

بررسی بیوشیمیایی و ژنتیکی انتروکوک های جدا شده از فاضلاب شهری تهران با تأکید بر سویه های دارای ژن *vanA* و *vanB*

فاتح رحیمی^۱، ملیحه طالبی^۲، مهناز سیفی^۲، محمد رضا پورشع^۳

۱. دانشجوی Ph.D میکروبیولوژی، عضو مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

۲. Ph.D میکروب شناسی، عضو مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

۳. Ph.D میکروبیشناسی، دانشیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات میکروب شناسی. تلفن: ۰۶۶۴۰۵۵۳۵، Pour@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: بهمن هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوکها فلور نرمال دستگاه گوارش بوده که مستقیماً یا از طریق فاضلاب وارد محیط می شوند. نقش آنها در ایجاد عفونت های بیمارستانی به سبب توانایی کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی بسیار حائز اهمیت می باشد. این پژوهش جهت تعیین تنوع بیوشیمیایی، ژنتیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی مقایسه ای میان آزمونهای بیوشیمیایی و ژنتیکی جهت شناسایی گونه های مختلف انتروکوک در فاضلاب شهری تهران صورت گرفته است.

مواد و روشها: ۷۱۲ ایزوله انتروکوک بر روی محیط *mEnterococcus agar* جداسازی و با آزمونهای مختلف بیوشیمیایی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه با آزمون *PCR* شناسایی شدند. آزمونهای تعیین حساسیت دارویی سویه ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک به انجام رسید. *MIC* سویه های مقاوم یا دارای مقاومت بینابینی به ونکومايسين بروش *Etest* تعیین گردید. الگوی پلاسمیدی و سویه های دارای ژن *vanA* و *vanB* معین گردیدند.

یافته ها: ۴۰۲، ۱۷۰، ۸۲، ۲۵، ۱۶، ۱۱، ۳، ۲ و ۱ سویه بترتیب *E. faecium*، *E. hirae*، *E. faecalis*، *E. gallinarum*، *E. mundtii*، *E. casseliflavus*، *E. raffinosus*، *E. dispar* و *E. avium* بودند.

مقاومت به آنتی بیوتیکهای ونکومايسين، جنتامایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، اریترومايسين و کلرامفنیکل بترتیب ۴، ۴، ۱۸، ۲۰، ۳۰ و ۶٪ بود. ۱۹ ایزوله مقاوم ($MIC \geq 512 \mu g/ml$) به ونکومايسين بوده و دارای ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف بودند. ۱۰۰٪ دارای ژن *vanA* و ۳۲٪ نیز دارای ژن *vanB* بودند. نتایج آزمون *PCR* در مورد تمامی گونه ها بطور ۱۰۰٪ منطبق بر نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بودند.

نتیجه گیری: علیرغم تنوع بسیار بالای انتروکوکها در فاضلاب شهری تهران اما سویه های مقاوم تماماً محدود به *E. faecium* بودند. تمامی سویه های مقاوم دارای ژن *vanA* بودند و فراوانی ژن *vanB* بیشتر از گزارشات دیگر بود. *PCR* برای شناسایی سویه های مختلف انتروکوکوس، روشی اختصاصی، سریع، مطمئن و برتر در مقایسه با آزمونهای بیوشیمیایی بوده و از اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ برخوردار می باشند.

واژگان کلیدی: انتروکوک، *vanA*، *vanB*، پلاسمید، فاضلاب، تهران

مقدمه

شوند. این باکتریها زمانیکه از طریق فاضلاب وارد محیط شوند می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند (۴-۱).
E. faecalis و *E. faecium* به ترتیب عامل حدود ۹۰-۸۰ درصد و ۱۵-۵ درصد کل عفونتهای انتروکوکوی هستند سایر انتروکوک ها مثل *E. avium* و *E. raffinosus* به ندرت عفونتهای انتروکوکوی ایجاد می کنند (۷-۳).

انتروکوک ها فلور همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات بوده که مستقیماً یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند نقش مهمی در ایجاد و تداوم عفونتهای بیمارستانی داشته باشند (۱ و ۲). این باکتریها از مهمترین عوامل ایجاد اندوکاردیت و عفونتهای ادراری بوده؛ همچنین از دهه ۱۹۷۰ به عنوان عامل رایج عفونتهای دستگاه تنفسی محسوب می

بیوتیک های مختلف بویژه ونکومایسین و همچنین بررسی مقایسه ای میان آزمونهای بیوشیمیایی و ژنتیکی در میان گونه های مختلف انتروکوک؛ جهت استفاده از یک روش سریع و اختصاصی بمنظور شناسایی گونه های مختلف صورت گرفته است.

روش کار

جهت انجام این بررسی در طی ۲۱ ماه از مهر ماه سال ۱۳۸۳ لغایت خرداد ماه ۱۳۸۵، ۱۰ مرتبه نمونه گیری از چهار تصفیه خانه فاضلاب شهر تهران بنامهای شهرک اکباتان، شوش، صاحبقرانیه و جنوب انجام گرفت؛ و در مجموع ۲۸۲ نمونه از فاضلاب ورودی، ۲۱۱ نمونه از فاضلاب لجن و ۲۱۹ نمونه از فاضلاب خروجی بدست آمد.

برای جدا سازی و شناسایی ایزوله ها ۲۰۰ میلی لیتر نمونه از عمق ۱۰۰-۳۰ سانتیمتری هر یک از حوضچه های فاضلاب ورودی، خروجی و لجن گرفته شده و در بطری های استریل ۲۵۰ میلی لیتر جمع آوری شد. تمامی نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران منتقل؛ و در کمتر از ۲ ساعت مورد بررسی های بعدی قرار گرفتند (۴و۱).

سپس بر اساس روشی که توسط Mollby و همکاران سابقا شرح داده شده (۴و۲)، ابتدا نمونه های بدست آمده از تمامی حوضچه های فاضلاب رقیق شده و از هر رقت نیز به اندازه ۱۰۰ میلی لیتر نمونه تهیه گردید. در این روش از سیستم فیلتراسیون (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) و فیلترهایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استفاده گردید و رقتهای بدست آمده از هر نمونه با کمک این سیستم فیلتر شدند. سپس فیلترها به محیط اختصاصی mEnterococcus agar (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) منتقل شده و بمدت ۴۸ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

سپس فیلترها به پلیتهای حاوی محیط bile esculin agar منتقل شده و بمدت ۲ ساعت در در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند (۴و۲و۱). ۲۴ کلنی سیاه رنگ در هر پلیت حاوی محیط bile esculin agar انتخاب و جهت بررسی های بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند.

تمامی ایزوله ها با استفاده از آزمونهای قابلیت رشد در دماهای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد و محیط نمک ۰/۶/۵؛ همچنین آزمون های کاتالاز و درجه سانتیگراد و محیط نمک ۰/۶/۵؛ همچنین آزمون های کاتالاز منفی بودند و همچنین قابلیت رشد در محیط نمک ۰/۶/۵ و دماهای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد را داشتند، تحت عنوان جنس انتروکوکوس انتخاب گردیدند.

سپس این سویه ها با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی تخمیر قندهای L-arabinose, D-sorbitol, D-manitol, L-sorbose, lactose, sucrose, methyl- α -D-glucopyranoside, Arginine, هیدرولیز Hippurate, هومولیز، آزمون حرکت، آزمون بررسی وجود یا عدم وجود پیگمان، آزمون احیاء Tetrazolium شناسایی شده و گونه های آنها نیز معین گردید (۱۳و۱۲).

در تمامی آزمونهای فوق الذکر از کنترلهای مثبت و منفی E. faecalis ATCC 29212, E. faecium BM4147 E. gallinarum BM14974, E. hirae, E. casseliflavus, E. mundtii حصول اطمینان از صحت عملکرد هر یک از آزمونها استفاده شد.

انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین نخستین بار از انگلیس و فرانسه در سال ۱۹۸۸ گزارش شدند، اما امروزه از بسیاری از نقاط دنیا نیز گزارش می شوند. اولین گزارشات در مورد انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین (دارای ژنوتایپ vanA) در E. faecium مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانتین بود (۵). سپس E. faecium مقاوم به ونکومایسین که واجد ژنوتایپ vanB بود از بیماران در ایالت میسوری در سال ۱۹۸۷ جدا شد. در سال ۱۹۹۰ عفونت های ناشی از انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان هایی در شمال شرق و غرب امریکا گزارش گردید. تا سال ۱۹۹۴ بسیاری از بیمارستانهای امریکا این سویه های مقاوم را جدا سازی نمودند (۵). فنوتایپ vanA به مقادیر بالای ونکومایسین و مقادیر متوسط تا زیاد تیکوپلانتین مقاوم است، که این مقاومت قابل انتقال می باشد. در فنوتایپ vanB مقاومت به مقادیر کم تا زیاد ونکومایسین و حساسیت به تیکوپلانتین مشاهده می شود. این مقاومت هم القایی و هم انتقال پذیر می باشد (۴-۱).

در مواردیکه میزان شیوع عفونتهای انتروکوک پایین است، غربالگری Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) در نمونه های روده ای بمنظور بررسی میزان شیوع گونه های انتروکوک رایج در جامعه و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها، یک پروسه بسیار مشکل می باشد (۴و۲). با در نظر گرفتن این مطلب که فاضلاب مجموعه ای از مدفوع هر یک از ساکنین آن منطقه در یک شبانه روز می باشد بنابراین جستجو در نمونه های فاضلاب شهری و بیمارستانی بعنوان یک روش جایگزین جهت غربالگری سویه های انتروکوک می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. فاضلاب حاوی تعداد بسیار زیادی از باکتری های با منشاء روده ای بوده و سهولت نمونه گیری باعث افزایش شانس جدا سازی سویه ها با تنوع بیشتر می گردد، پس بطور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرند (۴).

انتروکوک ها دارای قابلیت کسب مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف می باشند. وجود مقاومت ذاتی انتروکوک ها به بسیاری از آنتی بیوتیک های معمول، سبب می شود که در زمان درمان عفونت های سایر باکتری ها و عفونت های انتروکوک، سویه های با مقاومت چندگانه (MDR) در روده زیاد شده و جمعیت غالب موجود در آن منطقه را به خود اختصاص دهند. بنابراین امکان دریافت ژنهای مقاوم به مقادیر بالای آمینوگلیکوزیدها، پنی سیلین، تتراساکلین و ونکومایسین برای آنها فراهم می گردد (۸).

انتشار انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین باعث انتشار کلونال یک سویه مقاوم واحد و انتقال ژنتیکی ترانسپوزونها و پلاسمیدهای مقاوم بین سویه ها و حتی بین گونه های مختلف می شود. چنانکه سویه های استاف اورئوس مقاوم به ونکومایسین با ژنوتایپ vanA در امریکا گزارش شده است (۹و۱۰).

وجود مکانیسم های مختلف برای Conjugation (هم یوغی) می تواند از دلایل کسب مقاومت های چند گانه آنتی بیوتیکی در انتروکوک ها باشد (۱۱و۳). پلاسمید ها عوامل خارج کروموزومی هستند که در طی فرآیند کانجوگاسیون موجب انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک ها می گردند. اکثر موارد مقاومت در E. faecium مشاهده می شود که اغلب به آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام ها و نیز ونکومایسین مقاوم است. البته مقاومت ضد میکروبی به مقدار کمتر در سویه های دیگر مثل E. faecalis نیز به چشم می خورد.

این پژوهش جهت تعیین تنوع بیوشیمیایی و ژنتیکی انتروکوکهای موجود در فاضلاب شهر تهران و بررسی میزان مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

گونه	Sequence (5'-3')	منبع	اندازه محصول (bp)
<i>E. faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	۱۷	۶۵۸
<i>E. faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	۱۷	۹۴۱
vanA	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	۱۷	۱۰۳۰
vanB	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCTCTGCAAAAAA	۱۷	۴۳۳
<i>E. faecium</i>	CGAATTTAAATTCAGCAATTGA CTTTCCTCCATCAATGGAG	این مطالعه	۳۵۹
<i>E. faecalis</i>	ATGTGACTAACTTAAACGCGAG AATCTTGGTTGGTGTGAA	این مطالعه	۳۴۷
<i>E. gallinarum</i>	TTACTTGGCTGATTTTGATTTCG TGAATTCCTCTTGAATTCAG	۱۷	۱۸۹
<i>E. hirae</i>	TAAATCTCTCCTTAAATGTTG CTTCTGATATGGATGCTGT	۱۸ این مطالعه	۱۸۶
<i>E. casseliflavus</i>	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG TTAGCAGACTTTTCTCTGTAC	۱۸ این مطالعه	۲۵۲
<i>E. mundtii</i>	CAGACATGGATGCTATCCATCT AGGTTTCTTGCCTCCATCAAT	۱۸ این مطالعه	۳۰۱
<i>Enterococcus genus</i>	TTAAAACCATTAGCGGATCG CCCATNCCATNGANGRTCCAT	۱۹	۱۰۰

یافته ها

بر اساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی مختلف مربوط به تعیین جنس و گونه انتروکوکوس، از ۷۱۲ ایزوله انتروکوکوس بدست آمده در طی ۱۰ مرتبه نمونه گیری از چهار تصفیه خانه بزرگ شهر تهران در طی این مطالعه، در مجموع ۹ گونه مختلف انتروکوکوس شناسایی گردید. توزیع فراوانی کلیه سویه های مختلف متعلق به جنس انتروکوکوس در جدول شماره ۲ آورده شده است. تمامی سویه های مورد بررسی در این پایان نامه از چهار تصفیه خانه شهرک اکباتان، صاحبقرانیه، شوش و جنوب در سه نقطه شمال، جنوب و غرب شهر تهران جداسازی شده است. در جدول شماره ۳ نیز درصد فراوانی هر یک از گونه های مختلف انتروکوکوس در چهار تصفیه خانه فاضلاب دیده می شود. اختلاف معنی داری در میزان آلودگی و شیوع باکتری در تصفیه خانه های مختلف دیده نشد. تمامی ۷۱۲ ایزوله مختلف انتروکوکوس در طی ۱۰ مرتبه نمونه گیری در بازه های زمانی مختلف از مهرماه ۱۳۸۳ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ جداسازی شده اند. در جدول شماره ۴ میزان شیوع سویه های مختلف انتروکوکوس بر حسب بازه زمانی در تصفیه خانه های مختلف نشان داده شده است. بر اساس اطلاعات بدست آمده از این جدول، مشخص گردید که *E. faecium* در تمامی نمونه گیریها وجود داشته است و بعنوان سویه غالب در این ۱۰ مرتبه نمونه گیری مطرح بوده است. پس از آن، *E. faecalis* در ۹ مرتبه، *E. hirae* در ۶ مرتبه، *E. gallinarum*، *E. mundtii* و *E. casseliflavus* در ۵ مرتبه و گونه های *E. raffinosus*، *E. dispar* و *E. avium* نیز هر کدام تنها در یک مرتبه نمونه گیری جداسازی شده اند. اختلاف معنی داری در میزان شیوع گونه های مختلف باکتری در دفعات مختلف نمونه گیری مشاهده شد.

با استفاده از ۶ آنتی بیوتیک (۳۰ میکروگرم) tetracycline، (۳۰ میکروگرم) erythromycin، (۱۵ میکروگرم) gentamicin، (۱۲۰ میکروگرم) ciprofloxacin (۵ میکروگرم) و chloramphenicol (۳۰ میکروگرم) BBL (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA) روش disk diffusion و با استفاده از استانداردهای CLSI (Clinical Laboratory and Standard Institute)، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی هر سویه مشخص گردید (۱۴). سپس سویه هایی که نسبت به آنتی بیوتیک vancomycin مقاوم و یا دارای مقاومت بینابینی بودند؛ جهت انجام آزمون MIC انتخاب گردیدند (۱۵) و هم چنین مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها نسبت به سه آنتی بیوتیک amikacin (۳۰ میکروگرم)، streptomycin (۳۰۰ میکروگرم) و ampicillin (۱۲۰ میکروگرم) و disk diffusion تعیین گردید. بر اساس استانداردهای CLSI؛ MIC سویه های منتخب به روش Etest انجام شد، و سویه های مقاوم (MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$) دارای مقاومت بینابینی (MIC = 8-16 $\mu\text{g/ml}$) و حساس (MIC $\leq 4 \mu\text{g/ml}$) تعیین گردیدند (۱۵). در انجام آزمونهای disk diffusion و MIC از دو سویه استاندارد *E. faecalis* ATCC 51299 و *E. faecalis* ATCC 29212 بعنوان شاخصهای مقاومت و حساسیت به ونکومایسین استفاده گردید. در این مطالعه استخراج پلاسمید به روش کیت QIA Prep Spin (QIA GENE, Hilden, Germany) انجام شد. سپس محصولات در یک ژل آگارز ۰/۸٪ و همچنین ۰/۵ X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer الکتروفرز شده و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم برامید با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی وجود ژنهای مقاومت vanA و vanB که بر روی پلاسمید قرار دارند، از پلاسمید استخراج شده بعنوان الگوی DNA استفاده گردید و ۲ میکرولیتر از پلاسمید به Master Mix اضافه شد. جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی جنس و همچنین گونه های مختلف انتروکوکوس و ژنهای مقاومت به ونکومایسین، استخراج DNA بروش Boiling انجام گرفت (۱۶). بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ورتکس شده و بمدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی جهت انجام آزمون PCR به Master Mix متشکل از مواد زیر اضافه شد: ۱۰ PCR Buffer، ۰/۵ Unit taq DNA polymerase (HT Biotechnology, Cambridge, United Kingdom)، ۱/۲ μM MgCl_2 ، ۰/۶۴ μM dNTP، ۱/۶ μM primer جهت انجام آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی (ژن آنزیم superoxide dismutase و همچنین ژن کد کننده آنزیم D-alanine- D-alanine ligases (جدول شماره ۱) و برنامه حرارتی (4 95°C (min), 30 cycles [95°C (30s), 52°C (1 min), 72°C (1 min)], 72°C for 7 min. در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Hamburg, Germany) استفاده شد (۱۷). سپس محصولات در یک ژل آگارز ۰/۵٪ و همچنین ۰/۵ X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer الکتروفرز شده و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم برامید با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از سویه های *E. faecalis* V583 (vanB) and *E. faecium* BM4147 (vanA) و همچنین *E. faecalis* ATCC 29212، *E. gallinarum* BM14974، *E. hirae*، *E. casseliflavus*، *E. mundtii* بعنوان سویه های کنترلی استفاده شد.

مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از این آزمون نیز کاملاً و بطور ۱۰۰٪ منطبق بر نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بود (شکل شماره ۲). پس از بهینه سازی و انجام آزمون PCR بر روی سویه های فوق، محصول PCR ژن vanA با وزن ملکولی ۱۰۳۳ جفت باز و محصول PCR ژن vanB با وزن ملکولی ۴۳۳ جفت باز حاصل گردید (شکل شماره ۳). جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی ژنهای مقاومت، از دو الگوی DNA استفاده گردید. ۱. پلاسمید استخراج شده با استفاده از کیت، ۲. DNA استخراج شده بروش boiling. در ابتدا آزمون PCR در مورد تمامی سویه های VRE با استفاده از پلاسمید حاصل بعنوان الگوی DNA، انجام گرفت. تمامی سویه های VRE واجد ژن vanA بودند. سپس آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج شده بروش boiling انجام گرفت. در بررسی ژن مقاومت vanB معین گردید که این ژن در برخی از سویه ها کروموزومی و در برخی نیز پلاسمیدی بود.

جدول ۲. توزیع فراوانی گونه های مختلف مربوط به جنس

انتروکوکوس

گونه انتروکوکوس	تعداد	درصد
<i>E. faecium</i>	۴۰۲	۵۶
<i>E. hirae</i>	۱۷۰	۲۴
<i>E. faecalis</i>	۸۲	۱۲
<i>E. gallinarum</i>	۲۵	۳/۵
<i>E. casseliflavus</i>	۱۶	۲
<i>E. mundtii</i>	۱۱	۱/۵
<i>E. raffinosus</i>	۳	۰/۵
<i>E. dispar</i>	۲	۰/۳
<i>E. avium</i>	۱	۰/۲
جمع	۷۱۲	۱۰۰

جدول ۳. درصد فراوانی گونه های مختلف جنس انتروکوکوس بر

حسب تصفیه خانه محل جداسازی

تصفیه خانه	جنوب	شوش	صاحبقرانیه	شهرک اکباتان	انحراف معیار
<i>E. faecium</i>	۶۴/۸	۶۲/۸	۴۷/۹	۵۵/۳	۷/۹
<i>E. hirae</i>	۲/۹	۱۳/۷	۲۵/۳	۳۰/۱	۱۲/۱
<i>E. faecalis</i>	۸/۸	۱۵/۳	۱۸/۵	۸/۷	۴/۸
<i>E. gallinarum</i>	۱۹/۱	۰	۱/۷	۲/۵	۸/۹
<i>E. casseliflavus</i>	۱/۵	۵/۶	۰/۸	۱/۸	۲/۱
<i>E. mundtii</i>	۲/۹	۰	۳/۳	۱/۳	۱/۵
<i>E. raffinosus</i>	۰	۰	۲/۵	۰	۱/۲
<i>E. dispar</i>	۰	۱/۶	۰	۰	۰/۸
<i>E. avium</i>	۰	۰	۰	۰/۳	۰/۱

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بروش disk diffusion نشان داد که ۳۴٪ نمونه ها مقاوم به اریترومايسين، ۲۰٪ مقاوم به تتراسایکلین، ۱۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۶٪ مقاوم به کلرامفنیکل، و ۳٪ نمونه ها نیز مقاوم به آنتی بیوتیکهای ونکومايسين و جنتاميسين بودند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين مشاهده می گردد. آنتی بیوتیکهای ونکومايسين و جنتاميسين نیز از پایینترین میزان مقاومت برخوردار می باشند. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از گونه های مختلف انتروکوکوس در جدول شماره ۵ آورده شده است. همانگونه که از این جدول بر می آید، تمامی گونه های مختلف انتروکوکوس باستثناء *E. faecium* فاقد مقاومت به ونکومايسين بودند. *E. avium* تنها گونه ای بود که نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مذکور حساس بود و *E. dispar* نیز تنها نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بود. *E. hirae* و *E. raffinosus* نیز بترتیب نسبت به ۲ و ۳ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. علیرغم اینکه *E. hirae* دومین گونه غالب در فاضلاب شهری تهران بوده است اما با این وجود از حساسیت فوق العاده بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف برخوردار بود. علیرغم اینکه بیشتر گونه های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل حساس بودند اما سه گونه *E. gallinarum* و *E. casseliflavus* و *E. mundtii* نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین بالاترین میزان مقاومت نسبت به جنتاميسين در میان گونه های مختلف نیز متعلق به *E. mundtii* بود. پس از بررسی مقاومتهای آنتی بیوتیکی مختلف در میان ۷۱۲ سویه انتروکوکوس، معین گردید که ۱۹ سویه مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومايسين بودند. پس از شناسایی سویه های مقاوم به ونکومايسين، میزان مقاومت آنها نسبت به سه آنتی بیوتیک streptomycin, amikacin, ampicillin نیز بروش دیسک دیفیوژن معین گردید ۱۰۰٪. سویه های *E. faecium* مقاوم به ونکومايسين، نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین، ۸۹٪ سویه های نیز مقاوم به آنتی بیوتی کهای آمپی سلین و جنتاميسين، ۵۸٪ سویه ها مقاوم به کلرامفنیکل و ۵۳٪ نیز مقاوم به استرپتومايسين بودند. پایینترین مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین دیده شد (۳۳٪). ۶۵ سویه مختلف انتروکوکوس بروش Disc Difusion انتخاب و MIC آنها مشخص شد. سویه هایی که MIC آنها برابر یا بیش از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر بود، جهت بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. پس از انجام آزمون MIC معین گردید که ۱۹ سویه دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به ونکومايسين بودند. ($MIC \geq 512 \mu g/ml$). همچنین ۸ سویه نیز مقاومت بینابینی نسبت به ونکومايسين داشتند. ($MIC = 8 \mu g/ml$) و ۳۸ سویه نیز حساس به ونکومايسين بودند ($MIC > 4 \mu g/ml$). در تمامی سویه هایی که دارای مقاومت بینابینی بودند میزان MIC آنها $8 \mu g/ml$ بود. در میان سویه های حساس نیز ۱۲ سویه دارای $MIC < 2 \mu g/ml$ و ۲۵ سویه نیز دارای $MIC < 4 \mu g/ml$ بودند. در این پژوهش، پلاسمید مربوط به ۶۵ سویه مختلف انتروکوکوس (مقاوم به ونکومايسين یا دارای مقاومت بینابینی) استخراج گردید. نکته قابل توجه در این میان، وجود الگوی متنوع پلاسمیدی در میان سویه های *E. faecium* مقاوم به ونکومايسين بود. در حالیکه در میان سویه های حساس به ونکومايسين هیچگونه باند پلاسمیدی مشاهده نگردید. همانگونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می گردد، ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف در میان ۱۹ سویه مقاوم به ونکومايسين دیده می شود.

پس از شناسایی جنس و گونه های مختلف انتروکوکوس با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی، صحت عملکرد آزمونهای بیوشیمیایی با استفاده از آزمون PCR

جدول ۵. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از گونه های مختلف

انتروکوکوس

گونه های انتروکوکوس	کلرامفنیکل	سپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامیسین	تتراسایکلین	ونکومایسین
<i>E. faecium</i>	۱۰	۲۴	۵۴	۴	۲۲	۵
<i>E. hirae</i>	۰	۳	۲	۰	۲	۰
<i>E. faecalis</i>	۲	۱۲	۹	۲	۴۱	۰
<i>E. gallinarum</i>	۴	۱۲	۱۲	۰	۱۶	۰
<i>E. casseliflavus</i>	۶	۱۳	۵۰	۰	۲۵	۰

بحث

با انجام این تحقیق مشخص گردید که، شیوع گونه های انتروکوکی در سیستم فاضلاب شهر تهران از تنوع بسیار بالایی برخوردار می باشد. این تنوع جداسازی گونه ها در مطالعات مشابه نیز دیده می شود (۱۶ و ۳۰ و ۱۶ و ۳۰).

در این مطالعه بیشترین سویه جدا شده *E. faecium* بود، این نتایج منطبق بر مطالعات مشابه می باشد. در بیشتر مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان نیز همواره *E. faecium* بالاترین شیوع را داشته است (۱۶ و ۳۰ و ۱۶ و ۳۰). اما در مواردی نیز عکس این قضیه دیده می شود (۲۱). *E. hirae* دومین سویه غالب در فاضلاب شهری تهران بوده است؛ در سایر مطالعات انجام گرفته، کمتر دیده شده است که *E. hirae* از شیوع بالایی برخوردار باشد. اما در برخی از مطالعات نیز گزارشاتی از شیوع این سویه مشاهده شده است (۲ و ۲۳ و ۲۳).

بطور کلی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در فاضلاب شهری تهران در حدود ۳٪ می باشد. میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین در سایر کشورها نیز تا حدودی متفاوت می باشد. بعنوان مثال میزان مقاومت در کشورهای اسپانیا، زلاندو، فرانسه، آمریکا و پرتغال بترتیب ۴، ۰، ۶، ۴ و ۲۰٪ گزارش شده است (۱ و ۱۶ و ۲۱ و ۲۴ و ۲۵). Kuhn و Iversen نیز نشان دادند که میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین بترتیب در کشورهای اروپایی و همچنین سوئد بترتیب ۱۱-۸ و ۳٪ بود (۲ و ۴).

تمامی این اطلاعات نشان دهنده وجود اختلاف در فرکانس VRE ها در کشورهای مختلف و محلهای جداسازی مختلف می باشد. علیرغم اینکه در تمامی کشورهای جهان گزارشاتی از وجود گونه های مختلف انتروکوک مقاوم به ونکومایسین نظیر *E. faecalis* و *E. hirae* وجود دارد (۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۲۳ و ۲۶)، اما در این بررسی و در فاضلاب شهری تهران ما تنها توانستیم گونه *E. faecium* را جداسازی نماییم. که این امر خود می تواند نشان دهنده عدم جود انتقال ژنهای مقاومت به ونکومایسین در میان گونه های مختلف انتروکوکوس باشد که در کشورهای مختلف گزارش شده است (۲۷).

از نظر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف، مشابه با دیگر کشورها مقاومت نسبت به کلرامفنیکل (۲۰ و ۲۴ و ۲۶) با درصد پایین و مقاومت نسبت به جنتامایسین با درصد بالا در این مطالعه مشاهده می شود (۲۲ و ۲۴). همچنین مقاومت به اریترومایسین از شیوع بالایی برخوردار بوده و فراتر از سایر کشورها می باشد (۱۲ و ۲۰ و ۲۱ و ۲۲ و ۲۴ و ۲۶) که بنظر می رسد که ناشی از مصرف بالای این آنتی بیوتیک در خوراک دامها باشد.

در ارتباط با الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و همچنین محل جداسازی نمونه ها ارتباط معنی داری با الگوی پلاسمیدی مشاهده می گردد. به این ترتیب، الگوی پلاسمیدی خاصی در نمونه هایی که از یک تصفیه خانه بدست آمده، تکرار شده است. این مسأله در مورد الگوهای مقاومتی خاصی نظیر مقاومت به ونکومایسین، شکل دیگری بخود گرفته است. بطور کلی از آنجایی که ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف در این ۱۹ سویه مشاهده می گردد، الگوهای این سویه ها که از تصفیه خانه های مختلف جداسازی شده اند با یکدیگر متفاوت می باشد. به این ترتیب احتمال گسترش کلونال این سویه ها درک می گردد. در ارتباط با تصفیه خانه های مختلف نیز اگر تعداد سویه های مقاوم بدست آمده از همه یکسان بود، امکان قضاوت صحیح تری وجود داشت. در این مطالعه بیشتر نمونه ها متعلق به تصفیه خانه شهرک اکباتان می باشد.

آنچه از بررسی استخراج پلاسمید سویه ها استنباط می گردد، این است که روش استخراج پلاسمید با توجه به حساسیت این روش، تکرار پذیری و دقت آن می تواند بعنوان یک روش قابل قبول در بررسی های اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. در مورد تکرار پذیری آن، با انجام استخراج پلاسمید در دفعات مختلف بر روی سویه های فاقد پلاسمید و یا سویه های دارای چندین باند پلاسمیدی مختلف و مشاهده الگوی یکسان در تمامی دفعات تکرار، می توان گفت که با رعایت شرایط می توان به الگوهای بدست آمده استناد نمود.

امروزه در کشورهای مختلف جهان روشهای بیوشیمیایی بعنوان معمولترین و ساده ترین روشها جهت شناسایی باکتریها مورد استفاده قرار می گیرند. این روشها علیرغم ساده و قابل دسترس بودن و همچنین عدم نیاز به امکانات پیچیده و دستگاه های خاص در عین حال دارای معایبی نیز می باشند. از آنجمله، این روشها زمانبر بوده و از دقت کافی نیز برخوردار نمی باشند (۱۸). این اشکال در مورد سویه های بدست آمده از نمونه های محیطی و مواد غذایی بیشتر نمایان می گردد. در طبیعت باکتریها بر خلاف محیط داخلی بدن و آزمایشگاه از تمامی امکانات لازم جهت رشد و تکثیر خود برخوردار نیستند و تقریباً همواره به حالت گرسنه بسر می برند. بنابراین سیستمهای تخمیری قندهای مختلف را که بصورت اپرونی می باشند را خاموش و روشن می نمایند.

اما در مقابل، PCR بدلیل سرعت و دقت بالا روش بهتری جهت تشخیص می باشد. البته باید توجه داشت که PCR نیز روشی هزینه بر بوده و نیازمند استفاده از مواد و دستگاه های خاصی می باشد. همچنین جهت استخراج DNA کلنی باکتری مورد نظر باید خالص باشد؛ زیرا در غیر اینصورت و در صورت آلودگی ممکن است که در هنگام آزمون باعث ایجاد باندهای اضافی و ناخواسته در واکنش شود (۱۸). اما علیرغم تمامی موارد گفته شده، PCR یک روش بسیار اختصاصی است و با سرعت بسیار زیادی در مقایسه با آزمونهای بیوشیمیایی می تواند با شناسایی ژن مورد نظر، منجر به شناسایی جنس یا گونه باکتری گردد.

ترکیدی و پوسیدگی لوله ها منجر به راه یافتن فاضلاب و ارگانیسهای پاتوژن همراه آن به آبهای زیر زمینی و سطحی می گردد. با انتقال VRE به آبهای سطحی و همچنین مصرف این آبها سلامت عمومی جامعه نیز ممکن است در معرض تهدید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی کشور به انجام رسیده است. همچنین نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از Dr. Patrice Courvalin از انستیتو پاستور فرانسه که در تهیه سوشهای کنترلی همکاری نمودند، اعلام می نماید.

در بیشتر مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان، بیشتر سویه ها یا دارای ژن vanA بودند یا ژن vanB و کمتر این دو ژنوتایپ با یکدیگر گزارش شده است. میزان شیوع ژن vanA در کشورهای مختلف در حدود ۱۰۰-۵۷٪ گزارش شده است (۲۰۱۶و۲۰۱۷و۲۰۱۸و۲۰۱۹و۲۰۲۰و۲۰۲۱و۲۰۲۲و۲۰۲۳و۲۰۲۴و۲۰۲۵). همچنین میزان شیوع ژن مقاومت vanB نیز در کشورهای پرتغال، سوئیس و ایتالیا بترتیب در حدود ۱۳، ۱۴ و ۲۳٪ گزارش شده (۲۸و۲۲و۲۴) و در سایر نقاط نیز گزارشی از شیوع آن وجود ندارد (۲۰۱۶و۲۰۱۷و۲۰۲۱و۲۰۲۲). در سال ۲۰۰۵ در آمریکا از مجموع ۲۴۸ سویه مورد بررسی، دو سویه واجد هر دو ژن vanA و vanB بودند (۲۹).

نتیجه گیری

به رغم اینکه فاضلاب از طریق سیستم های لوله کشی و جمع آوری مرکزی جمع آوری می شود؛ اما کوچکترین نقصی در این سیستم و یا

REFERENCES

1. Harwood JV, Brownell M, Perusek W, et al. Vancomycin-Resistant Enterococcus spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:4930-4933.
2. Kuhn I, Iversen I, Finn M, et al. Occurrence and relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci in Animals, Humans, and the Environment in Different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:5383-5390.
3. Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:513-522.
4. Iversen A, Kuhn I, Franklin A, et al. High Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Swedish Sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:2838-2842.
5. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:686-707.
6. Wood, JJA. Vancomycin Resistant Enterococci. *N Eng J Med.* . 2000; 342:710-721.
7. Magi G, Capretti R, Paolletti, C, et al. Presence of vanA-carrying pheromone response plasmid (PBRG1) in a clinical isolate of Enterococcus faecium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1571-1576.
8. Noble WC, Virani K Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 93:195-198.
9. Erdem I, Cicek-senturk G, Yucesoy-dede B, et al. In vitro effect of levofloxacin and vancomycin combination against high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23:92-94.
10. Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, et al. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:428-438.
11. Wirth R. Sex pheromones and gene transfer in Enterococcus faecalis. *Res Microbiol.* 2000; 151:493-496.
12. Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus Species Isolated from Human Infections by a conventional Test Scheme. *J Clin Microbiol.* 1998; 27:731-734.
13. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus Spp. With a Biochemical key. *Apple Environ Microbiol.* 1999; 65:4425-4430.

14. National committee for clinical Laboratory standard. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerubically. Approved standard. M7-A5. MIC testing. NCCLS.Villanova, Pa.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement, vol. 21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
16. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:620-635.
17. Kariyama R., Mitsuata R, Chow jw, et al. Simple and reliable Multiplex PCR for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3092-3095.
18. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:3558-3565.
19. Teng LJ, Hsueh P, Wang YH., et al. Determination of *Enterococcus faecalis* groESL Full-Length Sequence and Application for Species Identification . *J Clin Microbiol.* 2001; 9:3326-3331.
20. Stobringh E, Bogaard A, London N, et al. Enterococci with Glycopeptide resistance in Turkey, turkey farmers, turkey slaughters and urban residents in the south of the Netherlands, evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:2215-2221.
21. Manson JM., Smith JMB, Cook GM. Persistence of Vancomycin-Resistant Enterococci in New Zealand Broilers after Discontinuation of avoparcin use. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:5764-5768.
22. Liassine N, Frei R, Jan I, et al. Charactrization of glycopeptide-resistant enterococci from Swiss hospital. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1853-1858.
23. Blanch AR, Caplin JL, Iversen A, et al. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J Appl Microbiol.* 2003; 94:994-1002.
24. Novais C, Couque TM, Ferreira H, et al. Environmental contamination with Vancomycin- Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:3364-3368.
25. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, et al. vanA- mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. In sewage. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994; 33:553-561.
26. Khan SA, Nawaz MS., Khan AA, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. From poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol Cel probes.* 2005; 19:27-34.
27. Murray BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4:37-47.
28. Miele A, Bandera M, Doldestein B. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in Enterococci and to study gene organization in vanA isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:1772-1778.
29. Domingo MC, Huletsky A, Giroux R, et al. High prevalence of glycopeptide resistance genes vanB, vanD, and vanG not associate eith Enterococci in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:4784-47.