

نقش فاضلاب‌های بیمارستانی در انتشار باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی به محیط زیست

رحیم عالی^۱، مهناز نیک آئین^{۲*}، مریم حاتم زاده^۲، ملیحه موذنی^۲، حسین خان احمد^۲، علی شهبازی^۳

^۱ گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز رشد فناوری سلامت، مجتمع آموزش عالی سلامت خوی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی مسبب مشکلات زیادی در بیمارستان‌ها است. نگرانی عمده در این زمینه، انتشار عوامل مقاوم به محیط زیست می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تنوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (ARB) و ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی (ARGs) در فاضلاب‌های بیمارستانی و میزان انتشار به محیط زیست بود. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مجموعاً ۳۳ نمونه فاضلاب خام از سه بیمارستان با رعایت زنجیره سرما برداشت شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش HPC سنجش شد. شش آنتی‌بیوتیک رایج در محیط‌های درمانی انتخاب شدند. شش ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش PCR بر روی ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و نمونه‌های فاضلاب جهت تعیین حضور/غیاب ژن‌های انتخاب شده، انجام شد. **یافته‌ها:** میانگین کلی ARB در فاضلاب خام $3/81 \times 10^7$ CFU/100mL بدست آمد. الگوی فراوانی ARB در فاضلاب‌های خام بیمارستانی به ترتیب شامل سفتانزیدیم (CAZ) > تتراسیکلین (TE) > سولفومتوکسازول (STX) > کلرامفنیکل (CHL) > اریترومايسين (ER) و جنتامایسین (GM) بود. فراوانی حضور ARGs در نمونه‌های فاضلاب بیشتر از نمونه‌های باکتری‌های ایزوله شده بود. بیشترین و کمترین ARGs شناسایی شده در نمونه‌های فاضلاب، *sul1* و *ctx-m-32* بود و الگوی کلی ژن‌های شناسایی شده بصورت *sul1*>*cmlA1*>*ermB*>*tetW*>*aac3-1*>*ctx-m-32* بدست آمد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد غلظت بالایی از ARB و ARGs در فاضلاب‌های بیمارستانی وجود دارند؛ بنابراین فاضلاب‌های بیمارستانی می‌توانند نقش مهمی را در انتشار باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم به محیط‌های طبیعی ایفاء نموده و می‌توانند از این طریق برای سلامت عمومی ایجاد خطر نمایند.

کلمات کلیدی: فاضلاب بیمارستانی، ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، PCR، محیط زیست

مقدمه

ایران در زمره پرمصرف‌ترین کشورها از نظر مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشد^۱. مصرف بالای آنتی‌بیوتیک در محیط‌های درمانی بویژه بیمارستان‌ها باعث تماس زیاد باکتری‌ها با گروه‌های آنتی‌بیوتیکی و ایجاد مقاومت باکتریایی می‌شود.^{۲ و ۳} مقاومت آنتی‌بیوتیکی موفقیت مداخلات بهداشتی را در همه سطوح مراقبت‌های بهداشتی تهدید می‌کند.^۴ به همین دلیل این مسئله باعث ایجاد پیامدهای مهم جهانی بر سلامت شده است.^۵ سازمان بهداشت جهانی ایجاد و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی را بعنوان یکی از سه خطر بزرگ تهدیدکننده سلامت عمومی مردم در قرن ۲۱ گزارش نموده است.^۶ ARB و ARGs از طرق مختلف وارد محیط زیست می‌شوند. فاضلاب‌های بیمارستانی دارای پتانسیل بالایی برای ورود این باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم به محیط زیست می‌باشند.^۶ انتشار ARB و ARGs به داخل محیط زیست باعث افزایش دغدغه در ارتباط با سلامت عمومی شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط زیست می‌تواند از باکتری‌های پاتوژن به باکتری‌های غیر پاتوژن منتقل شود. انتقال ژن‌های مقاوم از طریق پلاسمید، اینتگرون و ترانسپوزونها صورت می‌گیرد.^{۷-۱۰} مطالعات متعدد نشان داده که تعداد زیادی از ARGs و ARB بویژه گونه‌های بیمارستانی در مناطقی که فاضلاب‌های بیمارستانی تخلیه شده‌اند، یافت گردیده‌اند. Rodriguez-Mozaz و همکاران (۲۰۱۵) غلظت بالایی از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (*qnrS*, *tetW*, *ermB*, *SulI*) و (*blaTEM*) را در فاضلاب خروجی بیمارستان‌ها شناسایی نمودند.^{۱۱} Hadi و همکاران (۲۰۱۱) غلظت و تنوع بالایی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را در فاضلاب‌های بیمارستانی در کشور گزارش نمودند در این مطالعه نسبت به هفت گروه آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی مقاومت وجود داشت.^{۱۱} تعدادی از پژوهش‌ها گزارش نموده‌اند که باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم بیمارستانی در فاضلاب‌های شهری، لجن فعال و منابع آبی

یافت شده‌اند.^{۸ و ۹} البته برخی محققین از جمله Fuentefria و همکاران (۲۰۱۱) تشابه ژنتیکی بین گونه‌های مقاوم در بیمارستان و محیط را رد کرده‌اند.^{۱۲} همچنین مشخص شده است حذف باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم در تأسیسات تصفیه فاضلاب اتفاق نمی‌افتد و یا بندرت صورت می‌گیرد.^{۱۳} حتی بعضی از گزارشات نشان داده‌اند افزایش باکتری‌های مقاوم در تأسیسات تصفیه فاضلاب اتفاق می‌افتد.^{۱۴ و ۱۵} این نکته بسیار مهم است که بعضی از این منابع آبی آلوده برای آبرسانی عمومی استفاده می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده ARB و ARGs در محیط ماندگاری بالایی دارند و حتی در شبکه‌های توزیع آب شرب نیز ردیابی شده‌اند.^{۱۶-۱۸} این نگرانی جدی وجود دارد که این عوامل از طریق مصرف آب، افراد را درگیر نموده و خطر جدی برای سلامتی آن‌ها ایجاد کنند؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در بیمارستان و ژن‌های مقاوم به آن‌ها در فاضلاب خروجی چند بیمارستان بزرگ بود.

مواد و روش‌ها

مجموعاً ۲۴ نمونه فاضلاب خام از سه بیمارستان (بیمارستان بزرگ عمومی H1، بیمارستان قلب H2 و بیمارستان عمومی H3) در محدوده زمانی شهریور ۹۱ تا فروردین ماه ۹۲ برداشت شد. روش شمارش پلیت هتروتروفی HPC (Heterotrophic Plate Count) برای ارزیابی غلظت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نمونه‌ها استفاده شد. در این مطالعه شش آنتی‌بیوتیک رایج بر اساس الگوی مصرف در کشور و در استان اصفهان شامل جنتامایسین (GM)، کلرامفنیکل (CHL)، سفنازیدیم (CAZ)، تراسیکلین (TE)، سولفومتوکسازول (STX) و اریترومایسین (ER) مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت R2A آگار برای تعیین فراوانی ARB به تفکیک بر اساس

راهنمای Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) و تحقیقات فیلیدی انجام شد (جدول ۱).^{۱۹} نمونه‌های فاضلاب کاملاً همگن و رقت سریالی بر روی آن‌ها (تا 10^{-6}) انجام و از هر رقتی بر روی محیط R2A آگار حاوی آنتی‌بیوتیک موردنظر کشت داده شد. هم‌چنین برای مشخص کردن کل باکترهای هتروترف همزمان نمونه‌ها بر روی محیط کشت R2A بدون آنتی‌بیوتیک نیز کشت داده شد... پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای حداقل ۴۸ ساعت انکوبه شدند. همه آزمایشات بصورت دو بار تکرار انجام شد و میانگین بصورت

CFU/100mL گزارش شد. در این مطالعه هم‌چنین حضور یا عدم حضور ژن‌های مقاوم به شش آنتی‌بیوتیک موردنظر، بررسی شدند. برای هر آنتی‌بیوتیک، یک ژن کد کننده مقاومت، انتخاب و شش جفت پرایمر برای تکثیر ژن‌های انتخاب شده استفاده گردید (جدول ۲). وجود ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، هم در نمونه‌های فاضلاب خام و هم در ایزوله باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی گردید.

جدول ۱: غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در محیط کشت R2A آگار

منبع*	غلظت مورد استفاده بر حسب $\mu\text{g/mL}$	آنتی‌بیوتیک‌های انتخاب شده
۲۰-۲۲	۱۰	جنتامایسین
۹ و ۲۳	۱۶	تتراسیکلین
۲۴	۱۵	اریترومایسین
۱۶	۱۶	کلرامفنیکل
۱۲ و ۲۱ و ۲۴	۳۰	سفتازیدیم
۲۳ و ۲۵	۵۰/۴	سولفومتوکسازول

* از راهنمای CLSI و تحقیقات فیلیدی استفاده شده است.

جدول ۲: مشخصات ژن‌های مقاوم انتخابی

منبع	درجه حرارت ($^{\circ}\text{C}$) اتصال پرایمر (Annealing)	اندازه ژن تکثیر یافته bp	توالی (Sequences)	جفت پرایمر	ژن	دسته آنتی‌بیوتیکی (نوع) آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه)
۲۳، ۲۶ و ۲۷	۶۴	۱۶۸	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	<i>tet(W)-F</i> <i>tet(W)-R</i>	<i>tet W</i>	تتراسیکلین (تتراسیکلین)
۲۳ و ۲۸	۵۵/۹	۱۶۳	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG	<i>sul(I)-F</i> <i>sul(I)-R</i>	<i>sul1</i>	سولفونامیدها (سولفومتوکسازول)
۱۳ و ۲۹	۵۸	۲۳۹	TTCATCGCGCTTGCTGCTTYGA GCCACTGCGGGATCGTCRCCRTA	<i>Faac3-1</i> <i>Raac3-1</i>	<i>aac1</i>	آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)
۱۳ و ۳۰	۶۰	۱۹۳	AAAACCTACCCGCCATACCA TTTGCGGTGTTTCATTGCTT	<i>ermB-F</i> <i>ermB-R</i>	<i>ermB</i>	ماکرولیدها (اریترومایسین)
۱۳	۶۰/۴	۱۵۶	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA CGCTCATCAGCAGATAAAG	<i>ctx-m-32-F</i> <i>ctx-m-32-R</i>	<i>ctx-m-32</i>	بتالاکتامازها (سفتازیدیم)
۱۳	۶۱	۱۳۷	TAGTTGGCGGTACTCCCTTG GAATTGTGCTCGCTGTCGTA	<i>cml-F</i> <i>cml-R</i>	<i>cmlA1</i>	کلرامفنیکل (کلرامفنیکل)

10.5 میکرو لیتر از آب یونیزه انجام گرفت. همه آزمایشات PCR دارای کنترل منفی و مثبت بودند. انجام فرایند PCR با استفاده از مرحله دناتوراسیون اولیه برای 10 دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه (Denaturation)، درجه سانتی گراد متناسب (جدول ۲) برای ۳۰ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد برای 45 ثانیه (Extention) انجام گرفت. گسترش نهائی در ۷۲ سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱.۵ درصد) و بر روی UV ترانس ایلومیناتور آشکارسازی و بررسی شدند.

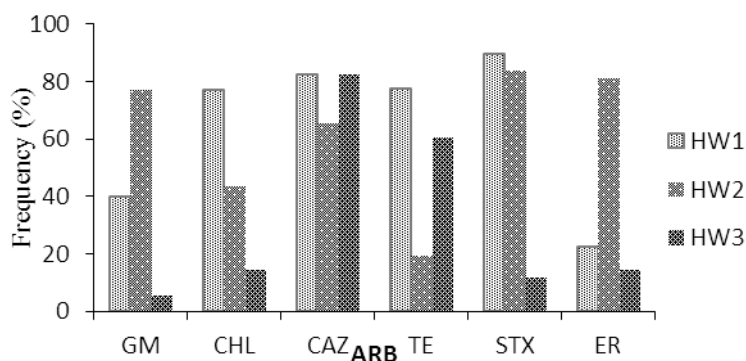
یافته‌ها

نتایج بررسی ARB و HPC به تفکیک در جدول ۳ آورده شده است.

جهت بررسی ژن مقاوم مرتبط با هر آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های غالب رشد کرده بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک موردنظر، بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی انتخاب و مجدداً بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیکی اولیه کشت داده شدند. کلنی‌های ایزوله شده سپس در ۱۰۰ میکرو لیتر آب دیونیزه معلق شده و اجزاء ژنتیکی با استفاده از روش یخزدگی-ذوب استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. استخراج و خالص‌سازی DNA از نمونه‌های فاضلاب خروجی با استفاده از روش یخزدگی-ذوب و کیت استخراج (Promega Wizard Genomic DNA purification kit, Madison, WI) برای شناسایی ژن‌های مقاوم در ایزوله‌های باکتریایی و نمونه‌های فاضلاب، آزمایش مولکولی PCR جهت تعیین حضور/غیاب ژن‌های مورد بررسی انجام شد. تکثیر PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر حاوی ۱۲.۵ میکرو لیتر Permixon، ۰.۵ میکرو لیتر از هر پرایمر و 1 میکرو لیتر از DNA الگو و

جدول ۳: میانگین غلظت باکتری‌های شمارش پلیت هتروتروپی (HPC) و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های (ARBs) مورد بررسی در فاضلاب‌های بیمارستانی

	ER (CFU/100mL)	STX (CFU/100mL)	TE (CFU/100mL)	CAZ (CFU/100mL)	CHL (CFU/100mL)	GM (CFU/100mL)	HPC (CFU/100mL)	
H1	$1.0^{\vee} \times 1/36$	$1.0^{\vee} \times 5/42$	$1.0^{\vee} \times 4/69$	$1.0^{\vee} \times 5/00$	$1.0^{\vee} \times 4/68$	$1.0^{\vee} \times 2/41$	$1.0^{\vee} \times 6/05$	
H2	$1.0^{\vee} \times 2/18$	$1.0^{\vee} \times 2/25$	$1.0^{\vee} \times 5/19$	$1.0^{\vee} \times 1/77$	$1.0^{\vee} \times 1/17$	$1.0^{\vee} \times 2/07$	$1.0^{\vee} \times 2/69$	
H3	$1.0^{\vee} \times 2/68$	$1.0^{\vee} \times 2/16$	$1.0^{\vee} \times 1/12$	$1.0^{\vee} \times 1/53$	$1.0^{\vee} \times 2/68$	$1.0^{\vee} \times 1/05$	$1.0^{\vee} \times 1/85$	
Total	$1.0^{\vee} \times 2/07$	$1.0^{\vee} \times 3/28$	$1.0^{\vee} \times 5/48$	$1.0^{\vee} \times 7/34$	$1.0^{\vee} \times 2/84$	$1.0^{\vee} \times 1/84$	$1.0^{\vee} \times 9/09$	



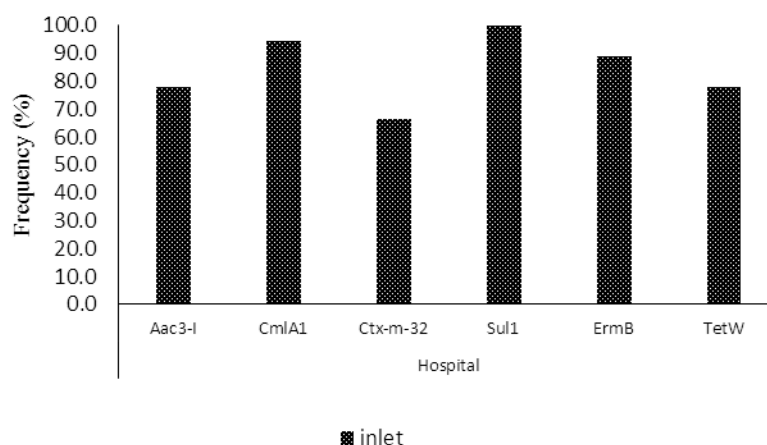
شکل ۱: درصد فراوانی گروه‌های ARB (بصورت درصد در مقایسه با HPC) در فاضلاب خام بیمارستانی. توضیح مخفف آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

فاضلاب خام برداشتی در شکل ۲ ارائه شده است. درصد کلی ژن‌های شناسایی شده در فاضلاب‌های بیمارستانی (۸۴/۲ درصد) بود. نتایج درصد ARGs در فاضلاب‌های خام بیمارستان‌ها نشان داد *sul1* (۱۰۰ درصد) بیشترین و *ctx-m-32* (۶۳ درصد) کمترین را در فاضلاب خام داشته‌اند. (شکل ۲)؛ اما در کلنی‌های ایزوله شده درصد شناسایی متفاوت و کم بود. نتایج مربوط به ژن‌ها در کلنی‌های ایزوله شده در جدول ۴ آورده شده است.

میانگین کلی ARB در فاضلاب خام CFU/100mL بود و بیشترین و کمترین مقدار ARB به ترتیب مربوط به CAZ و GM بود. الگوی ARB در فاضلاب‌های خام بیمارستانی از نظر تعداد باکتری‌های مقاوم به صورت مقابل بود: CAZ>TE>STX>CHL>ER>GM. درصد فراوانی گروه‌های ARB در مقایسه با HPC در شکل ۱ آورده شده است. درصد فراوانی کلیه ژن‌های مورد بررسی در نمونه‌های

جدول ۴: حضور / غیاب ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی (ARGs) در کلنی‌های ایزوله شده از فاضلاب‌های خام بیمارستانی

فاضلاب بیمارستانی			ژن مورد بررسی
H1	۲H	۳H	
+	+	-	<i>aac(3)-1</i>
+	+	-	<i>cmlA1</i>
+	-	+	<i>ctx-m-32</i>
+	+	+	<i>sul1</i>
-	-	-	<i>tetW</i>
-	-	-	<i>ermB</i>



شکل ۲: درصد کلی فراوانی ARGs در فاضلاب‌های خام بیمارستانی

بحث

نگرانی ناشی از انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مقوله جهانی است.^۸ این موضوع صرفاً به محیط‌های درمانی محدود نبوده و بخش‌های زیست محیطی را نیز درگیر نموده است. مطالعه ARB و ARGs در این تحقیق ثابت نمود باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم به شش گروه آنتی‌بیوتیکی در فاضلاب بیمارستانی وجود دارند. این یافته با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد.^{۸، ۳۳ و ۳۱} مقادیر ARG در مقایسه با میانگین بدست آمده در فاضلاب‌های بیمارستانی دیگر بالاتر است. Doung و همکاران 10^3-10^6 CFU/100mL را گزارش نمودند.^{۳۲} معمولاً ARG در فاضلاب‌های بیمارستانی از فاضلاب‌های شهری بالاتر است مقایسه نتایج بدست آمده با نتایج بررسی‌ها در فاضلاب‌های شهری از جمله Munir و همکاران (۲۰۱۱)، Rienthaler و همکاران (۲۰۰۳)، Auerbach و همکاران (۲۰۰۷) و Zhang و همکاران (۲۰۰۹a) این موضوع را تأیید می‌کند. میانگین ARG گزارش شده توسط محققین در فاضلاب خام برابر $10^{5.96}-10^{3.9}$ CFU/100mL بوده است.^{۳۳ و ۳۴} لذا فاضلاب‌های بیمارستانی نیازمند توجه جدی می‌باشند نتایج نشان داد تنوع و فراوانی ARGs در فاضلاب‌های بیمارستانی مورد بررسی بالاست (شکل ۲). مقادیر بالای ژن‌های مقاوم در فاضلاب خام بیمارستانی می‌تواند بدلیل بار جمعیتی میکروبی بالا و انتقال افقی (Horizontal Gene Transfer) و سهولت در انتقال بین جمعیت‌های باکتریایی باشد.^{۲۳ و ۳۵} مکانیسم انتقال افقی ARGs در بین باکتری‌های محیطی بسیار شایع بوده و از طریق اجزاء متحرک ژنتیکی مانند پلاسمید، ترانسپوزون‌ها و ایتنگرون‌ها صورت می‌پذیرد. مطالعات Martinez و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند ساختار اجزاء ژنتیکی مانند پلاسمید‌ها قبل از عصر انقلاب آنتی‌بیوتیکی و بعد از آن تغییر نداشته است و تنها اختلاف مشاهده شده کسب ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید و دیگر اجزاء ژنتیکی بعد از دوران شناسایی

آنتی‌بیوتیک بوده است. این موضوع ناشی از فشار زیاد آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی بر روی باکتری‌های پاتوژن و غیر پاتوژن می‌باشد.^{۳۶ و ۳۷} این موضوع با این واقعیت که میزان مصرف گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی در بیمارستان‌ها زیاد است مطابقت دارد. مصرف گروه‌های آنتی‌بیوتیکی در ایران بویژه در محیط‌های درمانی بسیار بالاست.^{۱ و ۳۸} لذا خطر ایجاد و انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی دور از انتظار نیست. مطالعات کلینیکی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشور، شیوع بسیار بالای این عوامل در محیط‌های بیمارستانی را نشان می‌دهد. به هر حال میزان تخلیه ARGs و ARB به محیط از طریق فاضلاب‌های بیمارستانی بسیار بالاست (رنج خروجی $10^7 \times 7-10^7$ CFU/100mL غیرقابل ردیابی). ورود بالای این عوامل از طریق فاضلاب باعث فشار زیاد بر میکروارگانیسم‌ها در منابع آب و اکوسیستم‌های طبیعی می‌شود. تحقیقات دانشمندان نشان داده که ARGs و ARB از طریق منابع آبی وارد تصفیه‌خانه‌های آب می‌شوند و بدلیل عدم کارایی لازم تصفیه‌خانه‌های آب، این عوامل وارد شبکه توزیع آب شرب شهری می‌شوند. حتی گزارش‌ها نشان می‌دهد این عوامل به‌وفور در آب شرب وجود دارند.^{۱۸} در کل نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعاتی که فاضلاب‌های بیمارستانی را منبعی غنی از ARGs و ARB می‌دانند، همخوانی دارد.^{۱۱ و ۳۳} این محققین، بالا بودن ARGs را ناشی از بالا بودن غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب بیمارستانی و در نتیجه افزایش شانس تماس باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها و گونه‌های مقاوم می‌دانند. برخی مطالعات استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های بیمارستانی را مزیت انتخابی برای ARGs می‌دانند. Schwarz و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی بیوفیلم فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی، رودخانه و شبکه توزیع شهری نشان دادند ARGs در فاضلاب شهری و ARGs در فاضلاب‌های بیمارستانی بالاتر می‌باشد. نتایج ARGs و ARB نشان داد میزان مقاومت و تنوع

موضوع کمک کند.

نتیجه گیری

این مطالعه ثابت نمود فاضلاب‌های بیمارستانی در کشور دارای غلظت بالایی از باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. با توجه به اینکه تمهیدات خاصی برای مدیریت و یا تصفیه فاضلاب‌های بیمارستانی در کشور صورت نمی‌گیرد لذا خطر انتشار این عوامل آلاینده به منابع محیطی وجود دارد. طی سالهای گذشته استانداردسازی و سازماندهی اطلاعات مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها در مناطقی در دنیا پیگیری و انجام شده است ولی متأسفانه این موضوع در بیمارستان‌ها در کشور ما انجام نشده است. متأسفانه بررسی‌های زیست محیطی هم وضعیت مناسبی ندارند لذا به نظر می‌رسد مطالعات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مکان‌های کلینیکی و همچنین محیط زیست کشور نیاز به سیاست‌گذاری هماهنگ و بالادستی دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹۱۰۸۳ با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. لذا از معاونت پژوهشی دانشگاه، معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت و کلیه کسانی که ما را در این تحقیق یاری نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌کنیم.

ژنتیکی ژن‌های شناسایی شده بسیار متفاوت است. این موضوع می‌تواند ناشی از میزان پتانسیل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب - که خود تحت تأثیر حلالیت، جذب و تجزیه پذیری قرار دارد.^{۳۹} میزان سازگاری گروه‌های مختلف میکروبی، مواجهه و میزان مقاومت گروه‌های میکروبی متفاوت باشد. حتی این موضوع در بین یک گروه از میکروب‌ها نیز می‌تواند صادق باشد.^{۴۰} بصورت کلی رخداد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فاضلاب خام الزاماً برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و گروه‌های میکروبی متفاوت یکسان نیست.

مقایسه نتایج ARGs در کلنی‌های ایزوله شده (جدول ۴) و نمونه‌های فاضلاب (شکل ۲) نشان می‌دهد درصد ARGs شناسایی شده در نمونه‌های ایزوله شده بسیار پائین تر می‌باشد. دلیل این موضوع می‌تواند وجود ژن‌های کد کننده مقاومت متفاوت از ژن‌های مورد بررسی باشد. هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی دارای ده‌ها ژن کد کننده مقاومت می‌باشند. وجود ژن‌های کد کننده متفاوت و متنوع در فاضلاب‌های مورد بررسی دور از انتظار نیست چرا که فشار آنتی‌بیوتیکی و شرایط مناسب برای انتقال ژن‌های کد کننده مقاومت در منابع فاضلاب در ایجاد تنوع ژن‌های کد کننده دخیل است.^{۳۵} و^{۴۱} نتایج فراوانی باکتری‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک‌های مورد بررسی احتمال وجود باکتری‌های مقاوم دارای مقاومت چندگانه را در فاضلاب‌های بیمارستانی نشان می‌دهد. مقاومت چندگانه که از مزیت‌های انتخابی برای باکترها می‌باشد کنترل و روش‌های کنترلی را با مشکل مواجه می‌کند لذا بررسی‌های بیشتر در این زمینه می‌تواند در روشن تر شدن

منابع

1. Abdollahiasl A, Kebriaeezadeh A, Nikfar S, et al. Patterns of antibiotic consumption in Iran during 2000–2009. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):489-90.
2. Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res* 2015;69(0):234-42.
3. Rustam I, Aminov RIM. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol* 2007; 271 147-61.
4. Grundmann H, Klugman KP, Walsh T, et al. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resist Updates* 2011;14(2):79-87.

5. Abbassi-Ghozzi I, Jaouani A, Hammami S, et al. Molecular analysis and antimicrobial resistance of Salmonella isolates recovered from raw meat marketed in the area of "Grand Tunis", Tunisia. *Pathol Biol* 2012;60(5):e49-e54.
6. Aali R, Nikaeen M, Khanahmad H, et al. Occurrence of tetracycline resistant bacteria and resistance gene(tetW) in hospital and municipal wastewaters. *Fresenius Environ Bullet* 2014;23(10a):2560-6.
7. Kümmerer K, Alexy R, Hüttig J, Schöll A. Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Res* 2004;38(8):2111-6.
8. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulou E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol Environ Safety* 2013;91(0):1-9.
9. Huang J-J, Hu H-Y, Lu S-Q, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ Int* 2012;42:31-6.
10. Hoa PTP, Managaki S, Nakada N, et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci Total Environ* 2011;409(15):2894-901.
11. Hadi M, ebrahimzadeh namvar A.M, Karimi M, et al. antibiotic Resistance of Isolated Bacteria from Urban and Hospital Wastewaters in Hamedan city. *Iran J Health& environ* 2011;4(1):105-14.
12. Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? *J Environ Manage* 2011;92(1):250-5.
13. Rafael Szczepanowski BL, Irene K, Karl-Heinz G, et al. Detection of 140 clinically relevant antibioticresistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiol* 2009;155:2306-19.
14. Bahl MI, Hansen LH, Goesmann A, et al. The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established [alpha], [beta] and [delta] sub-groups. *Plasmid* 2007;58(1):31-43.
15. Laroche E PB, Berthe T, Skurnik D, et al. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 2009;68(1):118-30.
16. Xi C, Zhang Y, Marrs CF, et al. Prevalence of Antibiotic Resistance in Drinking Water Treatment and Distribution Systems. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(17):5714-8.
17. Armstrong JL, Calomiris J, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl Environ microbiol* 1982;44(2):308-16.
18. Ramteke P, Gaur A, Pathak S, Bhattacharjee J. Antibiotic resistance of coliforms in drinking water in rural areas. *The Indian journal of medical research* 1990;91:185-8.
19. Standards NCFCL. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard: National Committee Clinical Lab Standards; 2006.
20. Heuer H. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;42:289-302.
21. Figueira V, Vaz-Moreira I, Silva M, et al. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res* 2011;45(17):5599-611.
22. Zhang Y, Marrs CF, Simon C, Xi C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci Total Environ* 2009;407(12):3702-6.
23. Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res* 2011;45(2):681-93.
24. Garcia-Armisen T, Vercammen K, Passerat J, et al. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. *Water Res* 2011;45(2):788-96.
25. Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci Total Environ* 2012;421-422(0):173-83.
26. Aminov RI, Garrigues N, Teferedegne B, et al. Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2002 68(4):1786-93.
27. Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, et al. Detection of tetracycline resistance genes by PCR methods. *Methods mol biol-clifton then totowa* 2004;268:3-14.
28. Pei R, Kim S-C, Carlson KH, et al. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 2006;40(12):2427-35.
29. Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington EMH, et al. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;42(2):289-302.
30. Knapp CW, Zhang W, Sturm BSM, et al. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. *Environ Pollut* 2010;158(5):1506-12.

31. Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J Environ Manag* 2009;90(8):2354-66.
32. Duong HA, Pham NH, Nguyen HT, et al. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemo* 2008;72(6):968-73.
33. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res* 2003;37(8):1685-90.
34. Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res* 2007;41(5):1143-51.
35. Aminov R, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environl microbiol* 2001;67(1):22-36. Martinez JL. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Sci* 2008;321(5887):365-7.
37. Chadha T. Antibiotic Resistant Genes in Natural Environment. *Agrotechnol* 2012.
38. N Noorbakhsh Sabet AJ, D Mehrabani, S Japoni. Multi-Drug Resistance Bacteria in Qom Hospitals, Central Iran. *Iranian Red Crescent Med J (IRCMJ)* 2010;12(4):501-3.
39. Novo A, Manaia CM. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotech* 2010;87(3):1157-66.
40. Vilanova X, Manero A, Cerdà-Cuellar M, et al. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. *J Appl Microbiol* 2002;92(2):210-4.
41. Koike S KI, Oliver HD, Yannarell AC, et al. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(15):4813-23.

The role of Hospital Wastewaters in Dissemination of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes to the Environment

Rahim Aali¹, Mahnaz Nikaen^{2*}, Maryam Hatamzadeh³, Malihe Moazeni⁴,
Hossain Khanahmad⁵, Ali Shahryari⁶

1. Department of Environmental Health Engineering, Health Technology Incubator Center, Khoy Nursing and Health Faculty, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

2. Department of Environmental Health Engineering, School of Health Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3. Senior Demonstrator, Department of Environmental Health Engineering, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4. Department of Environmental Health Engineering, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5. Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

6. Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

* E-mail: nikaen@hlth.mui.ac.ir

Received: 13 Jan 2016 ; Accepted: 18 May 2016

ABSTRACT

Background: Antibiotic resistance Genes causes many problems in hospitals. Dissemination of these agents to the environment is a great concern worldwide. The aim of this study was to investigate the concentration of antibiotic resistant bacteria (ARB) and presence of antibiotic resistance genes(ARGs) in hospital wastewaters.

Methods: in present work, 33 sample from raw hospital wastewater were taken from three hospitals. Heterotrophic plate counts (HPC) method was used to assess the concentration of ARB in hospital wastewater samples. Six conventional antibiotics were selected. Presence of six resistance genes regarding to the selected antibiotics were surveyed in wastewater samples and isolated ARB by PCR method.

Results: Average concentration of ARB in raw hospital wastewater was 3.81×10^7 CFU/100mL. Frequency pattern of ARB in raw hospital wastewater was as follows: ceftazidim(CAZ)> tetracycline(TE)> sulfomethoxazol (STX)> chloramphenicol (CHL)> erythromycin (ER)> and gentamicin(GM), respectively. ARGs in raw wastewater samples were detected more than isolated bacteria. ARGs frequency pattern in wastewater samples were as follows: sul1>cmlA1>ermB>tetW>aac3-1>ctx-m-32.

Conclusion: The results of this study revealed that there are high concentration of ARB and ARGs in hospital wastewaters. Therefore, hospital wastewaters could play an important role in dissemination of ARB and ARGs into the natural environment and therefore, may pose serious public health risks.

Keywords: Hospital wastewaters, ARGs, PCR, Environment