

بررسی کلونالیتی سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و
انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به مقادیر بالای جنتا مایسین
جدا شده از فاضلابهای شهر تهران
فاتح رحیمی^۱، دکتر مهناز سیفی^۲، دکتر حمدرضا یورشفیع^۳، دکتر حمدمهدی سلطان
دلل^۴، دکتر محمد رضا اشراقیان^۵، دکتر محمد رضا پورمند^۶
۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، انسستیتو پاستور ایران
۲- دکتراي میکروب شناسی، مجتمع میکروب شناسی، انسستیتو پاستور ایران
۳- دانشیار، انسستیتو پاستور ایران، مجتمع میکروب شناسی، انسستیتو پاستور ایران، (مؤلف مسؤول)
تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۰۵۵۳۵ pour@pasteur.ac.ir
۴- دکتراي میکروب شناسی، مجتمع میکروب شناسی
۵- دکتراي آمار حیاتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت
۶- دکتراي میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت

چکیده

زمینه و هدف: در سالهای اخیر پیدایش انتروکوکهای مقاوم به مقادیر بالای پنیسیلین، گلیکو پپتیدها و جنتامایسین به تنها یکی یا بصورت چند مقاومتی باعث بروز مشکلات حاد در درمان عفونتهای انتروکوکی شده است. انتروکوکها جزء فلور نرمال روده هستند و از این راه به فاضلابها راه پیدا می‌کنند. یکی از روشهای بررسی جمعیت انتروکوکی غربالگری فاضلابها از حیث وجود انتروکوکها می‌باشد. هدف تحقیق حاضر بررسی کلونالیتی در بین سویه‌های HLGR انتروکوکی جدا شده از فاضلاب در تهران می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۴۰ ایزوله از سه تصفیه خانه فاضلاب در مناطق مختلف شهر تهران در محدوده زمانی آذر ماه ۸۵ تا اردیبهشت ماه ۸۶ جمع آوری شد. تعیین جنس و گونه ایزوله‌ها و زنگنه مقاومت به جنتامایسین توسط روش PCR و تست حساسیت آنتیبیوتیکی و MIC نیز با استفاده از استاندارد CLSI به انجام رسیده و روش Biochemical fingerprinting (PhP typing) با هدف تایپینگ سویه‌های HLGR انتروکوکی بکار رفت.

یافته‌ها: انتروکوکوس فکالیس %۲۶ و انتروکوکوس فیسیوم %۷۴، شایعترین گونه‌های جدا شده از نمونه‌های فاضلاب بودند. بالاترین مقاومت آنتیبیوتیکی در بین سویه‌های فیسیوم نسبت به اریترومایسین و در بین سویه‌های فکالیس نسبت به تراسیکلین دیده شد. MIC تمام سویه‌های HLGR انتروکوکی $\geq ۱۰۲۴\text{ }\mu\text{g/ml}$ بود و اکثریت آنها دارای Ia (۶')-Ie-aph (۲")-Ia بودند و فقط یک سویه انتروکوکوس فیسیوم دارای Ic (۲")-aph بود. روش PhP typing در گونه فکالیس ۱۶ تایپ مختلف را با $\text{Di}=۰/۹۱۰$ و در گونه فیسیوم با $\text{Di}=۰/۹۴۵$ ، $\text{Di}=۰/۹۴۵$ تایپ مختلف را مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: حضور Ia (۶')-Ie-aph (۲") در اکثریت ایزوله‌های HLGR، نشان دهنده انتشار وسیع این Ia در جمعیت انتروکوکی فاضلاب است. شیوع متنوع کلونال در جمعیت انتروکوکهای HLGR و چند مقاومتی در فاضلاب تهران نشان دهنده نقش احتمالی فاضلابها در چرخش این سویه‌ها در جامعه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکهای HLGR، PhP typing، فاضلاب، اصلاح نهایی: ۸۷/۵/۱، پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۴، وصول مقاله: ۸۷/۵/۶

هستند یکی از روشهای بررسی جمعیت انتروکوکی، کشت روتین از مدفع افراد است و لی بدلیل مشکلات نمونه‌گیری از مدفع، چون انتروکوکها از روده انسان می‌توانند به داخل فاضلابها راه پیدا کنند یک روش عملی دیگر غربالگری فاضلابها از حیث وجود انتروکوکها می‌باشد.

Biochemical fingerprinting (PhP typing)
یک سیستم بیوشیمیایی جهت تایپینگ انواع باکتریهایی است که دارای قدرت تخمیر قندهای می‌باشد. در این روش با آنالیز کمی واکنشهای بیوشیمیایی متعدد که در داخل میکروپلیت‌هایی حاوی سوبستراهاي دهیدراته انجام می‌شود می‌توان تعداد زیادی از باکتریهای هم جنس را گروه‌بندی نمود. تستهای انتخاب شده در این پانل به گونه‌ای انتخاب شده‌اند تا بطور کامل اختصاصی عمل کرده و بالاترین قدرت تفکیک را در بین گونه‌ها داشته باشند. آنالیز نهایی توسط نرم افزارهای کامپیوتري محاسبه شده و ایزوله‌های مورد آزمایش بر اساس تستهای بیوشیمیایی به فنوتیپهای مختلف گروه‌بندی می‌شوند. نتایج حاصل از این روش در مقایسه با روشهای مولکولی مختلف مانند PFGE و Ribotyping در اکثریت موارد همخوانی دارد (۴,۵). در این روش هر بیوتایپ به ایزوله‌هایی با درصد شباهت بیشتر یا ایزوله‌های مشابه اطلاق می‌شود که در یک گروه قرار می‌گیرند. Single type (ST) به ایزوله‌هایی اطلاق می‌شود که دارای الگوی منحصر به فرد هستند و Common type (CT) گروههایی هستند که بیش از یک

انتروکوکهای چند مقاومتی را به افزایش است و در این میان انتروکوکهای مقاوم به جنتامايسین و ونکومايسین از اهمیت خاصی برخوردارند (۱). انتروکوکها بصورت ذاتی به مقادیر پایین آمینوگلیکوزیدها مقاوم بوده و به همین علت این گروه از آنتی بیوتیکها به تنها ی در درمان عفونتهاي انتروکوکی ناکافی هستند و لی در ترکیب با مانع‌کننده‌های سنتز دیواره سلولی که ورود آنها را به سلول تسهیل می‌کند از مؤثرترین درمانهای رایج می‌باشند. بروز مقاومت بالا به جنتامايسین HLGR در اثر کسب ژنها ی است که باعث تغییرات آنزیمی بر روی دارو می‌شوند. در انتروکوکها ژن -Ia aac(6')-Ie-aph(2") در پیدايش نقش اصلی را در دوز بالای مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامايسین دارد و لی در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر از جمله ژنها ی aph(2")-Ic ، aph(2")-Id و aph(2")-Ib نیز در این قضیه مشخص شده است. این ژنها توسط پلاسمیدها و یا ترانسپوزونها منتقل می‌شوند (۲). در بحث شناسایی ژنها ی ایجادکننده مقاومت نسبت به انواع آمینوگلیکوزیدها، راهها و فرکانس انتقال آنها نیز بسیار مهم هستند (۳). تعیین تیپ سویه‌های انتروکوکی و یافتن تنوع کلinal بین آنها از یک منطقه، در یافتن راههای کنترل آنها کمک شایانی می‌نماید. روشهای کنترل شامل غربالگری سویه‌های انتروکوک از منابع آلودگی و تعیین تیپ و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها و سپس بکارگیری راههای مقابله با آنها است. از آنجاییکه انتروکوکها در روده کلونیزه

طبق مطالعات قبلی محققین (۶) بدلیل وجود تعداد زیاد جمعیت انترکوکوی در نمونه های فاضلاب، به منظور دستیابی به کلندی های تفکیک شده بر روی محیط کشت، از روش فیلتراسیون با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون (Millipore) و محیط کشت (Becton mEnterococcus agar Sparks, MD, USA) Dickinson and Co., استفاده شد (۷). در ابتدا رقت ۱/۱۰ از نمونه های فاضلاب با سرم فیزیولوژی استریل تهیه شده و با استفاده از سیستم فیلتراسیون استاندارد (Millipore) عمل فیلتر روی نمونه های رقیق شده انجام میگرفت. سپس فیلترها به مدت ۲ ساعت جهت غنی سازی بر روی محیط BHI و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از آن بر روی محیط کشت agar ۶۴ µg/ml mEnterococcus از آنتیبیوتیک جنتامایسین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) منتقل شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت کلندی های مشکوک به انترکوکوک، با رنگ صورتی بر روی فیلتر ظاهر شده و میتوان از روی این فیلترها کلندی برداری نموده و بر روی محیط بلادآگار خون گوسفندی منتقل نمود تا اولاً محیط غنیتری را جهت رشد انترکوکوها فراهم نمود و ثانیاً از این راه به خالص بودن سویه مورد مطالعه پی برده. پس از رشد انترکوکوها بر روی محیط بلادآگار آزمایشات تعیین جنس و گونه بر روی آنها انجام میشد. در

نوع ایزوله را شامل میشوند. در این روش تنوع جمعیتی در بین ایزوله ها به توزیع آنها در بین تیپهای مختلف بدست آمده بستگی دارد. به عبارت دیگر هر چه تعداد تیپهای بدست آمده بیشتر باشند Diversity index (Di) جمعیت باکتریال نیز بیشتر خواهد بود. در دندروگرام بدست آمده هر سویه توسط یک خط افقی مشخص میشود در حالیکه سویه های مختلف بر اساس میزان شباهتی فنوتیپی شان توسط خطوط عمودی بهم وصل میشوند. هدف تحقیق حاضر بررسی HLRG کلونالیتی در بین سویه های انترکوکوی جدا شده از فاضلاب تهران و تعیین مقاومت آنتیبیوتیکی آنها به منظور کنترل بهتر عفونتهاي انترکوکوی میباشد.

روش بررسی نمونه گیری فاضلاب

از تصفیه خانه اکباتان در آذر ماه ۸۵، تصفیه خانه شوش در اردیبهشت ۸۶ و تصفیه خانه صاحبقرانیه در بهمن ماه ۸۵ نمونه گیری بعمل آمده است. تعداد نمونه گیری یک بار برای هر تصفیه خانه بوده است. برای جمع آوري نمونه ها از ظروف شیشه ای و دربدار استریل با حجم ۲۵۰ میلی لیتر استفاده شده است. ظرف استریل در عمق ۵۰-۷۰ سانتیمتری از سطح فاضلاب قرار میگرفت و به این ترتیب نمونه ها جمع آوري شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل میشدند و در عرض کمتر از ۳ ساعت مورد بررسی قرار میگرفتند.

جدا سازی سویه های فاضلاب:

رسوبگیری از آن در ۱۰۰۰ rpm بعدt ۱۵ دقیقه، DNA رسوب نموده و با افزودن ۵۰ میکرولیتر از بافر TE حاوی RNase میتوان از آن در واکنش PCR استفاده نمود (۹). برای انجام تکثیر زن اختصاصی جنس و دوگونه مورد نظر توسط واکنش PCR بک میکرولیتر از DNA استخراج شده وارد واکنش با پرایمرهای 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. رنگآمیزی ژل نیز با اتیدیوم بروماید (غلظت ۵/۰ میکروگرم در میلیلیتر) انجام شده و مشاهده باند bp ۱۰۰ ۹۴۱ bp تشخیص جنس و باندهای ۶۵۸ bp به ترتیب برای تشخیص گونه‌های فکالیس و فیسیوم، در حضور مارکر وزن مولکولی انجام شد (۲).

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

پس از تعیین جنس و گونه باکتریهای جدا شده کلیه گونه‌های فکالیس و فیسیوم با روش Disk diffusion مورد سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای ۱۱ آنتی‌بیوتیک قرارگرفتند. دیسکهای آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین دوز بالا، آمپیسیلین، ونکومایسین، اریترومایسین، کوتريوكسازول، نیتروفورانتوئین، ترااسيکلین، سیپروفلوکسازین و تیکوپلانین از شرکت (BD BBL, Sparks, MD, USA) BD و دیسکهای سینرسید و لینه زولید از شرکت (Bootle, Mast Mersey Side, UK) بودند. کلیه مراحل انجام این

مجموع ۱۴۰ سویه انتروکوک HLGR در این تحقیق از فاضلاب ورودی این سه تصفیه خانه جمع آوری گردید. تعیین جنس و گونه سویه‌ها:

برای این منظور از تستهای کاتالاز، رشد در نک ۶/۵ درصد، هیدرولیز بایل اسکولین و تست PYR استفاده شد (۸). از آنجاییکه فقط دو گونه فکالیس و فیسیوم در این تحقیق مورد نظر بودند از تستهای تخمیر دو قند آرابینوز و سوربیتول و همچنین حیط تلوریت پتابسیم برای تعیین گونه استفاده شد.

روش PCR جهت تایید نهایی جنس و گونه انتروکوک:

تهیه DNA: ۳ میلیلیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی حیط کشت BHI broth را در دور سانتریفوژ نموده و پس از خارج کردن محلول رویی ۱۵۰ میکرولیتر از بافر Tris- (HCL, pH=8; Sucrose 7%, EDTA 1 mM) را به همراه ۲۰ میلیگرم در میلیلیتر از لیزوژیم (Sigma) و ۱۲ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد به رسوب اضافه می‌کنیم و با ورتسکس بطور کامل خلوط نموده بدت ۵ دقیقه در جاوارت یخ قرار می‌دهیم. در این مرحله پس از انجام سانتریفوژ در ۱۰۰۰ rpm بعدt ۵ دقیقه فاز رویی را به یک لوله جدید منتقل نموده و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از خلوط فتل و کلروفرم و سانتریفوژ جدد (سه بار)، فاز رویی را به لوله جدید منتقل می‌کنیم. در این مرحله با افزودن اتانول سرد به این محلول و قراردادن آن در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد به مدت یک شب و

scanget 4890 خوانده می شود و طی آنالیز با نرم افزار WinPh منجر به رسم دندروگرام گروه بندی فنوتیپی ایزوله ها می گردد (۴).

یافته ها

نتایج کشت نمونه ها:

گونه گیری از سه تصفیه خانه فاضلاب اکباتان، شوش و صاحبقرانیه در جمیع منجر به جداسازی ۴۰ سویه انتروکوک با مقاومت بالا به جنتامایسین گردید. توزیع گونه ای در بین این ایزوله ها به صورت (۳۸ مورد) %۲۶ و (۱۰۲ مورد) %۷۴ به ترتیب برای انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم بود. همانطوری که انتظار می رفت درصد جداسازی گونه فیسیوم در فاضلاب بطور مشخصی بالاتر از گونه فکالیس بود.

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی: بر طبق اطلاعات نمودار ۱ مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های فیسیوم نسبت به آمپیسیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکسازین و نیتروفورانتوئین بالاتر از سویه های فکالیس است. بر عکس مقاومت کوتريوكسازول و تراسیکلین در سویه های فکالیس بیشتر است. مقاومت به سینرسید در گونه فکالیس ذاتی است. بدنبال انجام MIC جنتامایسین، همه سویه ها دارای $MIC \geq 1024 \mu\text{g/ml}$ بودند.

نتایج PCR :

در گونه های فاضلاب (۳۶٪) از سویه های HLGR فکالیس و (۱۰۲٪) از سویه های فیسیوم aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia HLGR دارای ژن aph(2'')-aph(2'')-aph(2'')-Id بودند. دو ژن aph(2'')-aph(2'') در هیچکدام از ایزوله ها

آزمایش با استفاده از استانداردهای CLSI انجام شده است. تعیین حداقل غلظت Minimal Inhibitory Concentration (MIC) با microdilution روش آنتی بیوتیکی $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۲۴ شد (۱۰).

PCR جهت تشخیص ژنهای مقاومت به جنتامایسین در ایزوله های HLGR: مجموعاً چهار ژن عامل اجاد مقاومت به جنتامایسین در بین انتروکوکهای HLGR جدا شده با استفاده از پرایرهاي اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند (۳).

Biochemical Fingerprinting : (PhPlate)

در سیستم PhPlate (PhPlate Microplates Techniques AB, Sweden) یکسری تستهای بیوشیمیایی در تایپینگ و گروه بندی انتروکوکها استفاده می شود که اولاً از ثبات بیشتری در بین سویه های انتروکوکی برخوردارند و ثانیاً بیشترین قدرت افتراق را در بین آنها دارند. این ۱۱ تست شامل آرابینوز، لاکتوز، ملیبیوز، ملزیتوز، رافینوز، سوربیتول، اینوزیتول، مانیتول، Gal لاکتون، آمیگدالین و گلوكونات می باشد. این مواد در ته چاهکهای میکروپلیت ۹۶ تایی کوت شده اند. اساس این سیستم اند ازه گیری میزان جذب نوری و اکنشهای تخمیری انجام شده در سه زمان مختلف (۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت پس از تلقيق باکتری) بوده و پس از گذشت ۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت از تلقيق باکتری میزان رنگزایی هر چاهک با استفاده از اسکنر مدل HP

سویه ها به (ST) ۶ و (CT) ۱۰ گردید و در نهایت ۱۶ تایپ نهایی مشخص شدند (دندروگرام ۱).

نتایج گروه بندی PhPlate برای سویه های انتروکوکوس فیسیوم:

بر اساس اطلاعات حاصل از دندروگرام بدست آمده با (ST) Di=0.945 ۳۴ و (CT) ۱۶ در بین این سویه ها مشاهده گردید Common type بزرگترین گروه در بین دارای ۱۶ ایزوله بود و بقیه گروه های CT بین ۲-۱۱ سویه را در خود جای داده بودند. بر اساس نتایج فوق ۵۰ تایپ مختلف در بین جمعیت انتروکوکوس فیسیوم جدا شده از فاضلاب مشخص شدند (دندروگرام ۲).

مشاهده نشد ولی فقط یک سویه انتروکوکوس فیسیوم دارای ژن (2")-Ic bapI وجود (تصاویر ۱ و ۲).

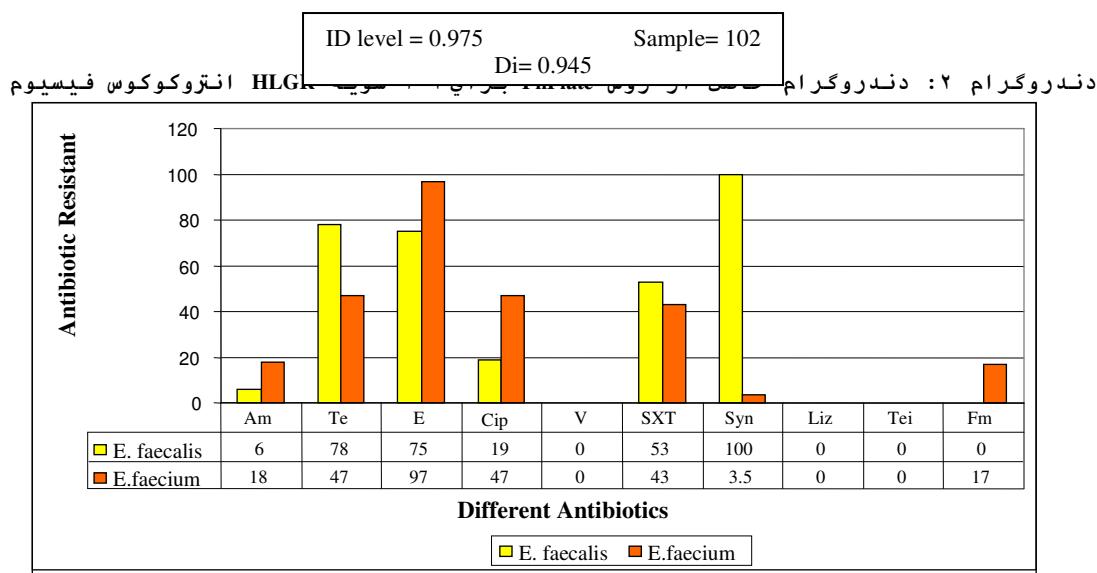
نتایج گروه بندی سویه های HLGR توسط روش PhPlate:

کشت اولیه فاضلاب بر روی محیط حاوی جنتامایسین به ترتیب منجر به جدا سازی ۱۰۲ و ۳۸ سویه مقاوم به جنتامایسین از گونه های فیسیوم و فکالیس شد. با استفاده از روش PhPlate در جمعیت انتروکوکوس فکالیس ۱۶ تایپ و در جمعیت انتروکوکوس فیسیوم ۵۰ تایپ مشخص شدند.

نتایج گروه بندی PhPlate برای سویه های انتروکوکوس فکالیس:

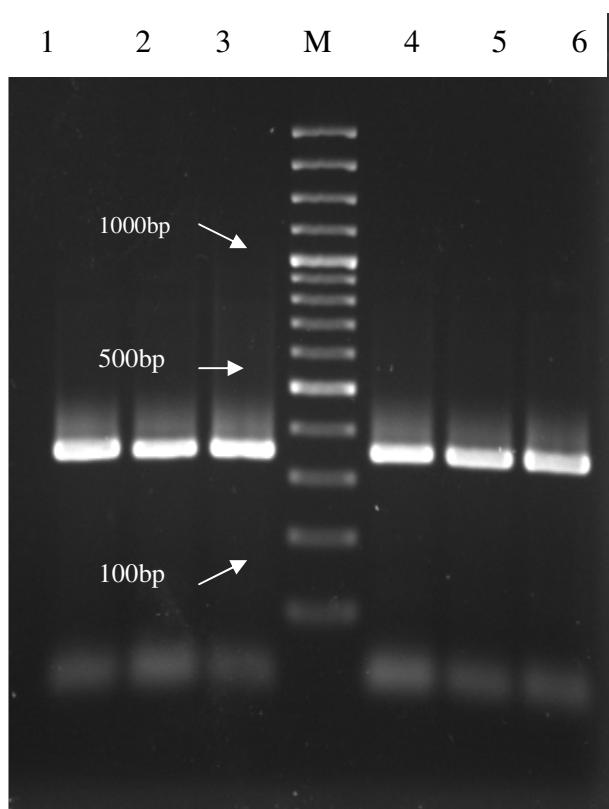
بدنبال انجام روش PhPlate برای فنوتایپینگ ۳۸ سویه انتروکوکوس فکالیس آنالیز کامپیوتري با استفاده از نرم افزار PhP Win-4.2 انجام شده و رسم دندروگرام نهایي با Di=0.910 منجر به گروه بندی



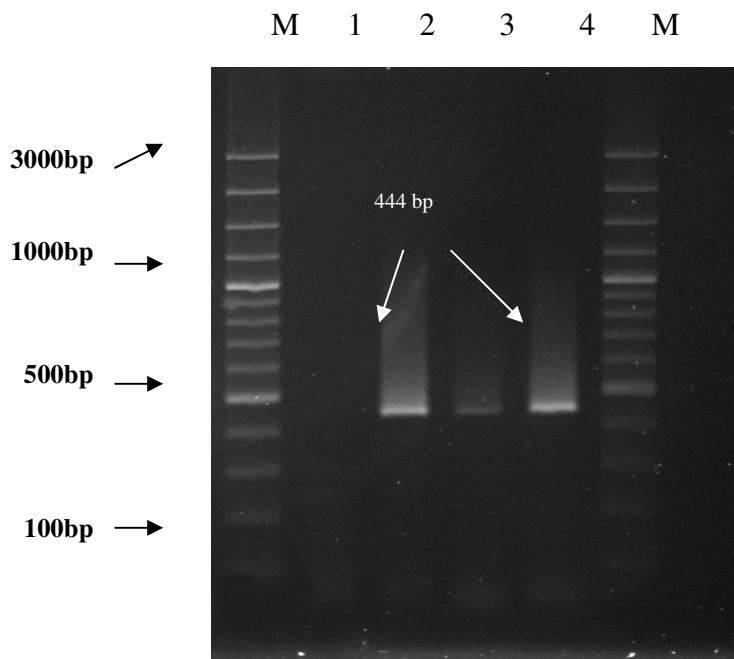


نمودار ۱ : درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی انتزوکهای فاضلاب به تفکیک گونه

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



تصویر ۱ : aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia PCR : ژن (Lane 1,2,3,4,5,6: HLGR strains , M: Molecular weight marker)



تصویر ۲ : aph(2'')-Ic PCR ژن در نمونه های فاضلاب همراه با مارکر وزن مولکولی (Lane 1,2,3,4,5,6 : HLGR strains , M: molecular weight marker)

جث

در سال ۲۰۰۲ (۱۵) فراوانی سوبه های چند مقاومتی در فاضلاب $\frac{۴۹}{۴}\%$ بوده است که شبیه به مطالعه ای در تایلند که توسط Tansuphasini (۱۶) در سال ۲۰۰۶ انجام گرفته ($\frac{۴۲}{۴}\%$) می باشد.

همانطوری که در نمودار ۱ مشخص است در بین ایزوله های گونه فیسیوم از سیستم فاضلاب مقاومت به سیپروفلوکسازین و اریترومایسین و تراسیکلین بالاترین درصد را به خود اختصاص داده اند در حالیکه در ایزوله های گونه فکالیس مقاومت به اریترومایسین، تراسیکلین و کوتريوكسازول بالاتر است.

گزارشات مقاومت آنتیبیوتیکی نسبت به اریترومایسین در کشورهای مختلف متفاوت است. مثلاً در تحقیق کان^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در آمریکا میزان مقاومت به اریترومایسین $\frac{۵۷}{۳}\%$ بوده است (۱۷). Stobberingh خود این مقاومت را $\frac{۳۲}{۳}\%$ گزارش نمود (۱۸). بالاتر بودن میزان مقاومت به اریترومایسین میتواند ناشی از مصرف بالای این آنتیبیوتیک درکشور باشد.

ترراسیکلین بیشتر در درمان عفونتهاي باكتيرياي گرم ثبت بكار ميورد. امروزه مصارف آن بدليل اثرات جانبی و هچنین ايجاد مقاومت نسبت به آن محدود شده است (۱۹). در کشورهای دیگر نيز میزان مقاومت به تراسیکلین در هر دو مورد سوبه های بالینی و فاضلاب، بالا بوده است (۴,۷,۲۰).

بر اساس گزارشات مختلف مقاومت نسبت به

در بین اعضای جنس انتروکوک، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم شایعترین گونه ها در ایجاد عفونتهاي انسانی هستند (۱۱).

انتروکوکوس فکالیس در عفونتهاي انتروکوکي نقش بيشری دارد ولي انتروکوکوس فیسیوم تواني با لايي در كسب انواع ژنهای مقاومت آنتي بيوتنيکي از خود نشان ميدهد و به شرایط محيطي مقاومتر است (۱۲).

توزيع گونه ای در انتروکوهای جدا شده از نمونه های فاضلاب (۱۰۲) $\frac{۷۳}{۲}\%$ به گونه فیسیوم و (۳۸) $\frac{۲۷}{۲}\%$ نيز به گونه فکالیس اختصاص داشت. بالا بودن درصد گونه فیسیوم نسبت به فکالیس در نمونه فاضلاب در تحقیقات مشابه دیگری که از محیط های حاوی آنتی بیوتیک استفاده شده گزارش شده است (۱۳).

Cupakova در سال ۲۰۰۳ در سوئد، ۱۰۰ ایزوله انتروکوکی از فاضلاب بدست آورد که $\frac{۶۰}{۹}\%$ از این ایزوله ها از گونه فکالیس و $\frac{۸}{۹}\%$ از آنها از گونه فیسیوم و بقیه موارد از دیگر گونه ها بودند. او در این مطالعه نشان داد که بيش از $\frac{۹۵}{۹}\%$ ایزوله ها به بيش از یک آنتی بیوتیک مقاومند و مقاومت همزمان به ۴ الی ۵ آنتی بیوتیک بطور همزمان به ترتیب $\frac{۳۷}{۳}\%$ و $\frac{۲۶}{۲}\%$ بود (۱۴).

در این مطالعه درصد فراوانی انتروکوهای چند مقاومتی در سیستم فاضلاب در گونه فکالیس $\frac{۶۴}{۹}\%$ و در گونه فیسیوم $\frac{۹۴}{۹}\%$ بود. بر طبق گزارش Martin de costa در برزیل

1. Kahn

مقاومت به سه گروه اصلی دارویی (گلیکو پپتیدها، آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتامها) پزشکان اغلب از این دو دارو کمک می‌گیرند. با اجتاد 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 بستره 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 بستره شدن افراد در بیمارستانها طولانی‌تر باشد چرخش این سویه‌های مقاوم در کلیه قسمتهاي بیمارستانها بیشتر و خطرناکتر خواهد بود (۲۳).

آمینوگلیکوزیدها و جخصوص جنتامایسین حداقل سه دهه است که در ایران بطور وسیعی استفاده می‌شوند و هنوز هم کاربرد زیادی در بیماران بستره 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

سیپروفلوکسازین در سالهای ۱۹۸۹-۱۹۹۰ 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 عفونتهاي ادراري بعنوان يكى از اولين 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 بیشتر دیده می‌شود ولي 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 بازار شده است اثر بسیار خوبی بر روی عفونتهاي انتروکوکی بخصوص انتروکوکوس فیسیوم چند مقاومتی دارد. در مطالعه حاضر مقاومت به سینرسید در بین ایزوله‌های کلینیکی گونه فیسیوم $\frac{2}{4}$ % مقاومت نسبت به لینه زولید در ایزوله‌های گونه فکالیس $\frac{3}{8}$ % است. این مقاومت پایین بدلیل عدم مصرف زیاد این دو داروی جدید و همچنین ناشناخته بودن آن برای برخی از پزشکان در درمان عفونتهاي انتروکوکی در ایران است. اگرچه در ایران نیز اخیراً در مورد

جنتامایسین بسیار متفاوت است (۲۱، ۲۶-۲۸). کنترل عفونتهاي انتروکوكوي چند مقاومتی بسیار مشکل است و هیچ راه درمانی کلاسیک و مشخصی در این مورد وجود ندارد (۲۹). در این حالت کنترل سرایت این قبیل میکروارگانیزمها اهمیت زیادی دارد و روشهای تایپینگ فنوتیپی و ژنوتیپی به ما در تشخیص کلونالیتی سویه ها و کنترل بهتر آنها کمک میکند. طیف وسیعی از روشهای فنوتیپی برای افتراق و تایپینگ استرینهای باکتریال معرفی شده اند که شامل استفاده از روشهای بیوشیمیایی، آنتی سرمها، حساسیت به باکتریوفاژ، تولید باکتریوسین، پروفایل پروتئینهای غشای خارجی و الگوی مقاومت آنتیبیوتیکی است. یکی از روشهای فنوتایپینگ جدیدی که در مطالعه جمعیتهاي بزرگ باکتریال کاربرد دارد PhP typing میباشد که ارزشی معادل با روشهای تایپینگ DNA میباشد.

همانطور که در دندروگرام ۱ مشاهده میشود 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 تستهای قندی مانیتول، لاكتوز و ملی 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 فنوتیپهای جدا شده بیشتر در قندهای رافینوز، سوربیتول،

با $MIC>2000 \mu\text{g/ml}$ مشخص میشود (۲۵). در مطالعه ما تمام دارای HLGR سویه های $MIC>1024\mu\text{g/ml}$ بودند. در بررسی ما ژن $\text{Ie-}(\text{Ie-aph}(2''))$ در %۱۰۰ از سویه های فیسیوم و %۹۵ درصد از سویه های فکالیس جدا شده از نمونه های فاضلاب دیده شد. درصد بالای فراوانی HLGR این ژن در ایزوله های فاضلاب بیانگر نقش ویژه و همچنین پراکندگی زیاد این ژن در ایران میباشد. خازن احتمالی ژنهای مقاومت به جنتامایسین در انتروکوکها هنوز به درستی مشخص نیستند ولی محققین نقش زنجیره غذایی و همچنین فلور نرمال افراد را در این زمینه دخیل میدانند (۲۶). غیر از یک سویه فیسیوم که از فاضلاب جدا شده بود و برای ژن $\text{aph}(2'')$ -Ic مثبت بود بقیه ایزوله ها از نظر دیگر ژنهای ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین شامل ژنهای $\text{Ic-aph}(2'')$ -Id، $\text{aph}(2'')$ -Ib و $\text{aph}(2'')$ -aph(2'') منفی بودند. در مورد منفی بودن نتیجه PCR برای سویه های HLGR که هیچکدام از ژنهای مقاومت به جنتامایسین را نداشتند میتوان گفت که شاید به علت موتاسیونهای احتمالی باشد که در ساختار این ژنها رخ داده و اتصال پرایرها به مناطق مورد نظر بر روی DNA هدف با مشکل مواجه میگردد و در نتیجه واکنش PCR منفی خواهد بود. در این صورت مطالعه تنوع این موتاسیونها نیز به نوبه خود ارزش زیادی خواهد داشت. آمار مطالعات مختلف در زمینه ژنهای ایجادکننده مقاومت به

فیسیوم کلاً مقاومتر از سویه های انتروکوکوس فکالیس هستند (۱۲) بیشتر از گونه فکالیس دیده شده و تنوع بیشتری را نیز نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

تاپینگ انجام شده در خصوص ایزوله های HLGR انتروکوکی حاکی از وجود تنوع بالا در بین این ایزوله ها است که میتواند مؤید متعدد بودن منابع آلودگی دخیل در چرخش سویه های 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 جمعیت های انسانی به شکل فلور نرمال و یا 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 سویه های شایع، میتوان قدمهای مؤثرب در جهت کنترل آنها برداشت و همچنین با در نظر گرفتن تدابیر بهداشتی مناسب از بروز آنها در وقوع اپیدمی ها در آینده پیشگیری نمود. تنوع تیپ در جمعیت انتروکوکی مورد مطالعه میتواند ناشی از: ۱) منابع مختلف آلوده کننده فاضلاب از جمله پسابهای خانگی و بیمارستانی، ۲) فلور نرمال روده ایرانی ها از لحاظ وجود انتروکوکهای HLGR و ۳) تبادلات ژنتیکی در مورد ژنهای مقاومت به جنتاماکسین در بین جمعیت انتروکوکی باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از نظر پراکنندگی زیاد سویه های HLGR انتروکوکی به نظر می‌رسد که

آمیگدالین و Gal لاکتون بوده است (دندروگرام ۲). با توجه به مطالب فوق الذکر میتوان نتیجه‌گیری نمود که تست قندی مانیتول در بین ایزوله های انتروکوکوس فکالیس در این تحقیق جهت افتراق کلونهای معرفی شده در روشن 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 حیطی در نمونه های مختلف، همچنان نتایج قابل اطمینانی را برای تاپینگ این گونه نشان داده است.

همچنین در بین ایزوله های انتروکوکوس فیسیوم نیز تستها قندی رافینوز و سوربیتول، صرف نظر از تنوع شرایط حیطی در تعیین سرنوشت تاپینگ سویه ها نقش ویژه ای داشتند و علیرغم تغییرات شرایط حیطی این دو تست قندی باعث افتراق تاپیها شدند.

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

$Di=0.945$ در بین ایزوله های انتروکوکوس فیسیوم بدین معناست که در ایزوله های فاضلاب، ما با جمعیت متنوعتری از سویه های فیسیوم روبرو هستیم. بنظر می‌آید که در سیستم فاضلاب با توجه به دینامیک بودن شرایط حیطی تنها استرینهایی بقا پیدا می‌کنند که مقاومترند و از آنجاییکه سویه های انتروکوکوس

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی کشور به انجام رسده است.

فاضلاب تهران میتواند نقش یک مخزن احتمالی را برای چرخش سویه های HLGR انترولوکوکی داشته باشد.

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, Mitsuhashi R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin 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 Clin 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. Villanova: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

- vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 27-34.
18. Stobring E, Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R. Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey slaughterers 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, Sorensen 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, Kalaphaki 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, Bartlett 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.