آوری شده و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل و در کمتر از ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند(۵).

به منظور جداسازی سویه ها از نمونه های فاضلاب، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه فاضلاب بر روی محیط اختصاصی M-Enterococcus agar base (Quelab, Canada) واجد ۴ میکروگرم/میلی لیتر ونکومایسین و رنگ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۱ درصد پخش گردید و سپس پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت، کلنیهای رنگی (قرمز، صورتی و بنفش) جهت بررسیهای بیشتر بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، رشد در محیط نمک ۶/۵ درصد، هیدرولیز بایل اسکولین (Merck, Germany)، PYR و رشد در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد به عنوان جنس *انتروکوکوس* مورد شناسایی قرار گرفتند(۶).

جهت استخراج DNA از کلنیهای باکتریایی از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد(۷). برای این منظور، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در میکروتیوبهای استریل اضافه شد و یک لوپ پر از کشت تازه باکتری در آب مقطر حل شده و به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوبهای حاوی سوسپانسیون ب

باکتری به مدت ۲۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک جوشانده شده و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان DNA الگو جهت انجام آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی گونه های مختلف جنس انتروکوکوس در میان نمونه های فاضلاب شهری اصفهان از آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی گونه های مختلف بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید(۶).

جهت بررسی حضور ژنوتایپهای مقاومت به ونکومایسین (vanA- vanG) در میان سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از آزمون multiplex-PCR بر اساس دستورالعمل Depardieu و همکاران استفاده گردید(۸).

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوکوس جداسازی شده از فاضلاب شهری از روش انتشار از دیسک با استفاده از استاندارد های CLSI استفاده گردید و مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین(۱۰ واحد)، ونکومایسین(۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین(۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین(۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین(۳۰۰ میکروگرم)، ریفامپین(۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل(۳۰ میکروگرم)، لینزولاید(۳۰ میکروگرم) و کینوپریستین-دالفوپریستین(۱۵ میکروگرم) تعیین گردید(۹). دیسکهای مورد استفاده در این مطالعه(به استثناء لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین) از شرکت پادتن طب تهیه شدند و صحت عملکرد این دیسکها به صورت تصادفی با دیسکهای آنتی بیوتیکی شرکت Mast (UK) مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها

در مجموع ۴۴۶ جدایه مشکوک به انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین بر روی محیط M-Enterococcus agar واجد ونکومایسین جدا گردید. پس از بررسی جدایه ها با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی اختصاصی جنس انتروکوکوس، در مجموع ۸۰ جدایه (۱۸ درصد) شناسایی و تأیید شدند(جدول ۱). بر این اساس مشخص گردید که ۵۸ سویه(۷۲ درصد)، ۱۶ سویه ۲۰ درصد) و ۶ سویه(۸ درصد) به ترتیب متعلق به فاضلاب ورودی، لجن و فاضلاب خروجی بودند. همچنین، بیشترین تعداد جدایه ها(۳۴ درصد) نیز مربط به دومین مرتبه نمونه گیری از تصفیه خانه فاضلاب جنوب اصفهان بود. در تمامی نمونه های جمع آوری شده از تصفیه خانه های فاضلاب، بیشترین جدایه ها از فاضلاب ورودی و کمترین جدایه ها نیز از فاضلاب خروجی جدا شدند.

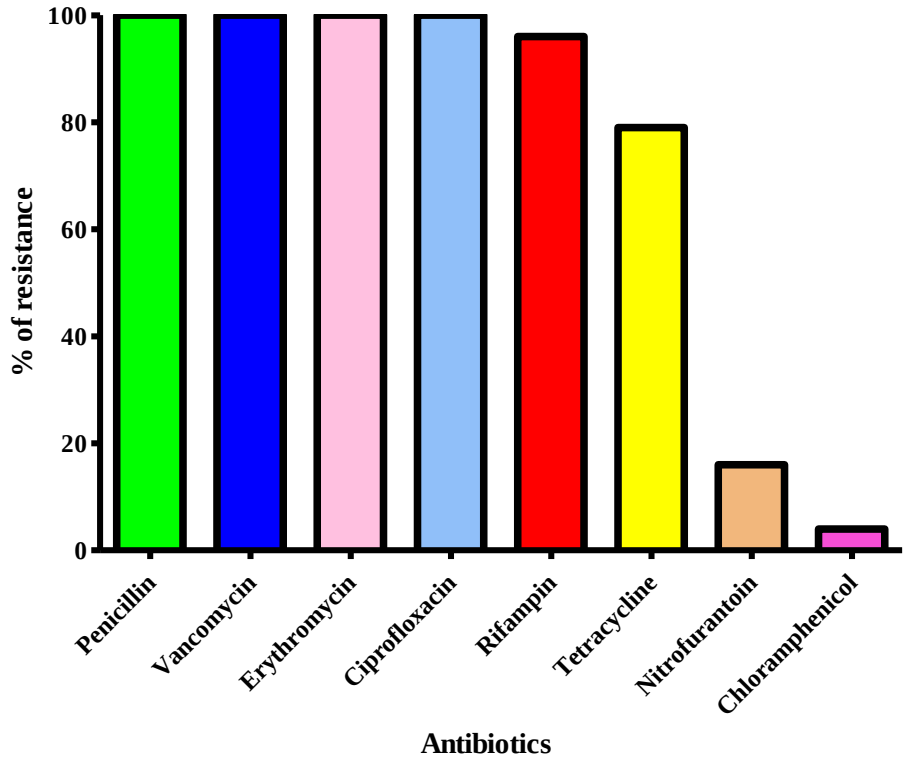
جدول ۱. فراوانی انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین در میان نمونه های فاضلاب شهری اصفهان.۱۳۹۷

تصفیه خانه فاضلاب	نمونه فاضلاب			جمع (٪)
	ورودی (٪)	لجن (٪)	خروجی (٪)	
جنوب اصفهان-۱	۱۳ (۷۲)	۵ (۲۸)	۰	۱۸ (۲۲)
جنوب اصفهان-۲	۲۳ (۸۵)	۳ (۱۱)	۱ (۴)	۲۷ (۳۴)
جنوب اصفهان-۳	۱۱ (۵۵)	۵ (۲۵)	۴ (۲۰)	۲۰ (۲۵)
بهارستان	۱۱ (۷۳)	۳ (۲۰)	۱ (۷)	۱۵ (۱۹)
جمع (٪)	۵۸ (۷۲)	۱۶ (۲۰)	۶ (۸)	۸۰

در میان ۸۰ جدایه انتروکوکوس در فاضلاب شهری اصفهان تنها دو گونه شناسایی شد. بر این اساس مشخص گردید که ۹۶ درصد(۷۷ سویه) و ۴ درصد(۳ سویه) جدایه ها به ترتیب انتروکوکوس فیسیوم و انتروکوکوس فکالیس بودند و هیچکدام از گونه های دیگر در دو تصفیه خانه فاضلاب شهری اصفهان مورد شناسایی قرار نگرفتند.

تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و ۹۶ و ۷۹ درصد سویه ها نیز به ترتیب نسبت به ریفامپین و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند.

همچنین، کمترین میزان مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای کلرامفنیکل(۴ درصد) و نیتروفورانتوئین(۱۶ درصد) مشاهده شد. علاوه بر این، هیچکدام از سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین نسبت به آنتی بیوتیکهای لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین مقاومت نشان ندادند(نمودار ۱).



نمودار ۱- مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین

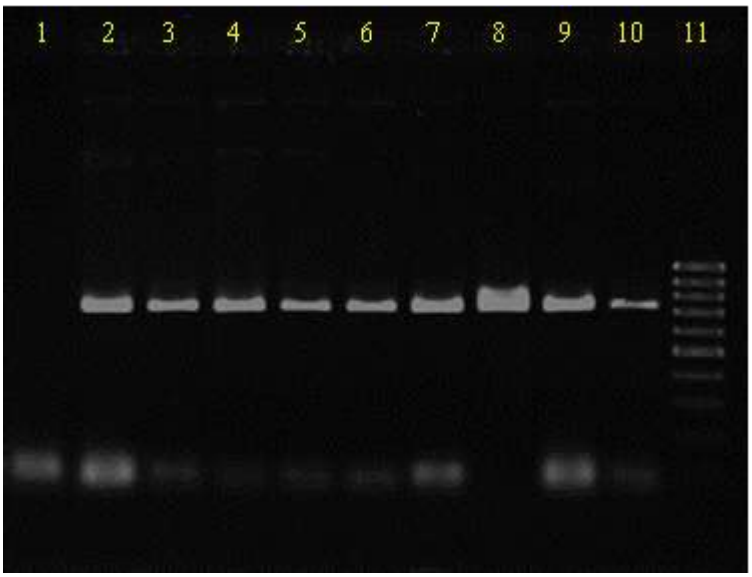
تمامی سویه ها حداقل نسبت به ۴ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و در مجموع ۵ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نیز در میان سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین مشاهده گردید(جدول ۲). بر این اساس مشخص گردید که ۲۰ و ۶۵ درصد سویه ها به ترتیب نسبت به ۴ و ۵ آنتی بیوتیک مقاوم بودند و ۱۵ درصد سویه ها نیز نسبت به ۶ آنتی بیوتیک پنی سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، ریفامپین، تتراسایکلین و نیتروفورانتوئین مقاومت نشان دادند. الگوی مقاومت شماره ۲ مشتمل بر مقاومت به پنی سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل) تنها در میان سویه های انتروکوکوس فکالیس مشاهده شد و سایر الگوهای مقاومتی نیز تنها متعلق به سویه های انتروکوکوس فیسیوم بودند. بنابراین، تمامی سویه های انتروکوکوس فیسیوم نسبت به کلرامفنیکل حساسیت نشان دادند.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین جدا شده از فاضلاب شهری اصفهان.۱۳۹۷

الگوی مقاومت	تعدادآنتی‌بیوتیک	نام آنتی‌بیوتیک	تعداد جدایه (درصد)
۱	۴	P, E, CIP, RP	۱۶ (۲۰)
۲	۵	P, E, CIP, TE, C	۳ (۴)
۳		P, E, CIP, RP, NI	۱ (۱)
۴		P, E, CIP, RP, TE	۴۸ (۶۰)
۵	۶	P, E, CIP, RP, TE, NI	۱۲ (۱۵)

C: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacin, E: erythromycin, NI: nitrofurantoin, P: penicillin, RP: rifampim, TE: tetracycline

تمامی سویه های انتروکوکوس فیسیوم و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین تنها واجد ژن مقاومت vanA بودند(شکل۱) و هیچکدام از ژنهای مقاومت vanB-vanG در میان سویه ها شناسایی نشد.



شکل ۲. آزمون PCR جهت شناسایی ژن *vanA* در میان سویه های جداسازی شده از فاضلاب شهری و بیمارستانی. لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲: کنترل مثبت (*E. faecalis* ATCC 29212)، لاینهای ۳-۱۰: سویه های مورد بررسی، لاین ۱۴: مارکر 1000 bp،

بحث

سازمان بهداشت جهانی ایجاد و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی را به عنوان یکی از سه خطر بزرگ تهدیدکننده سلامت عمومی افراد در قرن ۲۱ گزارش نموده است. با توجه به اینکه ایران از جمله پرمصرفترین کشورها از نظر استفاده از آنتی بیوتیک می باشد، افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتریهای بیماریزا، به عنوان یک چالش مهم برای جامعه پزشکی مطرح شده است. آنتی بیوتیکها در درمان عفونتهای انسانی و همچنین در دامپزشکی به عنوان محرک رشد در خوراک دام و طیور مورد استفاده قرار می گیرند (۷, ۱۰).

در این مطالعه در مجموع ۸۰ سویه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از نمونه های فاضلاب ورودی، لجن و پساب خروجی دو تصفیه خانه فاضلاب در شهر اصفهان جدسازی شدندکه ۹۶ درصد انتروکوکوس فیسیوم و ۴ درصد نیز انتروکوکوس فکالیس بودند. همچنین، تمامی سویه ها تنها واجد ژن vanA بودند. ایورسن و همکاران در سال ۲۰۰۲ در سوئد، جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین را از فاضلاب بیمارستانی، فاضلاب شهری و آبهای سطحی در استکهلم جدا سازی نمودند. در آن مطالعه، انتروکوکوس فیسیوم فراوانترین گونه جداسازی شده بود و ژنوتایپ vanA به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش گردید (۱۱). در مطالعه کریمی و همکاران، ۳۱۵ جدایه انتروکوکوس از تصفیه خانه فاضلاب بیمارستانی در همدان جداسازی شد که به ترتیب بیشترین فراوانی مربوط به گونه های انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس هایره، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس آویوم بود؛ همچنین، ۹ جدایه انتروکوکوس فیسیوم نیز نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند (۱۲). در مطالعه رحیمی و همکاران درسال ۲۰۱۶ از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در مجموع ۹۲ جدایه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین مشتمل بر سه گونه انتروکوکوس فیسیوم (۸۰ درصد)، انتروکوکوس فکالیس (۱۷ درصد) و انتروکوکوس گالیناروم (۳ درصد) جداسازی شد و سه ژن vanA، vanB و vanC نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که حضور ژن vanA در تمامی سویه ها گزارش شد و فراوانی ژن vanC تنها محدود به سویه های انتروکوکوس گالیناروم بود (۷). در مطالعه طالبی و همکاران در سال ۲۰۰۷، در مجموع ۵۹۳ سویه انتروکوکوس جداسازی شده از ۳ تصفیه خانه فاضلاب شهری در شهر تهران مورد بررسی قرار گرفتند. در آن مطالعه، گونه های انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس هایره و انتروکوکوس فکالیس فراوانترین گونه های شناخته شده بودند و گونه های انتروکوکوس گالیناروم، انتروکوکوس کسلی فلاووس، انتروکوکوس موندتی، انتروکوکوس رافینوزوز، انتروکوکوس دیسپار و انتروکوکوس آویوم کمترین شیوع را داشتند. همچنین، در آن مطالعه ۱۹ جدایه انتروکوکوس فیسیوم نسبت به ونکومایسین مقاومت نشان دادند و مقاومتی نسبت به ونکومایسین در سایر گونه ها مشاهده نشد (۵). عامری و همکاران در سال ۲۰۰۹ در شهر تهران، در طی ۶ مرحله نمونه‌گیری از ۳ تصفیه خانه فاضلاب شهری موفق به جداسازی ۲۰۳ سویه انتروکوکوس مختلف شدند. در آن مطالعه، انتروکوکوس گالیناروم فراوانترین گونه جداسازی شده بود و انتروکوکوس فیسیوم و انتروکوکوس کسلی فلاووس از فراوانی کمتری برخوردار بودند. تمامی جدایه های انتروکوکوس فیسیوم نسبت به ونکومایسین مقاوم بوده و فراوانی ژنهای vanA و vanB در میان جدایه های انتروکوکوس فیسیوم به ترتیب ۱۰۰ و ۳/۱ درصد بود. همچنین، فراوانی vanB در میان جدایه های انتروکوکوس کسلی فلاووس و انتروکوکوس گالیناروم نیز به ترتیب ۱۱ و ۱ درصد گزارش گردید (۱۳). در مطالعه شقاقی و همکاران بر روی نمونه های تصفیه خانه فاضلاب شهرک اکباتان تهران، گونه های انتروکوکوس گالیناروم (۷۵ درصد)، انتروکوکوس فیسیوم (۱۸ درصد) و انتروکوکوس کسلی فلاووس (۷ درصد) مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۴). در مطالعه حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در جنوب استان فارس بر روی ۱۵۵ جدایه انتروکوکوس جمع آوری شده از نمونه های فاضلاب بیمارستانی و آبهای سطحی، در مجموع ۴۶ جدایه نسبت به ونکومایسین مقاومت نشان دادند. همچنین، ۲ جدایه واجد ژن vanA و ۲ جدایه نیز واجد ژن vanB بودند، اما در هیچکدام از جدایه‌ها ژن vanC مورد شناسایی قرار نگرفت (۱۵). سندرسن و همکاران در مطالعه ای بر روی نمونه های تصفیه خانه فاضلاب شهری در کانادا موفق به شناسایی گونه های انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس کسلی فلاووس شدند (۱۶). نوایس و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور پرتغال، فراوانی جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین را در فاضلاب شهری در پورتو ۶۸ درصد گزارش کردند. در آن مطالعه ۳ ژنوتایپ vanA، vanB و vanC در میان جدایه ها شناسایی گردید (۱۷). در مطالعه برهانی و همکاران در سال ۲۰۱۴، در مجموع ۴۰ جدایه انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین از یک تصفیه خانه فاضلاب در شهر تهران جداسازی گردید. تمامی جدایه ها واجد ژن vanA و ۱۳ درصد نیز واجد ژن vanB بودند (۱۸). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۷، از مجموع ۷۱۲ سویه انتروکوکوس، ۹ گونه مختلف فیسیوم، فکالیس، گالیناروم، موندتی، کسلی فلاووس، هایره، دیسپار، رافینوزوز و آویوم) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و به روش PCR مورد شناسایی قرار گرفتند که به ترتیب انتروکوکوس فیسیوم، انتروکووس هایره و انتروکوکوس فکالیس از فراوانی بیشتری برخوردار بودند. در آن مطالعه فراوانی جدایه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در نمونه های فاضلابی شهر تهران ۲/۷ درصد گزارش گردید که ۱۰۰ درصد سویه ها واجد ژن vanA و ۳۲ درصد نیز واجد ژن vanB بودند (۶).

در این مطالعه تمامی سویه های انتروکوکوس فیسیوم و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین نسبت به آنتی

بیوتیکهای پنی سیلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند و هیچکدام از سویه ها نیز نسبت به لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین مقاوم نبودند. در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۷، مقاومت سویه های انتروکوکوس نسبت به اریترومایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و کلرامفنیکل به ترتیب ۳۴، ۲۰، ۱۷ و ۶ درصد گزارش گردید. همچنین، پایینترین میزان مقاومت نیز در میان سویه ها مربوط به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامایسین بود (۶). در مطالعه ایورسن و همکاران در سوئد، ۱۰۰ و ۶۷ درصد سویه ها نسبت به تتراسایکلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۱۱). در آمریکا در سال ۲۰۰۴ در مطالعه بر روی نمونه های ماکیان، ۹۶، ۸۰، ۵۷، ۷ و ۶/۵ درصد سویه ها نسبت به جنتامایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین و کلرامفنیکل مقاومت نشان دادند (۱۹). اربابی و همکاران در سال ۲۰۱۲، با مطالعه بر روی سویه های انتروکوکوس جداسازی شده از نمونه های ماکیان توانستند ۳ گونه انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس گالیناروم را جداسازی نمایند که انتروکوکوس گالیناروم گونه غالب بود. در آن مطالعه بیشترین میزان مقاومت مربوط به ونکومایسین (۳۲ درصد) بود و مقاومت به تتراسایکلین (۲۳ درصد) و اریترومایسین (۲۰ درصد) در مراتب بعدی قرار داشتند. کمترین مقاومت نیز نسبت به کلرامفنیکل مشاهده گردید (۲۰).

علت فراوانی و تنوع متفاوت سویه های جداسازی شده از فاضلاب در نقاط مختلف جهان و ایران را می تواند ناشی از منطقه جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، جمعیت ساکن در منطقه، سطح فرهنگی و آداب و رسوم متفاوت در نقاط مختلف جهان، تجهیزات و فرآیند مورد استفاده در تصفیه خانه های فاضلاب و سیاستهای متفاوت کشورها، شهرها و بیمارستانها در کنترل بهداشت و درمان عفونتها باشد. از طرفی، عوامل دیگر از جمله تجویز نادرست و فراوان آنتی بیوتیکها، در دسترس بودن و مصرف خودسرانه و همچنین عدم اتمام دوره درمان نیز می توانند در ظهور و گسترش مقاوتهای آنتی بیوتیکی در جوامع مختلف نقش بسیار مهمی ایفا نمایند. در ایران آنتی بیوتیکهای، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، اریترومایین و تتراسایکلین به طور گسترده ای جهت درمان عفونتها مورد استفاده قرار می گیرند، بنابراین مقاومت بالا نسبت به این دور از انتظار نبود. وجود هرگونه نقص در سیستم تصفیه فاضلاب شهری و بیمارستانی، یا سیستم انتقال فاضلاب از قبیل ترکیدگی و پوسیدگی لوله ها (با توجه به قدیمی بودن برخی زیرساختهای فاضلاب) منجر به راه یافتن فاضلاب و میکروارگانیسمهای بیماریزای همراه آن به آبهای زیرزمینی و سطحی می‌شود. بر اساس شواهد موجود، از یک طرف اعتقاد بر انتقال افقی انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین از محیط به انسان وجود دارد و از طرفی دیگر مشخص شده است که انواع گونه های انتروکوکی توانایی تکثیر و بقاء در آب و خاک را دارند که این مقاومت در محیط، مبارزه با آنها را بسیار مشکل ساخته است.

بنابراین، باید توجهات زیادی را به جلوگیری از انتقال و پخش این میکروارگانیسمها در طبیعت معطوف داشت. فاضلاب یک مخزن مناسب برای باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک، ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی و انتشار آنها است. انتقال ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی از طرق مختلف از جمله پلاسمیدها، اینتگرونها، باکتریوفاژها و ترانسپوزونها علاوه بر گسترش سویه های مقاوم می تواند سبب بروز مقاومتهای چندگانه در باکتریها شود. با توجه به افزایش روزافزون مقاومتهای آنتی بیوتیکی، نبود درمان قطعی و مشخص برای عفونتهای ناشی از باکتریهایی با مقاومتهای چندگانه، حضور باکتریهای مقاوم و ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در منابع محیطی و همچنین گسترش سویه های مقاوم در جوامع شهری، بنابراین بسیار ضروری است که عوامل بیماریزای مهم و شایع بیمارستانی به درستی شناسایی شوند و با تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، روشهای پیشگیری و درمان موثری جهت کنترل آنها به کار گرفته شوند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده عدم کارایی مناسب سیستمهای تصفیه فاضلاب در تصفیه خانه های فاضلاب شهر اصفهان جهت حذف کامل باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک است که در نهایت منجر به ورود این باکتریها به پساب خروجی خواهد شد. وجود انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین، که خود به عنوان مخازن بالقوه انتشار مقاومت نسبت به ونکومایسین شناخته می شوند، در فاضلاب تصفیه شده شهر اصفهان که در نهایت جهت آبیاری مزارع و صیفی جات مورد استفاده قرار می گیرند، می تواند امکان مواجه شدن افراد به شکلهای مختلف با این باکتریها را افزایش دهد و منجر به گسترش عفونتهای شدید در جامعه گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. 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.
2. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, et al. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. New England Journal of Medicine. 2011;365(10):892-900.
3. Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. Clinical Infectious Diseases. 2006;42(Supplement 1):S25-S34.
4. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. Microbial Drug Resistance. 2018;24(5):590-606.
5. 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):111-9.
6. Rahimi F, Talebi M, Saifi 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.
7. Rahimi F, Torabi M, Barahoei N. Isolation of vancomycin resistant enterococci from hospital sewage in Tehran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;23(83):47-53.
8. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(12):5857-60.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.
10. Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie MR. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(4):e15815.
11. 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.

12. Karimi F, Samarghandi MR, Shokoohi R, Godini K, Arabestani MR. Prevalence and removal efficiency of enterococcal species and vancomycin-resistant enterococci of a hospitalwastewater treatment plant. Avicenna Journal of Environmental Health Engineering. 2016;3(2):e8623.

13. Ameri S, Talebi M, Rahimi F, Pourshafie M, Ebrahimipour GH. The homogeneity of *van*B gene cluster among enterococcal isolates in Iran. Letters in Applied Microbiology. 2009;48(2):157-61.

14. Shaghaghi B, Nakhost lotfi M, Mahmmodi NS, Pourshafi MR. Different strains of enterococci in sewage treatment plants in Tehran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2007;12(37):61-6.

15. 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.

16. Sanderson H, Ortega-Polo R, McDermott K, Hall G, Zaheer R, Brown RS, et al. Quantification and multidrug resistance profiles of vancomycin-resistant enterococci isolated from two wastewater treatment plants in the same municipality. Microorganisms. 2019;7(12):626.

17. Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(6):3364-8.

18. 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 Journal of Microbiology. 2014;7(2):e8951.

19. 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.

20. Arbabi L, Vandyousefi J, Bouzari M, Rahimi F, Rastegar-Lari A. Antibiotic susceptibility pattern among vancomycin resistant enterococci isolated from meat and fecal samples in Tehran livestock husbandries Journal of Pure and Applied Microbiology. 2012;6(2):621-5.