مقاله پژوهشی

بررسی ژن aac(6′)Ie-aph(2″)Ia در میان سویه های بالینی انتروکوک و تشخیص سویه های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین

نرگس دادفرما*، دکتر مهوش اسکویی**، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی***، پریسا فرخ****

دریافت : ۸۹/۲/۲۳ ، پذیرش : ۸۹/۵/۲۶

چکیده:

مقدمه و هدف : انتروکوکها بعنوان یکی از مهمترین پاتوژنهای عامل عفونتهای بیمارستانی ظاهر شده اند.علاوه بر مقاومت های ذاتی به بسیاری از عوامل ضد میکروبی ، مقاومت های وابسته به پلاسمید و ترانسپوزون را ایجاد می کنند که مقاومت به سطح بالای جنتامایسین(HLGR) از جمله آنها است. HLGR در انتروکوک ها باعث شکست سینرژیسم دارویی یک آمینوگلیکوزید به همراه یک عامل فعال بر علیه دیواره سلولی می شود. معمولا پیدایش سویه های HLGR (MIC≥500µg/ml) در اثر حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia است.

روش کار : در این مطالعه تجربی در مجموع ۱۴۲ انتروکوک از بیماران جدا شد .تشخیص گونه انتروکوکها بر اساس تستهای بیوشیمیایی صورت گرفت و تست های حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک انجام شد. برای جدا کردن انتروکوکهای HLGR از دیسکهای جنتامایسین(۱۲۰ µg) استفاده شد.MIC برای جنتامایسین به روش براث میکرودیلوشن تعیین شد. PCR برای شناسایی ژنaac(6′)Ie-aph(2″)Ia و واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر Sca1 انجام شد.یکی از محصولات PCR تعیین توالی و با سویه استاندارد BLAST شد.

نتایج : از ۱۴۲ سویه ۶۲ (۴۳/۷٪) آنها HLGR بودند.۵۵ سویه HLGR ، دارای MIC برابر با ۱۰۲۴-۵۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر داشتند. همه سویه های HLGR بجز یکی از آنها دارای ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia بودند. ۴۲٪ از مجموع E.faecalis ها و۴۴٪ از مجموع E.faecium ها ،HLGR بودند . در سویه های HLGR شیوع مقاومت به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی و مقاومتهای چند دارویی (MDR) در مقایسه با non–HLGR بیشتر بود. شیوع این مقاومتها در گونه های فسیوم بیشتر از فکالیسها بود.محصول PCR تعیین توالی شده با توالی موجود در Genebank مقایسه وتایید شد.

نتیجه نهایی : شیوع بالای MDR وHLGR مشکل عمده ای در مراکز درمانی در ایران می باشد و گسترش ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia مسئول ایجاد این مقاومت در تهران است .

کلید واژه ها: انتروکوک / جنتامایسین / مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه :

انتروکوکها جزء فلور نرمال روده اند، عفونتهای انتروکوکی رایج ترین عفونتی است که توسط فلور کومنسال انسان ایجاد می شود و فراوانترین کوکسی گرم مثبت در مدفوع انسان می باشند(۱).

انتروکوکها از منابع مختلف انسانی،حیوانی ،گیاهی و سطوح مختلف محیطی قابل جداسازی هستند و از طریق فاضلاب در محیط رها می شوند.غذاهایی که منشاء حیوانی دارند گاهی با آلودگی توسط گونه های انتروکوک همراهند.(۲)

اکثر مقاومت های آنتی بیوتیکی در پاتوژنهای بیمارستانی مربوط به باکتریهای گرم مثبت است، که

* کارشناس ارشد گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
** استادیار بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
*** استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(imanifouladi.a@gmail.com)
**** کارشناس ارشد بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

Archive of SID
www.SID.ir

(MRSA)، انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین(VRE) انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین(HLGR) و انتروکوک هایی با مقاومت های چندگانه اشاره کرد که مشکلات عمده ای را در درمان بیماران ایجاد کرده اند(۳).

عفونتهای انتروکوکی شامل عفونتهای مجاری ادراری، اندوکاردیت، آبسه های داخل شکمی، عفونتهای زخم، باکتریمی ، سپسیس نوزادان و ... هستند. قدرت بیماریزایی انتروکوک ها بیش از آنکه به علت فاکتورهای ویرولانس آن باشد به علت وجود مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف است. انتروکوک ها به عنوان دومین ارگانیسم معمول در ایجاد عفونت دستگاه ادراری و زخم وسومین عامل ایجاد کننده باکتریمی در بیمارستان ها می باشند(۴).

HLGR در انتروکوکسی ابتدا در ۱۹۷۹ در فرانسه گزارش شد (۵). انتروکوک هایی با (MIC≥ ۵۰۰µg/ml) که مقاومت به سطح بالای جنتامایسین دارند توجه ویژه ای را برای درمان عفونتهای شدید انتروکوکی مانند اندوکاردیتیس به خود جلب کرده اند و یکی از معضلات عمده درمان آنتی میکروبی عفونتهای انتروکوکی هستند. در صورت بروز چنین مقاومتی حتی درمان بکمک اثر سینرژیسمی یک داروی آمینوگلیکوزید (ترجیحا جنتامایسین) بهمراه یک عامل فعال بر علیه دیواره سلولی (پنی سیلین یا گلیکوپپتید) ، با شکست روبرو می شود و این انتروکوک ها به درمان ترکیبی نیز بی اثر هستند. HLGR عموماً در اثرکسب ژنهای کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) بوجود می آیند. ژنهای رمزگذاری AMEs که سبب HLGR میشوند، شامل چندین ژن است که توسط پلاسمید و ترانسپوزون انتقال می یابند. در انتروکوک ها ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia نقش اصلی را در پیدایش مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامایسین بازی می کند و یک آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید با دو عملکرد (استیل ترانسفراز و فسفوترانسفراز) را کد می کند، لذا باعث مقاومت به همه آمینوگلیکوزیدهای مورداستفاده بالینی بجز استرپتومایسین می شود. در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر از جمله ژنهای aph(2″)-Ib، aph(2″)-Ic و aph(2″)-dI نیز در ایجاد این مقاومت مشخص شده است (۶).

حدود ۲۰ گونه انتروکوک وجود دارد ولی اغلب عفونتهای انتروکوکی در انسان توسط ۲ گونه E.faecalis و E.faecium بوجود می آیند. E.faecalis در عفونتهای انسانی شیوع بیشتری نسبت به E.faecium دارد ولی توانایی E.faecium برای کسب مقاومت دارویی بیشتر است (۷).

ویژگی های ذاتی انتروکوک ها موجب می شود که آنها قادر به بقاء در شرایط نامساعد برای مدت طولانی باشند. از دلایل اصلی در پایداری و گسترش انتروکوک ها درمحیط بیمارستان شامل: مقاومت ذاتی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکهای رایج در درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم مثبت ، توانایی این باکتری برای کسب ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک از طریق موتاسیون و یا اکتساب ماده ژنتیکی خارجی (پلاسمید،ترانسپوزون و شاخص های متحرک ژنتیک)، انتقال ژن مقاومت از طریق کونژوگاسیون ویا روش های انتقالی دیگر می باشد (۸,۹).

مصرف بالای ونکومایسین و جنتامایسین در مراکز کلینیکی باعث افزایش مقاومت در پاتوژن ها و همچنین در میکروارگانیسم های فلور نرمال بدن حیوانات و انسانها می شود. باکتری های فلور نرمال مقاوم محل ذخیره مناسبی برای انتقال ژنهای مقاومت به باکتری های پاتوژن می باشند. انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف قادرند از طریق مواد غذایی تهیه شده با منشاء حیوانی، فاضلاب های بیمارستانی و یا از طریق کلونیزه شدن در روده بیماران بیمارستانی به افراد سالم جامعه منتقل شوند.افراد ناقل با سویه های چند مقاومتی،در اثر بستری شدن در بیمارستان احتمال انتقال مقاومت به بیماران دیگر را از طریق دست آلوده پرسنل بیمارستان و یا وسایل آلوده، افزایش می دهند. طولانی تر شدن مدت بستری بیماران چرخش این سویه های مقاوم را در بیمارستان بیشتر خواهد کرد(۱۰).

تعیین گونه های انتروکوکی ، بررسی شیوع مقاومتهای آنتی بیوتیکی وبه کارگیری تکنیک های تایپینگ مولکولی مانند شناسایی ژنهای عامل ایجاد مقاومت در یافتن راههای کنترل این باکتریها موثر است، و باعث کاهش عفونتهای بیمارستانی ایجاد شده توسط انتروکوکها میشود. لذا در جلوگیری از گسترش میکروارگانیسمها در محیط بیمارستان، در تجویز آنتی بیوتیک مناسب برای درمان سویه های مقاوم، جلوگیری از افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها، کاهش مرگ و میر بیماران و کاهش هزینه ها اهمیت به سزایی دارند(۳).

هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی در

Archive of SID

www.SID.ir

انتروکوک ها و بررسی حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia در سویه های HLGR انتروکوکی و مقایسه این مقاومت ها دربین سویه های HLGR و non-HLGR جدا شده از نمونه های بالینی در تهران می باشد تا اطلاعات دقیق تر در زمینه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها و در نتیجه کنترل بهتر عفونتهای انتروکوکی بدست آید.

روش کار:

نمونه گیری و شناسایی در سطح جنس و گونه : در این مطالعه تجربی ۱۴۲ نمونه انتروکوک از بیماران بستری و سرپایی در مدت ۶ ماه فروردین تا شهریور ۱۳۸۸ از بیمارستان بقیۀ الله(عج) در تهران، جداسازی و جمع آوری شد و ادامه مطالعه در بخش میکروبشناسی انستیتو پاستور ایران صورت گرفت. پس از تهیه کشت خالص از نمونه ها ،سویه های انتروکوک جهت تعیین جنس و گونه مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین جنس با استفاده از آزمایش های کاتالاز، رشد در حضور NaCl 6.5% ،هیدرولیز بایل اسکولین و PYR(L-pyrolidonyl-β-naphtylamidase) صورت گرفت. برای شناسایی گونه انتروکوک ها از واکنش های بیوشیمیایی تخمیر قندهای آرابینوز، سوربیتول، مانیتول، سوربوز و ساکاروز ، هیدرولیز اسید آمینه آرژنین و تست حرکت استفاده شد (۱۱).در تمام مراحل انجام تست های شناسایی، تعیین مقاومت وPCR ، از سویه استاندارد E.faecalis (JH 22) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی : کلیه گونه های انتروکوک شامل E.faecalis ، E.faecium و گونه های دیگر با روش Disk diffusion (کربی- بائر) و با استفاده از محیط کشت مولر هینتون و سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید. اندازه گیری قطر هاله عدم رشد طبق استانداردهای National Committee for Clinical Laboratory Standards) NCCLS) سنجش شد(۱۲). دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل دوز بالای جنتامایسین(۱۲۰µg)، آمپی سیلین(10µg)، و نکومایسین (۳۰µg)، اریترومایسین(۱۵µg)، سیپروفلوکسازین(۵µg)، کلرامفنیکل(30µg) و تتراسایکلین(30µg) از شرکت (Bootle, Mast Mersey Side ,UK) بودند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) برای جنتامایسین با روش microdilution و از غلظت آنتی بیوتیکی ۸ gµ/ml تا ۱۰۲۴ µ g/ml انجام شد(۱۲).

استخراج DNA: از کشت شبانه باکتری ها (سویه های مقاوم به جنتامایسین)، رسوب تهیه شد و طبق روش ارائه شده توسط Belanger مراحل استخراج DNA انجام گردید (۱۳). ۳۷۰µl ازمحلول حاوی آنزیم های لیز کننده (Tris ۱M, EDTA۰/۵M, Sucrose) به همراه ۹۷ µl از لیزوزیم ۱۰mg/ml (sigma) و µ20% SDS27l جهت لیز کردن دیواره باکتری و پروتئیناز K و Rnase به منظور حذف ناخالصی ها اضافه شد. پس از ورتکس، سوسپانسیون حاصله ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس ۲۰۰µl از محلول ۷/۵ مولار استات آمونیوم اضافه و سانتریفوژ شد، تا بقایای سلول های لیز شده رسوب کنند.مایع رویی را به ویال دیگر منتقل کرده و با افزودن ایزوپروپانل سرد به میزان هم حجم سوپرناتانت و سانتریفیوژ آن، کلاف DNA تشکیل شد. رسوب را در الکل اتانول شستشو و سانتریفوژ کرده و بعد از دور ریختن الکل، رسوب را درTE حل کرده و در فریزر۲۰- نگهداری و از آن در واکنش PCR استفاده گردید.

PCR جهت تشخیص ژن اصلی مقاومت به جنتامایسین در ایزوله های HLGR : ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia عامل ایجاد مقاومت به سطح بالای جنتامایسین، در انتروکوک های HLGR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی تکثیر گردید (۱۴) (جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia

Sequence Nucleotid (5'-3')	Product size (bp)	Genbank assession of number nucleotide used sequences design primer in	References
5'-GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC-3' 5'-CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG-3'	505	M13771	14

Archive of SID

www.SID.ir

مخلوط واکنش PCR در حجم µ20l شامل µ2l (PCR buffer 10X)، ۱µl Mgcl (2.5mM) ، l (10mM)µ dNTPs 0.4 l ، 0.5 µl از پرایمرهای Forward , everseR (با غلظت µl/10 pmol) ، Polymerase 0.2 µl Tag DNA (µ 5U/l) تهیه شده از شرکت Genet Bio و DNA استخراج شده (۱۰۰ng) و آب مقطر دیونیزه می باشد. سیکل حرارتی برای تکثیر ژن به این صورت بود: دناتوراسیون اولیه در C ˚۹۵ به مدت ۴ دقیقه، سپس در۳۲ سیکل شامل (C˚۹۵ به مدت ۱ دقیقه ، C ˚۵۵ به مدت ۱ دقیقه و C ˚۷۲ به مدت ۱ دقیقه) و دمای Extention نهایی در C˚۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید و جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید (با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه استفاده شد.

جهت تایید این ژن از آنزیم محدود کننده Sca1 (Roche) ،استفاده و واکنش تعیین الگوی هضم آنزیمی محصول PCR توسط این آنزیم تعیین شد.

یکی از محصولات PCR ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia از یک گونه E.faecium جهت تعیین توالی به شرکت (Macrogen Research, Seol, Korea) فرستاده شد.

نتایج:

نمونه های جدا شده از بیماران بر اساس محل جداسازی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: فراوانی انتروکوک های جدا شده به تفکیک محل جداسازی

نمونه	تعداد	درصد
ادرار	۱۰۵	۷۴
زخم	۲۰	۱۴
خون	۴	۲/۸
مایعات استریل	۵	۳/۵
ترشحات ریوی	۵	۳/۵
آبسه	۲	۱/۴
سوند	۱	۰/۷

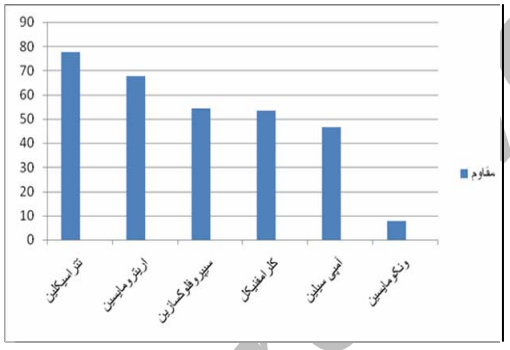
نتایج تعیین گونه نشان داد که تعداد ۹۰ (۶۳٪) سویه به گونه E.faecalis ، ۴۷ (۳۳٪) به گونه E.faecium ، ۱(۰/۷٪) به گونه E. gallinarum ، ۲ (۱/۴٪) به گونه E. casseliflavus و ۲(۱/۴٪) به گونه E.sulitarius تعلق داشت. از کل ۱۴۲ سویه، تعداد ۶۲ (۴۳/۷٪) از سویه ها HLGR بودند. نتایج تعیین گونه در میان ۶۲ سویه HLGR، E.faecalis(۶۱/۳٪)۳۸ ، E.faecium(۳۳/۹٪)۲۱ ، ۱(۱/۶٪) E.sulitarius و ۲(۳/۲٪) E.casseliflavus بودند.

توزیع جنسیت بطور مساوی ۷۱ سویه جدا شده از زنان و ۷۱ سویه از مردان بود ولی سویه های HLGR در مردان بیشتر بود. مقاومت ها در سنین بالا بیشتر دیده می شد. توزیع فراوانی سویه های مقاوم در گروههای سنی مختلف در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: فراوانی انتروکوک های HLGR در گروه های سنی مختلف

ردیف	گروههای سنی(سال)	تعداد	درصد
۱	۰-۱۵	۲	۳/۲
۲	۱۶-۳۰	۶	۹/۶
۳	۳۱-۴۵	۱۴	۲۲/۴
۴	۴۶-۶۰	۱۴	۲۲/۴
۵	بالاتر از ۶۰	۲۶	۴۱/۶

بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و تتراسیکلین بود و در رده‌بعدی آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین و کلرامفنیکل قرار داشتند(نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد مقاومت آنتروکوک به آنتی بیوتیک های مختلف به روش دیسک دیفیوژن

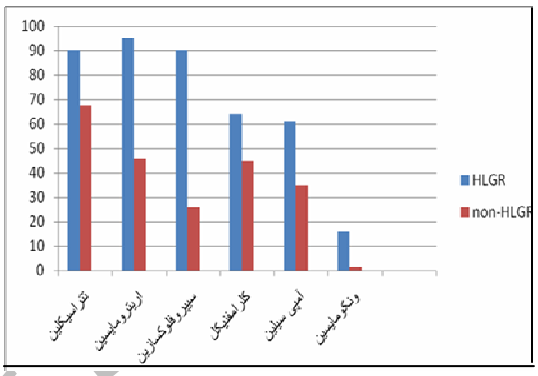
درصد این مقاومت ها به تفکیک گونه در جدول ۴ مشخص شده است.

جدول۴ : تعداد و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف برحسب گونه در نمونه های انتروکوک

آنتی بیوتیک	E. faecalis	E. faecium	E. gallinarum	E. casseliflavus	E. sulitarius
آمپی سیلین	۳۵ (۳۹)	۲۸ (۵۹/۶)	۰ (۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	۳۷ (۴۱)	۲۳ (۴۹)	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)
سیپروفلوکسازین	۴۷(۵۲/۲)	۲۶ (۵۵/۳)	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)
اریترومایسین	۶۱ (۶۸)	۳۲ (۶۸)	۰ (۰)	۱ (۵۰)	۰ (۰)
تتراسیکلین	۷۲ (۸۰)	۳۲ (۶۸)	۱ (۱۰۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)
ونکومایسین	۰ (۰)	۱۱ (۲۳/۴)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)

Archive of SID
www.SID.ir

۴۵/۷٪ از سـویه هـا بـه بـیش از ۳ آنتـی بیوتیـک مختلـف مقاومـت نـشان دادنـد. ۱۶ سـویه از E. faecium (۷۰٪) و ۲۲ سویه از E. faecalis (۵۷/۸٪)، MDR بودنـد. در سویه های HLGR شیوع مقاومت به آنتـی بیوتیکهـای مـورد بررسـی و مقاومتهـای چنـد دارویـی (MDR) در مقایسه بـا سـویه هـای non–HLGR بیـشتر بـود (نمودار۲).



نمودار۲: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی به تفکیک سویه های HLGR و non-HLGR به روش دیسک دفیوژن

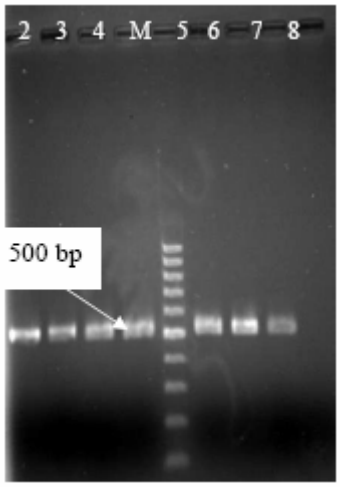
همه ۱۱(۷/۷٪) سویه مقاوم بـه ونکومایـسین، E.faecium بودنـد و همـه ایـن سـویه هـای انتروکـوک مقـاوم بـه ونکومایـسین (VRE) ، بـه آمپـی سیلین،اریترومایـسین وسیپروفلوکساسین نیز مقاوم بودند.گونه هـای E.faecium الگوهـــای مقاومـــت متفـــاوت تـــری نـــسبت بـــه گونه های E.faecalis داشتند.

آزمایش تعیین MIC جنتامایسین نـشان داد کـه ۵۵ (۸۹٪) از ســـویه هـــای HLGR دارای MIC بیـــشتر از ۵۰۰µg/ml و ۷ سـویه دارای MIC کمتـر از ایـن مقـدار بودند. محدوده MIC جنتامایسین در سویه های انتروکوک مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در جدول ۵ آورده شـده است.

جدول۵ : تعداد و درصد سویه‌های HLGR جدا شده برحسب میزان MIC

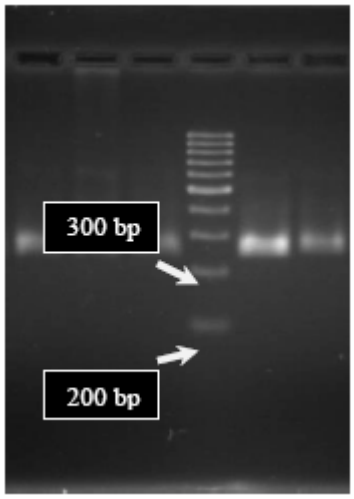
گونه	MIC(µg/ml)		
	۲۵۶	۵۱۲	≥۱۰۲۴
E. faecalis	۶ (۱۵/۸)	۹ (۲۳/۷)	۲۳ (۶۰/۵)
E. faecium	۰ (۰)	۲ (۹/۵)	۱۹ (۹۰/۵)
E.sulitarius	۱ (۵۰)	۰ (۰)	۱ (۵۰)
E. casseliflavus	۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)

رؤیت بانـد ۵۰۵pb بـرای تـشخیص ژن در حـضور مـارکر ۱۰۰bp انجـام شـد. بررسـی حـضور ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia توسط پرایمرهای اختصاصی نشان داد که این ژن در همـه سـویه هـای HLGR بـه غیـر از یـک سـویه (E.faecalis با MIC=512 µg/ml) وجود داشت(تصویر۱).



تصویر ۱ : PCR ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia ، ۱-۷ سویه های HLGR و ۸ سویه کنترل منفی

تایید وجود این ژن با استفاده از الگوی هضم آنزیمی Sca1 مورد آزمایش قرار گرفت.این آنزیم دارای یک سایت بـرش در ناحیه مـورد تکثیـر از ژن مـی باشـد و دو قطعـه ۲۴۲ و۲۶۳ جفت باز(با توجه به نرم افزار VEB Cutter2) مـورد انتظار بود که به علت فاصله کم و اندازه تقریباً نزدیک این دو قطعه حاصل از برش ،به صورت دو باند منطبق بـر روی هم مشاهده شد (با وجود اینکه الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد و با ولتاژ ۴۰V انجام گرفت)(تصویر ۲) .



تصویر۲ : هضم آنزیمی ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia

Archive of SID
www.SID.ir

محصول PCR مربوط به یک سویه حامل ژن مقاومت تعیین توالی شد.پس از تعیین توالی DNA محصول PCR مربوط به یک سویه حامل ژن مقاومت ،ژن سکانس شده با ژن سویه استاندارد M13771 ، BLAST شد و توسط نرم افزار MEGA 4 همولوژی بین آنها ۹۹٪ بود.

بحث:

در بین انتروکوکها ،انتروکوکوس فکالیس و فسیوم دو گونه غالب جداسازی شده از عفونت های انسانی می باشند. انتروکوکوس فکالیس به دلیل قدرت اتصال بالا و تکثیر در روده ،نقش بیشتری در عفونتهای انتروکوکی دارد، ولی فسیوم به دلیل پتانسیل بالا در کسب مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها،درصد بالایی از مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را نشان می دهد(۱۵،۱۶). توزیع گونه ای در این بررسی۶۳٪ به گونه E.faecalis و۳۳٪ به گونه E.faecium تعلق داشت. این توزیع گونه ای در مناطق جغرافیایی مختلف، بعلت اختلافات آب و هوایی و موقعیت باکتری در هر منطقه متفاوت است.در هند و ژاپن E.faecium درصد بیشتری از انتروکوک ها را به خود اختصاص می دهند ولی در کشورهایی مانند ایران، آمریکا، انگلیس و بسیاری از کشورهای اروپایی E.faecalis گونه غالب جدا شده می باشد.در سویه های جدا شده از فاضلاب درصد E.faecium ها به دلیل بقا وپایداری آنها در فاضلاب بیشتراست(۱۷).

بیشتر بودن تعداد نمونه های جدا شده از ادرار نسبت به نمونه های دیگر دلیلی بر شایع بودن انتروکوک ها به عنوان عامل عفونتهای ادراری می باشد. مطالعات مختلف انجام شده حاکی از غالب بودن گونه E.faecium در بین انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین می باشد(۱۸). در این مطالعه همه سویه های مقاوم به ونکومایسین جدا شده E.faecium شناسایی شدند که نشان دهنده اهمیت نقش اینگونه انتروکوک در انتشار مقاومت به ونکومایسین از طریق کلونیزه شدن آنها در روده بیماران بستری در بیمارستانها و همچنین از طریق فاضلاب های بیمارستانی و شهری می باشد ومقاومت به ونکومایسین باعث نفوذ جمعیت های E.faecium در مراکز درمانی و اجتماع شده است.

در مطالعه انجام شده توسط فیض آبادی و همکاران شیوع HLGR در انتروکوکهای جدا شده از نمونه های بالینی به ترتیب۳۰٪ و ۵۲٪ گزارش شد (۱۶). در این بررسی میزان انتروکوک هایی با مقاومت به سطح بالای جنتامایسین۴۳/۷٪ مشاهده شد. شیوع انتروکوکهای HLGR در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت و از ۶۵-۷/۵٪ متغیر است.در بین کشورهای اروپایی بالاترین شیوع HLGR در انتروکوکهای جدا شده از نمونه های کلینیکی در یونان (۴۸/۹٪) و سپس در ترکیه (۴۸/۱٪)گزارش شده که نسبت به ایران بیشتر است ولی این شیوع در سایر کشورهای اروپایی در مقایسه با ایران بسیار کمتر می باشد ولی در بعضی کشورهای آسیایی بیشتر از ایران گزارش شده است(۱۹).

در این مطالعه در مقاومت به سطح بالای جنتامایسین بین دو گونه E.faecalis و E.faecium اختلاف معنی داری وجود نداشت. در اروپا مقاومت به سطح بالای آمینوگلیکوزید ها در سویه های E.faecium رایج تر است(۱۵).

مطالعات بر روی ژنهای مختلف ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین در سویه هایHLGR درایران و جهان ، حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia را به میزان بالا گزارش کرده اند (۱۶،۲۰). در نمونه های انتروکوک با مقاومت به سطح بالای جنتامایسین جدا شده از مواد غذایی و حیوانات و نمونه های فلور طبیعی و فاضلاب نیز این ژن شایع ترین عامل HLGR است(۲۱). در این بررسی نیز ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia در۶۱ (۹۸٪) از سویه های مقاوم وجود داشت.درصد بالای این ژن در سویه های HLGR بیانگر نقش ویژه و پراکندگی زیاد آن در ایران می باشد. حضور این ژن همچنین در انتروکوک هایی با MIC< ۵۰۰µg/ml برای جنتامایسین نیز به اثبات رسیده است(۶). در مطالعه حاضر ۷ سویه E.faecalis و دارای MIC< ۵۰۰ µg/ml حامل این ژن بودند که نشان دهنده حضور این ژن در انتروکوک هایی با سطح متوسط مقاومت به جنتامایسین می باشد. فقط در یک سویه E.faecalis که از نظر فنوتیپی مقاوم بود، این ژن شناسایی نشد که مقاومت در این سویه ممکن است به علت وجود یکی از سه ژن دیگر عامل مقاومت به جنتامایسین یعنی aph(2″)-Ib، aph(2″)-Ic و dI-aph(2″) باشد ولی تا کنون ژن های aph(2″)-Ib و aph(2″)-dI در ایران گزارش نشده اند.تایپ و انتشار این سه ژن دیگر مقاومت به جنتامایسین در انتروکوک های مقاوم در ایران متفاوت با سایر نقاط جهان است(۱۶). دو ژن ذکر شده فوق که در ایران گزارش نشده اند در

Archive of SID

www.SID.ir

انتروکوک های جدا شده از حیوانـات منبـع غـذایی شـایع ترند و از طریق غذاهایی با منشاء حیوانی آلوده به باکتری، به انسان منتقـل مـی شـوند(۲۲). ازآنجائیکـه در ایـران از جنتامایسین در طیور و حیوانات کمتر استفاده مـی شـود، احتمالاً این ژن ها در سویه های حیوانی نیز شـیوع کمـی دارند.

انتروکوک ها نقش مهمی در انتشار و پایداری ژنهـای مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق عناصر ژنتیکی قابل انتقال دارند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها معمولا در اثر تغییـرات آنزیماتیـک دارو بوسـیله آنـزیم هـای تغییـر دهنـده آمینوگلیکوزید رخ می دهد. هادل و مورای تشخیص دادند کـه ژنaac(6')-Ie-aph(2")-Ia قـسمتی از ترانـسپوزون Tn5281 می باشد که وجود این ژن بـر روی ترانـسپوزون توجیهی برای انتشار سریع مقاومت و شیوع بالای HLGR در انتروکوک ها است و احتمال انتقال افقی ژن را افـزایش می دهد. این ژن همچنین بر روی ترانسپوزون Tn4001 که به جنس استافیلوکوکوس نسبت داده شـده و ترانـسپوزون های مشابه Tn4001 قرار دارد (۲۳).

ترانسپوزون هایی که در کروموزوم باکتری جای دارند انتقال عوامل مقاومت را با سرعت پـایین تـری نـسبت بـه ترانسپوزون های موجود در پلاسمیدهای کونژوگیتیو سبب می شوند.اندازه پلاسمید حامل ژن نیـز در سـرعت انتقـال آن تاثیرگـذار اسـت.در بررسـی بـر روی ژنـوم یـک گونـه فکـالیس مـشخص گردیـد کـه قـسمتی از ژنـوم از DNA اگزوژنوس و متحرک تـشکیل شـده اسـت کـه دلیلـی بـر اکتساب ژن ها می باشد(۲۱).

از آنجاییکه مقاومت انتروکوک ها به آنتی‌بیوتیک های استرپتومایسین و جنتامایسین از مکانیـسم‌هـای متفـاوتی ایجاد می‌شود، تعیین میزان حساسیت سویه ها بـه هـر دو آنتی‌بیوتیک الزامی به نظر می‌رسد.

اکثریـت سـویه هـای دارای مقاومـت هـای چندگانـه یا MDR به سطح بالای جنتامایسین نیزمقـاوم بودنـد بـه این صورت کـه۳۱/۷٪ از سـویه هـای HLGR و(۱۴٪) از سویه های non-HLGR دارای مقاومـت هـای چنـد گانـه بودند(۶).

عفونت های ایجاد شده توسط انتروکوک هـای مقـاوم به چندین آنتی بیوتیک مختلف به طور همزمـان در حـال افزایش اسـت. ونکومایـسین داروی انتخـابی عفونـت‌هـای حاصل از سویه‌های چند مقاومتی است. گزارشات نشـــان می‌دهند که مقاومت‌های چند دارویـی معمـولاً در افـرادی که اخیراً تحت درمان با آنتی‌بیوتیک بوده‌اند دیده می‌شود، و از آنجا که در درمان آنتی‌بیـوتیکی سـویه‌هـای حـساس حذف می‌شوند، سویه‌های مقاوم و خصوصاً مقاوم به چنـد دارو در دستگاه گوارش این افراد کلونیزه می شـوند بـدین ترتیب سرعت انتقال مستقیم و غیـر مـستقیم سـویه‌هـای مقاوم افزایش می‌یابد(۲۰).

کنترل عفونتهـای انتروکـوکی چنـد مقـاومتی بـسیار مشکل است و در این حالت کنتـرل گـسترش ایـن قبیـل میکروارگانیسم ها اهمیت زیادی دارد.

طـی سـه دهـه اخیـر آمینوگلیکوزیـدها از جملـه جنتامایـسین در سـطح وسـیع جهـت درمـان عفونتهـای مختلـف در بیمـاران دچارعفونـت بیمارسـتانی و غیـر بیمارستانی در ایران مورد استفاده قرار می گیرد و این امر می تواند مهمترین عامل شیوع مقاومت باشد.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که اغلـب مـوارد VRE دارای مقاومت به مقادیر بالای آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام‌ها نیز می‌باشند. در مطالعه ای که بـر روی پلاسـمیدهای انتقـال دهنـده مقاومـت انجـام شـده اسـت مـشاهده شـده کـه پلاسمیدهای حامـل مقاومـت بـه ونکومایـسین همـراه بـا پلاسمیدهای مقاومت به جنتامایـسین منتقـل مـی شـوند (۲۴). ولی شیوع VRE و HLGR ارتبـاطی بـا هـم نـدارد بطوریکه یونان با بـالاترین میـزان شـیوع HLGR در بـین کشورهای اروپایی ، هیچ گزارشی از شـیوع VRE نداشـته است(۱۹).

نتیجه نهایی:

در ایـن مطالعـه بـا توجـه بـه کمتـر بـودن تعـداد E.faecium مقاومت های چندگانه و تنوع الگوی مقاومـت دارویی در E.faecium بیشتر می باشد. بـالا بـودن درصـد مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در سویه هـای HLGR و همراهی سایر مقاومت ها و مقاومت به بیش از۳ آنتی بیوتیک در این سویه هـا یـک هـشدار و زنـگ خطـر جدی است زیرا در اینصورت درمان این قبیـل سـویه هـا بسیار مشکل خواهد بود و لزوم راههای کنترل و پیشگیری از افـزایش چنـین مقـاومتی را در انتروکوکهـا بـا بررسـی اپیـدمیولوژی مقاومتهـا و بکـارگیری روشـهای تایپینـگ مولکـولی آشـکار مـی سـازد. اسـتفاده از دیـسک هـای آمینوگلیکوزیدی حاوی دوز بالای آنتـی بیوتیـک و انجـام MIC برای آنها در آزمایشگاه ها ضروری است. احتیاط در

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از آنتی بیوتیک ها بسیار مؤثر بوده و مطالعات بـر روی میانکنش بین انتروکوک ها و ارتباط بین سویه هـای جدا شده از محیط بیمارستان و سویه های بـالینی از نظـر قرابت ژنتیکی اطلاعات با ارزشی در اختیـار پزشـکان قـرار خواهد داد.

منابع :

1. Abriouel H, Omar NB, Cobo Molinos A, Lopez R. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. J Food Microbiol 2008; 123: 38-49.
2. Silva Lopes MF, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. J Food Microbiol 2005; 103:191-198.
3. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3):512-530.
4. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology 2009: 155;1749–1757.
5. Thal LA, Chow JW, Patterson J. Molecular characterization of highly gentamicin-resistant enterococcus faecalis isolates lacking high-level streptomycin resistance. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(1): 134-137.
6. Chow JW. Aminoglycoside resistance in Enterococci. Clin Infect Dis 2000;31:586–9.
7. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance-an overview. Indian J Med Microbiol 2005; 23(4):214-9.
8. Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Microbes Infect 2002; 4: 215–224.
9. Rodriguez-Bano J, Ramirez E, Muniain MA, Santos J, Joyanes P. Colonization by high-level aminoglycoside resistant enterococci in intensive care unit patients: epidemiology and clinical relevance. J Hosp Infect 2005; 60: 353–359.
10. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci:the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 1998;4:239-249.
11. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Appl Environ Microbiol 1999;65:4425 -4430.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. 7th ed (M2-A7). Villanoa: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000.
13. Belanger AE, Lai A, Brackman MA, Le Blanc DJ. PCR-based ordered genomic libraries:a new approach to drug target identification for streptococcus pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(8): 2507-2512.
14. Ting-Ting Qu, Ya-Gang Chen, Yun-Song Yu, Ze-Qing Wei, Zhi-Hui Zhou, Lan-Juan Li. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant Enterococcus in a Chinese hospital. J Infect 2006; 52: 124–130.
15. Zarrilli R, Tripodi MF, Popolo AD, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. (2005). J Antimicrob Chemother 2005;56: 827–835.
16. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in Iran. Microb Drug Resist 2006; 12: 265-268.
17. Galimand M, Sabtecheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon TN1548. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2949-2953.
18. Billstrom H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical Enterococcus faecium. J Antimicrob Agents 2008;32 :374–377.
19. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19 :816–822.
20. Saifi M, Pourshafie MR, Eshraghian MR. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. Iran Biomed J 2008; 12:185-90.
21. Zarrilli R, Tripodi MF, Fortunato R, Bagattini M. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. J Antimicrob Chemother 2005;56:827-835.
22. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: Evidence of spread from animals to humans through food. J Clin Microbiol 2003;41: 1109–1113.
23. Hodel-Christian SL, Murray BE. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from Enterococcus faecalis and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1147–1152.
24. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003;16:430-450.

Archive of SID

www.SID.ir