مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم ، شماره سی و سوم-زمستان ۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی مقاومت سطح بالا به جنتامایسین و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزید در *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* جداشده از عفونت زخم سوخته

محسن محمدی[۱]، محسن جعفری[۲]، مرتضی حیدری [۳]، حمید اسحاقی [۴]، اباذر پورنجف [۵]، رامین کفشگری [۶]، مهرداد غلامی[۷]، کتایون برهانی[۴]، محمود خدابنده [۴*]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر کودکان، موسسه پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲- دپارتمان بیماری‌های عفونی کودکان، بیمارستان کودکان بهرامی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دپارتمان نورولوژی کودکان، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دپارتمان بیماری‌های عفونی کودکان، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دپارتمان میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۶- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۷- دپارتمان میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزید در *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* جداشده از عفونت زخم سوختگی بود.

مواد و روش‌ها: پس از شناسایی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم*، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شد. به‌منظور شناسایی سویه‌های HLGR از دیسک‌های جنتامایسین استفاده شد. آزمون PCR به‌منظور شناسایی ژن‌های کدکننده AMEs انجام گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۱۱۴ جدایه *انتروکوکوس*، تعداد ۵۶/۱ ٪ سویه HLGR بودند. تمامی سویه‌های HLGR واجد ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* بودند. ۱/۹ ٪ از سویه‌های HLGR *انتروکوکوس فیسیوم* حامل ژن *aph(2'')-Id* بودند.

نتیجه‌گیری: داده‌های ما نشان داد که مقاومت به جنتامایسین در عفونت زخم سوخته در بیمارستان ما شیوع بالایی دارد. مسئول اصلی بروز مقاومت به جنتامایسین در مطالعه حاضر، ژن *aac (6') -Ie -aph (2'') –Ia* است.

واژه‌های کلیدی: جنتامایسین، آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزید، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس فیسیوم*، زخم سوختگی.

مقدمه

انتروکوکوس‌ها[1] کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که فلور طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات هستند (۲۷). این ارگانیسم‌ها قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری، اندوکاردیت، مننژیت، عفونت‌های خون، عفونت‌های داخل شکمی و لگنی و عفونت‌های نوزادان هستند (۲۹). این میکروارگانیسم دومین عامل ایجادکننده عفونت ادراری و

نویسنده مسئول:
دپارتمان بیماری‌های عفونی اطفال، مرکز طبی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
پست الکترونیک: khodabandeh@farabi.tums.ac.ir.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۹

[1] Enterococcus

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

سومین عامل رایج باکتریمی در عفونت‌های بیمارستانی[۲] هستند (۳). از میان تمامی ۲۰ گونه مختلف جنس انتروکوکوس، گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس*[۳] و *انتروکوکوس فیسیوم*[۴] شایع‌ترین علل ایجاد عفونت در افراد بستری در بیمارستان هستند (۱۷). تخمین زده‌شده که ۹۰-۸۵ درصد از تمامی عفونت‌های ناشی از انتروکوکوس توسط *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۰-۱۵ درصد آن‌ها توسط *انتروکوکوس فیسیوم* در انسان رخ می‌دهد (۱۸). به‌تازگی انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا (IDSA)[۵] فهرستی از میکروارگانیسم‌های با مقاومت بالا را که در عفونت‌های بیمارستانی شرکت می‌کنند و سبب شکست درمانی می‌شوند منتشر کرده که به‌اختصار ESKAPE pathogens (E؛ *انتروکوکوس فیسیوم*، S؛ *استافیلوکوکوس اورئوس*[۶]، K؛ *کلبسیلا پنومونیه*[۷]، A؛ *اسینتوباکتر بومانی*[۸]، P؛ *پسودوموناس آئروژینوزا*[۹] و E؛ گونه‌های *انتروباکتر*[۱۰]) نامیده می‌شوند (۲۸ ، ۱۹). از دلایل موفقیت انتروکوکوس‌ها می‌توان به مقاومت ذاتی، موتاسیون و یا کسب فاکتورهای مقاومتی از طریق مکانیسم‌های انتقال افقی ژن (HGT)[۱۱] نام برد (۲۰). مشخص‌شده است که به‌دلیل نفوذ اندک آمینوگلیکوزیدها از خلال غشای سلولی گونه‌های انتروکوکوس، این سویه‌ها به‌خصوص *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* دارای مقاومت ذاتی به غلظت‌های پایین جنتامایسین هستند، به‌طوری‌که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[۱۲] در این باکتری‌ها ۴ تا ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر است (۹). از طرفی ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام و یا ونکومایسین ایجاد حالت سینرژیستی[۱۳] نموده که می‌تواند در درمان عفونت‌ها مؤثر باشد (۲۵).

در سال‌های اخیر، به‌دلیل افزایش مصرف خودسرانه آنتی بیوتیک‌ها، سویه‌های مقاوم به غلظت‌های بالای جنتامایسین (HLGR)[۱۴] با MIC> ۵۰۰ µg/ml گزارش‌شده است (۶). سویه‌های HLGR توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی (AMEs)[۱۵] دارند (۱۲). AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره را از بین می‌برند. ژن *aac(6′)-aph(2′)* که کدکننده یک آنزیم دوکاره ۶-آمینوگلیکوزیل‌استیل-ترانسفراز و ۲- آمینوگلیکوزیل‌فسفوترانسفراز است در اغلب انتروکوکوس‌ها دیده می‌شود (۲۱). هم‌چنین ژن‌های *aph(2′)-Ia*، *aph (2′)-Ib*، *ant (4′)-Ia*، *aph (3′)- IIIa* و *aph (2′)-Id* در جمعیت‌های انتروکوکوسی و در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها یافت شده است (۱۴). Samadi و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژن‌های *aac (3′)-Ia*، *aac(3′)-IIa* و *acc (6′)-Ib* را در ۱۴۰ سویه انتروکوک مطالعه شده به‌ترتیب برابر ۷۲/۰۴ ٪، ۶۶/۷ ٪ و ۳۶/۶ ٪ اعلام نمودند. این محققین نتیجه گرفتند که ژن استیله کننده نقش مهمی در مقاومت به آمینوگلیکوزید در ایزوله‌های انتروکوک دارد. از این‌رو، هدف از مطالعه حاضر، تعیین شیوع بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین و ژن‌های AMEs در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* جداشده از عفونت زخم سوخته و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی[۱۶] که در یک بازه زمانی ۹ ماهه از ابتدای دی ۱۳۹۵ لغایت انتهای شهریور ۱۳۹۶ انجام شد، تعداد ۱۸۲ نمونه غیرتکراری از زخم سوختگی ۸۴ (۴۶/۲٪) بیمار زن و ۹۸ (۵۳/۸٪) بیمار مرد بستری در مرکز درمانی شهید مطهری تهران جمع‌آوری گردید. میانگین سنی بیماران مطالعه شده ۲۳/۵ سال و با دامنه بین ۱۶ تا ۶۸ سال بود. هم‌زمان اطلاعات هر بیمار شامل

[2] Hospital-acquired infection (HAI) or nosocomial infection
[3] *Enterococcus faecalis*
[4] *Enterococcus faecium*
[5] Infectious Diseases Society of America
[6] *Staphylococcus aureus*
[7] *Klebsiella pneumoniae*
[8] *Acinetobacter baumannii*
[9] *Pseudomonas aeruginosa*
[10] Enterobacter species
[11] Horizontal gene transfer
[12] Minimum inhibitory concentration
[13] Synergistic effect
[14] High Level Gentamicin Resistant
[15] Aminoglycosides Modifying Enzymes
[16] Cross-sectional study

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن ثبت گردید. هم-چنین رضایت‌نامه اخلاقی از تمامی بیماران و یا همران آن‌ها به دست آمد. نمونه‌ها با استفاده از سوآپ استریل و زیر نظر پزشک متخصص عفونی جمع‌آوری گردید. به‌منظور جداسازی انتروکوک‌ها، بعد از کشت اولیه روی محیط‌های آگار خون‌دار (Merck, Germany)، کوکسی-های گرم مثبت کاتالاز منفی جدا و آزمایش‌های تکمیلی جهت تشخیص انتروکوکوس‌ها در شرایط دمای ۴۵-۱۰ درجه سلسیوس، تحمل دمای ۶۰ درجه سلسیوس، هیدرولیز بایل اسکولین و رشد در حضور نمک ۶/۵٪ انجام گرفت. برای شناسایی گونه از تست تخمیر قند و جهت تولید اسید، از آرابینوز استفاده شد. برای تأیید روش‌های تشخیص *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *انتروکوکوس فیسیوم* ATCC 51559 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. تمام جدایه‌ها در محیط لوریا-برتانی براث (Merck، Frankfurt، Germany) حاوی ۲۰٪ گلیسرول (v/v) در دمای ۸۰- سیلسیوس برای استفاده بیش‌تر نگهداری شدند.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار از دیسک (DAD)[17] و مطابق با استانداردهای مؤسسه بالینی و آزمایشگاهی (CLSI, M100-S28) (۷)، بر روی محیط مولر-هینتون آگار (Merck Co.، Germany) برای کلرامفنیکل (CHL؛ ۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (AMP؛ ۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (ERY؛ ۱۵ میکروگرم)، لینزولاید (LNZ، ۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (NIT؛ ۳۰۰ میکروگرمی)، لووفلوکساسین (LEV؛ ۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CIP؛ ۵ میکروگرم)، ونکومایسین (VAN، ۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (TET؛ ۳۰ میکروگرم) و تریموتریم-سولفامتوکسازول (SXT؛ ۵ میکروگرم) (MAST Diagnostics، Merseyside، UK) انجام شد.

آزمون فنوتیپی سویه‌های HLGR

از دیسک‌های جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرمی برای تعیین سویه‌های HLGR بر روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. به‌منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی جنتامایسین (MIC) از روش ماکروبراث-دایلوشن[18] و مطابق با استاندارد CLSI استفاده شد (۷). بدین‌منظور رقت‌های متوالی از پودر جنتامایسین (Sigma, St. Louis, MO) در محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان) تهیه شد. رقت‌ها شامل ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ بود. به‌طور خلاصه و برای این منظور به ده لوله‌آزمایش استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون براث استریل افزوده شد و به لوله اول ۱ میلی‌لیتر محلول جنتامایسین اضافه گردید. محتویات لوله مذکور به‌خوبی مخلوط گردید تا غلظت نهایی عصاره در آن برابر ۵۰ mg/ml شود. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل و به‌خوبی مخلوط شد تا غلظت دارو نصف لوله اول و برابر mg/ml ۲۵ گردد. غلظت‌های سوم تا دهم دارو به‌همین ترتیب در لوله‌های بعدی تهیه شد. سپس به هر غلظت ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هینتون براث که کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (سوسپانسیون باکتریایی حاوی CFU/ ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$) داشت، اضافه شد. در نهایت لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند و با مقایسه کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمون با کدورت کنترل منفی، کم‌ترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهارشده بود به‌عنوان MIC انتخاب گردید. در این آزمون لوله حاوی پودر جنتامایسین و *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *انتروکوکوس فیسیوم* ATCC 51559 به‌عنوان کنترل مثبت و لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

تکثیر ژن‌های AMEs با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA به‌روش فنل کلروفرم انجام گرفت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) در OD=260/280=1.8-2nm آنالیز شد. پس از ثبت و سفارش توالی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران)، صحت آن‌ها در سایت NCBI و با استفاده از

[17] Disk agar diffusion

[18] Macrobroth dilution

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

نرم‌افزار BLAST مورد تأیید قرار گرفتند (جدول ۱) (۱۲،۲۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، $MgCl_2$ (3 mM) و dNTPs (0.4 mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (F و R)[19] به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۳/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با دناتوراسیون[20] اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه برای ۳۲ سیکل شامل؛ دناتوراسیون در ۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها[21] در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، بسط[22] در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ ٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase) انجام شد.

آزمون آماری

داده‌ها در برنامه نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) و با استفاده از آزمون آماری کای اسکوئر تجزیه‌وتحلیل شدند. در این مطالعه سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جداسازی سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه، از مجموع ۱۸۲ نمونه سوآپ اخذشده از زخم‌های سوخته عفونی بیماران مراجعه‌کننده به مرکز سوانح سوختگی شهید مطهری، تعداد ۱۱۴ (۶۲/۶٪) سویه انتروکوکوس شامل ۷۳ (۶۴/۱٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۴۱ (۳۵/۹٪) *انتروکوکوس فیسیوم* به‌دست آمد.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

نتایج آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی بر روی ۱۱۴ جدایه انتروکوکوس در جدول ۲ نشان داده‌شده است. در این مطالعه لینزولاید[23] (از خانواده اگزازولیدینون[24]) دارای بهترین اثر ضد میکروبی بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* بود. هم‌چنین به‌ترتیب ۹ سویه (۲۱/۹ ٪) و ۴ سویه (۲/۷ ٪) از *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* به ونکومایسین مقاوم بودند. بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *انتروکوکوس فیسیوم* (۹۲/۷٪) و سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* (۹۰/۴ ٪) مربوط به تتراسیکلین بود (p value <0.03).

تعیین فراوانی سویه‌های HLGR

از مجموع ۱۱۴ سویه انتروکوکوس، تعداد ۶۴ (۵۶/۱٪) سویه HLGR بودند. نتایج تعیین گونه در میان ۶۴ سویه HLGR نشان داد که ۳۶ (۵۶/۳٪) سویه *انتروکوکوس فکالیس* و ۲۸ (۴۳/۷٪) تا *انتروکوکوس فیسیوم* هستند. نتایج ماکروبراث دایلوشن در تعیین MIC نشان داد که تمام سویه‌های مقاوم به جنتامایسین دارای MIC≥500 µg/m هستند. مابقی سویه‌ها یا به مقادیر پایین جنتامایسین (فنوتیپ LLGR[25]؛ n=42, MIC≤64) مقاوم بودند و یا مقادیر حدواسط (MIC<500, 64<n=8) مقاوم بودند (جدول ۳).

تکثیر ژن‌های AMEs در واکنش PCR

سویه‌هایی که دارای سطوح مختلفی از مقاومت نسبت به جنتامایسین بودند (HLGR و LLGR) برای بررسی ژن‌های AMEs استفاده شدند. فراوانی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها در بین سویه‌های انتروکوکوس در جدول ۴ آمده است. نتایج آزمون مولکولی نشان داد که تمامی سویه‌های HLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* می باشند. هم‌چنین ۳۷ سویه (۸۸/۱٪) از تمامی سویه‌های LLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* بودند. تمامی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* با فنوتایپ HLGR و LLGR فاقد ژن *aph(2'')-Id* بودند. درمجموع از ۱۰۶ سویه با فنوتایپ

[19] Forward and reverse primers
[20] Denaturation
[21] Annealing step
[22] Extension step
[23] Linezolid
[24] Oxazolidinones
[25] Low-level gentamicin-resistant

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

LLGR و HLGR، تنها ۲ سویه (۱/۹٪) حامل ژن *aph(2")-Id* بودند. تمامی سویه‌های LLGR از نظر وجود ژن‌های *aph(2")-Id*، *aph(2")-Ib* و *aph(2")-Ic* منفی بودند.

بحث

لینزولاید دارای بهترین اثر ضدمیکروبی بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* بود. هم-چنین به‌ترتیب ۲۱/۹٪ و ۲/۷٪ از *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* به ونکومایسین مقاوم بودند. این نتایج با مطالعه Samadi و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد (۲۴). Dadfarma و همکاران (۱۳۸۹) (۸) اظهار کردند که وجود انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین نشان‌دهنده اهمیت نقش این‌گونه انتروکوک در انتشار مقاومت به ونکومایسین از طریق کلونیزه شدن آن‌ها در محل عفونت بیماران بستری در بیمارستان‌ها و هم‌چنین از طریق فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری است که با نتایج پیش رو هم‌خوانی دارد. Abamecha و همکاران (۲۰۱۵) (۱) نشان دادند که از ۱۱۴ ایزوله انتروکوکوس، ۳۶٪ به آمپی‌سیلین، ۵۰٪ به سیپروفلوکساسین، ۴۹/۱٪ به نورفلوکساسین، ۶۳/۲٪ به اریترومایسین، ۶۴/۹٪ به تتراسیکلین، ۳۴/۲٪ به کلرامفنیکل و ۳۲/۴٪ به نیتروفورانتوئین مقاوم هستند. Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) مقاومت به تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین را در *انتروکوکوس فیسیوم* به‌ترتیب برابر ۹۳/۱٪، ۵۵/۱٪، ۸۹/۶٪، ۳/۱٪، ۶۵/۵٪ و ۱۳/۸٪ گزارش کرده‌اند در حالی-که در مورد *انتروکوکوس فکالیس* برابر ۹۳/۳٪، ۲۲/۲٪، ۹۵/۵٪، ۲۸/۹٪ و ۰٪ بود. این نتایج نشان می‌دهد مقاومت در سویه‌های *انتروکوکوس فیسیوم* بیش‌تر از *انتروکوکوس فکالیس* است که با نتایج ما کامل مطابقت دارد. هم‌چنین مطالعه Simonsen و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که تمامی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی به آمپی‌سیلین حساس هستند درحالی‌که ۴۸/۸٪ از ایزوله‌های *انتروکوکوس فیسیوم* مقاوم بودند (۲۶). در این مطالعه‌ها علت برخی از تفاوت‌ها در الگوی مقاومت دارویی می‌تواند ناشی از پراکندگی ژن‌های مقاومتی، منشأ نمونه‌ها، شیوع متفاوت عفونت‌های بیمارستانی در مراکز درمانی مختلف، رعایت زنجیره بهداشتی در مراکز درمانی و مانیتورینگ محیط بیمارستان از نظر کنترل کیفی میکروبی باشد.

در این مطالعه از مجموع ۱۱۴ سویه انتروکوکوس، تعداد ۵۶/۱٪ سویه HLGR بودند که از میان آن‌ها ۵۶/۳٪ *انتروکوکوس فکالیس* و ۴۳/۷٪ *انتروکوکوس فیسیوم* بودند. هم‌چنین تعداد ۴۲ ایزوله با MIC≤ ۶۴ (LLGR) وجود داشت که ۶۱/۹٪ و ۳۸/۱٪ به‌ترتیب متعلق به *انتروکوکوس فیسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* بودند. ازسوی دیگر ۶۲/۵٪ از *انتروکوکوس فکالیس* و ۳۷/۵٪ از *انتروکوکوس فیسیوم* دارای مقاومت به مقادیر حدواسط (۶۴<MIC<۵۰۰) جنتامایسین بودند. Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) از ۵۰۰ نمونه مدفوع، تعداد ۱۵ سویه (۱۵/۲٪) HLGR جداسازی نمودند. هم‌چنین در مطالعه Dadfarma و همکاران (۱۳۸۹) (۱۸) از ۱۴۲ سویه جداشده از بیماران، ۶۲ سویه (۴۳/۷٪) HLGR بودند. Amini و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۷ و Padmasini و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۴ فراوانی سویه‌های HLGR را با استفاده از روش MIC برابر ۴۲/۲٪ و ۴۲/۷٪ گزارش نمودند که با نتایج فعلی هم-خوانی دارد. Simonsen و همکاران (۲۶) اظهار کردند که فراوانی سویه‌های HLGR در آزمایشگاه‌های بالینی مختلف متفاوت است (۲۷/۶٪-۱/۱٪). در مطالعه Feizabadi و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۰۶ از مجموع ۷۹ *انتروکوکوس فکالیس* و ۳۵ *انتروکوکوس فیسیوم*، ۵۱ سویه دارای فنوتایپ HLGR، ۳۸ تا LLGR و ۱۷ تا دارای مقاومت به مقادیر حد واسط جنتامایسین بودند. Jabalameli و همکاران (۱۱) فراوانی سویه‌های HLGR را ۵۲٪ اعلام کردند. در سال ۲۰۱۸، Chotinantakul و همکاران (۵) نشان دادند که از ۱۱۸ انتروکوکوس جمع‌آوری‌شده از گوشت خوک تخمیر شده تایلندی، ۷/۶٪ دارای فنوتایپ HLGR هستند. Osuka همکاران (۲۰۱۵) (۱۵) علت این تناقض‌ها را در نتیجه تفاوت در مکان و زمان انجام مطالعه، منبع نمونه‌گیری و مواد و روش‌هایی می‌دانند که ارگانیسم‌ها با آن‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. در مورد ژن‌های مختلف ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین نشان داده شده که ۷۹٪ مقاومت‌های HLGR توسط ژن *aac(6')-Ie-aph(2")-*

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

Ia ،۵٪ توسط ژن *aph(2'')-Ib*، ۱۶٪ توسط ژن *aph(2'')-Ic* و ۱۴ ٪ توسط ژن *aph(2'')-Id* کد می‌شوند. مطابق بامطالعه Feizabadi و همکاران (۲۰۰۶) (۱۰) و Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) تمامی سویه های HLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* بودند. این نتایج نشان داد که این ژن، ژن غالب در ایجاد مقاومت سطح بالا به جنتامایسین است. در این مطالعه ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* در تمامی سویه‌های HLGR و ۸۸/۱٪ از تمامی سویه‌های LLGR وجود داشت که اهمیت ویژه این ژن در ایجاد و انتقال مقاومت به جنتامایسین در سویه‌های انتروکوکوس موجود در زخم‌های سوختگی را نشان می‌دهد. Padmasini و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۴ فراوانی ژن‌های کدکننده AMEs را ۳۸/۲٪ و ۴۰/۴٪ به ترتیب برای ژن‌های *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* و *aph(3')-IIIa* گزارش نمودند. این محققین نیز ژن‌های *aph(2'')-Ib*، *aph(2'')-Ic* و *aph(2'')-Id* را در میان ایزوله‌های خود مشاهده ننمودند. هم‌چنین Amini و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۷ در کرمانشاه فراوانی ژن‌های *aac(6')- Ie-aph(2'')-I*، *ant(6')-Ia* و *ant(3'')-III* را به‌ترتیب ۴۲/۶٪، ۲۰/۴٪ و ۱۵/۷٪ گزارش نمودند. در مطالعه پیش رو تمامی سویه-های *انتروکوکوس فکالیس* فاقد ژن *aph(2'')-Id* بودند، درحالی‌که ۱/۹٪ از سویه‌های HLGR *انتروکوکوس فیسیوم* حامل این ژن بودند. Rosvoll و همکاران (۲۰۱۲) (۲۲) در مطالعه خود شیوع ژن *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia* را در ایزوله‌های HLGR ۹۸ ٪ اعلام کردند. Behnood و همکاران (۲۰۱۳) (۴) اعلام کردند که شیوع ژن *aac (6') Ie-aph (2'')Ia* در ایزوله‌های مقاوم به جنتامایسین بسیار بالا است. این محققین اظهار کردند که حمل ژن *aac (6') Ie-aph (2'')Ia* در عنصر قابل انتقال Tn5281 امکان انتقال این ترانسپوزون را در بین ایزوله‌های انتروکوکوس فراهم می‌کند.

نتیجه‌گیری

توزیع ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک یک انتشار خاص جغرافیایی و منطقه‌ای دارد به‌طوری‌که در هر منطقه الگوی خاصی وجود دارد که این می‌تواند به عملکرد کمیته‌های نظارت بر مصرف دارو، سطح آگاهی مردم منطقه در عواقب استفاده خودسرانه از آنتی‌بیوتیک و تنوع ژنتیکی سویه‌ها وابسته باشد. داده‌های ما نشان داد که مقاومت به جنتامایسین در عفونت زخم سوخته شیوع بالایی دارد. علت اصلی بروز مقاومت به جنتامایسین در سویه‌های جداشده از بیماران سوخته تحت مطالعه، ژن *aac (6') -Ie -aph (2'') –Ia* است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان بخش میکروب‌شناسی بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری (تهران) به‌علت جمع‌آوری نمونه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن هدف	توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمر (۳'→۵')	اندازه محصول PCR (bp)
aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia	F= 5′-CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG-3′ R=5′-CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC-3′	۳۶۹
aph(3')-IIIa	F=5′-GGCTAAAATGAGAATATCACCGG-3′ R= 5′-CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG-3′	۵۲۳
ant(4')-Ia	F=5-′CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC-3′ R= 5-′GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT-3′	۲۹۶
aph(2'')-Id	F=5′- GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC -3′ R= 5- CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC -3′	۶۴۱
aph(2'')-Ib	F=5′- CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC -3′ R= 5- GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT -3′	۸۶۷
aph(2'')-Ic	F=5′- CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC -3′ R= 5- CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG -3′	۴۴۴

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

جدول ۲: پروفایل حساسیتی سویه‌های تحت مطالعه

عامل ضد میکروبی	*انتروکوکوس فکالیس*			*انتروکوکوس فیسیوم*		
	S	I	R	S	I	R
کلرامفنیکل	۳۲(٪ ۴۳/۸)	۰(٪ ۰)	۴۱(٪ ۵۶/۲)	۱۹(٪ ۴۶/۳)	۲(٪ ۴/۸)	۲۰(٪ ۴۸/۸)
آمپی‌سیلین	۷۳(٪ ۱۰۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۱۷(٪ ۴۱/۵)	۱(٪ ۲/۴)	۲۳(٪ ۵۶/۱)
اریترومایسین	۲۴ (٪ ۳۲/۸)	۰(٪ ۰)	۴۹(٪ ۶۷/۱)	۹(٪ ۲۱/۹)	۰(٪ ۰)	۳۲(٪ ۷۸)
تریموتریم-سولفامتوکسازول	۳۰(٪ ۴۱/۱)	۱(٪ ۱/۴)	۴۲(٪ ۵۷/۵)	۱۰(٪ ۲۴/۴)	۱(٪ ۲/۴)	۳۰(٪ ۷۳/۲)
سیپروفلوکساسین	۳۳(٪ ۴۵/۲)	۰(٪ ۰)	۴۰(٪ ۵۴/۷)	۲۳(٪ ۵۶/۱)	۰(٪ ۰)	۱۸(٪ ۴۳/۹)
تتراسیکلین	۷(٪ ۹/۵)	۰(٪ ۰)	۶۶(٪ ۹۰/۴)	۳(٪ ۷/۳)	۰(٪ ۰)	۳۸(٪ ۹۲/۷)
نیتروفورانتوئین	۴۴(٪ ۶۰/۳)	۱(٪ ۱/۴)	۲۸(٪ ۳۸/۴)	۲۲(٪ ۵۳/۶)	۰(٪ ۰)	۱۹(٪ ۴۶/۳)
لووفلوکساسین	۶۳(٪ ۸۶/۳)	۰(٪ ۰)	۱۰(٪ ۱۳/۷)	۲۹(٪ ۷۰/۷)	۰(٪ ۰)	۱۲(٪ ۲۹/۳)
ونکومایسین	۶۹(٪ ۹۴/۵)	۰(٪ ۰)	۴(٪ ۲/۷)	۳۲(٪ ۷۸)	۰(٪ ۰)	۹(٪ ۲۱/۹)
لینزولاید	۷۳(٪ ۱۰۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۴۱(٪ ۱۰۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)

Abbreviations: R, resistant; S, susceptible, I, intermediate.

جدول ۳: نتایج ماکروبراث دایلوشن در تعیین MIC جنتامایسین در سویه‌های تحت مطالعه

سویه‌های تحت مطالعه	MIC≥۵۰۰µg/mL	MIC≤۶۴ µg/mL	۶۴<MIC< ۵۰۰
انتروکوکوس فکالیس	۳۶ (٪ ۵۶/۳)	۲۶(٪ ۶۱/۹)	۵(٪ ۶۲/۵)
انتروکوکوس فیسیوم	۲۸(٪ ۴۳/۷)	۱۶(٪ ۳۸/۱)	۳(٪ ۳۷/۵)

جدول ۴: فراوانی ژن‌های کدکننده AMEs

سویه‌های تحت مطالعه	فنوتایپ‌های مقاومتی	ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی					
		aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia	*Aph (3')-IIIa*	*ant(4')-Ia*	*aph(2'')-Id*	*aph(2'')-Ib*	*aph(2'')-Ic*
انتروکوکوس فکالیس	HLGR (N=36)	۳۶(٪ ۱۰۰)	۱۲(٪ ۳۳/۳)	۸(٪ ۲۲/۲)	۰(٪ ۰)	۴(٪ ۱۱/۱)	۱(٪ ۲/۷)
	LLGR (N= 26)	۲۳(٪۸۸/۵)	۲(٪ ۷/۷)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)
انتروکوکوس فیسیوم	HLGR (N=28)	۲۸(٪ ۱۰۰)	۱۸(٪ ۶۴/۳)	۱۱(٪ ۳۹/۳)	۲(٪ ۷/۱)	۰(٪ ۰)	۳(٪ ۱۰/۷)
	LLGR (N=16)	۱۴(٪۸۷/۵)	۴(٪ ۲۵)	۱(٪ ۶/۳)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)
جمع کل	HLGR (N=64)	۶۴(٪ ۱۰۰)	۳۰(٪ ۴۶/۹)	۱۹(٪ ۲۹/۷)	۰(٪ ۰)	۴(٪ ۶/۳)	۴(٪ ۶/۶)
	LLGR (N=42)	۳۷(٪۸۸/۱)	۶(٪ ۱۴/۳)	۱(٪ ۲/۴)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)	۰(٪ ۰)
	Total (N= 106)	۱۰۱(٪۹۵/۳)	۳۶(٪ ۳۳/۹)	۲۰(٪ ۱۸/۹)	۲(٪ ۱/۹)	۴(٪ ۳/۷)	۴(٪ ۳/۷)

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

منابع

1. Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. BMC Res Notes. 2015; 8(1):213.

2- Amini F, Krimpour HA, Ghaderi M, Vaziri S, Ferdowsi S, Azizi M, et al. Prevalence of aminoglycoside resistance genes *in Enterococcus* strains in Kermanshah, Iran. Iran J Med Sci. 2018; 43(5):487.

3. Anderson AC, Andisha H, Hellwig E, Jonas D, Vach K, Al-Ahmad A. Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic Susceptibility of Oral *Enterococcus faecalis* Isolates Compared to Isolates from Hospitalized Patients and Food. Adv Exp Med Biol. 2018; 1057:47-62.

4. Behnood A, Farajnia S, Moaddab SR, Ahdi-Khosroshahi S, Katayounzadeh A. Prevalence of aac (6′)-Ie-aph (2 ″)-Ia resistance gene and its linkage to Tn5281 in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from Tabriz hospitals. Iran J Microbiol. 2013; 5(3):203.

5. Chotinantakul K, Chansiw N, Okada S. Antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand. J Glob Antimicrob Resist. 2018; 12:143-8.

6. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2):403-34.

7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

8. Dadfarma N, Oskoei M, Imani Fouladi A, Farokh P. Study of aac(6')Ie-aph(2″)Ia Gene in Clinical Strain of Enterococci and Identification of High-Level Gentamicin Resistant Enterococci. Avicenna J Clin Med. 2010; 17(3):25-32.

9. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. J Prev Med Hyg. 2016; 57(4):E200.

10. 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(4):265-8.

11. Jabalameli F, Emaneini M, Shahsavan S, Sedaghat H, Abdolmaliki Z, Aligholi M. Evaluation of antimicrobial susceptibility patterns of Enterococci isolated from patients in Tehran University of Medical Sciences Teaching Hospitals. Acta Med Iran. 2009; 47(4):325-8.

12. Jahansepas A, Aghazadeh M, Rezaee MA, Hasani A, Sharifi Y, Aghazadeh T, et al. Occurrence of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in Various Clinical Infections: Detection of Their Drug Resistance and Virulence Determinants. Microb Drug Resist. 2018; 24(1):76-82.

13. Noohi N, Talebi M, Ebrahimipour G, Pourshafie M. The study of high level gentamicin resistanance in Enterococcus species isolated from healthy human in Tehran, 2007-8. Iran J Med Microbiol. 2009; 2(3):47-52.

14. Niu H, Yu H, Hu T, Tian G, Zhang L, Guo X, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. Braz J Microbiol. 2016; 47(3):691-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

15. Osuka H, Nakajima J, Oishi T, Funayama Y, Ebihara T, Ishikawa H, et al. High-level aminoglycoside resistance in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. J Infect Chemother. 2016; 22(1):61-3.

16. Padmasini E, Padmaraj R, Ramesh SS. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of Enterococcus species in Chennai, India. Scientific World journal. 2014:329157.

17. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11(3):297-308.

18. Phoon HY, Hussin H, Hussain BM, Lim SY, Woon JJ, Er YX, et al. Distribution, genetic diversity and antibiotic resistance of clinically important bacteria from the environment of a tertiary hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2018; 11:35-42.

19. Pourcel G, Sparo M, Corso A, Delpech G, Gagetti P. Molecular Genetic Profiling of Clinical and Foodborne Strains of Enterococci with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin. Clin Microbiol. 2017; 6(272):2.

20. Qu T-T, Chen Y-G, Yu Y-S, Wei Z-Q, Zhou Z-H, Li L-J. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant Enterococcus in a Chinese hospital. J Infect. 2006; 52(2):124-30.

21. Ranieri MR, Whitchurch CB, Burrows LL. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. Curr Opin Microbiol. 2018; 45:164-169.

22. Rosvoll TC, Lindstad BL, Lunde TM, Hegstad K, Aasnæs B, Hammerum AM, et al. Increased high-level gentamicin resistance in invasive Enterococcus faecium is associated with aac (6′) Ie-aph (2 ″) Ia-encoding transferable megaplasmids hosted by major hospital-adapted lineages. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012; 66(2):166-76.

23. Samadi N, Pakzad I, Sefidan AM, Hosainzadegan H, Tanomand A. Study of aminoglycoside resistance genes in enterococcus and salmonella strains isolated from ilam and milad hospitals, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(4): e18102.

24. Samadi H, Pirhajati Mahabadi R, Pournajaf A, Omidi S, Moghimyan S, Alyasin N. An Investigation of the vanA and vanB Genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Strains isolated from the Hospitalized Patients in Shariati Hospital and Evaluation of Their Antibiotic Susceptibility. Qom Univ Med Sci J. 2015; 9(3): 32-38.

25. Shete V, Grover N, Kumar M. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among Enterococcal Isolates. J Pathog. 2017; 2017:3256952.

26. Simonsen G, Småbrekke L, Monnet D, Sørensen T, Møller J, Kristinsson K, et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(2):323-31.

27. Stein-Thoeringer C, Peled JU, Lazrak A, Slingerland AE, Shono Y, Staffas A, et al. Domination of the Gut Microbiota with Enterococcus Species Early after Allogeneic Bone Marrow Transplantation is an Important Contributor to the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease (GHVD) in Mouse and Man. Biol Blood Marrow Transplant. 2018; 24(3):S40-S1.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Tyson GH, Nyirabahizi E, Crarey E, Kabera C, Lam C, Rice-Trujillo C, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. Appl Environ. Microbiol. 2018; 84(1):e01902-17.

29. Wei Y, Kypraios T, O'Neill PD, Huang SS, Rifas-Shiman SL, Cooper BS. Evaluating hospital infection control measures for antimicrobial-resistant pathogens using stochastic transmission models: application to vancomycin-resistant enterococci in intensive care units. Stat Methods Med Res. 2018; 27(1):269-85.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:37 +0430 on Tuesday April 9th 2019

Archive of SID

www.SID.ir