مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۵، شماره ۴، زمستان ۹۴، صفحات ۲۸۳ تا ۲۸۸

Original Article

بررسی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در فاضلاب‌های بیمارستانی

مریم قانع

استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر

چکیده

سابقه و هدف: *آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، بزرگ‌ترین گروه از آنتی بیوتیک‌هایی هستند که در بیمارستان‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی به‌کار می‌روند. انتروباکتریاسه‌ها به عنوان میکروفلور دستگاه گوارش انسان، بخش بزرگی از باکتری‌های پساب‌های بیمارستانی را تشکیل داده و می‌توانند به عنوان منبعی برای ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف(Extended-Spectrum Beta Lactamases) (ESBLs) باشند. این ژن‌ها می‌توانند به سایر باکتری‌های موجود در فاضلاب‌ها و محیط انتقال یابند.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. سویه‌های جدا شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مطابق با روش برگی (Bergey) شناسایی شدند. آزمایش تایید فنوتیپ برای تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با استفاده از روش استاندارد دیسک‌های دوگانه انجام شد. سویه‌هایی که از لحاظ فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع‌الطیف مثبت بودند، از لحاظ حضور ژن bla_{CTX-M} با روش PCR (Polymerase Chain Reaction) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شدند.*

یافته‌ها: *در کل، ۱۰۸ سویه از فاضلاب‌های بیمارستانی جدا شدند. ۵۲ سویه (۴۸٪) به لحاظ فنوتیپی توانایی تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را داشتند و ۳۲ سویه (۲۹/۶۳٪) از لحاظ ژن bla_{CTX-M} مثبت بودند. در بین سویه‌های شناسایی شده، E. coli و Citrobacter از لحاظ تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بیشترین فراوانی را داشتند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان می‌دهند که ژن‌های bla_{CTX-M} در فاضلاب‌های بیمارستانی وجود دارند و تهدیدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شوند.*

واژگان کلیدی: *بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، فاضلاب بیمارستانی، ژن bla_{CTX-M}.*

مقدمه

انتروباکتریاسه‌ها باکتری‌های گرم منفی میله‌ای هستند که به میزان زیادی در طبیعت انتشار دارند. این میکروارگانیسم‌ها، مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب بوده و مسبب عفونت‌های ادراری، سپتی‌سمی و پنومونی هستند (۱). بتالاکتام‌ها، به ویژه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، کاربا‌پنم‌ها و فلوروکینولون‌ها از اهداف درمانی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروباکتریاسه‌ها هستند. در سال‌های اخیر افزایش مقاومت انتروباکتریاسه‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده است (۲).

بتالاکتامازهای تولید شده توسط گرم منفی‌ها مسئول ایجاد مقاومت این پاتوژن‌ها تحت فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. مقاومت اکتسابی به بتالاکتام‌ها توسط بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) انتقال می‌یابد که باعث ایجاد مقاومت به همه بتالاکتام‌ها شامل کاربا‌پنم‌ها و سفامایسین می‌شود. ژن‌های رمزکننده این مقاومت می‌توانند به طور افقی بین باکتری‌های مختلف منتقل شوند (Horizontal Gene Transfer). انواع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در انتروباکتریاسه‌ها شناسایی شده‌اند. بتالاکتامازهای CTX-M یکی از متداول‌ترین بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف هستند (۳،۲). این بتالاکتامازها نقش اصلی را در ظهور شاخصه‌های عفونت در انتروباکتریاسه‌ها دارند. این بتالاکتامازها اخیرا شناسایی

آدرس نویسنده مسئول: اسلامشهر، میدان نماز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، دکتر مریم قانع
(**email**: ghane@iiau.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۲/۱۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۶/۲

شده‌اند و در دهه اخیر در باکتری‌های موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی نیز مشاهده شده‌اند (۵،۴). ژن‌های بتالاکتاماز اغلب بر روی پلاسمید قرار دارند تا کروموزوم، و اغلب همراه با عناصر ژنتیکی متحرکی مانند ترانسپوزون‌ها و یا اینتگرون‌ها هستند و ژن‌های رمز کننده مقاومت به سایر عوامل ضدمیکروبی را نیز حمل می‌کنند (۷،۶). این امر سبب انتشار سریع آن‌ها شده و بدین ترتیب انتشار بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف یک مشکل جهانی محسوب می‌شود.

آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به همراه مدفوع وارد فاضلاب‌های بیمارستانی می‌شوند (۹،۸). انتروباکتریاسه‌ها میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش و بخش عظیمی از جمعیت باکتری‌های تشکیل دهنده پساب‌های بیمارستانی هستند و می‌توانند منبعی برای ژن‌های رمزکننده بتالاکتاماز و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف باشند. این ژن‌ها ممکن است به سایر باکتری‌های موجود در پساب‌ها و محیط منتقل شوند.

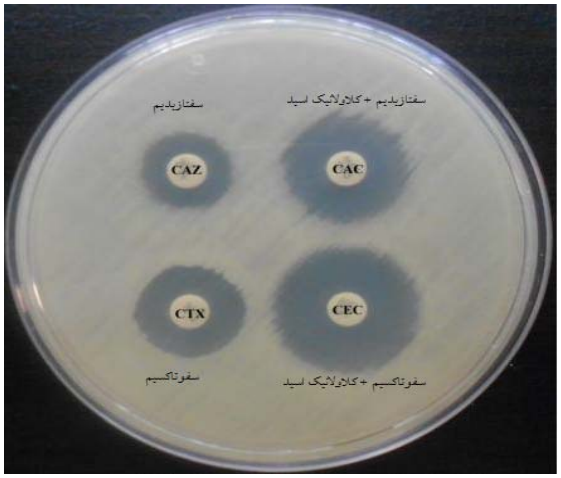
ظهور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در باسیل‌های گرم منفی یک چالش درمانی مهم است، چرا که دارای محدوده وسیعی از آنزیم‌های هیدرولیز کننده هستند و قادر به هیدرولیز انواع بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف می‌باشند. از آنجا که اغلب این آنزیم‌ها باعث کاهش حساسیت به بتالاکتام‌ها می‌شوند و نیز ژن‌هایی که آنزیم‌های بتالاکتاماز را رمز می‌کنند متحرک بوده و ممکن است باعث انتشار آن‌ها شود؛ بنابراین لازم است توجه بیشتری نسبت به آن‌ها مبذول داشت. اغلب مطالعات در خصوص ژن‌های رمزکننده ESBLs در انتروباکتریاسه‌ها، بر روی نمونه‌های بالینی متمرکز هستند (۴، ۱۲-۱۰) و مطالعات کمتری بر روی نمونه‌های محیطی صورت گرفته است. در ایران نیز تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بررسی انتروباکتریاسه‌های دارای ژن‌های رمزکننده ESBLs در پساب‌های بیمارستانی انجام نشده است. نظر به اهمیت فاضلاب‌های بیمارستانی در انتشار ژن‌های مقاومت، به‌ویژه ژن‌های ESBLs، هدف از این مطالعه بررسی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در فاضلاب‌های بیمارستانی شهرستان اسلامشهر بود.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، از فاضلاب دو بیمارستان شهرستان اسلامشهر (بیمارستان امام زمان و بیمارستان امام رضا) در ۱۰ نوبت نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری در اواخر بهمن ۱۳۹۲ در طی ۱۰ روز متوالی و در هر روز از هر بیمارستان یک نمونه تهیه شد. نمونه‌ها در بطری‌های استریل ۱۰۰ ml جمع‌آوری شدند و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل و در کمتر از ۲ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. ۱ mL از هر نمونه فاضلاب به ۹ mL محلول سالین (۸/۵٪ NaCl) اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. به منظور کاهش تعداد باکتری‌ها، از نمونه‌ها رقت‌های سریال در محلول سالین تهیه شد. ۱۰۰µl از هر رقت در پلیت‌های حاوی محیط کشت Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (Merk, Germany) پخش شد و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. ۱۲۸ کلنی که از لحاظ ظاهری با هم تفاوت داشتند، انتخاب شده و از لحاظ فقدان تولید سیتوکروم اکسیداز با استفاده از محلول ۱٪ تترا متیل پارا فنیل دی‌آمین مورد آزمایش قرار گرفتند. ۱۰۸ کلنی اکسیداز منفی برای شناسایی انتخاب شدند. از کلنی‌های منتخب کشت خالص تهیه شد و در محیط کشت Luria Bertani (LB) (Merk, Germany) با ۱۵٪ گلیسرول، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و با روش برگی (Bergey) انجام شد (۱۳).

غربالگری ابتدایی برای تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با استفاده از سنجش حساسیت سویه‌های جدا شده به دو سفالوسپورین وسیع‌الطیف شامل سفوتاکسیم (۳۰ µg/ml) و سفتازیدیم (۳۰ µg/ml) (Mast Diagnostics Ltd, UK) و مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام شد (۱۴). برای انجام آزمایش از هر یک از باکتری‌ها در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون تهیه شد و پس از مقایسه کدورت آن‌ها با نیم مک فارلند، با استفاده از سواب استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار(Merk, Germany) به صورت متراکم کشت داده شدند (۱۵). در نهایت، پس از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردیدند. مطابق دستورالعمل CLSI سویه‌هایی که هاله عدم رشد ۲۲ mm≤ برای سفتازیدیم یا ۲۷ mm≤ برای سفوتاکسیم را داشته باشند، احتمالا سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشند. آزمایش تاییدی جهت تایید فنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با روش آزمایش هم‌افزایی دیسک‌های دوگانه (Duble Disk Synergy Test) با استفاده از دو جفت دیسک سفوتاکسیم (۳۰ µg/ml) و

سفوتاکسیم/ کلاوولانیک اسید (۳۰/۱۰µg/ml) و نیز سفتازیدیم (۳۰ µg/ml) و سفتازیدیم/ کلاوولانیک اسید (۳۰/۱۰µg/ml) (Mast Diagnostics Ltd, UK) و مطابق با استانداردهای CLSI انجام شد (۱۴). این دیسک‌ها نیز بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merk, Germany) که با هر یک از سویه‌ها تلقیح شده بودند، قرار داده شد و پس از گرماگذاری مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردید. اختلاف ≥ 5mm بین قطر هاله عدم رشد اطراف سفوتاکسیم و سفوتاکسیم/ کلاوولانیک اسید و نیز سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوولانیک اسید به عنوان فنوتیپ مثبت در نظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱- تعیین فنوتیپ تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با استفاده از دیسک‌های دوگانه

هر یک از سویه‌هایی که از لحاظ تولید ESBL مثبت بودند، از لحاظ وجود ژن *bla* CTX-M مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار از پرایمرهای F و R به شرح زیر استفاده شد (۱۶).

R:CGATATCGTTGGTGGTGCCATA)،

F:TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA)

DNA پلاسمیدی برای تعیین ژن *bla* CTX-M استفاده شد. برای تهیه DNA پلاسمیدی، یک کلنی منفرد از هر یک از سویه‌های جدا شده در ml ۵ محیط کشت LB در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه کشت داده شد (۱۷)، سپس استخراج پلاسمید بر اساس دستور کار شرکت سازندهٔ کیت (Fermentas, Lithuania) صورت گرفت. واکنش PCR مطابق با روش‌های استاندارد و برنامه زمانی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (۱ سیکل) ، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه (۳۵ سیکل) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۱ سیکل) انجام شد (۱۷). سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ (Merk, Germany) الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Sigma- Aldrich) با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

یافته‌ها

در کل، ۱۲۸ سویه از فاضلاب بیمارستان‌های شهرستان اسلامشهر جدا شدند. تمام سویه‌ها از لحاظ آزمایش اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۰۸ سویه اکسیداز منفی و ۲۰ سویه اکسیداز مثبت بودند. سویه‌های اکسیداز منفی برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. شناسایی سویه‌های فوق مطابق با روش برگی (Bergey) صورت گرفت. سویه‌های جدا شده مربوط به خانواده انتروباکتریاسه و متعلق به ۴ جنس *E. coli*، *Klebsiella* spp.، *Citrobacter* spp. و *Enterobacter* spp. بودند. بیشترین فراوانی مربوط به *E. coli* (۴۸٪) و پس از آن *Klebsiella* spp. (۳۳/۳٪) بود (جدول ۱).

جدول ۱- شیوع فنوتیپ و ژنوتیپ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در انتروباکتریاسه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی

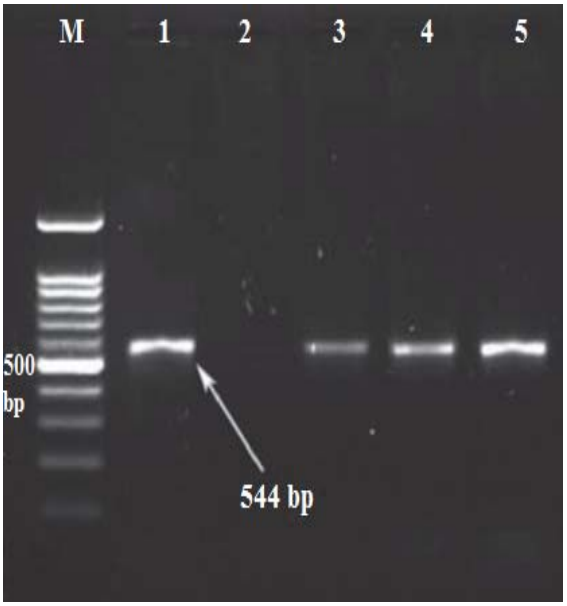
سویه‌های جدا شده	ایزوله‌ها	دارای فنوتیپ ESBL	دارای ژن *bla* CTX-M
E. coli	۵۲(۴۸)*	۲۸ (۵۳/۸)	۱۵ (۲۸/۸)
Klebsiella spp.	۳۶ (۳۳/۳)	۱۵ (۴۱/۶)	۱۲ (۳۳/۳)
Enterobacter spp.	۸ (۷/۴)	۳ (۳۷/۵)	۲ (۲۵)
Citrobacter spp.	۱۲ (۱۱)	۶ (۵۰)	۳ (۲۵)
تعداد کل سویه‌ها	۱۰۸(۱۰۰)	۵۲ (۴۸)	۳۲ (۲۹/۶)

* تعداد (درصد)

مطالعه سنجش حساسیت انتروباکتریاسه‌های جدا شده به دو آنتی بیوتیک بتالاکتام وسیع‌الطیف سفوتاکسیم و سفتازیدیم نشان داد که ۹۸ سویه (۹۰/۷٪) به سفوتاکسیم و ۸۲ سویه (۷۵/۹٪) به سفتازیدیم مقاوم بودند. آزمایش تایید فنوتیپ ESBL با روش آزمایش هم‌افزایی دیسک‌های دوگانه نشان داد که در کل ۵۲ سویه (۴۸٪) دارای فنوتیپ تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند (جدول ۱).

آزمایش PCR برای هر یک از ۵۲ سویه که از لحاظ فنوتیپ ESBL مثبت بودند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن *bla* CTX-M صورت گرفت. الکتروفورز محصول PCR بر

روی ژل آگارز ۱٪، یک قطعه تقریبا ۵۴۴bp که نشان دهنده حضور ژن *bla* CTX-M است را در ۲۹/۶٪ سویه‌های جدا شده اثبات نمود (شکل ۲).



شکل۲- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪. ستون ۱، ۳ ، ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *bla* CTX-M برای *E. coli*، *Klebsiella* spp. ، *Citrobacter* spp. و *Enterobacter* spp. ، ستون ۲ کنترل منفی، M مارکر DNA

بحث

در سال‌های اخیر افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به دلیل تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به واسطه پلاسمید گزارش شده است. این نوع مقاومت در تمام انتروباکتریاسه‌ها در سرتاسر جهان وجود دارد. انتروباکتریاسه‌های موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی نقش مهمی را در انتشار این ژن‌های مقاومت بر عهده دارند.

در تحقیقات انجام شده توسط Yang و همکارانش، که بر روی ۴۳۵ سویه جدا شده از فاضلاب بیمارستانی انجام شد، *E. coli* (۳۲/۹٪، ۱۴۳ مورد)، *Enterobacter* spp. (۱۹/۸٪، ۸۶ مورد)، *Klebsiella* spp. (۱۱/۳٪، ۴۹ مورد) و *Citrobacter* spp. (۱۰/۳٪، ۴۵ مورد) سویه‌های غالب بودند (۱۸). در مطالعات انجام شده توسط Wang و همکارانش نیز انتروباکتریاسه‌های غالب که دارای ژن‌های بتالاکتاماز بودند شامل *E. coli* (۳۱/۳٪، ۱۰/۳۲)، *Klebsiella* spp. (۴۰/۶٪، ۱۳/۳۲) و *Citrobacter* spp. (۱۵/۶٪، ۵/۳۲) بودند (۱۹).

در این مطالعه، از مجموع ۱۰۸ سویه انتروباکتریاسه که از فاضلاب‌های بیمارستانی جدا شده بود، ۹۸ سویه (۹۰/۷٪) به سفوتاکسیم و ۸۲ سویه (۷۵/۹٪) به سفتازیدیم مقاوم بودند. گزارش‌ها نشان داده است که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از نوع CTX-M قادر به هیدرولیز سفوتاکسیم و به میزان کمتری سفتازیدیم هستند (۲۰)؛ بنابراین این فرضیه مطرح شد که احتمالا تعداد زیادی از سویه‌های جدا شده توانایی تولید بتالاکتامازهای CTX-M را دارند. نتایج حاصل از بررسی‌های فنوتیپی فرضیه فوق را تایید کرد، به طوری که نتایج نشان داد که ۵۲٪ سویه‌های جدا شده از لحاظ فنوتیپ تولید ESBL مثبت بودند و *E. coli* درصد بالایی از فنوتیپ تولید بتالاکتاماز را به خود اختصاص داده بود، به علاوه تولید ESBL در هر ۴ جنس جدا شده مشاهده شد. در مطالعه Chagas و همکارانش نیز که بر روی ۲۲۱ باکتری گرم منفی موجود در فاضلاب بیمارستانی صورت گرفت، ۴۰٪ سویه‌های جدا شده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را تولید می‌کردند و سویه‌های غالب شامل *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter cloaceae* و *E. coli* بودند (۲۱).

در تحقیق حاضر حضور ژن *bla* CTX-M در ۵۲ سویه که فنوتیپ تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در آن‌ها تایید شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. از میان آن‌ها، ۳۲ سویه (۶۱/۵٪)، حاوی ژن *bla* CTX-M بودند. این یافته با نتایج به دست آمده توسط Chagas و همکارانش مطابقت دارد (۲۱). آنان حضور ژن *bla* CTX-M را در ۶۷٪ سویه‌های با فنوتیپ تولید ESBL اثبات کردند. در مطالعه حاضر ۳۸/۵٪ سویه‌ها فاقد ژن *bla* CTX-M بودند؛ این سویه‌ها احتمالا سایر آنزیم‌های بتالاکتاماز را حمل می‌کردند.

در این پژوهش، حضور ژن *bla* CTX-M در هر ۴ جنس تایید شد. گزارشات زیادی در خصوص حضور ژن *bla* CTX-M در نمونه‌های بالینی در هر یک از جنس‌های فوق وجود دارد و ژن *bla* CTX-M به عنوان ژن غالب ESBL در سویه‌های بالینی مطرح شده است (۲۲، ۲۴،۲۳). فیض آبادی و همکارانش ژن *bla* CTX-M را در سویه‌های بالینی *Klebsiella pneumoniae* از بیمارستان لبافی نژاد جدا کردند (۲۵). مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که شیوع ژن *bla* CTX-M روبه افزایش است (۲۶) و به‌ندرت در نمونه‌های محیطی وجود دارد. Reinthaler و همکارانش اخیرا این ژن را به عنوان ژن غالب در باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نمونه‌های لجن فاضلاب در استرالیا گزارش کردند (۲۷). به علاوه، Lu و همکاران این ژن را از باکتری‌های تولیدکننده

بتالاکتاماز موجود در رسوبات رودخانه در چین جدا نمودند (۲۸). نتایج حاصل از این تحقیق نیز حضور ژن bla_{CTX-M} را در ۲۹٪ انتروباکتریاسه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی اثبات نمود. از آنجا که ژن‌های رمزکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف CTX-M اغلب بر روی پلاسمید قرار دارند و امکان انتقال آن‌ها به سایر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد؛ لذا حضور این ژن‌ها در نمونه‌های محیطی و به خصوص فاضلاب‌ها می‌تواند تهدیدی جدی برای بهداشت و سلامت عمومی باشد. محیط‌های مغذی و غنی مانند فاضلاب‌ها می‌توانند شرایط بهینه‌ای را برای انتقال افقی این ژن‌ها فراهم کرده و باعث انتقال پلاسمید و ترانسپوزون‌های رمزکننده مقاومت آنتی بیوتیکی شوند (۳۰،۲۹).

نتایج حاصل از این تحقیق، باکتری‌های رمزکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و ژن‌های آن‌ها به ویژه bla_{CTX-M} را در فاضلاب‌های بیمارستانی اثبات می‌کند. این باکتری‌ها و ژن‌های رمزکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌توانند به سرعت به محیط انتشار یافته و تهدیدی جدی برای سلامت عمومی محسوب شوند لذا لازم است اقدامات عاجل را در تصفیه هر چه دقیق‌تر فاضلاب‌های بیمارستانی مبذول داشت.

تشکروقدردانی

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. Qin X, Zerr DM, Weissman SJ, Englund JA, Denno DM, Klein EJ, et al. Prevalence and mechanisms of broad-spectrum beta-lactam resistance in Enterobacteriaceae: a children's hospital experience. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3909-14.
2. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro surveill 2008; 13: 1-11.
3. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob.Chemother 2007; 59: 165-74.
4. Dzier_zanowska D, Kami_nska W, Semczuk K, Borowiec D, Matysiak M, Szuma1a-Kakol A, et al. Carriage of genes for various extended-spectrum b-lactamases: a novel resistance strategy of *Klebsiella pneumoniae* in Poland. Int J Antimicrob Agents 2010; 35: 392-95.
5. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, et al. The Beta-PL Study Group. Molecular survey of b-lactamases conferring resistance to newer b-lactams in Enterobacteriaceae isolates from polish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2449-54.
6. Bradford PA. Extended-spectrum b-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
7. Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gützkow T, Eichler W, et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiol SGM 2009; 155: 2306-19.
8. Huang JJ, Hu HY, Lu SQ, Li Y, Tang F, Lu Y, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. Environ Int 2012; 42: 31-36.
9. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum b-lactamase-producing Klebsiella pneumonia in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. Lett Appl Microbiol 2008; 46: 136-41.
10. Mansouri S, Abbasi S. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in South east Iran. Iran J Med Sci 2010; 35: 101-108.
11. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, et al. The Beta-PL Study Group, Molecular survey of b-lactamases conferring resistance to newer b-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2449-54.
12. Lim KT, Yasin R, Yeo CC, Puthucheary S, Thong KL. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing Escherichia coli isolates from hospitals in Malaysia. J Biomed Biotechnol 2009; 1-10.
13. Holt GJ, Krieg RN, Sneath AHP, Staley T, Williams TS, Eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th Ed. London: Williams and Willkins; 1993.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Information Supplement. M100-S17, USA; 2007.

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. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3724-32.

17. Sambrok J, Russell DW, Maniatis T, Editors. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

18. Yang CM, Lin MF, Liao PC, Yeh HW, Chang BV, Tang TK, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. Lett Appl Microbiol 2009; 48: 560-65.

19. Wang C, Dang H, Ding Y. Incidence of diverse integrons and b-lactamase genes in environmental Enterobacteriaceae isolates from Jiaozhou Bay, China. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24: 2889-96.

20. Korzeniewska E, Harnisz M. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. J Environ Manage 2013; 123: 1-7.

21. Chagas TPG, Seki LM, Cury JC, Oliveira JAL, Da´ vila AMR, Silva DM, et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. J Appl Microbiol 2011; 111: 572–81.

22. Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type b-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1249-55.

23. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2700-706.

24. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2818-24.

25. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microbial Drug Resistance 2010; 16: 49-53.

26. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2008; 14:144–53.

27. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. ESBL-producing E. coli in Austrian sewage sludge. Water Res 2010; 44:1981–85.

28. Lu SY, Zhang YL, Geng SN, Li TY, Ye ZM, Zhang DS, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 5972–76.

29. Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. Anim Biotechnol 2006; 17: 125-35.

30. Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. Gene transfer events and their occurrence in selected environments. Food Chem Toxicol 2009; 47: 978-83.