Archive of SID

Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 17, No. 2, Summer 2017, Pages 164-173

Antibiotic Resistance Pattern and Identification of Vancomycin Resistance Genes in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in Southern Fars province

Hosseini F[1], Kargar M[1]*

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Fars, Iran
Corresponding author. Tel: +987154336703, Fax: +987154372010, E-mail: mkargar@jia.ac.ir

Received: Dec 21, 2016 Accepted: May 10, 2017

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

ABSTRACT

Background & objectives: *Enterococcus* spp. are predominant in the faecal microflora which enter the environment directly or through wastewater. These bacteria play an important role in the development of nosocomial infections due to their ability to acquire resistance genes and their transmission to other bacteria, particularly *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to identify the prevalence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) and to detect *van A*, *van B* and *van C1/C2* genes in VRE strain isolated from environmental samples of the in southern Fars province.

Methods: This cross-sectional study was carried out on 155 *Enterococcus* spp isolates collected from environmental samples (hospital wastewaters and surface waters) in different areas of Larestan and Jahrom cities. Isolates were identified and confirmed as *Enterococcus* spp. using the membrane filtration method, selective growth on Kenner Fecal Streptococcus Agar (KF) medium and biochemical tests. The disk diffusion test and Macro Broth dilution method based on CLSI guidelines were used to determine antimicrobial susceptibility against conventional antibiotics and vancomycin and to measure the minimum inhibitory concentration (MIC), respectively. Finally, the presence of *van A*, *van B* and *van C1/C2* genes in VRE strains was determined by multiplex PCR technique.

Results: Out of all of *Enterococcus* spp. isolates, 41 cases (26.45%) were belonged to *E.faecalis*, 6 cases (3.87%) to *E.faecium* and 108 cases (69.68%) to non-*faecalis* and non-*faecium*. In total, 46 isolates (29.67%) were resistant to vancomycin and 4 isolates showed MIC ≥128 µg/ml. Resistant to all types of antibiotics was observed in 4 isolates (8.70%). Further, 2 isolates (50%) had *vanA* gene and 2 isolates (50%) had *vanB* gene, but *vanC1/C2* genes were detected in none of them.

Conclusion: The results indicated that the VRE strains are widespread in the studied area, therefore there is an urgent need for prudent use of vancomycin and implementation of control measures to prevent the environmental spread of VRE strains.

Keywords: *Enterococcus;* Nosocomial Infections; Vancomycin; Antibiotic Resistance.

www.SID.ir

Archive of SID

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین ژن‌های مقاومت به ونکومایسین در ایزوله‌های *انتروکوک* جداشده از نمونه‌های محیطی جنوب استان فارس

فاطمه حسینی[1]، محمد کارگر[1]*

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد جهرم، فارس، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۷۱۵۴۳۳۶۷۰۳ فاکس: ۰۷۱۵۴۳۷۲۰۱۰ پست الکترونیک: microkargar@jia.ac.ir

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوک ها فلور غالب مدفوع می‌باشند که مستقیماً و یا از طریق فاضلاب‌ها به محیط وارد می‌شوند. این باکتری‌ها به دلیل توانایی کسب ژن‌های مقاومت و انتقال آن به سایر باکتری‌ها به‌ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس*، نقش مهمی را در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌نمایند. این پژوهش با هدف ارزیابی شیوع انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین و شناسایی ژن‌های *vanA*، *vanB*، *vanC1/C2* در ایزوله‌های VRE جدا شده از نمونه‌های محیطی جنوب استان فارس انجام شد.

روش کار: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۱۵۵ جدایه انتروکوک جمع‌آوری شده از نمونه‌های محیطی (فاضلاب بیمارستانی و آب‌های سطحی) مناطق مختلف لارستان و جهرم انجام شد. جداسازی انتروکوک ها با روش فیلتراسیون‌غشایی، کشت در محیط اختصاصی KF و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های متداول و ونکومایسین مطابق با استاندارد CLSI با استفاده از روش انتشار دیسک و محاسبه حداقل غلظت بازدارنده رشد با روش Macro Brothdilution انجام شد. سپس وجود ژن‌های *vanA*، *vanB*، *vanC1/C2* در ایزوله‌های VRE با روش PCR چندگانه ارزیابی گردید.

یافته‌ها: از مجموع ایزوله‌های انتروکوک، ۴۱ (۲۶/۴۵٪) *انتروکوکوس فکالیس*، ۶ (۳/۸۷٪) *انتروکوکوس فیسیوم* و ۱۰۸ (۶۹/۶۸٪) *غیرفکالیس/ غیرفیسیوم* تعلق داشتند. در مجموع ۴۶ مورد (۲۹/۶۷٪) از جدایه‌های انتروکوک نسبت به ونکومایسین مقاومت داشتند. از این تعداد ٤ ایزوله MIC≥۱۲۸ را نشان دادند. در ٤ ایزوله (۸/۷۰٪) مقاومت به تمامی گروه‌های آنتی بیوتیک مورد بررسی مشاهده شد. ۲ ایزوله (۵۰٪) ژن *van*A و ۲ ایزوله (۵۰٪) ژن *van*B را داشتند، اما در هیچکدام ژن *van*C1/C2 شناسایی نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که ایزوله‌های VREدر منطقه مورد پژوهش شیوع گسترده‌ای دارند، از این رو ضرورت توجه به مصرف محتاطانه ونکومایسین و اقدامات کنترلی به منظور ممانعت از انتشار محیطی ایزوله‌های VRE وجود دارد.

واژه های کلیدی: *انتروکوک*، عفونت بیمارستانی، ونکومایسین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۱ **پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۳/۲۰

مقدمه

انتروکوک ها[1] کوکسی‌های گرم مثبت غالب در مدفوع انسان با گستره 10^{7}-10^{5}CFU/g هستند [۱] که مستقیماً از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می‌توانند نقش مهمی را در ایجاد و تداوم عفونت‌های بیمارستانی داشته باشند [۲]. در سال ۱۹۷۲ برای اولین بار ازآنتی‌بیوتیک ونکومایسین به منظور درمان عفونت‌های انتروکوکی استفاده گردید [۳] و پس از گذشت یک دهه انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین در سال ۱۹۸۰ در آمریکا و پس از آن در ۱۹۸۶ در اروپا گزارش شد [٤]. امروزه انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین از جمله پاتوژن‌های مهم باکتریایی عامل عفونت‌های اکتسابی در بیشتر بیمارستان‌ها

[1] *Enterococci*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

می‌باشند [۵،۱]. بر اساس اطلاعات سیستم‌های مراقبتی عفونت‌های بیمارستانی در آمریکا، انتروکوک‌ها چهارمین عامل عفونت‌های بیمارستانی، سومین عامل عفونت‌های باکتریمی و دومین عامل عفونت‌های ادراری می‌باشد [۳]. از آنجایی که این باکتری‌ها می‌توانند بر روی سطوح خشک و محیط برای مدت زمان طولانی بین یک هفته تا سه ماه زنده بمانند [۶] و از طرفی به دلیل استفاده از فاضلاب برای آبیاری محصولات کشاورزی و با توجه به اینکه انتروکوک‌ها یکی از مخازن انتشار ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک هستند، حضور ایزوله‌های مقاوم در فاضلاب می‌تواند خطری جدی برای بهداشت جامعه باشد [۱]. این پژوهش با هدف پایش محیطی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین و ارزیابی شیوع ژن‌های مقاومت در ایزوله‌های VRE[1] انجام شد.

روش کار

نمونه‌گیری

این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۱۵۵ جدایه انتروکوک بدست آمده از آب‌های سطحی و فاضلاب بیمارستان پیمانیه شهر جهرم و منطقه لارستان از تیرماه ۱۳۹۳ تا تیرماه ۱۳۹٤ انجام پذیرفت. نمونه‌های فاضلاب به حجم ۲۵۰ سی‌سی در شرایط استریل از عمق ۱۰۰-۵۰ سانتی‌متری حوضچه‌های ورودی، خروجی و هوادهی بیمارستان پیمانیه و چاه‌های جذبی منطقه لارستان و نمونه‌های آب سطحی به حجم ۱۰۰ سی‌سی از عمق ۲۰ سانتی‌متری جمع‌آوری گردید [۷]. همچنین اطلاعات مربوط به هر نمونه در پرسش نامه تنظیمی ثبت گردید.

جداسازی انتروکوک

انتقال نمونه‌های فاضلاب بیمارستان و آب‌های سطحی با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه انجام شد. سپس عمل فیلتراسیون به کمک دستگاه فیلتراسیون غشایی در بازه زمانی بین ٤-۲ ساعت پس از نمونه گیری انجام پذیرفت. نمونه‌های تهیه شده از حوضچه‌های ورودی و هوادهی و همچنین چاه‌های جذبی قبل از فیلتراسیون به نسبت یک به ۱۰ رقیق شدند. انتقال فیلترهای سلولزی به محیط اختصاصی KF Agar[2] (ساخت شرکت Merck، آلمان) طبق دستورالعمل EPA1600[3] بلافاصله پس از اتمام عمل فیلتراسیون به کمک پنس استریل انجام داده می‌شد. کلنی‌های انتروکوک پس ازگرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت بر روی این محیط به صورت کلنی‌های صورتی و آلبالویی ظاهر شدند. به دلیل فراوانی باکتری‌ها در نمونه‌های فاضلاب بیمارستان و آب‌های سطحی، پس از هر بار نمونه‌گیری، ۵ کلنی انتخاب و آزمون‌های کاتالاز، رشد در ٤۵ درجه سلسیوس، رشد در محیط بایل‌اسکولین آگار(ساخت شرکت Merck، آلمان)، رشد در ۶/۵٪ نمک و آزمون حرکت به منظور تایید جنس انترکوکوس بر روی آن‌ها انجام شد [۸].

حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک و با استفاده از دیسک‌های ونکومایسین ۳۰ µg، آمپی‌سیلین ۱۰ µg، تیکوپلانین ۳۰µg، جنتامیسین ۱۰µg، کانامایسین ۳۰µg، کلیندامایسین ۳۰µg، دالفوپریستین- کینوپریستین ۳۰µg، لاینوزولید ۳۰µg و کوتریموکسازول [تری‌متوپریم (۱/۲۵) + سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵)] تهیه شده از شرکت Mast کشور انگلستان، بر روی محیط مولرهینتون آگار (ساخت شرکت Merck، آلمان) انجام شد. حداقل غلظت بازدارنده رشد[4] (MIC) ونکومایسین به روش Broth Macro Dilution تعیین گردید. در این پژوهش به منظور مشخص شدن دقیق‌تر میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد آنتی‌بیوتیک ٤ برابر

[1] Vancomycin-Resistant *Enterococci*

[2] Kenner Fecal Agar
[3] Environmental Protection Agency
[4] Minimum Inhibitory Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

غلظت گفته شده در استاندارد CLSI[1] تهیه گردید. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری چند کلنی از کشت ۲٤ ساعته باکتری برداشته و در ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین تا رسیدن به کدورت نیم مک فارلند حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون درون ۹/۹ میلی‌لیتر نرمال سالین رقیق گردید و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. از محیط کشت مولر هینتون براث (ساخت شرکت Merck، آلمان)به منظور انجام MIC در این پژوهش استفاده گردید و درون هر ۱۰ لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر از این محیط مایع ریخته شد. پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک براث از قبل تهیه شده، درون لوله شماره یک ریخته و سپس از لوله شماره یک میزان ۰/۵ میلی‌لیتر محیط براث به همراه آنتی‌بیوتیک برداشته و به لوله شماره ۲ انتقال داده شد. رقت سازی تا لوله شماره ۱۰ انجام و از آن، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر محیط براث به همراه آنتی‌بیوتیک به بیرون ریخته شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی به تمامی لوله‌ها به جزلوله‌های شماره ۹ (کنترل رشد) و شماره ۱۰ (کنترل استریل) اضافه گردید. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس حداقل غلظت مهاری بر اساس دستورالعمل CLSI قرائت شد [۹].

شناسایی مولکولی گونه‌های انتروکوک و ژن‌های *vanA*، *vanB*، *vanC1/C2*

استخراج DNA باکتری با روش پیشنهادی جی‌آ[2] و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام شد [۱۰]. به منظور تایید جنس *انتروکوک* از ژن *16S rRNA* استفاده گردید. تمایز در توالی ژن سوپراکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (*sod*A) در بین گونه‌های مختلف *انتروکوک* اختصاصی است، از این رو به منظور تشخیص و افتراق بین گونه‌ای انتروکوک‌ها مناسب می‌باشد. در این پژوهش از توالی‌های پیشنهادی به وسیله‌ی جکسون[3] و همکاران در سال ۲۰۰٤ به منظور افتراق بین گونه‌های *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک فیسیوم* استفاده گردید [۱۲،۱۱]. همچنین *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومیسین، نیز به منظور شناسایی ژن‌های *vanA*، *vanB* و *vanC1/C2*، به وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه[4] مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱) [۱۳]. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP و ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. در ادامه واکنش PCR به منظور تایید جنس *انتروکوکوس* و شناسایی گونه‌های *فکالیس* و *فیسیوم* در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در مرحله ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵٪ دارای اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردید. از *انتروکوکوس فیسیوم* BM4147 حامل ژن *vanA* (۷۳۲bp)، *انتروکوکوس فکالیس* V583 حامل ژن *vanB* (٦٤۷bp)، *انتروکوکوس گالیناروم* BM4147 حامل ژن *vanC1*(۸۱۵bp) و *انتروکوک کسلی‌فلاووس* ATCC25788 حامل ژن *vanC2* (۸۲۷bp) به عنوان کنترل مثبت برای تعیین کنترل کیفی (QC) استفاده گردید. همچنین از *انتروکوکوس فکالیس* ATCC29212 حساس به ونکومایسین (۳٦۰bp) و *استافیلوکوکوس اورئوس*[5] ATCC25923 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute
[2] Jia
[3] Jackson
[4] Multiplex PCR
[5] *Staphylococcus aureus*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

همچنین به منظور تایید از هر ژن یک مورد تعیین توالی گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

نام پرایمر	توالی 5′ → 3′	ژن	اندازه	جنس/گونه	منبع
Ent151f	ACACCTGGAACAGGTGC	*16S rRNA*	۲۴۳	*Enterococcus* spp.	۱۲
Ent376R	TCGGTCAGACTTCCGTCC	*16S rRNA*	۲۴۳	*Enterococcus* spp.	۱۲
FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	*Sod*A	۳۶۰	*Enterococcus faecalis*	۱۱
FL2	TAATGGTGATCCTGGTTTGG	*Sod*A	۳۶۰	*Enterococcus faecalis*	۱۱
FM1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	*Sod*A	۲۱۵	*Enterococcus faecium*	۱۱
FM 2	TGCTTTTTTGATTTTCTTTA	*Sod*A	۲۱۵	*Enterococcus faecium*	۱۱
EA1(+)	GGGAAAACGACAATTGC	*van*A	۷۳۲	*Enterococcus* spp.	۱۳
EA2(-)	GTACAATGCGGCCGTTA	*van*A	۷۳۲	*Enterococcus* spp.	۱۳
EB3(+)	ACGGAATGGGAAGCCGA	*van*B	۶۴۷	*Enterococcus* spp.	۱۳
EB4(-)	TGCACCCGATTTCGTTC	*van*B	۶۴۷	*Enterococcus* spp.	۱۳
EC5(+)	ATGGATTGGTAYTKGTAT[c]	*van*C1/C2	۸۱۵/۸۲۷	*Enterococcus* spp.	۱۳
EC6(-)	TAGCGGGAGTGMCYMGTAA[c]	*van*C1/C2	۸۱۵/۸۲۷	*Enterococcus* spp.	۱۳

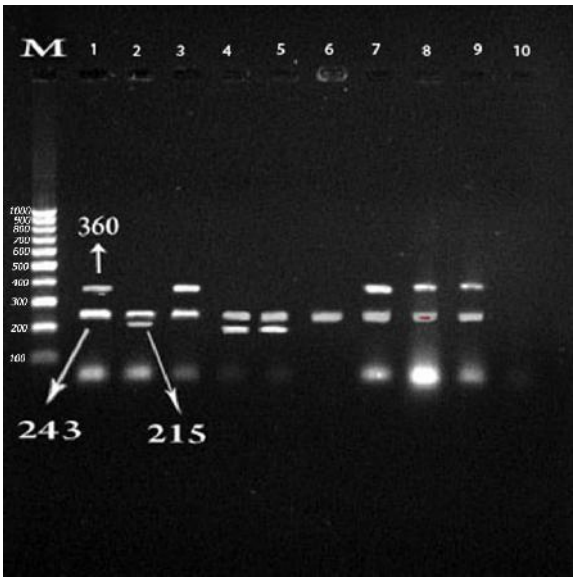
آنالیز آماری

با استفاده از SPSS-16 و آزمون مربع کای آنالیز داده‌ها انجام گرفت. سطح معنی‌داری در $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

جمع آوری نمونه و شناسایی جنس و گونه انتروکوک

از مجموع نمونه‌های محیطی مورد پژوهش، ۱۵۵ جدایه انتروکوک، ٤١ ایزوله (۲۶/٤٥٪) *انتروکوکوس فکالیس*[1]، ۶ ایزوله (۳/۸۷٪) *انتروکوکوس فیسیوم*[2] و ۱۰۸ ایزوله (۶۹/۶۸٪) *غیرفکالیس/غیرفیسیوم*[3] شناسایی شد (شکل ۱). بین جدایه‌های جنس انتروکوک و نمونه‌های فاضلاب و آب‌های سطحی ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p=۲/٦٤٧$). اما بین نمونه‌های جداشده از فاضلاب بیمارستانی در شهر جهرم و گونه‌های انتروکوک جداشده ارتباط معناداری وجود داشت ($p=۰$).



شکل ۱. نمایش ژن های شناسایی شده به منظور شناسایی گونه انتروک. M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی ، ۱: *انتروکوک فکالیس*V583، ۲: *انتروکوک فیسیوم* BM4147 ، ۳، ۷، ۸ و ۹: *انتروکوک فکالیس*، ٤و ۵: *انتروکوک فیسیوم*، ۱۰: *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923کنترل منفی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین حداقل غلظت مهاری

با ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های VRE، مشخص گردید که بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول و کمترین میزان مقاومت نسبت به تیکوپلانین وجود دارد (شکل ۲). با استفاده از آزمون

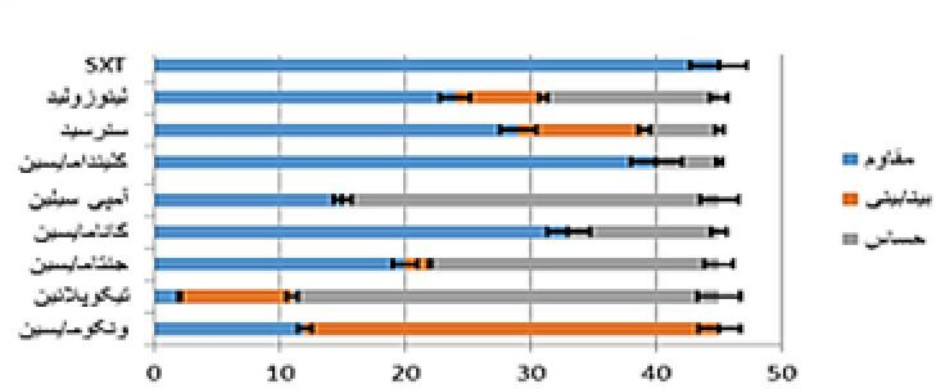
[1] *Enterococcus faecalis*
[2] *Enterococcus faecium*
[3] *Enterococcus*.spp

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

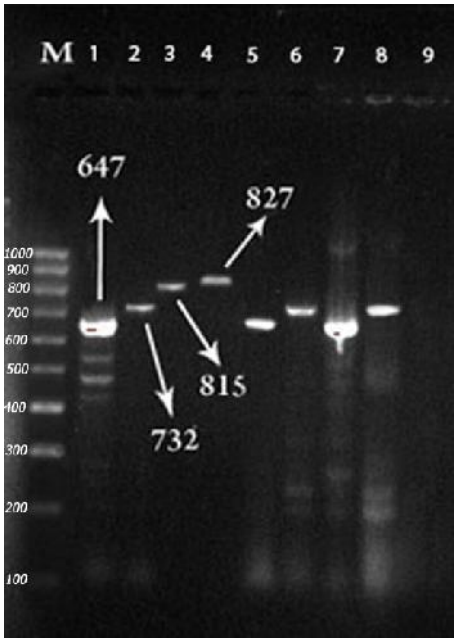
آماری مربع کای پیرسون مشخص شد که بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و نمونه‌های محیطی ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($p=۰$). تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که ٤ ایزوله (۸/۷۰٪) به ونکومایسین مقاوم می‌باشد. اما ایزوله‌های دارای مقاومت بینابینی مشاهده نگردید. از میان ایزوله‌های مقاوم، ۱ ایزوله حداقل غلظت مهاری ۱۲۸میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود.



شکل ۲. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های VRE مورد بررسی

شناسایی مولکولی ژن‌های *vanA*،*vanB*،*vanC*$_1$/*C*$_2$

نیمی ازایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین (۵۰ ٪)، ژن *vanA* و نیمی دیگر (۵۰ ٪) نیز ژن *vanB* را داشتند. اما به صورت هم زمان در هیچ کدام از ایزوله‌ها، هر دو ژن*vanA* و *vanB* مشاهده نگردید. همچنین در هیچ کدام از ایزوله‌ها ژن *vanC1/C2* شناسایی نشد (شکل ۳). دو ژن *vanB* توسط دو جدایه *انتروکوکوس فکالیس* و دوژن *vanA* هر کدام توسط یک جدایه *انتروکوکوس فیسیوم* و یک جدایه غیرفکالیس/ غیرفیسیوم حمل می‌شد.آزمون آماری مربع کای پیرسون نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های مقاومت و نمونه‌های محیطی وجود ندارد.



شکل ۳. نمایش ژن های مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک های جدا شده از نمونه های محیطی:M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی ،۱: *انتروکوکوس فکالیس*V583 حاوی ژن *van*B ،۲: *انتروکوکوس فیسیوم*BM4147 حاوی ژن *van*A ،۳: *انتروکوکوس گالیناروم*BM4174 حاوی ژن *van*C1 ، ٤: *انتروکوکوس کسلی‌فلاووس* ATCC25788 حاوی ژن *van*C2 ، ۵ و۷ : ایزوله حامل ژن *van*B، ۶ و ۸ : ایزوله حامل ژن *van*A ،۹: *انتروکوکوس فکالیس*ATCC29212 کنترل منفی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

بحث

شناسایی عوامل مهم و شایع پاتوژن‌های بیمارستانی و الگوی دقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی به منظور ارائه روش دقیق درمان وکنترل آن برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم و ضروری است [۱٤]. مطالعات بیوکی[1] و همکاران نشان داد که وضعیت سیستم‌های تصفیه فاضلاب برای تکثیر باکتری‌های مقاوم مطلوب می‌باشد. همچنین محققین نامبرده، بیوفیلم‌های تشکیل شده در بیمارستان، فاضلاب شهری، آب‌های جاری و آب‌های آشامیدنی را به عنوان منبع محیطی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در آلمان معرفی کردند [۵].

در پژوهش حاضر به دلیل وجود تعداد زیاد جمعیت انتروکوکی در نمونه‌های فاضلاب و به منظور دست‌یابی به کلنی‌های تفکیک شده بر روی محیط کشت بر اساس توصیه ایورسن[2] و همکاران [۱] از روش فیلتراسیون غشایی به منظور جداسازی ایزوله‌های انتروکوک استفاده گردید.

انتروکوکوس فکالیس و *انتروکوکوس فیسیوم* شایع‌ترین گونه‌های ایجادکننده عفونت‌های انسانی هستند. *انتروکوکوس فکالیس* در عفونت‌های انتروکوکی نقش بیشتری دارد، اما *انتروکوکوس فیسیوم* توانایی بالایی در کسب انواع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان می‌دهد و مقاومت محیطی بیشتری دارند [۱۵]. در پژوهش‌های مختلف انجام شده بر روی جداسازی انتروکوک‌ها از نمونه‌های مختلف در اغلب مناطق دنیا، نتایج متفاوتی از شیوع *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* گزارش شده است. در بیشتر پژوهش‌ها *انتروکوکوس فکالیس* ایزوله غالب و پس از آن *انتروکوکوس فیسیوم* و دیگر گونه‌های انتروکوکی تعیین شده‌اند. اما ایورسن و همکاران نشان دادند که *انتروکوکوس فیسیوم* (۶۹٪) ایزوله غالب فاضلاب‌های کشور سوئد می‌باشد [۱].

۲۹/۶۷ درصد از ایزوله‌های انتروکوک شناسایی شده در پژوهش حاضر، نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند. این نتایج با پژوهش قلندرزاده و همکاران در بندرعباس همخوانی داشت، اما میزان مقاومت به ونکومایسین نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده در ایران بالا تربود [۳]. اصلی‌ترین دلیل مقاومت به ونکومایسین، استفاده بیش از اندازه از این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های انتروکوکی می‌باشد. هم‌چنین تجویز ونکومایسین در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های دیگر می‌تواند موجب مقاومت شود، چرا که انتقال ژن توسط باکتری‌های دیگر را امکان‌پذیر می‌سازد [۱۶]. همچنین مانند نتایج گزارش‌شده به وسیله‌ی گلدستین[3] و همکاران تمامی ایزوله‌های VRE جداسازی شده در پژوهش حاضر دارای الگوی مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند [۱۷] و ٤ جدایه (۸/۷۰٪) به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت داشتند (جدول ۲). بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و بیشترین حساسیت نسبت به تیکوپلانین مشاهده گردید.

با وجود این که لینوزولید یک آنتی‌بیوتیک جدید است، اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت به آن، نسبت به سایر پژوهش‌های مشابه بیشتر می‌باشد. تفاوت در میزان مصرف در بیمارستان، میزان مقاومت ارگانیسم‌های بیمارستانی و حتی محیط بیمارستان می‌تواند دلیل این مساله باشد. در پژوهش زانل[4] و همکاران در کشور آمریکا نیز ۳ درصد از جدایه‌های VRE شناسایی شدند که همگی به لینوزولید مقاوم بودند [۱۸].

[1] Bouki
[2] Iversen
[3] Goldstein
[4] Zhanel

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های VRE

ردیف	الگوی مقاومت	تعداد جدایه (٪)
۱	V، TEC، GM، K، AM، CC، SYN، LZD، SXT	٤(٪۸/۷۰)
۲	V، TEC، GM، K، CC، SYN، LZD، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۳	V، GM، K، AM،CC، SYN، LZD، SXT	۳(٪۶/۵۳)
٤	V، TEC، GM، K، AM، CC، SYN، SXT	۳(٪۶/۵۳)
۵	V، K، AM، CC، SYN، LZD، SXT	۳(٪۶/۵۳)
۶	V، TEC، K، CC، SYN، LZD، SXT	۳(٪۶/۵۳)
۷	V، GM، K، CC، SYN، LZD، SXT	۵(٪۱۰/۸۷)
۸	V، TEC، K، AM، CC، SYN، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۹	V، TEC، GM، K، SYN، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۱۰	V، GM، K، AM، CC، SYN، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۱۱	V، GM، K، AM، CC، LZD، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۱۲	V، K، AM، CC، SYN، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۱۳	V،K، CC، SYN، LZD ، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۱٤	V، K، AM، CC، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۱۵	V، GM، K، CC، SYN، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۱۶	V، K، AM، SYN، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۱۷	V، K، AM، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۱۸	V، K، CC، SYN، SXT	۲(٪٤/۳۵)
۱۹	V،K، SYN، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲۰	V،K، CC، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲۱	V،K،AM ، CC، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲۲	V،GM ، K، LZD، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲۳	V، K، CC، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲٤	V، TEC، K، SXT	۱(٪۲/۱۷)
۲۵	V، K، SYN، SXT	۱(٪۲/۱۷)
جمع	-	٤۶ (٪۱۰۰)

در بیشتر پژوهش‌های انجام شده در خارج و داخل کشور ژن *vanA*، ژن غالب در میان ایزوله‌های VRE گزارش شده است [۶،۳،۱]، اما درپژوهش حاضر فراوانی ژن‌های *vanA* و *vanB* (٪۵۰) یکسان بود و نتایج فنوتیپی با نتایج ژنوتیپی مطابقت داشت. در مطالعه قلندرزاده و همکاران، و نیز وهابی و همکاران نیز وجود هردو ژن *vanA* و *vanB* گزارش شده است [۱۹،۳]. همچنین الهانی[1] و همکاران، وجود ژن *vanA* را در تمامی نمونه‌های محیطی گزارش نموده‌اند [۶]. دلیل غالب تر بودن ژن *vanA* در جدایه‌های انترکوک را می‌توان به قابلیت بالاتر این ژن در انتقال به کمک ترانسپوزون نسبت داد.

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر مانند بسیاری از پژوهش‌های دیگر نشان دادکه فاضلاب‌های بیمارستانی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی محسوب شود. از این رو ضرورت پایش مستمر و هم زمان نمونه‌های محیطی وکلنیکی به منظور ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. هم‌چنین ضرورت اندازه‌گیری غلظت آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های فاضلاب و ارزیابی ارتباط آن‌ها با میزان مقاومت در پژوهش‌های بعدی توصیه می‌گردد.

[1] Elhani

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

نتیجه گیری

ایزوله‌های VRE در نمونه‌های محیطی همچون سایر پژوهش‌های انجام شده در سراسر دنیا به طور گسترده در مناطق مورد پژوهش شیوع یافته است. نتایج این پژوهش نشان داد که تمامی ایزوله‌های VRE دارای فنوتیپ مقاومت چندگانه می‌باشند. این مسأله می‌تواند درمان عفونت‌های حاصل از انتروکوک را در این مناطق با مشکل مواجه نماید. از این رو ضرورت انجام اقدامات کنترلی مناسب به منظور جلوگیری از شیوع ایزوله‌های مقاوم وجود دارد و می‌بایست در مصرف ونکومایسین بسیار محتاطانه عمل نمود. همچنین نتایج نشان داد که وجود ژن *vanA* و*vanB* ، اصلی‌ترین دلیل مقاومت به ونکومایسین در منطقه مورد پژوهش می‌باشد، اما برای تایید این نتایج نیاز به پایش تکمیلی و مداوم نمونه‌های محیطی و بیمارستانی وجود دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به شماره ۸۷۰۰۱۴۰۴۳ بود. نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و جناب آقای مسعود رحمانیان کارشناس محترم آزمایشگاه به دلیل همکاری صمیمانه در انجام پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1- Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High Prevalence of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Swedish Sewage. Appl Environ Microbiol. 2002 Jun; 68(6): 2838–2842.

2-Riquelme Breazeal VM, Novak TJ, Vikesland JP, Pruden A. Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. Water Res. 2013 Jun; 47(1):130 -140.

3- Ghalandarzadeh daryai Z, Javadpour S. Kargar M. Evaluation of supply of vanA &vanB in vancomycin resistance in Enterococcus isolated of clinical species of martyr Mohammady in Bandar Abbas. J microbial World. 2013 Apr; 6(1): 23-33. [Full text in Persian]

4- Babar N, Usman J, Munir T, Mushtaq Gill M, Anjum R, Gilani M, et al. Frequency and Antibiogram of Vancomycin Resistant Enterococcus in a Tertiary Care Hospital . J Coll Physicians Surg Pak. 2014 Jan; 24 (1): 27-29.

5- Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. J Ecotoxicol Environ Saf. 2013 May; 91:1-9.

6- Elhani D, Klibi N, Dziri R , Ben Hassan M, Asli Mohamed S, Ben Said L ,et al. vanA-containing E. faecium isolates of clonal complex CC17 in clinical and environmental samples in a Tunisian hospital. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 May;79(1):60-3.

7- Ferguson DM, Griffith JF, McGee CD, Weisberg SB, Hagedorn C. Comparison of enterococcus species diversity in marine water and wastewater using enterolert and epa method 1600. J Environ Public Health. 2013; 2013:848049.

8- Kotzamanidis C, Zdragas A, Kourelis A, Moraitou E, Papa A,Yiantzi V,et al. Characterization of vanA-type Enterococcus faecium isolates from urban and hospital wastewater and pigs. J Appl Microbiol. 2009 Mar; 107:997–1005.

9- CLSI, Clinical and laboratory standards institute [M100-S23]. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Cockerill FR, Patel JB, Alder J, Bradford PA, Dudley MN, Eliopoulos GM, producers, 25th ed. USA: Pennsylvani; 2013.

10- Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species: A Hospital-Based Study in China. Int J Environ Res Public Health. 2014 Mar;11: 3424-3442.

11- Jackson CR, Fedorka-Cray P J, Barrett JB. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. J Clin Microbiol. 2004 Aug; 42(8):3558–3565.

12- Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, et al. Development of Quantitative PCR Assays Targeting the 16S r RNA Genes of Enterococcus spp . and their Application

www.SID.ir

Archive of SID

to the Identification of Enterococcus Species in Environmental Samples. Appl Environ Microbiol. 2013 Jan; 79:196-203.
13- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004 Dec; 42(12):5857–5860.
14-Saifi M, Pourshafie M, Borhani K, Rahimi F, Soltandalal M. Studying the existence of aac (6')-le-aph(2")-la genes in multi-resistant strains of Enterococcus faecalis and faecium and the strains resistant to large amounts of gentamicin. Iran J Med Microbiol. 2007 Jun; 1(1):33-38. [Full text in Persian]
15- Sadowy E, Luczkiewicz A. Drug-resistant and hospital-associated Enterococcus faecium from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. BMC Microbiol. 2014 Mar; 66:1-15.
16-Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 Nov; 19(11):816-822.
17- Rosenberg Goldstein RE, Micallef SA, Gibbs SG, George A, Claye E, Sapkota A, et al. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S.wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. Sci Total Environ. 2014 Jan; 466–467: 404–411.
18-ZhanelGG, Laing NM, Nichol KA, Palatinick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). J Antimicrob Chemother. 2003 Sep;52(3):382-8.
19-Vahabi A, Hasani A, Nahaei M, Farajnia S. The prevalence ampicillin, gentamicin and vancomycin resistant enterococci in stool samples of hospitalized patients and outpatients in three hospitals of the University of Medical Sciences. J Tabriz Univ Med Sci. 2011 Sep; 33(3): 78-85. [Full text in Persian]

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 11:23 IRST on Saturday October 14th 2017

www.SID.ir