مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۷، شماره ۴
مهر ۹۳، صفحه: ۶۶۲-۶۵۵

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 57, No. 4 P: 655-662
Sep 2014

**مقاله اصلی**

# فراوانی ژن های ermA,B,C در انتروکوک های مقاوم به اریترومایسین جدا شده ازنمونه های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان های دانشگاهی شهر قزوین و تهران

**تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/٤/۲۱**

[۱] معصومه اصلانی مهر
[۲] امیر پیمانی
[۳] داود درزی رامندی*
[۴] تقی ناصرپور فریور

*۱- استادیار میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران*
*۲- استادیار گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران*
*۳- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران*
*۴- استاد میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروب شناسی قزوین، ایران*

* قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۴۸۱۲۲۳۱
Email: d.darzir@gmail.com

## خلاصه

**مقدمه**

انتروکوکها از عوامل مهم عفونت دستگاه ادراری هستند که مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی دارند، این مطالعه تعیین فراوانی ژن های ermA,B,C در انتروکوکهای مقاوم به اریترومایسین جدا شده ازنمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهر قزوین و تهران را هدف قرار داده است.

**روش کار**

در این مطالعه اپیدمیولوژی- توصیفی که از سال ۱۳۹۱- ۱۳۹۲ در دو بیمارستان آموزشی در قزوین و سه بیمارستان در تهران صورت گرفت، تعداد ۱۶۵ ایزوله انتروکوک مورد مطالعه قرار داده شدند، مقاومت به اریترومایسین با روش انتشار دیسک و رقت سازی در آگار برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) براساس استانداردهای CLSI ( Standard Institute Clinical and Laboratory) تعیین گردید و با انجام PCR حضور ژنهای ermA,B,C بررسی شدند.

**نتایج**

از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک ۱۴۲ ایزوله (۸۶٪) انتروکوکوس فکالیس و ۲۳ ایزوله (۱۳/۹٪) انتروکوکوس فاسیوم بودند. نتایج تست های حساسیت دارویی نشان داد که در مجموع ۱۵۸ ( ۹۵٪ ) ایزوله ها دارای مقاومت و یا حساسیت حد واسط نسبت به اریترومایسین بوده و همچنین نتایج نشانگر قرابت معنادار نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن با آگار دایلوشن بود. از مجموع ۱۶۵ سویه مورد مطالعه تعداد ۱۴۷ (۸۹٪) ایزوله مقاوم به اریترومایسین (MIC≥8 µg/ml) و ۱۱ (۶/۶٪) ایزوله دارای مقاومت حد واسط (۱-۴µg/ml MIC) و ۷ (۴/۲٪) ایزوله حساس به اریترومایسین (MIC≤0.5 µ g/ml) بودند.

**نتیجه گیری**

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنهای ermA,B,C در سویه های مقاوم به اریترومایسین انتروکوک از شیوع بالایی برخوردار بوده و فراوان ترین ژن عامل مقاومت ژن ermB می باشد.

**کلمات کلیدی:** انتروکوک، *erm*، اریترومایسین، مقاومت ماکرولیدها، مقاومت آنتی بیوتیکی

**پی نوشت:** بدین وسیله از معاونت و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین برای تأمین هزینه انجام این طرح، از جناب آقای دکتر عینی جهت تامین سویه های استاندارد، کارشناسان و کارکنان آزمایشگاه مرجع وگروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و کلیه کسانی که در امر جمع آوری نمونه ها و انجام این تحقیق کمک کردند، تشکر می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

*Original Article*

# Frequency of erm A, B, C genes in Erythromycin resistant Enterococci isolated from Clinical samples of inpatients of Teaching Hospitals in Qazvin & Tehran

Received: April 6 2014- Accepted: July 12 2014

1- Masoumeh Aslanimehr
2- Amir Peymani
3- Davood Darzi Ramandi*
4- Taghi Naserpour-Farivar

*1- Assistant Professor in Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran*
*2- Assistant Professor in Qazvin University of Medical, Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran*
*3- MSc. In Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran*
*4- Professor in Microbiology, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran*

** Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran*
*Tel: 09124812231*
*Email: d.darzir@gmail.com*

## *Abstract*

**Introduction:** *Enterococci* are among the most important causes of urinary tract infections. The aim of this study was to assess the frequency of *erm A, B,* and *C* genes in erythromycin-resistant *Enterococci* isolated from the clinical samples of inpatients of university teaching hospitals in Qazvin and Tehran.

**Methods:** From 2012 to 2013, a total of 165 samples of *enterococci* were isolated from the clinical samples of inpatients. Susceptibility to erythromycin in *enterococci* isolates was performed by agar dilution and disk diffusion methods according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Erythromycin resistance genes (*ermA, B,* and *C*) were identified by PCR.

**Result:** Out of 165 clinical isolates of *enterococci*, 142 (86%) isolates were *Enterococcus faecalis* and 23 (13.9%) isolates *Enterococcus faecium*. The results of susceptibility test showed that 158 (% 95) isolates were resistant or with intermediate sensitivity to erythromycin. There was a good correlation between the results of disk diffusion and agar dilution methods. Of total samples, 147 (89%) isolates were resistant to erythromycin (MIC≥8 µg/ml), 11 (6.6%) isolates with intermediate sensitivity (MIC 1-4 µg/ml), and 7 (4.2%) isolates with complete sensitivity to erythromycin (MIC ≤ 0.5 µg/ml).

**Conclusion:** The results of this study showed high prevalence of *ermA*, *B*, and *C* genes in erythromycin-resistant strains with *ermB* as the most common resistance gene among these isolates.

**Key words:** *Enterococci*, *Erm*, Erythromycin, Macrolides Resistance, Antibiotic resistance

**Acknowledgement:** The author would like to thank the research division of Qazvin University of Medical Sciences for funding the current study. Also our thank goes to Dr Emaneini who kindly provided us with the standard strains.

Archive of SID

www.SID.ir

**مقدمه**

انتروکوک ها از جمله شایع ترین عوامل عفونت بیمارستانی، به ویژه در بخش های مراقبت ویژه (*ICU*) هستند. عفونت ناشی از این باکتری هنگام تجویز سفالوسپورین ها و دیگر آنتی بیوتیک هایی که انتروکوک ها نسبت به آنها مقاومند ایجاد می شود. انتروکوک ها عمدتا از یک بیمار به بیمار دیگر از طریق دست کارکنان بیمارستان که برخی از آنها نیز ناقل هستند منتقل می شوند. حدود ۱۲ گونه انتروکوک وجود دارد. انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) شایع ترین گونه بوده و عامل ۸۵-۹۰ ٪ عفونت های انتروکوکی است و انتروکوکوس فسیوم (*E.faccium*) عامل ۵-۱۰ ٪ عفونت ها می باشد (۱). در ایالات متحده تخمین زده می شود که سالانه ۸۰۰۰۰ عفونت انتروکوکی رخ می دهد که هزینه درمان برای هر مورد حدود ۵۰۰ دلار می باشد (۲). در این گروه از باکتری ها مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مشاهده می گردد از جمله این مقاومت ها می توان به مقاومت ذاتی به ماکرولید ها،کلرامفنیکل، پنی سیلین،تتراسایکلین وآمینوگلیکوزیدها اشاره کرد. مقاومت چندگانه (MDR[1]) یکی از خصوصیات انتروکوک ها می باشد (۳-۶). ماکرولیدها محصول متابولیسم ثانویه بسیاری از گونه های اکتینومیست ها هستند. اریترومایسین، آنتی بیوتیک شاخص این گروه می باشد که از یک حلقه لاکتون متصل به دو قند دیسوسامین[2] و کلادینوز[3] تشکیل شده است. ماکرولیدهای دیگر از اریترومایسین مشتق شده اند و شامل کلاریترومایسین، آزیترومایسین، دیریترومایسین[4] و رکسیترومایسین[5] هستند (۷-۹). دو مکانیسم مهم در مقاومت به ماکرولید ها وجود دارد که مهمترین آن تغییر جایگاه هدف که به واسطه ژن های erm[6] کد شده و مقاومت به ماکرولید ها و لینکوزآمیدها، استرپتوگرامین B (MLSB) را سبب می شود و یک سیستم پمپ افلاکس که در غشا واقع شده که ژن های *msr*, *mef(A/E)* آن را کد می کنند و سبب خروج دارو از سلول باکتری می گردد (۱۰). ژن های *erm* مسئول کد کردن متیل ترانسفرازها می باشند. این آنزیم ها سبب القاء دمیتیلاسین یک گروه آدنین (A2058/A2059) از دومین V در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز زیر واحد ۲۳S ریبوزومی می گرددکه در نهایت سبب کاهش میل ترکیبی اتصال و ایجاد مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزآمین ها واستریتوگرامین B (MLSB) می گردد. ژن های *erm* در بسیاری از ترانسپوزون ها شناسایی شده اند (۱۱-۱۳). پمپ های یونی از دوازده بخش تشکیل شده اند که از عرض غشای سیتوپلاسمی عبور نموده و در ایجاد انرژی و نیروی محرکه پروتونی دخالت دارند. پمپ یونی *mefA* سوبستراهای متعددی مانند اریترومایسین و مشتقات آن مانند آزیترومایسین را دارد (۱۵،۱۴). در مطالعات اخیر که بر انتروکوک ها انجام شده، نشان داده که مقاومت انتروکوک ها به اریترومایسین (ERY) بالاتر از ۷۰٪ -۸۰ ٪ می باشد (۶). اکثر ایزوله های انتروکوکی جدا شده ی مقاوم به اریترومایسین که تا کنون مطالعه شده اند دارای ژن ها *ermA,B,C* می باشند و فراوانی ژن *ermB* بیش از همه (بالاتر از ۷۰٪) بوده و فراوانی ژن های *ermA* و *ermC* وابسته به منطقه جغرافیایی متفاوت می باشند. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و مکانیسم های مولکولی آن از جمله مقاومت به ماکرولید ها در انتروکوک ها از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا دراین مطالعه به بررسی مقاومت به اریترومایسین و فراوانی ژن های *erm A*، *B* و *C* در ایزوله های بالینی انتروکوک جدا شده از بیماران بستری پرداخته شده است.

## روش کار

تعداد ۱۶۵ ایزوله انتروکوکی جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در دو بیمارستان آموزشی شهر قزوین و بیمارستان های شریعتی ، سینا و مسیح دانشوری تهران از اردیبهشت ماه ۱۳۹۱- خرداد ماه ۱۳۹۲ جمع آوری گردید.پس از آن تمامی نمونه ها به منظور ذخیره کردن در محیط TSB + گلیسرول ۱۰٪ برده ودردمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریز گردید.

تمامی نمونه ها بر اساس تست های تشخیصی رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد در ۶/۵٪ نمک،آزید مالتوز آگارو

[1] Multi Drug Resistance
[2] Dysosamin
[3] Cladinose
[4] Dirithromycin
[5] Roxithromycin
[6] Erythromycin (ERY) ribosomal methylases

Archive of SID
www.SID.ir

بایل اسکولین تائید گردیدند.

تست های افتراقی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، تست تخمیر قند و تولید پیگمان می باشد. در این بررسی از قند های سوربیتول ، آرابینوز و رافینوز استفاده شد.

در روش دیسک دیفیوژن، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیون معادل نیم McFarland تهیه و بر روی محیط Muller-Hinton آگار به روش کشت جارویی تلقیح شد، سپس دیسک اریترومایسین ۱۵ µg (ساخت شرکت Mast) بر روی محیط قرار داده شد آن گاه پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و در نهایت پلیت ها از نظر قطر هاله مطابق استاندارد CLSI ۲۰۱۳ مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت. برای انجام کنترل کیفی دیسک اریترومایسین و محیط مولر هینتون آگار از سویه استاندارد *Entercoccus faecalis ATCC* ۲۹۲۱۲ مطابق با استاندارد های پیشنهادی CLSI استفاده گردید .

در این مرحله حداقل غلظت مهاری اریترومایسین (MIC[1]) کلیه ایزوله های انتروکوکی به روش آگار دایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. تعیین MIC انتروکوک هایی که در غلظت µg/ml MIC≥8 از آنتی بیوتیک اریترومایسین رشدشان مهار شد، انتروکوک مقاوم به اریترومایسین، انتروکوک هایی در غلظت µg/ml MIC1-4 به عنوان حد واسط و انتروکوک هایی که در غلظت µg/ml MIC≤ 0.5 از آنتی بیوتیک اریترومایسین رشد داشتند حساس در نظر گرفته شدند.

در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت استخراج *(USA/ Life Technologies)* استفاده شد و مراحل آن مطابق با دستورالعمل کیت انجام گرفت.

برای شناسایی ژن های *ermA,B,C* از آزمایش PCR استفاده شد تا حضور ژن ها در انتروکوک های مقاوم مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق از سه جفت پرایمر برای شناسایی این ژن ها استفاده شد. روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسا یکلر (ABI Biosystem / USA) باشرایط بهینه سازی شده به شکل زیر انجام گرفت. واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (Hot start) ودر ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Denaturation)، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Extension) و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای این منظور ۸ میکرولیتر Master Mix Red 1.5Mm Mgcl2 2X Taq، ۰/۷ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۶ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به منظور مشاهده محصول PCR از ژل الکتروفورز *(spain/* max pure agarose) با غلظت ۱٪ آماده سازی شد و نتایج با دستگاه ژل داکت (USA / 212 pro GEL LOGIC ) ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت ژن های *ermA,B,C* از سویه های سکانس شده جناب آقای دکتر عینی استفاده گردید (۱۳). اطلاعات با نرم افزار ***SPSS*** تجزیه و تحلیل شد.

## نتایج

با استفاده از توانایی تخمیر قند سوربیتول، آرابینوز و رافینوز و رشد در ۴ درجه تمامی نمونه ها به منظور جداسازی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم و تمایز آنها انجام گردید. از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک ، انتروکوک فکالیس۱۴۲ (۸۶٪) وانتروکوک فاسیوم ۲۳ (۱۳/۹٪) نمونه بوده، ایزوله های بالینی به ترتیب فراوانی، ۱۱۳ (۶۸/۴٪) از ادرار، ۱۸ (۱۰/۹٪) از زخم، ۱۵ (۹٪) از خون، ۵ (۳٪) از آسیت و ۱۴ (۸/۴٪) از نمونه های کلینیکی دیگر وجود داشت. همچنین فراوانی ایزوله ها به تفکیک بخش های بیمارستانی، بخش مراقبت های ویژه ۶۸ (۴۱/۲٪)، بخش کودکان ۴۷ (۲۸/۴٪)، بخش داخلی ۵۰ (۳۰/۳٪) بودند. طبق دستورالعمل CLSI ، نتایج به دست آمده از MIC به روش آگار

**جدول شماره۱**- لیست پرایمرها جهت بررسی ژن های erm

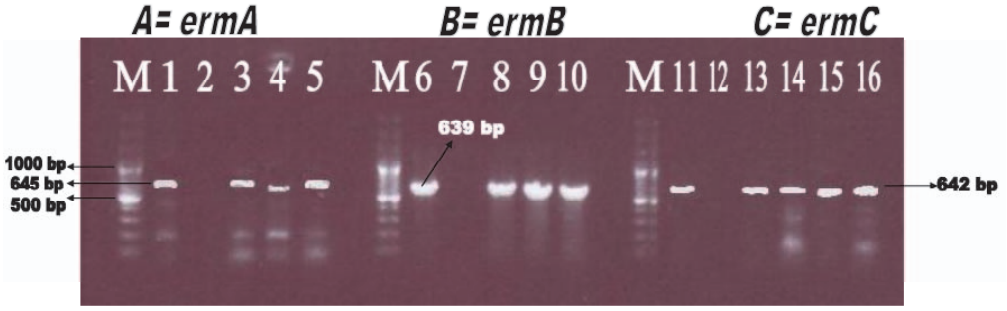
| ژن | توالی پرایمر | طول قطعه | مرجع |
|---|---|---|---|
| *erm(A)* | F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA<br>R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT | ۶۴۵ bp | ۱۱ |
| *erm(B)* | F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA<br>R:AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC | ۶۳۹bp | ۱۱ |
| *erm(C)* | F: TCAAAACATAATATAGATAAA<br>R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT | ۶۴۲ bp | ۱۱ |

R: Reverse F: Forward

[1] Minimum inhibitory concentration

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۱-** قسمت(A)- M : DNA مارکر (ladder 100 bp)۱ : کنترل مثبت ژن (۶۴۵ bp)ermA. ۲: کنترل منفی ژن ermA. ۵-۳ نمونه های بالینی مثبت ermA. قسمت(B)- 6: کنترل مثبت ژن (۶۳۹ bp)ermB. ۷: کنترل منفی ژن ermB. ۱۰-۸: نمونه های بالینی مثبت ژن ermB. قسمت(C)- ۱۱: کنترل مثبت ژن (۶۴۲ bp)ermC . ۱۲: کنترل منفی ژن ermC. ۱۶-۱۳: نمونه های بالینی مثبت ژن ermC

دایلوشن، ۷ (۴/۲٪) ایزوله حساس به اریترومایسین (MIC≤ $\mu$g/ml 0/5)، ۱۱ (۶/۶٪) ایزوله حدواسط (MIC 1-4 $\mu$g/ml ) و ۱۴۷ (۸۹٪) ایزوله مقاوم به اریترومایسین (MIC≥8$\mu$g/ml) بودند که در نتایج دیسک دیفیوژن و آگار دایلوشن هم خوانی کامل وجود داشت. از بین ۲۳ ایزوله انتروکوکوس فسیوم تعداد ۲۱ ایزوله (۹۱/۳٪) مقاوم به اریترومایسین بودند که بیانگر مقاومت آنتی بیوتیکی بیشتر انتروکوکوس فسیوم نسبت به فکالیس می باشد . در ۱۶۵ ایزوله انتروکوک، تعداد ۱۸ سویه (۱۰/۹٪) دارای MIC پایین تر از ۱۲۸$\mu g/ml$< بودند و تعداد ۱۴۷ سویه (۸۹٪) دارای MIC بالا تر از ۱۲۸$\mu g/ml$< بودند. مقادیر MIC50 و MIC90 برای ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و فسیوم بالاتر از ۱۲۸$\mu g/ml$< بود. فراوانی ژن های *ermA,B,C* در ۱۵۸ ایزوله غیر حساس (ایزوله های مقاوم و حد واسط) به اریترومایسین بدین ترتیب می باشد ، ۴۱ (۲۵/۹٪) ایزوله دارای ژن *ermB*، ۶۴ (۴۰/۵٪) ایزوله دارای ژن *ermB,C*، ۱۴ (۸/۸٪) ایزوله دارای ژن *ermA,B* و ۳۹ (۲۴/۶٪) ایزوله دارای ژن *ermA,B,C* بودند. ژن های *ermA* و *ermC*به تنهایی در هیچ کدام از ایزوله ها مشاهده نشد. در مجموع *ermB* با ۹۵٪ به عنوان فراوانترین ژن و ژن های *ermC* (۶۳٪) و *ermA* (۳۲٪) به ترتیب در رتبه های بعدی قرار گرفتند.

## بحث

انتروکوک ها گروه مهم و متنوعی از باکتری ها هستند که اهمیت ویژه ای از نظر مقاومت دارویی چند گانه *(MDR)* دارند. مهمترین مشکل انتروکوک ها مقاومت نسبی و مطلق آنها در برابر آنتی بیوتیک ها است. از عوامل خطر برای انتروکوک های MDR شامل کلونیزاسیون گاستروانتستینال انتروکوک ها، سن بالا، بیماری زمینه ای شدید، سرکوب سیستم ایمنی، اقامت در ICU ، جراحی (مخصوصاً دستگاه گوارش، قلبی عروقی و پیوند)، ابزارهای داخل عروقی و در تماس بودن مداوم با آنتی بیوتیک های دیگر می باشد (۱۶). آنتی بیوتیک های مصرفی درمحیط های بیمارستانی، انتخاب انتروکوک های پاتوژن راتحت تاثیرقرارداده، به گونه ای که برتعداد سویه های دارای مقاومت چندداروییی و بعضاً سویه های مقاوم به همه آنتی بیوتیک ها افزوده می شود.مقاومت به ماکرولیدها در انتروکوک ها اهمیت اپیدمیولوژیکی زیادی در مناطق مختلف دنیا داشته است. در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت درمصرف میزان آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و جدید متفاوت می باشد. با این وجود افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری یک پدیده جهانی است (۱۷). این باکتری سومین عامل باکتریمی و دومین عامل عفونت دستگاه ادراری[1] به شمار می آید وهمچنین به دلیل عدم اطلاع کافی به مقاومت آنتی بیوتیکی به ویژه در اپیدمی انتروکوک ها بعضی از اطلاعات برای درمان مناسب عفونت های انتروکوکی

[1] urinary tract infections

Archive of SID

www.SID.ir

مورد نیاز هستند (۱۸،۱۹). در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی بیوتیک اریترومایسین بررسی شد که بیان کننده مقاومت ذاتی و بالا به ماکرولیدها در سویه های انتروکوک می باشد. از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک مورد بررسی، مقاومت به اریترومایسین در ۱۴۷ ایزوله (۸۹٪) بوده که بیانگر مقاومت بالای انتروکوک ها به اریترومایسین است. در این مقاومت *ermB* بیشترین فراوانی را داشته که۱۵۸ (۹۵٪) ایزوله، ژن *ermC* ۱۰۴ (۶۳٪) ایزوله و ژن *ermA* ۵۳ (۳۲/۱٪) ایزوله بودند. در مطالعه حاضر از MIC به روش آگاردایلوشن با رقت های ۱۲۸-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتراستفاده شده بود که ۷ (۴/۲٪) ایزوله حساس به اریترومایسین، ۱۱ (۶/۶٪) ایزوله حدواسط و ۱۴۷ (۸۹٪) ایزوله مقاوم به اریترومایسین بودند. MIC50 و MIC90 برای ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و فسیوم بالاتر از $>128\mu g/ml$ بود. در این مطالعه سویه های بالینی از ادرار۱۱۳ (۶۸/۴٪)، زخم ۱۸ (۱۰/۹٪) ، خون ۱۵ (۹٪) بیشترین تعداد نمونه کلینیکی را تشکیل دادند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۹ در چین توسط زو[1] و همکارانش صورت گرفت از ۱۱۷ ایزوله انتروکوکوس فکالیس جدا شده از بیماران، ۷۸ (۶۶/۶٪) ایزوله مقاومت به اریترومایسین گزارش شد. 58 (74/3٪) ایزوله دارای *ermB* و ۳۷ (47/4٪) ایزوله دارای *ermA* بودند. ۱۷٪ از ایزوله ها هر دو ژن *ermB* و *ermA* و ۲/۵٪ ایزوله ها دارای *ermC* بودند. از بین ۷۸ ایزوله مقاوم به اریترومایسین، ۷۵ ایزوله با MIC≥128 µg/ml بودند که مشابه مطالعه حاضر بود (۱۱). در مطالعه ای دیگری که توسط عینی وهمکارانش در سال ۲۰۰۷ بر ۳۲۶ ایزوله بیمارستانی انتروکوک در بیمارستان های تهران انجام شد، مقاومت به اریترومایسین ۴۵٪ گزارش گردید و ۴۱٪ ایزوله های مقاوم به اریترومایسین حاوی ژن*ermB*, ۵ ٪ ایزوله ها حاوی *ermA* بوده و *ermC* در هیچ ایزوله ای مشاهده نشد (۱۳) *ermB* در این مطالعه مشابه با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بیشترین فراوانی را داشته در حالیکه فراوانی *ermC* با مطالعه حاضر که (۶۳٪) بوده متفاوت می باشد، که این تفاوت می تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی بیوتیک در مناطق جغرافیایی مختلف باشد. مطالعه دیگری در اسپانیا در سال ۲۰۱۰ توسط لوپز[2] و همکارانش برای تشخیص مقاومت MLSB در انتروکوک ها بر اساس حضور ژن های متیلاز ***rRNA*** با روش ***PCR*** و تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که از ۱۴۸ ایزوله مورد بررسی، ۹۴٪ از ایزوله ها دارای مقاومت به اریترومایسین بوده و ***MIC 50 , MIC 90*** برای این ایزوله ها µg/ml ۲۵۶تعیین گردید و۸۹/۲٪ از ایزوله ها فقط دارای ژن *ermB* بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ یک از ایزوله ها دارای مقاومت به لینوزولید، تیکوپلانین نمی باشند (۲۰). ارسترایپ[3] و همکارانش درسال ۲۰۰۰-۱۹۹۹ بر روی ۹۸ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ۶۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم در دانمارک مطالعه کردند. این مطالعه نشان داد که ۷۲ سویه از انتروکوکس فکالیس ( ۷۳/۵ ٪) و همچنین (۹۶/۹ ٪) از سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به اریترومایسین بودند. فراوانی ژن *ermB* در انتروکوکوس فکالیس(۸۴/۷ ٪) و در انتروکوکوس فسیوم (۶۱/۷٪) گزارش شده بود (۲۱). با توجه به اینکه انتروکوک ها در دستگاه گوارش انسان وحیوانات کلنیزه شده و باعث بیماری می شوند لذا این باکتری ها از نظر دامپزشکی و بیماری های مربوط به دام نیز حائز اهمیت می باشند. این باکتری ها با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در حیوانات مولد غذا مقاومت را کسب کرده و باعث آلودگی گوشت و فرآورده های گوشتی شده و از این طریق به دستگاه انسان راه می یابند. در سال های اخیر مطالعات مشابه زیادی در دامپزشکی بر روی مقاومت به انتروکوک ها انجام شده است. اوبنگ[4] و همکارانش در سال ۲۰۰۸-۲۰۰۹ بر ایزوله های انتروکوک جمع آوری شده از جوجه ها در واحدهای پرورش مرغ استرالیا به بررسی پرداختند. از روش فنوتیپی آگاردایلوشن و روش ژنوتیپی PCR برای تشخیص ژن های مقاومت به اریترومایسین استفاده شده بود. مهمترین عامل مقاومت ژن *ermB* گزارش شده بود که مقاومت متقاطع با تایلوزین و لینکوزآمین ایجاد می کرد (۲۲). مطالعه دیگر در چین توسط لیو[5] و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر ۴۵۳ ایزوله انتروکوک از حیوانات مولد غذا انجام

[1] Zou

[2] Lopez
[3] Aarestrup
[4] Obeng
[5] Liu

Archive of SID

www.SID.ir

شد که مقاومت به اریترومایسین به روش آگاردایلوشن و PCR، ۷۲/۸٪ گزارش شده بود (۲۳).

## نتیجه گیری

نتایج این مطالعه و پژوهش مقاومت بسیار بالای انتروکوک های جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری را به اریترومایسن و شیوع بسیار زیاد ژن های *erm* به ویژه *ermB* را نشان می دهد. هر چند مقاومت دارویی به تنهایی توجیه کننده بیماری زایی انتروکوک ها نمی باشد وسایر خصوصیات بیماریزایی مانند توانایی اتصال،انتشار وفرار از سیستم ایمنی در کنار شاخص های مقاومت دارویی می تواند در این امر دخالت داشته باشد ولیکن باتوجه به سهولت انتقال ژن های بیماریزایی ومقاومت آنتی بیوتیکی درمیان سویه های انتروکوک نسبت به سایرباکتری های گرم مثبت؛ شناسایی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط های کلینیکی می تواند به عنوان یک خطر جدی تلقی گردد. همچنین نیاز به آنتی بیوتیک های جدید جهت جایگزینی آنتی بیوتیک های موثر فعلی برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها د.رآینده ای نزدیک دور از انتظار نیست . استخراج الگوی مقاومت و تعیین مکانیسم های مولکولی آن از طرف دیگرمی تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چند گانه و همچنین از نظر بررسی های اپیدمیولوژی و نیز از جنبه اقتصادی برای کاهش هزینه درمان می تواند موثر باشد.

Archive of SID

***References***

1. Geo FB, Karen CC, Janet SB, Stephen AM. Jawetz- Melnick & Adelborg's Medical Microbiology. 26th ed. United state: McGraw-Hill; 2013.
2. Harbarth S, Cosgrove S, Carmeli Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant *enterococci*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(6):1619–1628.
3. Feizabadi MM, Sayadi S, Shokrzadeh L, Parvin M, Yadegarynia D. Increase in prevalence of vancomycin resistant isolates of Enterococcous faecium at Labbafinejad hospital. Iranian J Clin Infect Dis2008; 3(2):73-77.
4. Lucia MT, Maria DA, Patricia LS. *Enterococcus.* In: JAMES V, KAREN C, CARROL GF, JAMES H (editors). Manual of clinical microbiology,Vol 1. 10th ed. Washington D.C. ASM Press; 2011.350-364
5. Arias CA, Murray BE: *Enterococcus species, Streptococcus bovis* group, and *Leuconostoc species*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Elsevier, 2010.
6. Murray PA, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7th ed. Saunders. Mosby: ELSEVIER Inc; 2013.
7. Schonfeld W, Kirst HA. Macrolide Antibiotics. Milestones in drug therapy. Birkhauser, Germany, 2002
8. Louis B. Rice, Robert A.Bonomo. Genetic and Biochemical mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Victor Lorian M.D (editor). Antibiotics in Laboratory medicine. 5th ed. edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 440-470.
9. Joseph DC, Yao, Robert C, Moellering JR. *Antibacterial agents.* In: JAMES V, KAREN C, CARROL GF, JAMES H (editors). Manual of clinical microbiology,Vol 1. 10th ed. Washington D.C. ASM Press; 2011. 1053-1055.
10. Sutcliffe J, Amelia TK , Wondrack L. Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system**.** Antimicrob Agents Chemother 1996 Aug;40(8):1817-1824.
11. Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, *et al*. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. New Microbiol 2011; 34(1):73-80.

www.SID.ir

12. Cauwerts K, Decostere A, De Graef EM, Haesebrouck F, Pasmans F. High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm(B) gene. Avian Pathol 2007; 36(5):395-399.
13. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. Pol J Microbiol 2008;57(2):173-178.
14. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide Resistance Genes in Enterococcus spp. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(4): 967–971.
15. Lim JA , Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. J Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49(3):489-495.
16. McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications**.** Emerg Infect Dis. 1997 Jul-Sep;3(3):311-317.
17. Kim J, Lee S, Choi S. Copper resistance and its relationship to erythromycin resistance in *Enterococcus* isolates from bovine milk samples in Korea. J Microbiol 2012, 50(3):540-543.
18. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes gene among isolates of *Enterococus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. Microb Drug Resist 2006;12(2):256-268.
19. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall C.G. Vancomycin-Resistant *Enterococci.*Clin. Microbiol Rev 2000;13: 680-707
20. Lopez F, Culebras E, Betriú C, Rodríguez-Avial I, Gómez M, Picazo JJ. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin-dalfopristin: level of quinupristin-dalfopristin resistance is not dependent on erm(B) attenuator region sequence. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 66(1):73-77.
21. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 37(2):127-137.
22. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Comparison of antimicrobial resistance patterns in *enterococci* from intensive and free range chickens in Australia. Avian Pathol 2013;42(1):45-54.
23. Liu Y, Liu K, Lai J, Wu C, Shen J, Wang Y. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. J Appl Microbiol 2013;114(2):555-563.

Archive of SID

www.SID.ir