مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۲، تابستان ۹۲، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۳

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی یک *Acinetobacter* sp. مقاوم به آنتی‌بیوتیک از فاضلاب بیمارستانی و بررسی الگوی پلاسمیدی آن

مریم قانع[۱]، مژگان بنده‌پور[۲]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر
[۲] استادیار، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *ظهور ژن‌های مقاوم به عوامل ضد میکروبی و استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به انتشار باکتری‌های مقاوم به چند دارو در محیط می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از فاضلاب‌های بیمارستانی و بررسی نقش پلاسمید در ایجاد مقاومت بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. شناسایی با روش برگی (Bergey) و مطالعات فیلوژنتیک بر مبنای توالی ژن rRNA 16S انجام شد. استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی و آزمایش کیورینگ پلاسمید (Plasmid curing) با اتیدیوم بروماید انجام شد.*

یافته‌ها: *۱۰ سویه از فاضلاب‌های بیمارستانی جدا شد. در تمام سویه‌ها مقاومت چند دارویی مشاهده گردید. یکی از سویه‌ها (ST1) نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک های مورد آزمایش مقاوم بود. مطالعات فیلوژنتیک نشان داد که سویه ST1 متعلق به جنس Acinetobacter بوده و نزدیک‌ترین خویشاوند آن Acinetobacter baumanni IARI-V-4 است. سویه فوق Acinetobacter sp. HM_C نامیده شد و توالی نوکلئوتیدی آن در GenBank ثبت شد. تیمار سویه ST1 با اتیدیوم بروماید منجر به حذف پلاسمیدها و در نهایت از دست رفتن مقاومت به آمیکاسین و جنتامایسین شد. نتایج نشان داد که ژن‌های مقاومت به آمیکاسین و جنتامیسین در این سویه بر روی پلاسمید قرار دارند.*

نتیجه‌گیری: *فاضلاب بیمارستانی عاملی مهم در انتشار باکتری‌های مقاوم چند آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مقاومت است.*

واژگان کلیدی: *مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فاضلاب بیمارستانی، پلاسمید، Acinetobacter sp.*

مقدمه

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شده که اثرات منفی را بر درمان عفونت‌های باکتریایی دارد. اغلب آنتی‌بیوتیک‌هایی که در انسان و حیوانات استفاده می‌شوند، متابولیزه نشده و مقادیر قابل ملاحظه‌ای از آن دفع شده و وارد فاضلاب‌ها و در نهایت آب‌های پذیرنده می‌شود (۱). محققین، فاضلاب‌ها را به عنوان جایگاهی مساعد برای مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها در مقابل انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌دانند. در این میان فاضلاب‌های بیمارستانی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند. باکتری‌هایی که در پساب‌های بیمارستانی زندگی می‌کنند همواره در معرض محدوده وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان فشار گزینشی برای توسعه مقاومت عمل می‌کنند (۲). فاضلاب‌های بیمارستانی همچنین دارای

آدرس نویسنده مسئول: اسلامشهر، میدان نماز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلام شهر، دکتر مریم قانع
(**email**: ghane@iiau.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۱۸

تعداد زیادی از باکتری‌های مقاوم می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌ها با کشتن و ممانعت از رشد باکتری‌های حساس، از طرفی باعث انتخاب باکتری‌هایی می‌شوند که دارای مکانیسم‌های مقاومتی هستند و از طرف دیگر باعث انتخاب موتاسیون جدید می‌شوند (۳). فاکتورهای مقاومت همچنین می‌توانند با انتقال افقی ژن از طریق هم‌یوغی، انتقال با واسطه فاژ و نیز انتقال بی‌واسطه کسب شوند. در نهایت، این باکتری‌های مقاوم می‌توانند با محیط سازگار شده و به عنوان حاملینی برای انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی عمل کنند (۴).

بیشتر گزارشات در خصوص مقاومت میکروبی، بر روی سویه‌های بالینی متمرکز است و نشان می‌دهد که مقاومت چند دارویی این سویه‌ها به تدریج در بسیاری از کشورها در حال افزایش است (۶،۵). برخی گزارشات نشان می‌دهد که مقاومت چند دارویی در باکتری‌های کامنسال و محیطی نیز دیده می‌شود (۸ ،۷). از آن جا که باکتری‌های محیطی می‌توانند برای مدت طولانی در محیط باقی بمانند، می‌توان آنها را به عنوان مخازن اصلی برای انتقال ژن‌های مقاومت در نظر گرفت. خطر جدی برای سلامت عمومی زمانی است که ژن‌های مقاومت از باکتری‌های محیطی به باکتری‌های بیماری‌زا انتقال یابند (۹). ژن‌های مقاومت اغلب از طریق پلاسمید (۱۰)، ترانسپوزون (۱۱) و یا اینتگرون‌ها (۱۲) بین باکتری‌ها انتشار می‌یابند. به خوبی مشخص شده که پلاسمیدها یکی از مهم‌ترین عوامل انتشار سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌ها هستند (۱۳). پلاسمیدهای R قابل انتقال می‌توانند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را از طریق هم‌یوغی به سایر باکتری‌ها منتقل نمایند. فشار انتخابی به دلیل حضور آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است باعث افزایش انتشار پلاسمیدهای R در بین باکتری‌ها شود. پلاسمیدهای کوچک‌تر نیز می‌توانند در انتشار ژن‌های مقاومت نقش داشته باشند. این پلاسمیدها می‌توانند از طریق پلاسمیدهای هم‌یوغی متحرک شده و یا از طریق انتقال با واسطه فاژ منتقل شوند (۱۴).

در زمینه نقش فاضلاب‌های بیمارستانی در انتشار باکتری‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی به محیط، مطالعات زیادی صورت گرفته است. Chitnis و همکاران انتشار باکتری‌های مقاوم چند آنتی‌بیوتیکی از فاضلاب‌های بیمارستانی به سیستم فاضلاب شهری را مطالعه کردند (۱۵). Yang و همکاران الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی و سویه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی را مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که سویه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی نسبت به سویه‌های بالینی مقاومت بالاتری دارند (۱۶). Ferreira و همکاران *Acinetobacter baumannii* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک را از فاضلاب بیمارستانی جدا کردند (۱۷). Guardabassi و همکاران الگوی پلاسمیدی باکتری‌های *Acinetobacter* جدا شده از فاضلاب را بررسی کردند و نشان دادند که شیوع مقاومت چند دارویی در بین این باکتری به دلیل انتقال پلاسمید است (۱۸). هادی و همکاران مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از فاضلاب شهری و بیمارستانی شهر همدان را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که مقاومت چند دارویی در باکتری‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی نسبت به فاضلاب شهری بیشتر است (۱۹). با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تبعات آن بر سلامت انسان و اهمیت فاضلاب‌های بیمارستانی در انتشار ژن‌های مقاومت، هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک از فاضلاب‌های بیمارستانی و نیز بررسی نقش پلاسمید به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل انتقال ژن‌های مقاومت در پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی از ۲ بیمارستان سطح شهرستان اسلامشهر جمع‌آوری شد. انجام نمونه‌برداری از فاضلاب‌های بیمارستانی در طی ۵ روز متوالی و در هر روز از هر بیمارستان یک نمونه تهیه شد. نمونه‌ها در بطری‌های استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شده و در شرایط دمایی تقریبا ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. از نمونه‌ها رقت‌های متوالی در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از رقت 10^{-2} در محیط کشت Plate-Count agar (PCA) (Merk, Germany) پخش شد. ۱۰ کلنی که از لحاظ ظاهری با هم تفاوت داشتند، انتخاب شدند. بعد از تهیه کشت خالص، باکتری‌های جدا شده مطابق با روش برگی (Bergey) مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۰).

سنجش حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک، به روش دیسک دیفیوژن (۲۱) و مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام شد (۲۲). مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر یک از سویه‌ها نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک به عنوان نماینده از گروه‌های اصلی شامل آموکسی‌سیلین (پنی‌سیلین‌ها)، سفتریاکسون، سفالوتین (سفالوسپورین‌ها)، آمیکاسین، جنتامایسین (آمینوگلیکوزیدها)، نالیدیکسیک

اسید (کینولون‌ها)، تتراسایکلین (تتراسایکلین‌ها) و کلرامفنیکل (فنیکل‌ها) که به طور روزمره در بیمارستان‌ها استفاده می‌شدند، مورد آزمایش قرار گرفت.

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق، شامل آموکسی‌سیلین (۱۰ µg/ml)، تتراسایکلین (۳۰ µg/ml)، سفالوتین (۳۰ µg/ml)، جنتامیسین (۱۰ µg/ml)، سفتریاکسون (۳۰ µg/ml)، آمیکاسین (۳۰ µg/ml)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg/ml) و کلرامفنیکل (۳۰ µg/ml) از شرکت Mast خریداری شد (Mast Diagnostics Ltd, UK).

بعد از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردید. سویه استاندارد *P. aeruginosa* PTCC 1430 به عنوان سویه رفرنس استفاده شد.

برای شناسایی مولکولی سویه‌های جدا شده از روش تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد. برای این کار از پرایمرهای یونیورسال F1 و R1 (F1: agagtttgatcatggctc , R1: aaggaggtgatccaacc) استفاده شد. برای تهیه DNA الگو یک کلنی منفرد از سویه جدا شد و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Luria Bertani (LB) (Merk, Germany) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه کشت داده شد (۲۳). سپس استخراج DNA بر اساس دستور کار شرکت سازندهٔ کیت (شرکت Promega) صورت گرفت. واکنش PCR مطابق با روش‌های استاندارد و برنامه زمانی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) انجام شد (۲۳). سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ (Merk, Germany) الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Sigma-Aldrich) با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). محصول PCR پس از خالص‌سازی، از روی ژل با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (Fermantas، توسط شرکت Microgene کره جنوبی) توالی یابی شد. توالی‌های ژن 16S rRNA با استفاده از Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مقایسه شد.

درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار مگا (MEGA version 5) (۲۴) و با الگوریتم neighbor joining (۲۵) رسم شد. فاصله تکاملی با استفاده از روش Countor & Jukes (۲۶) و آنالیز bootstrap (۱۰۰۰) تعیین شد. استخراج پلاسمید با استفاده از روش لیز قلیایی انجام گرفت (۲۳). در این روش، یک کلنی از باکتری در ۵ میلی‌لیتر از محیط LB کشت داده و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد. سپس سلول‌ها با SDS و NaOH متلاشی شدند. پروتئین‌ها با فنل/ کلروفرم رسوب داده شدند. DNA پلاسمیدی در اتانول مطلق و سپس اتانول ۷۰٪ رسوب داده شد و در بافر TE حل شد.

برای مشخص نمودن این که آیا ژن‌های مقاومت به وسیله پلاسمید رمز می‌شوند، آزمایش کیورینگ پلاسمید انجام شد (۲۷). برای این کار سویه ST1 در محیط LB دارای غلظت ۴۰۰ µg/ml اتیدیوم بروماید به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد. حذف پلاسمید در سویه‌های حاصل با الکتروفورز پلاسمید مورد تایید قرار گرفت. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های فاقد پلاسمید با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد.

یافته‌ها

در این تحقیق، ۱۰ باکتری از فاضلاب‌های بیمارستانی شهرستان اسلامشهر جدا شد. نتایج حاصل از سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمامی سویه‌ها مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی داشته و حداقل نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (جدول ۱). در بین سویه‌های جدا شده یک سویه (ST1) نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم بود. به همین دلیل، سویه فوق برای مطالعات مولکولی انتخاب شد.

نتایج حاصل از مطالعات ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژی سویه فوق در جدول ۲ آمده است. سویه جدا شده در محدوده وسیعی از pH (۱۰-۶) رشد داشت، اما تحمل نمک آن پایین بود، به طوری که محیط نوترینت براث با بیش از ۲/۵٪ نمک، رشد آن را متوقف می‌کرد.

تعداد ۱۳۸۵ نوکلئوتید از توالی ژن 16S rRNA سویه جدا شده توالی‌یابی شد. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank نشان داد که سویه ST1 متعلق به جنس *Acinetobacter* است. سویه فوق *Acinetobacter* sp. HM_C نامیده شد و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در GenBank ثبت شد (Accession number: JX025742). درخت فیلوژنتیک که ارتباط این سویه را در میان اعضای جنس *Acinetobacter* مشخص می‌کند، در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس آنالیز فیلوژنتیکی *Acinetobacter* sp.

جدول ۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده از فاضلاب بیمارستانی*

سویه های جدا شده	آنتی‌بیوتیک‌ها							
	AM	Te	Cf	Gm	Cro	AN	NA	C
ST1	R	R	R	R	R	R	R	R
ST2	R	I	S	S	S	S	I	R
ST3	S	R	I	R	R	R	R	R
ST4	R	S	R	I	S	R	S	R
ST5	S	I	R	S	I	R	R	S
ST6	S	R	R	R	I	S	R	S
ST7	R	R	R	R	R	S	S	S
ST8	S	R	S	S	I	I	S	R
ST9	S	I	R	S	S	S	R	S
ST10	R	R	R	I	S	I	R	S

* AM: آموکسی‌سیلین، Te: تتراساکلین، Cf: سفالوتین، Gm: جنتامیسین، Cro: سفتریاکسون، AN: آمیکاسین، NA: نالیدیکسیک اسید، C: کلرامفنیکل، R: مقاوم، S: حساس، I: بینابینی. تفسیر نتایج بر اساس جداول CLSI صورت گرفت.

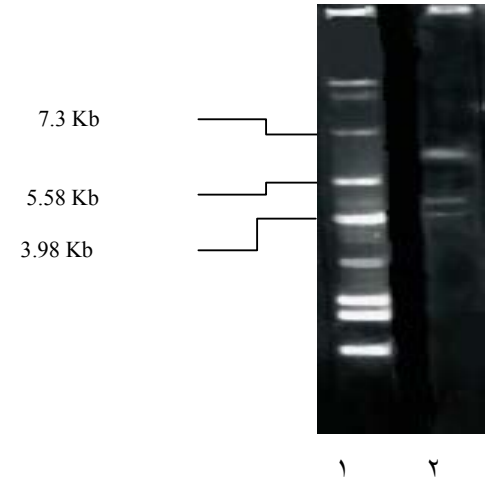
HM_C و *Acinetobacter baumanni* IARI-V-4 در شاخه مشابهی قرار دارند. آنالیز Bootstrap نشان داد که سویه فوق از لحاظ آماری با *Acinetobacter baumanni* IARI-V-4 مشابه بوده و نزدیک‌ترین خویشاوند آن *Acinetobacter baumanni* IARI-V-4 می‌باشد (با مشابهت ۱۰۰٪).

جدول ۲- برخی صفات بیوشیمیایی سویه ST1

مشخصات	نتایج
رنگ آمیزی گرم	-
مورفولوژی	کوکوباسیل
اسپور	-
حرکت	-
کاتالاز	+
اکسیداز	-
تولید رنگدانه	-
تولید اسید از گلوکز	-
هیدرولیز:	
نشاسته	-
ژلاتین	-
مصرف سیترات	+
رشد در :	
۴۴ درجه سانتی‌گراد	+
۴۱ درجه سانتی‌گراد	+
۳۷ درجه سانتی‌گراد	+

نتایج حاصل از استخراج پلاسمید سویه جدا شده (*Acinetobacter* sp. HM_C) در شکل ۲ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل دیده می‌شود سویه فوق دارای ۳ پلاسمید می‌باشد. مقایسه پلاسمیدهای فوق با پلاسمید استاندارد نشان داد که این پلاسمیدها بین Kb ۷-۴ اندازه داشتند.

تیمار سویه فوق با اتیدیوم بروماید منجر به حذف پلاسمیدها شد و حذف آنها با الکتروفورز پلاسمید مورد تایید قرار گرفت. سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی این سویه پس از حذف پلاسمید نشان داد که سویه حاصل فنوتیپ مقاومت به دو آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و آمیکاسین را از دست داده و نسبت به آنها حساس شده بود. نتایج فوق بیانگر این مطلب است که ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین و آمیکاسین در این سویه بر روی پلاسمید قرار دارند.

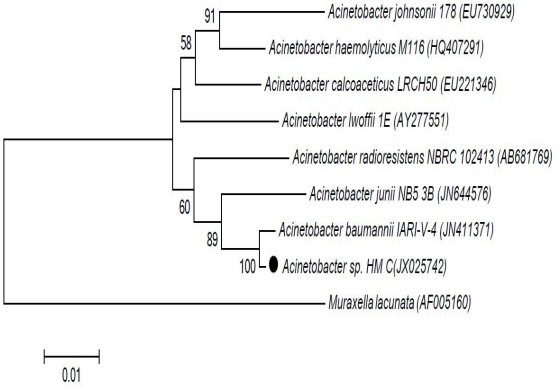


شکل ۱- الکتروفورز DNA پلاسمیدی سویه جدا شده بر روی ژل آگارز ۱٪ . ستون ۱ پلاسمید رفرنس از باکتری *E. coli* MTCC 131، ستون ۲ الگوی پلاسمیدی سویه ST1

بحث

با افزایش روز افزون مقاومت دارویی در باکتری‌ها و تبعات آن بر سلامت انسان، اهمیت بررسی عوامل دخیل در انتشار ژن-

های مقاومت ضروری به نظر می‌رسد. فاضلاب‌های بیمارستانی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل انتشار ژن‌های مقاومت محسوب می‌شوند. این فاضلاب‌ها باکتری‌هایی را با خود حمل می‌کنند که می‌توانند به عنوان مخازن بالقوه ژن‌های مقاومت دارویی عمل کنند. هدف اصلی این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک موجود در فاضلاب‌های بیمارستانی و بررسی نقش پلاسمید در ایجاد مقاومت در این باکتری‌ها بود.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک بر اساس آنالیز توالی 16S rRNA که موقعیت سویه ST1 را در بین سایر اعضای جنس Acinetobacter نشان می‌دهد. Muraxella lacunata برای ریشه دار کردن درخت استفاده شد (۳۸).

در این تحقیق به منظور مطالعه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، ۱۰ باکتری از فاضلاب‌های بیمارستانی مورد بررسی قرار گرفت. همه سویه‌ها مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی داشتند. مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی بارها گزارش شده است (۲۹،۲۸). مطالعات انجام شده توسط Elmanama و همکاران نشان داد که اکثریت سویه‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی حداقل به ۲ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. وی همچنین سویه‌هایی را جدا کرد که به ۴ آنتی‌بیوتیک یا بیشتر مقاوم بودند (۲۸). نتایج مطالعات بر مبنای 16S rRNA نشان داد که سویه ST1 به اعضای جنس *Acinetobacter* وابسته است. خواص فیزیولوژی و بیوشیمیایی سویه ST1 که در این تحقیق به دست آمده با خواص فیزیولوژی و بیوشیمیایی گزارش شده با جنس *Acinetobacter* مطابقت دارد (۲۰).

گزارشات زیادی مبنی بر جداسازی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *Acinetobacter* از فاضلاب‌ها وجود دارد و سویه‌های مقاوم چند آنتی‌بیوتیکی *Acinetobacter* مشابه آنچه در این تحقیق به دست آمده بسیار گزارش شده است (۳۱-۲۹). Ferreira و همکاران سویه‌هایی از *Acinetobacter* را از پساب‌های بیمارستانی برزیل جدا کردند که نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. آنها در تحقیقات خود از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، مروپنم، ایمیپنم، سفیپنم، آزترونام و پیپراسیلین-تازوباکتام استفاده کردند و سویه‌هایی را که حداقل به ۴ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند را مقاوم چند آنتی‌بیوتیکی نامیدند (۲۹). مقاومت به کلرامفنیکل و آموکسی‌سیلین در سویه ST1، مطالعات قبلی مبنی بر متداول بودن مقاومت به این دو آنتی‌بیوبیک در بین سویه‌های *Acinetobacter* را تایید می‌کند (۳۱،۳۲). از آنجا که باکتری‌های جنس *Acinetobacter* دارای توانایی قابل ملاحظه‌ای برای توسعه مقاومت به عوامل ضد میکروبی بوده و ظرفیت بالایی برای کسب شاخصه‌های مقاومت دارند (۳۳) و این که آنتی‌بیوتیک ها به میزان زیاد در محیط‌های بیمارستانی استفاده شده و وارد فاضلاب بیمارستانی می‌شوند، تعجب آور نیست که سویه جدا شده در این تحقیق مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته باشد.

الکتروفورز DNA پلاسمید سویه جدا شده نشان داد که سویه فوق دارای ۳ پلاسمید با وزن مولکولی نسبتا بالا است. مطالعات انجام شده در مورد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *Acinetobacter* نیز حضور چندین پلاسمید را در اغلب سویه ها اثبات نموده است (۳۴،۳۵). گزارشات نشان داده بیش از ۸۰٪ سویه‌های *Acinetobacter* دارای چندین پلاسمید با اندازه‌های مختلف می‌باشند (۳۶). حضور پلاسمیدهای R قابل انتقال نیز در این باکتری‌ها گزارش شده است. پلاسمیدهای جدا شده از سویه ST1، از لحاظ اندازه نسبت به پلاسمیدهای R قابل انتقال کوچک‌تر بودند. مطالعات انجام شده توسط Joshi بر روی سویه‌های *Acinetobacter* جدا شده از بیماران حضور پلاسمیدهای ۵، ۱۵ و Kb ۶۶ را اثبات کرد (۳۵). مطالعات آنان نشان داد که پلاسمید قابل انتقال، Kb ۶۶ اندازه داشت. پلاسمیدهای R قابل انتقال معمولا بیش از Kb ۴۰ اندازه دارند. در حقیقت وجود اجزای ضروری برای انتقال باعث ایجاد یک پلاسمید هم‌یوغی با اندازه بزرگ می‌شود. پلاسمیدهای جدا شده از سویه ST1 به دلیل اندازه کوچک، جزء پلاسمیدهای R قابل انتقال دسته‌بندی نمی‌شوند. با این وجود، این پلاسمیدها نیز می‌توانند در انتشار ژن‌های مقاومت نقش داشته باشند (۱۴). گزارشات زیادی مبنی بر حضور ژن های مقاومت بر روی پلاسمیدهای کوچک‌تر نظیر

پلاسمیدهایی که از سویه ST1 جدا شده، وجود دارد (۳۴،۳۷). برای اثبات این که آیا ژن‌های مقاومت در سویه جدا شده بر روی پلاسمید قرار دارد، آزمایش کیورینگ انجام گرفت. از دست رفتن مقاومت نسبت به جنتامایسین و آمیکاسین پس از حذف پلاسمیدها نشان دهنده این است که ژن‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی پلاسمید قرار دارند. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده توسط Patwardhan و همکاران مطابقت دارد (۳۴). به علاوه Nigro و همکاران حضور ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را بر روی پلاسمیدهای Kb ۶ اثبات کردند (۳۷).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد باکتری‌هایی که مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی داشته و ژن‌های مقاومت را حمل می‌کنند، در فاضلاب‌های بیمارستانی وجود دارند. حضور *Acinetobacter* sp. HM_AC به عنوان یک باکتری همه جایی که به کلیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم بوده و برخی از ژن‌های مقاومت آن بر روی پلاسمید قرار دارند، می‌تواند به عنوان مخزن بالقوه ژن‌های مقاومت دارویی عمل کرده و باعث انتقال مقاومت شود. پلاسمیدهای جدا شده از این باکتری اگر چه اندازه‌ای کوچک داشته و پلاسمیدهای هم یوغی محسوب نمی‌شوند، اما می‌توانند به وسیله پلاسمیدهای هم یوغی متحرک شده و باعث انتقال ژن‌های مقاومت شوند. این داده‌ها لزوم تصفیه هر چه دقیق‌تر پساب‌های بیمارستانی را به منظور جلوگیری از انتشار ژن‌های مقاومت در محیط اثبات می‌کند.

تشکر و قدردانی

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

REFERENCES

1. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment- a review- Part I**.** Chemosphere 2009; 75:417-34.
2. Kummerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1203–14.
3. Wassenaar TM. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. Crit Rev Microbiol 2005; 31:155–69.
4. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol 2005; 3:711–21.
5. Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infections isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2540–45.
6. Oteo J, La´zaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J. Antimicrobial resistant invasive *Escherichia coli*. Spain Emerg Infect Dis 2005; 11: 546–53.
7. Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. Emerg Infect Dis 2006; 12: 907–13.
8. Kummerer K. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 311–20.
9. Kruse H. Indirect transfer of antibiotic resistance genes to man. Acta Vet Scand 1999; 92: 59-65.
10. Seifert H, Boullion B, Schulze A, Pulverer G. Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: Clinical application in a complex endemic setting. Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15: 520–28.
11. Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22: 323–329.
12. Segal H, Thomas R, Gay EB. Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. Plasmid 2003; 49: 169–78.
13. Dale JW, Park S. Molecular genetics of bacteria. 4nd edition. UK: John Wiley & Sons Inc; 2004.
14. Udo EE, Love H, Grubb WB. Intra- and interation of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal species mobilisation of nonconjugative plasmids in Staphylococci. Journal of Medical Microbiology 1992; 37: 180–86.
15. Chitnis V, Chitnis S, Vaidya K, Ravikant S, Patil S, Chitnis DS. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. Water Res 2004; 38: 441–77.

16. Yang CM, Lin MF, Liao PC, Yehl HW, Chang BV, Tang TK, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. Letters in Applied Microbiology 2009; 48: 560–65.

17. Ferreira AE, Cunha GR, Fuentefria DB, Corcao G. Susceptibility profile against antimicrobial agents by *Acinetobacter* spp. strains isolated from hospital effluents in the city of Porto Alegre/Brazil. Caderno de Farmácia 2007; 23: 9–14.

18. Guardabassi L, Petersen A, Olsen JE, Dalsgaard A. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3499–502.

19. Hadi M, Shokoohi R, Ebrahimzadeh NamvarAM, Karimi M, Solaimany Aminabad M.Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan city. Iran J Health Environ 2011; 4: 106-13.

20. Holt GJ, Krieg RN, Sneath AHP, Staley T, Williams TS, Editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9nd Edition. London: Williams and Willkins; 1993.

21. 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.

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

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

24. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods". Mol Biol Evol 2011; 28: 2731–39.

25. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987; 4: 406-25.

26. Jukes TH, Cantor CR, Editor. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, Editor, Mammalian Protein Metabolism. New York: Academic Press; 1969.

27. Trevors JT. Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol Rev 1986; 32: 149-57.

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

29. Ferreira AE, Marchetti DP, De Oliveira LM, Gusatti CS, Fuentefria DB, Corcao G. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. Microbial Drug Res 2011; 17: 221-27.

30. Gulati S, Kapil A, Dass B, Dwivedi SN, Mahapatra AK. Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. Neurol India 2001; 49: 134-37.

31. 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: 3702–706.

32. Dhakephalkar PK, Chopade BA. High levels of multiple metal resistances and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. Biometals 1994; 7: 67–74.

33. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 684–704.

34. Patwardhan RB, Dhakephalkar PK, Niphadkar KB,Chopade BA. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. Indian J Med Res 2008; 128: 178-87.

35. Joshi SG. Plasmid-borne extended-spectrum β-lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol 2003; 52: 1125-27.

36. Gerner-Smidt P. Ferquency of plasmids in strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. J Hosp Infect 1989; 14: 23-28.

37. Nigro SJ, Post V, Hall RM. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. J Antimicrob Chemother 2011; 1-6.

38. Carr EL, Kampfer P, Patel BKC, Gutler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int J Sys Evolution Microbiol 2003; 53: 953-63.