مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي كردستان/ دوره سيزدهم/ پائيز ۱۳۸۷/ ۸۲-۷۰

بررسي كلونالیتي سويه‌هاي انتروكوكوس فكاليس و انتروكوكوس فيسيوم مقاوم به مقادير بالاي جنتامايسين جداشده از فاضلابهاي شهر تهران

فاتح رحيمي[۱]، دكتر مهناز سيفي[۲]، دكتر محمدرضا پورشفيع[۳]، دكتر محمدمهدي سلطان دلال[۴]، دكتر محمدرضا اشراقيان[۵]، دكتر محمدرضا پورمند[۶]

۱- كارشناس ارشد ميكروبيولوژي، انستيتو پاستور ايران
۲- دكتراي ميكروبشناسي، بخش ميكروب شناسي، انستيتو پاستور ايران
۳- دانشيار، انستيتو پاستور ايران، بخش ميكروبشناسي، انستيتوپاستورايران، (مؤلف مسؤول)
تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵-۰۲۱ pour@pasteur.ac.ir
۴- دكتراي ميكروب شناسي، بخش ميكروب شناسي
۵- دكتراي آمار حياتي، دانشگاه علوم پزشكي تهران، دانشكده بهداشت
۶- دكتراي ميكروب شناسي، دانشگاه علوم پزشكي تهران، دانشكده بهداشت

چكيده

زمينه و هدف: در سالهاي اخير پيدايش انتروكوك‌هاي مقاوم به مقادير بالاي پني‌سيلين، گليكوپپتيدها و جنتامايسين به تنهايي يا بصورت چند مقاومتي باعث بروز مشكلات حاد در درمان عفونتهاي انتروكوكي شده است. انتروكوك‌ها جزء فلور نرمال روده هستند و از اين راه به فاضلابها راه پيدا مي‌كنند. يكي از روشهاي بررسي جمعيت انتروكوكي غربالگري فاضلابها ازحيث وجود انتروكوك‌ها مي‌باشد. هدف تحقيق حاضر بررسي كلونالیتي در بين سويه‌هاي HLGR انتروككي جدا شده از فاضلاب در تهران مي‌باشد.

روش بررسي: تعداد ۱۴۰ ايزوله از سه تصفيه خانه فاضلاب در مناطق مختلف شهر تهران در محدوده زماني آذر ماه ۸۵ تا ارديبهشت ماه ۸۶ جمع‌آوري شد. تعيين جنس و گونه ايزوله‌ها و ژنهاي مقاومت به جنتامايسين توسط روش PCR و تست حساسيت آنتي‌بيوتيكي و MIC نيز با استفاده از استاندارد CLSI به انجام رسيده و روش Biochemical fingerprinting (PhP typing) با هدف تايپينگ سويه‌هاي HLGR انتروكوكي بكار رفت.

يافته‌ها: انتروكوكوس فكاليس ۲۶% و انتروكوكوس فيسيوم ۷۴%، شايعترين گونه‌هاي جدا شده از نمونه‌هاي فاضلاب بودند. بالاترين مقاومت آنتي‌بيوتيكي در بين سويه‌هاي فيسيوم نسبت به اريترومايسين و در بين سويه‌هاي فكاليس نسبت به تتراسيكلين ديده شد. MIC تمام سويه‌هاي HLGR انتروكوكي g/ml µ۱۰۲۴≤ بود و اكثريت آنها داراي ژن aac (6')-Ie-aph (2")-Ia بودند و فقط يك سويه انتروكوكوس فيسيوم داراي ژن aph(2")-Ic بود. روش PhP typing در گونه فكاليس ۱۶ تايپ مختلف را با Di=۰/۹۱۰ و درگونه فيسيوم با Di=۰/۹۴۵، ۵۰ تايپ مختلف را مشخص نمود.

نتيجه‌گيري: حضور ژن aac (6')-Ie-aph (2")-Ia در اكثريت ايزوله‌هاي HLGR، نشان دهنده انتشار وسيع اين ژن در جمعيت انتروكوكي فاضلاب است. شيوع متنوع كلونال در جمعيت انتروكوك‌هاي HLGR و چند مقاومتي در فاضلاب تهران نشان دهنده نقش احتمالي فاضلابها در چرخش اين سويه‌ها در جامعه مي‌باشند.

كليد واژه‌ها: انتروكوكوس فكاليس، انتروكوكوس فيسيوم، انتروككهاي HLGR، PhP typing، فاضلاب

وصول مقاله: ۸۷/۴/۴ اصلاح نهايي: ۸۷/۵/۱ پذيرش مقاله: ۸۷/۵/۶

مقدمه

طي آخرين آمارها عفونتهاي بيمارستاني ناشي از

Archive of SID
www.SID.ir

انتروکوک‌هاي چند مقاومتي رو به افزايش است و در اين ميان انتروکوک‌هاي مقاوم به جنتامايسين و ونکومايسين از اهميت خاصي برخوردارند (۱). انتروکوک‌ها بصورت ذاتي به مقادير پايين آمينوگليکوزيدها مقاوم بوده و به همين علت اين گروه از آنتي بيوتيکها به تنهايي در درمان عفونتهاي انتروکوکي ناکافي هستند ولي در ترکيب با ممانعت‌کننده‌هاي سنتز ديواره سلولي که ورود آنها را به سلول تسهيل مي‌کند از مؤثرترين درمانهاي رايج مي‌باشند. بروز مقاومت بالا به جنتامايسين HLGR در اثر کسب ژنهايي است که باعث تغييرات آنزيمي بر روي دارو مي‌شوند. در انتروکوک‌ها ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia نقش اصلي را در پيدايش مقاومت نسبت به دوز بالاي جنتامايسين دارد ولي در سالهاي اخير نقش چند ژن ديگر از جمله ژنهاي aph(2")-Ic ، aph(2")-Id و aph(2")-Ib نيز در اين قضيه مشخص شده است. اين ژنها توسط پلاسميدها و يا ترانسپوزونها منتقل مي‌شوند (۲). در بحث شناسايي ژنهاي ايجادکننده مقاومت نسبت به انواع آمينوگليکوزيدها، راهها و فرکانس انتقال آنها نيز بسيار مهم هستند (۳). تعيين تيپ سويه‌هاي انتروکوکي و يافتن تنوع کلنال بين آنها از يک منطقه، در يافتن راههاي کنترل آنها کمک شاياني مي‌نمايد. روشهاي کنترل شامل غربالگري سويه‌هاي انتروکوک از منابع آلودگي و تعيين تيپ و مقاومت آنتي‌بيوتيکي آنها و سپس بکارگيري راههاي مقابله با آنها است. از آنجاييکه انتروکوک‌ها در روده کلونيزه هستند يکي از روشهاي بررسي جمعيت انتروککي، کشت روتين از مدفوع افراد است ولي بدليل مشکلات نمونه‌گيري از مدفوع، چون انتروکوک‌ها از روده انسان مي‌توانند به داخل فاضلابها راه پيدا کنند يک روش عملي ديگر غربالگري فاضلابها از حيث وجود انتروکوک‌ها مي‌باشد.

Biochemical fingerprinting (PhP typing)

يک سيستم بيوشيميايي جهت تايپينگ انواع باکتريهايي است که داراي قدرت تخمير قندها مي‌باشند. در اين روش با آناليز کمي واکنشهاي بيوشيميايي متعدد که در داخل ميکروپليتهايي حاوي سوبستراهاي دهيدراته انجام مي‌شود مي‌توان تعداد زيادي از باکتريهاي هم جنس را گروه‌بندي نمود. تستهاي انتخاب شده در اين پانل به گونه‌اي انتخاب شده‌اند تا بطورکاملاً اختصاصي عمل کرده و بالاترين قدرت تفکيک را در بين گونه‌ها داشته باشند. آناليز نهايي توسط نرم افزارهاي کامپيوتري محاسبه شده و ايزوله‌هاي مورد آزمايش بر اساس تستهاي بيوشيميايي به فنوتيپهاي مختلف گروه‌بندي مي‌شوند. نتايج حاصل از اين روش در مقايسه با روشهاي مولکولي مختلف مانند PFGE و Ribotyping در اکثريت موارد همخواني دارد (۴,۵). در اين روش هر بيوتايپ به ايزوله‌هايي با درصد شباهت بيشتر يا ايزوله‌هاي مشابه اطلاق مي‌شود که در يک گروه قرار مي‌گيرند. Single type (ST) به ايزوله‌هايي اطلاق مي‌شود که داراي الگوي منحصر به فرد هستند و Common type (CT) گروههايي هستند که بيش از يک

Archive of SID

www.SID.ir

نوع ایزوله را شامل مي‌شوند. در این روش تنوع جمعیتي در بین ایزوله‌ها به توزیع آنها در بین تیپهاي مختلف بدست آمده بستگي دارد. به عبارت دیگر هر چه تعداد تیپهاي بدست آمده بیشتر باشند Diversity index (Di) تنوع آن در جمعیت باکتریال نیز بیشتر خواهد بود. در دندروگرام بدست آمده هر سویه توسط یک خط افقي مشخص مي‌شود در حالیکه سویه‌هاي مختلف بر اساس میزان شباهتهاي فنوتیپي شان توسط خطوط عمودي بهم وصل مي‌شوند. هدف تحقیق حاضر بررسي کلونالیتي در بین سویه‌هاي HLGR انتروکوکي جدا شده از فاضلاب تهران و تعیین مقاومت آنتي‌بیوتیکي آنها به منظور کنترل بهتر عفونتهاي انتروکوکي مي‌باشد.

روش بررسي

نمونه‌گیري فاضلاب

از تصفیه خانه اکباتان در آذر ماه ۸۵، تصفیه خانه شوش در اردیبهشت ۸۶ و تصفیه خانه صاحبقرانیه در بهمن ماه ۸۵ نمونه‌گیري بعمل آمده است. تعداد نمونه‌گیري یک بار براي هر تصفیه خانه بوده است. براي جمع‌آوري نمونه‌ها از ظروف شیشه‌اي و دربدار استریل با حجم ۲۵۰ میلي‌لیتر استفاده شده است. ظرف استریل در عمق ۷۰-۵۰ سانتیمتري از سطح فاضلاب قرار مي‌گرفت و به این ترتیب نمونه‌ها جمع‌آوري شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل مي‌شدند و در عرض کمتراز ۳ ساعت مورد بررسي قرار مي‌گرفتند.

جداسازي سویه‌هاي فاضلاب:

طبق مطالعات قبلي محققین (۶) بدلیل وجود تعداد زیاد جمعیت انتروکوکي در نمونه‌هاي فاضلاب، به منظور دستیابي به کلني‌هاي تفکیک شده بر روي محیط کشت، از روش فیلتراسیون با استفاده از فیلترهاي ۰/۴۵ میکرون (Millipore) و محیط کشت اختصاصي mEnterococcus agar (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) استفاده شد (۷). در ابتدا رقت ۱/۱۰ از نمونه‌هاي فاضلاب با سرم فیزیولوژي استریل تهیه شده و با استفاده از سیستم فیلتراسیون استاندارد (Millipore) عمل فیلتر روي نمونه‌هاي رقیق شده انجام مي‌گرفت. سپس فیلترها به مدت ۲ ساعت جهت غني سازي بر روي محیط BHI و در دماي ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از آن بر روي محیط کشت agar mEnterococcus که حاوي ۶۴µg/ml از آنتي‌بیوتیک جنتامایسین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) است منتقل شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار مي‌گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت کلني‌هاي مشکوک به انتروکوک، با رنگ صورتي بر روي فیلتر ظاهر شده و مي‌توان از روي این فیلترها کلني برداري نموده و بر روي محیط بلادآگار خون گوسفندي منتقل نمود تا اولاً محیط غني‌تري را جهت رشد انتروکوکها فراهم نمود و ثانیاً از این راه به خالص بودن سویه مورد مطالعه پي برد. پس از رشد انتروککها بر روي محیط بلادآگار آزمایشات تعیین جنس و گونه بر روي آنها انجام مي‌شد. در

Archive of SID

www.SID.ir

مجموع ۱۴۰ سویه انتروکوک HLGR در این تحقیق از فاضلاب ورودي این سه تصفیه خانه جمع آوري گردید.

تعیین جنس و گونه سویه‌ها:

براي این منظور از تستهاي کاتالاز، رشد در نمک ۶/۵ درصد، هیدرولیز بایل اسکولین و تست PYR استفاده شد (۸). از آنجایکه فقط دو گونه فکالیس و فیسیوم در این تحقیق مورد نظر بودند از تستهاي تخمیر دو قند آرابینوز و سوربیتول و همچنین محیط تلوریت پتاسیم براي تعیین گونه استفاده شد.

روش PCR جهت تایید نهایي جنس وگونه انتروکوک:

تهیه DNA: ۳ میلي‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتري بر روي محیط کشت BHI broth را در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و پس از خارج کردن محلول رویي ۱۵۰ میکرولیتر از بافر TES (Tris-HCL, pH=8; Sucrose 7%, EDTA I mM) را به همراه ۲۰ میلي‌گرم در میلي‌لیتر از لیزوزیم (Sigma) و ۱۲ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد به رسوب اضافه مي‌کنیم و با ورتکس بطور کامل مخلوط نموده بمدت ۵ دقیقه در مجاورت یخ قرار مي‌دهیم. در این مرحله پس از انجام سانتریفوژ در rpm۱۰۰۰۰بمدت ۵ دقیقه فاز رویي را به یک لوله جدید منتقل نموده و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل و کلروفرم و سانتریفوژ مجدد (سه بار)، فاز رویي را به لوله جدید منتقل مي‌کنیم. در این مرحله با افزودن اتانول سرد به این محلول و قراردادن آن در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت یک شب و رسوبگیري از آن در rpm ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه، DNA رسوب نموده و با افزودن ۵۰ میکرولیتر از بافر TE حاوي RNase مي‌توان از آن در واکنش PCR استفاده نمود (۹). براي انجام تکثیر ژن اختصاصي جنس و دوگونه مورد نظر توسط واکنش PCR یک میکرولیتر از DNA استخراج شده وارد واکنش با پرایمرهاي جنس و گونه گردید (۱۰).

الکتروفورز با ۱۰ میکرولیتر از محصولات و ۳ میکرولیتر از لودینگ بافر و با استفاده از آگارز ۱% در ولتاژ ۸۰ انجام شده است. رنگ‌آمیزي ژل نیز با اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلي‌لیتر) انجام شده و مشاهده باند bp ۱۰۰ براي تشخیص جنس و باندهاي ۹۴۱ bp و۶۵۸ bp به ترتیب براي تشخیص گونه‌هاي فکالیس و فیسیوم، در حضور مارکر وزن مولکولي انجام شد (۲).

تست تعیین حساسیت آنتي‌بیوتیکي:

پس از تعیین جنس و گونه باکتریهاي جدا شده کلیه گونه‌هاي فکالیس و فیسیوم با روش Disk diffusion مورد سنجش حساسیت آنتي بیوتیکي براي ۱۱ آنتي بیوتیک قرارگرفتند. دیسکهاي آنتي بیوتیکي جنتامایسین دوز بالا، آمپي‌سیلین، ونکومایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، نیتروفورانتوئین، تتراسیکلین، سیپروفلوکسازین و تیکوپلانین از شرکت (BD BBL, Sparks, MD, USA) BD و دیسکهاي سینرسید و لینه زولید از شرکت (Bootle, Mast Mersey Side, UK) تهیه شده بودند. کلیه مراحل انجام این

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش با استفاده از استانداردهاي CLSI انجام شده است. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگي Minimal Inhibitory Concentration براي جنتامایسین با روش microdilution و تا غلظت آنتيبیوتیکي ۱۰۲۴ µg/ml انجام شد (۱۰).

PCR جهت تشخیص ژنهاي مقاومت به جنتامایسین در ایزوله هاي HLGR:

مجموعاً چهار ژن عامل ایجاد مقاومت به جنتامایسین در بین انتروکوکهاي HLGR جداشده با استفاده از پرایمرهاي اختصاصي مورد بررسي قرار گرفتند (۳).

Biochemical Fingerprinting (PhPlate):

در سیستم PhPlate (PhPlate Microplates Techniques AB, Sweden) از یکسري تستهاي بیوشیمیایي در تایپینگ و گروه بندي انتروکوکها استفاده ميشود که اولاً از ثبات بیشتري در بین سویه هاي انتروکوکي برخوردارند و ثانیاً بیشترین قدرت افتراق را در بین آنها دارند. این ۱۱ تست شامل آرابینوز، لاکتوز، ملیبیوز، ملزیتوز، رافینوز، اینوزیتول، سوربیتول، مانیتول، Gal لاکتون، آمیگدالین وگلوکونات ميباشد. این مواد در ته چاهکهاي میکروپلیت ۹۶ تایي کوت شده اند. اساس این سیستم اندازهگیري میزان جذب نوري واکنشهاي تخمیري انجام شده در سه زمان مختلف (۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت پس از تلقیح باکتري) بوده و پس از گذشت ۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت از تلقیح باکتري میزان رنگزایي هر چاهک با استفاده از اسکنر مدل HP scanget 4890 خوانده ميشود و طي آنالیز با نرم افزارPhP Win منجر به رسم دندروگرام گروهبندي فنوتیپي ایزوله ها ميگردد (۴).

یافته ها

نتایج کشت نمونه ها:

نمونهگیري از سه تصفیه خانه فاضلاب اکباتان، شوش و صاحبقرانیه در مجموع منجر به جداسازي ۱۴۰ سویه انتروکوک با مقاومت بالا به جنتامایسین گردید. توزیع گونهاي در بین این ایزوله ها به صورت (۳۸ مورد) ۲۶% و (۱۰۲مورد) ۷۴% به ترتیب براي انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم بود. همانطوري که انتظار ميرفت درصد جداسازي گونه فیسیوم در فاضلاب بطور مشخصي بالاتر از گونه فکالیس بود.

نتایج تست حساسیت آنتي بیوتیکي:

بر طبق اطلاعات نمودار ۱ مقاومت آنتيبیوتیکي در بین سویه هاي فیسیوم نسبت به آمپيسیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکسازین و نیتروفورانتوئین بالاتر از سویه هاي فکالیس است. بر عکس مقاومت به کوتریموکسازول و تتراسیکلین در سویه هاي فکالیس بیشتر است. مقاومت به سینرسید در گونه فکالیس ذاتي است. بدنبال انجام MIC جنتامایسین، همه سویه ها داراي MIC≥1024µg/ml بودند.

نتایج PCR :

در نمونه هاي فاضلاب (۳۶) ۹۵% از سویه هاي HLGR فکالیس و (۱۰۲) ۱۰۰% از سویه هاي فیسیوم HLGR داراي ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia بودند. دو ژن aph(2")-Ia ، aph(2")-Id در هیچکدام از ایزوله ها

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده نشد ولي فقط يک سويه انتروکوکوس فيسيوم داراي ژن aph(2")-Icبود (تصاوير ۱و۲).

نتايج گروه بندي سويه‌هاي HLGR توسط روش PhPlate:

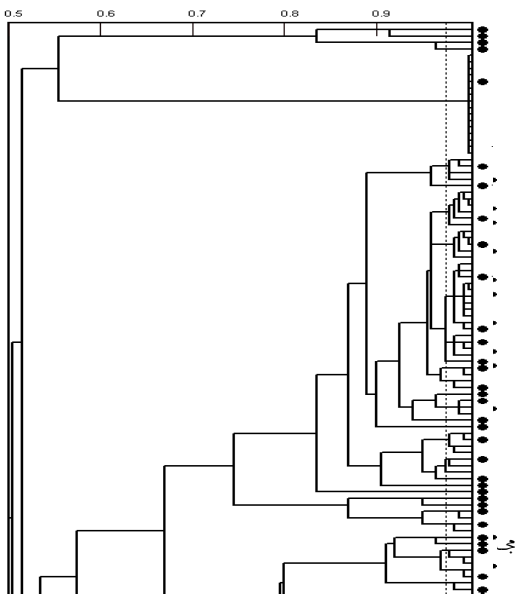
کشت اوليه فاضلاب بر روي محيط حاوي جنتامايسين به ترتيب منجر به جدا سازي ۱۰۲ و ۳۸ سويه مقاوم به جنتامايسين از گونه‌هاي فيسيوم و فکاليس شد. با استفاده از روش PhPlate در جمعيت انتروکوکوس فکاليس ۱۶ تايپ و در جمعيت انتروکوکوس فيسيوم ۵۰ تايپ مشخص شدند.

نتايج گروه‌بندي PhPlate براي سويه‌هاي انتروکوکوس فکاليس:

بدنبال انجام روش PhPlate براي فنوتايپينگ ۳۸ سويه انتروکوکوس فکاليس آناليز کامپيوتري با استفاده از نرم افزارPhP Win- 4.2 انجام شده و رسم دندروگرام نهايي با Di=0.910 منجر به گروه بندي سويه‌ها به (ST) ۶ و (CT) ۱۰گرديد و در نهايت ۱۶ تايپ نهايي مشخص شدند (دندروگرام ۱).

نتايج گروه‌بندي PhPlate براي سويه‌هاي انتروکوکوس فيسيوم:

بر اساس اطلاعات حاصل از دندروگرام بدست آمده با Di=0.945 (ST) ۳۴ و(CT)۱۶ در بين اين سويه‌ها مشاهده گرديد بزرگترين گروه در بين Common type داراي ۱۶ ايزوله بود و بقيه گروههاي CT بين ۱۱-۲ سويه را در خود جاي داده بودند. بر اساس نتايج فوق۵۰ تايپ مختلف در بين جمعيت انتروکوکوس فيسيوم جدا شده از فاضلاب مشخص شدند (دندروگرام ۲).



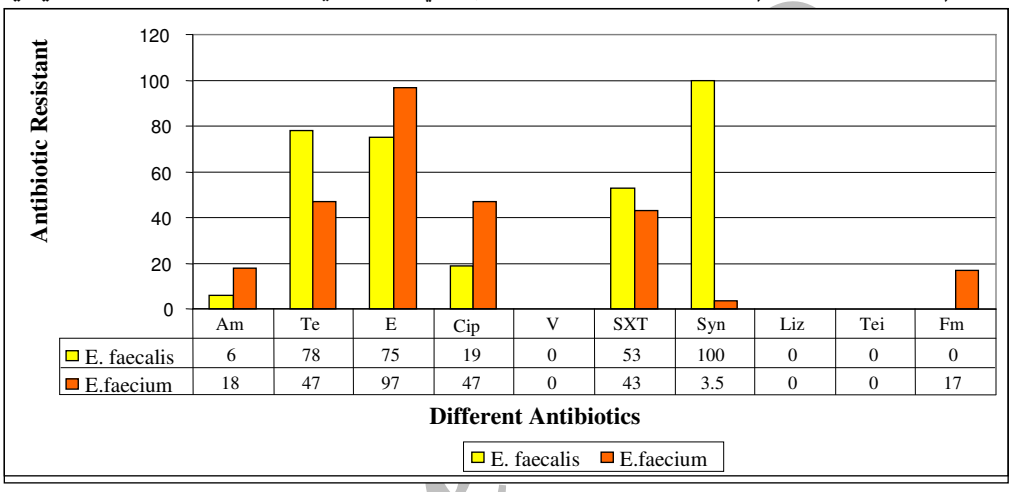
دندروگرام ۱: دندروگرام PhPlate براي ۳۸ سويه HLGR فاضلاب

حاصل از روش انتروکوکوس فکاليس

Archive of SID
www.SID.ir

ID level = 0.975 Sample= 102
Di= 0.945

دندروگرام ۲: دندروگرام [illegible] انتروکوکوس فیسیوم



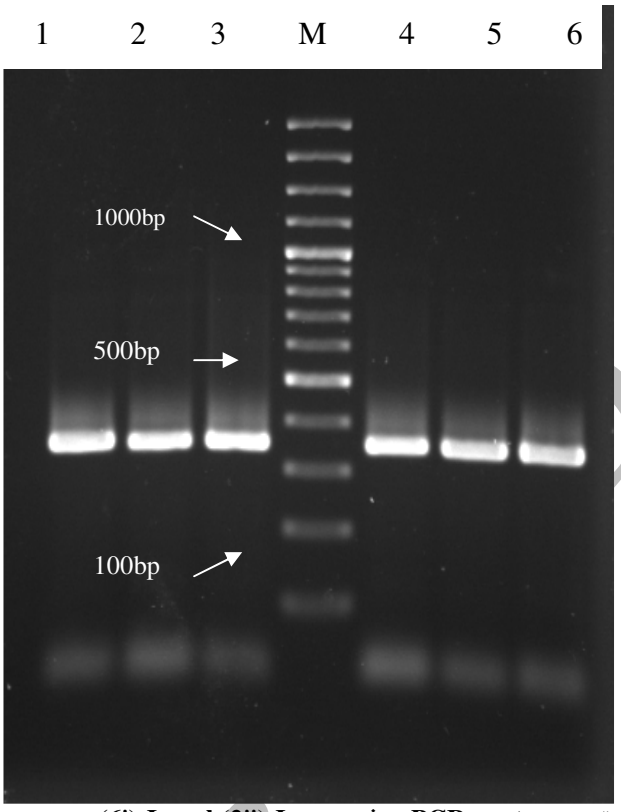
	Am	Te	E	Cip	V	SXT	Syn	Liz	Tei	Fm
E. faecalis	6	78	75	19	0	53	100	0	0	0
E.faecium	18	47	97	47	0	43	3.5	0	0	17

نمودار ۱: درصد فراواني مقاومت آنتي بيوتيكي انتروككهاي فاضلاب به تفكيك گونه

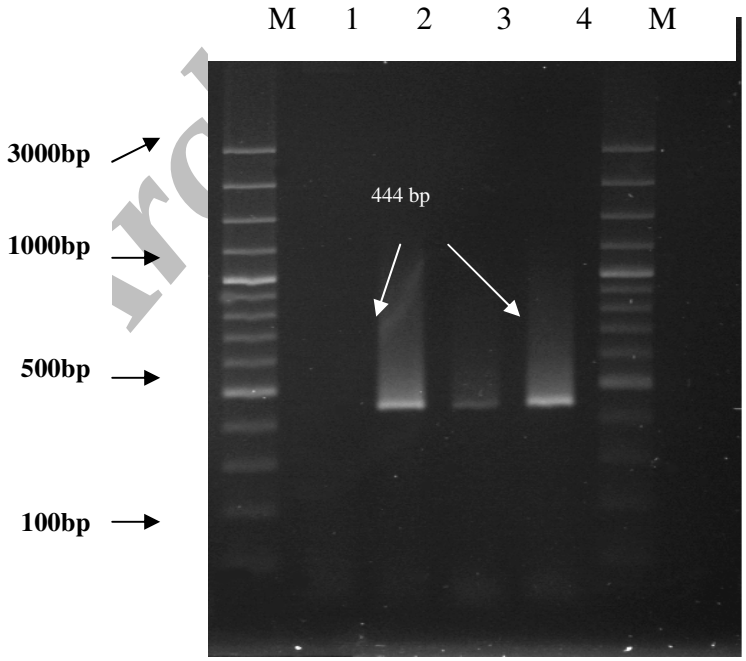
V: Vancomycin, Te: Tetracycline, Am: Ampicillin, E: Erythromycin, Cip: Ciprofloxacin, Tei: Teicoplanin, Fm: Nitrofurantoin, Syn: Quinupristin-dalfopristin (Synercid), Lin: linezolid, SXT: trimethoprime-sulfametoxazole, Gm: Gentamicin

Archive

www.SID.ir



تصویر۱: PCR ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia :
(Lane 1,2,3,4,5,6: HLGR strains , M: Molecular weight marker)



تصویر۲: PCR ژن aph(2'')-Ic در نمونه‌هاي فاضلاب همراه با ماركر وزن مولكولي
(Lane 1,2,3,4,5,6 : HLGR strains , M: molecular weight marker)

بحث

www.SID.ir

در بين اعضاي جنس انتروكوك، انتروكوكوس فكاليس و انتروكوكوس فيسيوم شايعترين گونه‌ها در ايجاد عفونتهاي انساني هستند (۱۱). انتروكوكوس فكاليس در عفونتهاي انتروكوكي نقش بيشتري دارد ولي انتروكوكوس فيسيوم توانايي بالايي در كسب انواع ژنهاي مقاومت آنتي بيوتيكي از خود نشان مي‌دهد و به شرايط محيطي مقاوم‌تر است (۱۲).

توزيع گونه‌اي در انتروكوكهاي جدا شده از نمونه‌هاي فاضلاب (۱۰۲) ۷۳% به گونه فيسيوم و (۳۸) ۲۷% نيز به گونه فكاليس اختصاص داشت. بالا بودن درصد گونه فيسيوم نسبت به فكاليس در نمونه فاضلاب در تحقيقات مشابه ديگري كه از محيطهاي حاوي آنتي‌بيوتيك استفاده شده گزارش شده است (۱۳).

Cupakova در سال ۲۰۰۳ در سوئد، ۱۰۰ ايزوله انتروكوكي از فاضلاب بدست آورد كه ۶۰% از اين ايزوله‌ها از گونه فكاليس و ۸% از آنها از گونه فيسيوم و بقيه موارد از ديگر گونه‌ها بودند. او در اين مطالعه نشان داد كه بيش از ۹۵% ايزوله‌ها به بيش از يك آنتي‌بيوتيك مقاومند و مقاومت همزمان به ۴ الي ۵ آنتي‌بيوتيك بطور همزمان به ترتيب ۳۷% و ۲۶% بود (۱۴).

در اين مطالعه درصد فراواني انتروكوك‌هاي چند مقاومتي در سيستم فاضلاب در گونه فكاليس ۶۴% و در گونه فيسيوم ۹۴% بود. بر طبق گزارش costa Martin de در برزيل در سال ۲۰۰۲ (۱۵) فراواني سويه‌هاي چند مقاومتي در فاضلاب ۴۹/۴% بوده است كه شبيه به مطالعه‌اي در تايلند كه توسط Tansuphasini (۱۶) در سال ۲۰۰۶ انجام گرفته (۴۲%) مي‌باشد.

همانطوري كه در نمودار ۱ مشخص است در بين ايزوله‌هاي گونه فيسيوم از سيستم فاضلاب مقاومت به سيپروفلوكسازين و اريترومايسين وتتراسيكلين بالاترين درصدها را به خود اختصاص داده‌اند در حاليكه در ايزوله‌هاي گونه فكاليس مقاومت به اريترومايسين، تتراسيكلين و كوتريموكسازول بالاتر است.

گزارشات مقاومت آنتي‌بيوتيكي نسبت به اريترومايسين در كشورهاي مختلف متفاوت است. مثلاً در تحقيق كان[1] و همكارانش در سال ۲۰۰۴ در آمريكا ميزان مقاومت به اريترومايسين ۵۷% بوده است (۱۷). Stobberingh نيز در تحقيق خود اين مقاومت را ۳۲% گزارش نمود (۱۸). بالاتر بودن ميزان مقاومت به اريترومايسين مي‌تواند ناشي از مصرف بالاي اين آنتي‌بيوتيك دركشور باشد.

تتراسيكلين بيشتر در درمان عفونتهاي باكتريهاي گرم مثبت بكار مي‌رود. امروزه مصارف آن بدليل اثرات جانبي و همچنين ايجاد مقاومت نسبت به آن محدود شده است (۱۹). در كشورهاي ديگر نيز ميزان مقاومت به تتراسيكلين در هر دو مورد سويه‌هاي باليني و فاضلاب، بالا بوده است (۴,۷,۲۰).

بر اساس گزارشات مختلف مقاومت نسبت به

1. Kahn

Archive of SID

www.SID.ir

سیپروفلوکسازین در سالهای ۱۹۹۰-۱۹۸۹ سیر صعودی داشته است (۲۱). مقاومت بالا (حدود ۴۰٪) به سیپروفلوکسازین در بین ایزوله‌های فاضلاب در تحقیق ما نیز مشاهده شد که می‌تواند بدلیل استفاده زیاد از این دارو در درمان انواع عفونتها و بخصوص عفونتهای ادراری بعنوان یکی از اولین انتخابهای درمانی باشد. اکثر سویه‌های HLGR در مطالعه ما مقاوم به سیپروفلوکسازین هم بودند.

انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین از سال ۱۹۸۰ به بعد اهمیت زیادی پیدا کردند. مقاومت به ونکومایسین غالباً در انتروکوکوس فیسیوم بیشتردیده می‌شود ولی اخیراً در گونه فکالیس هم رو به افزایش گذاشته است (۲۲). مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در مطالعه حاضر در بین سویه‌های جدا شده مشاهده نگردید.

کوئینو پریستین-دالفوپریستین (سینرسید) و لینه- زولید بعنوان داروهایی که اخیراً وارد بازارشده است اثر بسیار خوبی بر روی عفونتهای انتروکوکی بخصوص انتروکوکوس فیسیوم چند مقاومتی دارد. در مطالعه حاضر مقاومت به سینرسید در بین ایزوله‌های کلینیکی گونه فیسیوم ۲/۴٪ و مقاومت نسبت به لینه زولید در ایزوله‌های گونه فکالیس ۳/۸٪ است. این مقاومت پایین بدلیل عدم مصرف زیاد این دو داروی جدید و همچنین ناشناخته بودن آن برای برخی از پزشکان در درمان عفونتهای انتروکوکی در ایران است. اگرچه در ایران نیز اخیراً در مورد مقاومت به سه گروه اصلی دارویی (گلیکوپپتیدها، آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتامها) پزشکان اغلب از این دو دارو کمک می‌گیرند.

با ایجاد مقاومت دارویی، روده با سویه‌های مقاوم انتروکوکی کلونیزه می‌شود و انتقال این مقاومت به سویه‌های حساس هم صورت می‌گیرد. وجود این سویه‌های مقاوم در مدفوع منجر به آلودگی فاضلابها و انتشار ژنهای مقاومت می‌شود. چنانچه افراد کلونیزه با سویه‌های چند مقاومتی به دلایلی در بیمارستانها بستری شوند احتمال انتقال سویه‌های مقاوم به سایر بیماران هم وجود خواهد داشت. راه این انتقال می‌تواند از طریق دست آلوده پرسنل بیمارستان و یا وسایل آلوده باشد. هر چه زمان بستری شدن افراد در بیمارستانها طولانی‌تر باشد چرخش این سویه‌های مقاوم در کلیه قسمتهای بیمارستانها بیشتر و خطرناکتر خواهد بود (۲۳).

آمینوگلیکوزیدها و بخصوص جنتامایسین حداقل سه دهه است که در ایران بطور وسیعی استفاده می‌شوند و هنوز هم کاربرد زیادی در بیماران بستری و سرپایی دارند، پس درصد بالای مقاومت به این دارو در جمعیت انتروکوکی مورد مطالعه می‌تواند ناشی از مصرف بالای آن باشد. اولین استافیلوکوک مقاوم به جنتامایسین بدنبال مصرف گسترده جنتامایسین در دهه ۱۹۷۰ پیدا شد و همین قضیه در سال ۱۹۷۹ منجر به ظهور انتروکوک‌های HLGR شد (۲۴) مقاومت سطح بالا به جنتامایسین در انتروکوک‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

با MIC>2000 µg/ml مشخص مي‌شود (۲۵). در مطالعه ما تمام سویه‌هاي HLGR داراي MIC>1024µg/ml بودند.

در بررسي ما ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia در (۱۰۲) ۱۰۰% از سویه‌هاي فیسیوم و (۳۶) ۹۵% درصد از سویه‌هاي فکالیس جداشده از نمونه‌هاي فاضلاب دیده شد. درصد بالاي فراواني این ژن در ایزوله‌هاي HLGR فاضلاب بیانگر نقش ویژه و همچنین پراکندگي زیاد این ژن در ایران مي‌باشد. مخازن احتمالي ژنهاي مقاومت به جنتامایسین در انتروکوک‌ها هنوز به درستي مشخص نیستند ولي محققین نقش زنجیره غذایي و همچنین فلور نرمال افراد را در این زمینه دخیل مي‌دانند (۲۶). غیر از یک سویه فیسیوم که از فاضلاب جدا شده بود و براي ژن aph(2")-Ic مثبت بود بقیه ایزوله‌ها از نظر دیگر ژنهاي ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین شامل ژنهاي aph(2")-Ic، aph(2")-Id و aph(2")-Ib منفي بودند. در مورد منفي بودن نتیجه PCR براي سویه‌هاي HLGR که هیچکدام از ژنهاي مقاومت به جنتا مایسین را نداشتند مي‌توان گفت که شاید به علت موتاسیونهاي احتمالي باشد که در ساختار این ژنها رخ داده و اتصال پرایمرها به مناطق مورد نظر بر روي DNA هدف با مشکل مواجه مي‌گردد و در نتیجه واکنش PCR منفي خواهد بود. در این صورت مطالعه تنوع این موتاسیونها نیز به نوبه خود ارزش زیادي خواهد داشت. آمار مطالعات مختلف در زمینه ژنهاي ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین بسیار متفاوت است (۲۱, ۲۶-۲۸).

کنترل عفونتهاي انتروکوکي چند مقاومتي بسیار مشکل است و هیچ راه درماني کلاسیک و مشخصي در این مورد وجود ندارد (۲۹). در این حالت کنترل سرایت این قبیل میکروارگانیزمها اهمیت زیادي دارد و روشهاي تایپینگ فنوتیپي و ژنوتیپي به ما در تشخیص کلونالیتي سویه‌ها و کنترل بهتر آنها کمک مي‌کند.

طیف وسیعي از روشهاي فنوتیپي براي افتراق و تایپینگ استرین‌هاي باکتریال معرفي شده‌اند که شامل استفاده از روشهاي بیوشیمیایي، آنتي سرمها، حساسیت به باکتریوفاژ، تولید باکتریوسین، پروفایل پروتئینهاي غشاي خارجي و الگوي مقاومت آنتي‌بیوتیکي است. یکي از روشهاي فنوتایپینگ جدیدي که در مطالعه جمعیتهاي بزرگ باکتریال کاربرد دارد PhP typing مي‌باشد که ارزشي معادل با روشهاي تایپینگ DNA مي‌باشد.

همانطور که در دندروگرام ۱ مشاهده مي‌شود در بین ۳۸ سویه انتروکوکوس فکالیس فاضلاب که همه HLGR بودند، با استفاده از روش PhP typing و Di= 0.910 در کل ۱۶ کلون جدا شدند و وجه تمایز این کلونها بیشتر بر اساس تستهاي قندي مانیتول، لاکتوز و ملي بیوز بود.

در بین ۱۰۲ سویه انتروکوکوس فیسیوم فاضلاب که همه HLGR بودند، با استفاده از روش PhPlate و Di=0.945، ۵۰ فنوتیپ مختلف جدا شدند. وجه تمایز فنوتیپهاي جدا شده بیشتر در قندهاي رافینوز، سوربیتول،

Archive of SID

www.SID.ir

آمیگدالین و Gal لاکتون بوده است (دندروگرام ۲).

با توجه به مطالب فوق‌الذکر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تست قندی مانیتول در بین ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس در این تحقیق جهت افتراق کلونهای معرفی شده در روش PhPlate نقش بسزایی داشته و این نکته حائز اهمیت است که این تست قندی علیرغم اختلاف در منابع نمونه‌گیری و احتمال وقوع تغییرات مختلف، در نتیجه شرایط محیطی در نمونه‌های مختلف، همچنان نتایج قابل اطمینانی را برای تایپینگ این گونه نشان داده است.

همچنین در بین ایزوله‌های انتروکوکوس فیسیوم نیز تستهای قندی رافینوز و سوربیتول، صرف نظر از تنوع شرایط محیطی در تعیین سرنوشت تایپینگ سویه‌ها نقش ویژه‌ای داشتند و علیرغم تغییرات شرایط محیطی این دو تست قندی باعث افتراق تایپها شدند.

نکته مهم دیگر در مورد نتایج تایپینگ فنوتیپی با این روش این است که هرچه Diversity index در جمعیت مورد مطالعه به عدد یک نزدیکتر باشد یعنی تنوع سویه‌ها بیشتر است.

Di=0.945 در بین ایزوله‌های انتروکوکوس فیسیوم بدین معناست که در ایزوله‌های فاضلاب، ما با جمعیت متنوع‌تری از سویه‌های فیسیوم روبرو هستیم. بنظر می‌آید که در سیستم فاضلاب با توجه به دینامیک بودن شرایط محیطی تنها استرین‌هایی بقا پیدا می‌کنند که مقاوم‌ترند و از آنجایکه سویه‌های انتروکوکوس فیسیوم کلاً مقاوم‌تر از سویه‌های انتروکوکوس فکالیس هستند (۱۲) بیشتر از گونه فکالیس دیده شده و تنوع بیشتری را نیز نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

تایپینگ انجام شده در خصوص ایزوله‌های HLGR انتروکوکی حاکی از وجود تنوع بالا در بین این ایزوله‌ها است که می‌تواند مؤید متعدد بودن منابع آلودگی دخیل در چرخش سویه‌های HLGR باشد. از طرف دیگر وجود کلونهای HLGR شایع می‌تواند بیانگر شیوع کلونال استرینهای مهم و اصلی در سطح جامعه بوده و یادآور این باشد که استرینهای مشترک چه در جمعیت‌های انسانی به شکل فلور نرمال ویا پاتوژنهای بیمارستانی و چه بصورت چرخش در سیستم فاضلاب همواره می‌توانند تداوم پیدا کنند. در این مورد با در دست بودن اطلاعات مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌های شایع، می‌توان قدمهای مؤثری در جهت کنترل آنها برداشت و همچنین با در نظر گرفتن تدابیر بهداشتی مناسب از بروز آنها در وقوع اپیدمی‌ها در آینده پیشگیری نمود. تنوع تیپ در جمعیت انتروکوکی مورد مطالعه می‌تواند ناشی از: ۱) منابع مختلف آلوده‌کننده فاضلاب از جمله پسابهای خانگی و بیمارستانی، ۲) فلور نرمال روده ایرانی‌ها از لحاظ وجود انتروکوکهای HLGR و ۳) تبادلات ژنتیکی در مورد ژنهای مقاومت به جنتامایسین در بین جمعیت انتروکوکی باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از نظر پراکندگی زیاد سویه‌های HLGR انتروکوکی به نظر می‌رسد که

Archive of SID

www.SID.ir

فاضلاب تهران مي‌تواند نقش يک مخزن احتمالي را براي چرخش سويه هاي HLGR انتروكوكي داشته باشد.

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتي با حمایت معاونت تحقیقات و فناوري وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشكي كشور به انجام رسده است.

تقدیر و تشکر

References

1. Udo EE, Al-Sweih N, John P, Mohanakrishnan S. Characterization of high-level aminoglycoside-resistant enterococci in Kuwait hospitals. Microb Drug Resist 2004; 10: 139-145.
2. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Cli Microbiol 2000; 38: 3092-3095.
3. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zerror MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1423-1426.
4. Kühn I, Burman G, Haeggman S, Tullus K, Muray BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J Clin Microbiol 1995; 33: 2812-2817.
5. Kühn I, Iversen A, Mollby R. The PhenePlate system for studies of the diversity of enterococcal populations from the food chain and the environment. Int J Food Microbiol 2003; 2000: 189-196.
6. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kuhn I, Mollby R, Eshraghis S, Pourshafie MR. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. Water Air Soil Pollut 2007; 185: 111-119.
7. Iversen A, Kuhn I, Franklin A, Mollby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 2838-2842.
8- Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Cli Microbiol 1989; 27: 731-734.
9. Woodford N, Reynolds R, Turton J, Scott F, Sinclair A, williams A. Two widely disseminated strains of Enterococcus faecalis highly resistant to gentamicin and ciprofloxacin from bacteraemias in the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 711-714.
10. National Committee for clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility tests, approved standard. 7th ed. Villanoa:National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000.
11. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L and Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in Iran. Microb. Drug Resist 2006; 12: 265-268.
13. Karmarkar MG, Gershom ES, Mehta PR. Enterococcal infections with special reference to phenotypic characterization & drug resistance. Indian J Med Res 2004; 119 (Suppl): 22-25.
13. Galimand M, Sabtecheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon TN1548. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2949-2953.
14. Cupakova S, Lukasova J. Agricultural and municipal waste water as a source of antibiotic-resistant enterococci. Acta Vet. Brno 2003; 72: 123-129.
15. Martins da Costa P, Vaz-Pires P, Bernardo F. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants.Water Res 2006; 40: 1735-40.
16. Tansuphasiri U, Khaminthakul D, Pandii W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37: 162-170.
17. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug- resistant Enterococcus spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and

Archive of SID

www.SID.ir

vancomycin resistance gene markers by PCR. Mol Cell Probes 2005; 19: 27-34.
18. Stobringh E, Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R. Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey slaughters and urban residents in the south of the Netherlands, evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? Antimicrob Agent Chem 1999; 43: 2215-2221.
19. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Therapy of enterococcal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 14: 29-35.
20. Novais C, Couque T, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant Enterococci from hospital sewage in Portugal. App Environ Microbiol 2005; 71: 3364-3368.
21. Schaberg DR, Dillon WI, Terpenning MS, Robinson KA, Bradly SF and Kauffman CA. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2533-2535.
22. Simonsen GS, Smabrekke L, Monnet DL, sSorensen TL. Moller JK, Kristinsson KG 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: 323-331.
23. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future.Emerg Infect Dis 1998; 4: 239-249.
24. Titze-de-Almeida,R, Filho MR, NOgueira CA, Rodrigues IP, Filho JE, Donacimento RS et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian`intensive care units. BJID 2004; 8: 197-205.
25. Daikos GL, Bamias G, Kattamis C, Zerros MJ, Chow JW, Christakis G et al. Structures, locations, and transfer frequencies of genetic elements conferring high-level gentamicin resistance in Enterococcus faecalis isolates in Greece. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3950-3953.
26. Galimand M, Sabtecheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA Aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon TN1548. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2949-2953.
27. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothaki V. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 277-278.
28. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MD, Chow JW, Barttett P, et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. J Clin Microbiol 2003; 41: 1109-1113.
29. Kuzucu A, Hallgren A, Saeedi B, Nilsson M, Monstein HJ, Isaksson B, and et al. Genetic relatedness among Enterococcus faecalis with transposon-mediated high-level gentamicin resistance in Swedish intensive care units. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 162-167.

Archive of SID

www.SID.ir