

بررسی کلونالیتی سویه های 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 محمد رضا پور شفیعی^۳، دکتر محمد مهدی سلطان
دلالت^۴، دکتر محمد رضا اشراقیان^۵، دکتر محمد رضا پورمند^۶
۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران
۲- دکترای میکروبیولوژی، بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۳- دانشیار، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، (مؤلف مسؤول)
تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۰۵۵۳۵ pour@pasteur.ac.ir
۴- دکترای میکروب شناسی، بخش میکروب شناسی
۵- دکترای آمار حیاتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت
۶- دکترای میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت

چکیده

زمینه و هدف: در سالهای اخیر پیدایش انتروکوکهای مقاوم به مقادیر بالای پیسیلین، گلیکو پپتیدها و جنتامایسین به تنهایی یا بصورت چند مقاومتی باعث بروز مشکلات حاد در درمان عفونتهای انتروکوکوی شده است. انتروکوکها جزء فلور نرمال روده هستند و از این راه به فاضلابها راه پیدا میکنند. یکی از روشهای بررسی جمعیت انتروکوکوی غربالگری فاضلابها از حیث وجود انتروکوکها میباشد. هدف تحقیق حاضر بررسی کلونالیتی در بین سویه های 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 ایزوله ها و ژنهای مقاومت به جنتامایسین توسط روش PCR و تست حساسیت آنتی بیوتیکی و MIC نیز با استفاده از استاندارد CLSI به انجام رسیده و روش Biochemical fingerprinting (PhP typing) با هدف تایپینگ سویه های HLGR انتروکوکوی بکار رفت.

یافته ها: انتروکوکوس فکالیس ۲۶٪ و انتروکوکوس فیسیوم ۷۴٪، شایعترین گونه های جدا شده از نمونه های فاضلاب بودند. بالاترین مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های فیسیوم نسبت به اریترومایسین و در بین سویه های فکالیس نسبت به تتراسیکلین دیده شد. MIC تمام سویه های HLGR انتروکوکوی $\geq 10.24 \mu\text{g/ml}$ بود و اکثریت آنها دارای ژن aac (6)-Ie-aph (2)-Ia بودند و فقط یک سویه انتروکوکوس فیسیوم دارای ژن aph (2)-Ic بود. روش PhP typing در گونه فکالیس ۱۶ تایپ مختلف را با $Di=0/910$ و در گونه فیسیوم با $Di=0/945$ ، ۵۰ تایپ مختلف را مشخص نمود.

نتیجه گیری: حضور ژن aac (6)-Ie-aph (2)-Ia در اکثریت ایزوله های HLGR، نشان دهنده انتشار وسیع این ژن در جمعیت انتروکوکوی فاضلاب است. شیوع متنوع کلونال در جمعیت انتروکوکهای HLGR و چند مقاومتی در فاضلاب تهران نشان دهنده نقش احتمالی فاضلابها در چرخش این سویه ها در جامعه میباشد.

کلید واژه ها: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکهای HLGR ، PhP typing، فاضلاب

وصول مقاله: ۸۷/۴/۴ اصلاح نهایی: ۸۷/۵/۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۶

مقدمه
طی آخرین آمارها عفونتهای
بیمارستانی ناشی از

هستند یکی از روشهای بررسی جمعیت انتروکوک، کشت روتین از مدفوع افراد است ولی بدلیل مشکلات نمونه‌گیری از مدفوع، 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 باکتریهای است که دارای قدرت تخمیر قندها می‌باشند. در این روش با آنالیز کمی واکنشهای بیوشیمیایی متعدد که در داخل میکروپلیتهایی حاوی سوبستراهای دهیدراته انجام می‌شود می‌توان تعداد زیادی از باکتریهای هم جنس را گروه‌بندی نمود. تستهای انتخاب شده در این پانل به گونه‌ای انتخاب شده‌اند تا بطورکاملاً اختصاصی عمل کرده و بالاترین قدرت تفکیک را در بین گونه‌ها داشته باشند. آنالیز نهایی توسط نرم افزارهای کامپیوتری 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) و گروه‌هایی هستند که بیش از یک

انتروکوک‌های چند مقاومتی رو به افزایش است و در این میان انتروکوک‌های مقاوم به جنتامایسین و ونکومایسین از اهمیت خاصی برخوردارند (۱). انتروکوک‌ها بصورت ذاتی به مقادیر پایین آمینوگلیکوزیدها مقاوم بوده و به همین علت این گروه از آنتی بیوتیکها به تنهایی در درمان عفونتهای انتروکوک‌ها ناکافی هستند ولی در ترکیب با ممانعت‌کننده‌های سنتز دیواره سلولی که ورود آنها را به سلول تسهیل می‌کند از مؤثرترین درمانهای رایج می‌باشند. بروز مقاومت بالا به جنتامایسین HLGR در اثر کسب ژنهایی است که باعث تغییرات آنزیمی بر روی دارو می‌شوند. در انتروکوک‌ها ژن -aac(6)-Ie-aph(2") نقش اصلی را در پیدایش مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامایسین دارد ولی در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر از جمله ژنهای -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 ژنهای ایجادکننده مقاومت نسبت به انواع آمینوگلیکوزیدها، راهها و فرکانس انتقال آنها نیز بسیار مهم هستند (۳). تعیین تیپ سویه‌های انتروکوک‌ها و یافتن تنوع کلنال 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 آنتی‌بیوتیکی 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 انتروکوکوی در نمونه های فاضلاب، به منظور دستیابی به کلنی های تفکیک شده بر روی محیط کشت، از روش فیلتراسیون با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون (Millipore) و محیط کشت اختصاصی (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 می گرفت. 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 mEnterococcus که حاوی ۶۴ μg/ml از آنتی بیوتیک جنتامایسین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) است منتقل شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت کلنی های مشکوک به انتروکوک، با رنگ صورتی بر روی فیلتر ظاهر شده و می توان از روی این فیلترها کلنی برداری نموده و بر روی محیط بلادآگار خون گوسفندی منتقل نمود تا اولاً محیط غنی تری را جهت رشد انتروکوکها فراهم نمود و ثانیاً از این راه به خالص بودن سویه مورد مطالعه پی برد. پس از رشد انتروکوکها بر روی محیط بلادآگار آزمایشات تعیین جنس و گونه بر روی آنها انجام می شد. در

نوع ایزوله را شامل می شوند. 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) تنوع آن در جمعیت باکتریال نیز بیشتر خواهد بود. در دندروگرام بدست آمده هر سویه توسط یک خط افقی مشخص می شود در حالیکه سویه های مختلف بر اساس میزان شباهتهای فنوتیپی شان توسط خطوط عمودی بهم وصل می شوند. هدف تحقیق حاضر بررسی کلونالیتی در بین سویه های HLGR انتروکوکوی جدا شده از فاضلاب تهران و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به منظور کنترل بهتر عفونتهای انتروکوکوی می باشد.

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 آوری 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 می گرفت و به این ترتیب نمونه ها جمع آوری شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل می شدند و در عرض کمتر از ۳ ساعت مورد بررسی قرار می گرفتند. جداسازی سویه های فاضلاب:

رسوب‌گیری از آن در ۱۰۰۰۰ rpm بمدت 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 ژن اختصاصی جنس و دوگونه مورد نظر توسط واکنش PCR یک میکرولیتر از DNA استخراج شده وارد واکنش 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 ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شده و مشاهده باند bp ۱۰۰ برای تشخیص جنس و باندهای bp ۹۴۱ و ۶۵۸ 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، کوتریموکسازول، نیتروفوران‌توئین، تتراسیکلین، سیپروفلوکسازین و تیکوپلانین از شرکت (BD BBL, Sparks, MD, USA) و دیسک‌های سینرسید و لینه زولید از شرکت (Bootle, Mersey Side, UK) تهیه شده بودند. کلیه مراحل انجام این

مجموع ۱۴۰ سویه انتروکوک HLGR در این تحقیق از فاضلاب ورودی این سه تصفیه‌خانه جمع‌آوری گردید.
تعیین جنس و گونه سویه‌ها:

برای این منظور از تست‌های کاتالاز، رشد در نمک 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 محیط تلوریت پتاسیم 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 محیط کشت BHI broth را در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و پس از خارج کردن محلول رویی ۱۵۰ میکرولیتر از بافر TES (-Tris) (HCL, pH=8; Sucrose 7%, EDTA I mM) را به همراه ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از لیزوزیم (Sigma) و ۱۲ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد به رسوب اضافه می‌کنیم و با ورتکس بطور کامل مخلوط نموده بمدت ۵ دقیقه در مجاورت یخ قرار می‌دهیم. در این مرحله پس از انجام سانتریفوژ در rpm ۱۰۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه فاز رویی را به یک لوله جدید منتقل نموده و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل و کلروفرم و سانتریفوژ مجدد (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 می‌شود و طی آنالیز با نرم افزار WinPhP منجر به رسم دندروگرام گروه‌بندی فنوتیپی ایزوله‌ها می‌گردد (۴).

یافته‌ها

نتایج کشت نمونه‌ها:

نمونه‌گیری از سه تصفیه خانه فاضلاب اکباتان، شوش و صاحبقرانیه در مجموع منجر به جداسازی ۱۴۰ سویه انتروکوک با مقاومت بالا به جنتامایسین گردید. توزیع گونه‌ای در بین این ایزوله‌ها به صورت (۳۸ مورد) ۲۶٪ و (۱۰۲ مورد) ۷۴٪ به ترتیب برای انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم بود. همانطوری که انتظار می‌رفت درصد جداسازی گونه فیسیوم در فاضلاب بطور مشخصی بالاتر از گونه فکالیس بود. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

بر طبق اطلاعات نمودار ۱ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های فیسیوم نسبت به آمپیسیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکسازین و نیتروفوران‌توئین بالاتر از سویه‌های فکالیس است. بر عکس مقاومت به کوتریموکسازول و تراسیکلین در سویه‌های فکالیس بیشتر است. مقاومت به سینرسید در گونه فکالیس ذاتی است. بدنبال انجام MIC جنتامایسین، همه سویه‌ها دارای $MIC \geq 1024 \mu g/ml$ بودند.

نتایج PCR:

در نمونه‌های فاضلاب (۳۶) ۹۵٪ از سویه‌های HLGR فکالیس و (۱۰۲) ۱۰۰٪ از سویه‌های فیسیوم HLGR دارای ژن $aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia$ بودند. دو ژن $aph(2'')$ ، $aph(2'')$ Id در هیچکدام از ایزوله‌ها

آزمایش با استفاده از استانداردهای CLSI انجام شده است. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی Minimal Inhibitory Concentration برای جنتامایسین با روش microdilution و تا غلظت آنتی‌بیوتیکی $1024 \mu g/ml$ انجام شد (۱۰).

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

Biochemical Fingerprinting : (PhPlate)

در سیستم PhPlate (PhPlate Microplates Techniques AB, Sweden) از یکسری تست‌های بیوشیمیایی در تایپینگ و گروه‌بندی انتروکوک‌ها استفاده می‌شود که اولاً از ثبات بیشتری در بین سویه‌های انتروکوک‌ها 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 و گلوکونات می‌باشد. این مواد در ته چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی کوت شده‌اند. اساس این سیستم اندازه‌گیری میزان جذب نوری واکنش‌های تخمیری انجام شده در سه زمان مختلف (۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت پس از تلقیح باکتری) بوده و پس از گذشت ۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت از تلقیح باکتری میزان رنگزایی هر چاهک با استفاده از اسکنر مدل HP

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

نتایج گروه‌بندی PhPlate برای سویه‌های انتروکوکوس فیسیوم:

بر اساس اطلاعات حاصل از دندروگرام بدست آمده با $Di=0.945$ (ST) ۳۴ و (CT) ۱۶ در بین این سویه‌ها مشاهده گردید بزرگترین گروه در بین Common type دارای ۱۶ ایزوله بود و بقیه گروه‌های CT بین ۱۱-۲ 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 aph(2'')-Ic بود (تساویر (۱ و ۲)).

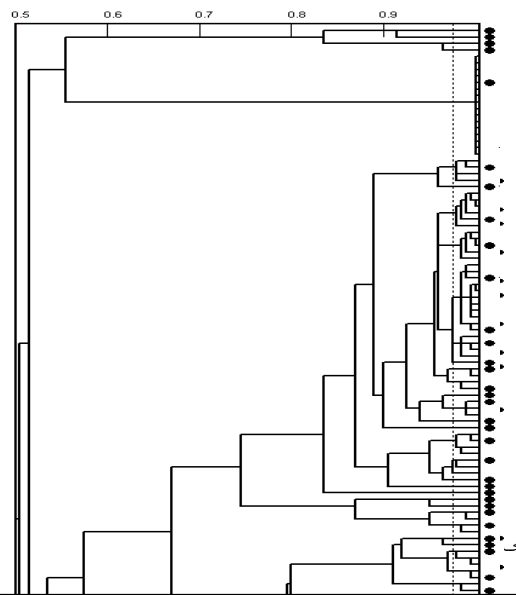
نتایج گروه‌بندی سویه‌های HLGR توسط روش PhPlate:

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

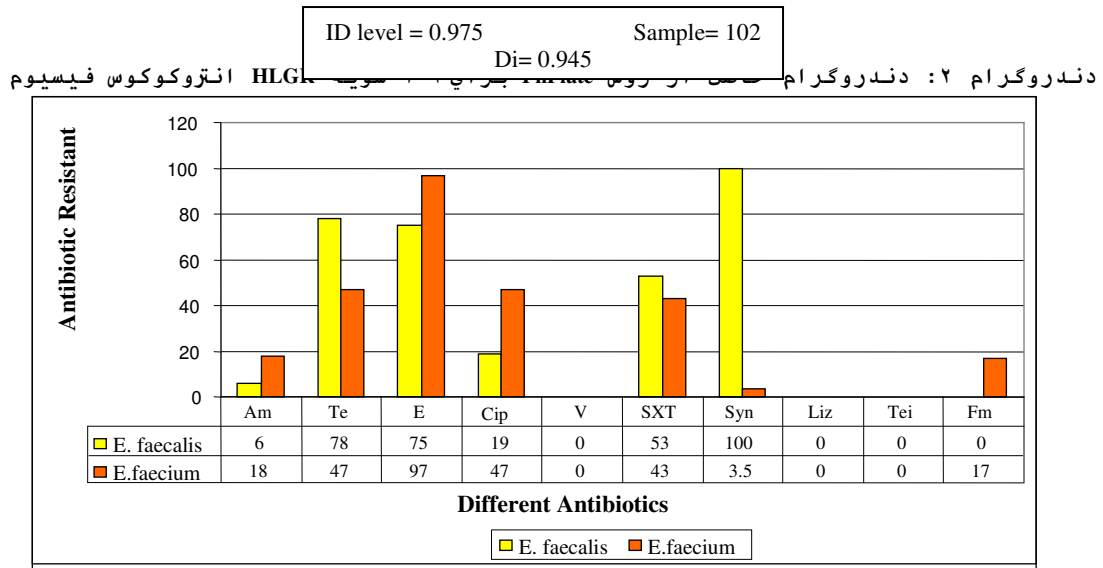
نتایج گروه‌بندی PhPlate برای سویه‌های انتروکوکوس فکالیس:

بدنبال انجام روش PhPlate برای فنوتایپینگ ۳۸ سویه انتروکوکوس فکالیس آنالیز کامپیوتری با استفاده از نرم افزار Win-4.2 PhP انجام شده و رسم دندروگرام نهایی با $Di=0.910$ منجر به گروه‌بندی

حاصل از روش
انتروکوکوس فکالیس

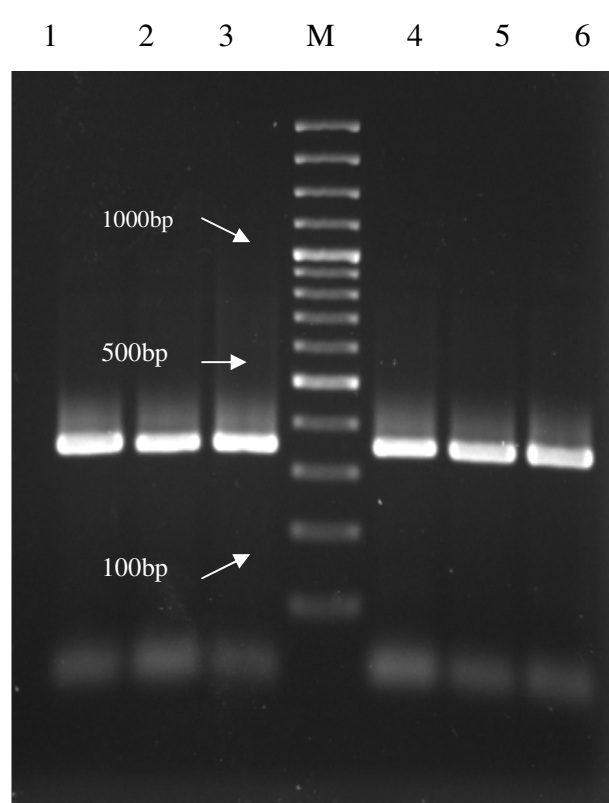


دندروگرام ۱: دندروگرام
PhPlate برای ۳۸ سویه HLGR
فاضلاب

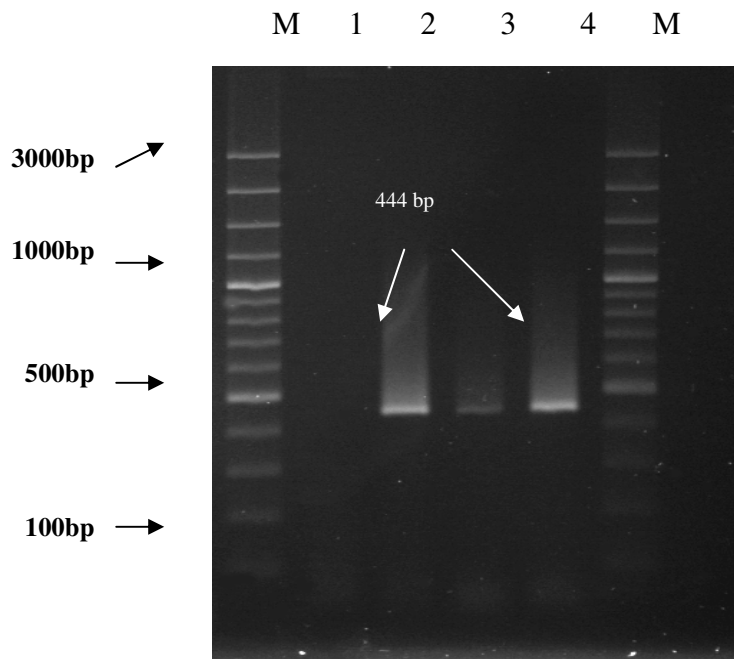


نمودار ۱: درصد فراوانی مقاومت آنی بیوتیکی انتروکوکهای فاضلاب به تفکیک گونه

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



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



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

در سال ۲۰۰۲ (۱۵) فراوانی سویه های چند مقاومتی در فاضلاب ۴/۴۹٪ بوده است که شبیه به مطالعه ای در تایلند که توسط Tansuphasini (۱۶) در سال ۲۰۰۶ انجام گرفته (۴۲٪) می باشد.

همانطوری که در نمودار ۱ مشخص است در بین ایزوله های گونه فیسوم از سیستم فاضلاب مقاومت به سیپروفلوکسازین و اریترومايسين و تراسیکلین بالاترین درصدها را به خود اختصاص داده اند در حالیکه در ایزوله های گونه فکالیس مقاومت به اریترومايسين، تراسیکلین و کوتریموکسازول بالاتر است.

گزارشات مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به اریترومايسين در کشورهای مختلف متفاوت است. مثلاً در تحقیق کان^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در آمریکا میزان مقاومت به اریترومايسين ۵۷٪ بوده است (۱۷). Stobberingh نیز در تحقیق خود این مقاومت را ۳۲٪ گزارش نمود (۱۸). بالاتر بودن میزان مقاومت به اریترومايسين می تواند ناشی از مصرف بالای این آنتی بیوتیک در کشور باشد.

تراسیکلین بیشتر در درمان عفونتهای باکتریهای گرم مثبت بکار می رود. امروزه مصارف آن بدلیل اثرات جانبی و همچنین ایجاد مقاومت نسبت به آن محدود شده است (۱۹). در کشورهای دیگر نیز میزان مقاومت به تراسیکلین در هر دو مورد سویه 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 فیسوم شایعترین گونه ها در ایجاد عفونتهای انسانی هستند (۱۱).

انتروکوکوس فکالیس در عفونتهای انتروکوکوی نقش بیشتری دارد ولی انتروکوکوس فیسوم توانایی بالایی در کسب انواع ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی از خود نشان می دهد و به شرایط محیطی مقاوم تر است (۱۲).

توزیع گونه ای در انتروکوکهای جدا شده از نمونه های فاضلاب (۱۰۲) ۷۳٪ به گونه فیسوم و (۳۸) ۲۷٪ نیز به گونه فکالیس اختصاص داشت. بالا بودن درصد گونه فیسوم 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 انتروکوکوی از فاضلاب بدست آورد که ۶۰٪ از این ایزوله ها از گونه فکالیس و ۸٪ از آنها از گونه فیسوم و بقیه موارد از دیگر گونه ها بودند. او در این مطالعه نشان داد که بیش از ۹۵٪ ایزوله ها به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاومند و مقاومت همزمان به ۴ الی ۵ آنتی بیوتیک بطور همزمان به ترتیب ۳۷٪ و ۲۶٪ بود (۱۴).

در این مطالعه درصد فراوانی انتروکوکهای چند مقاومتی در سیستم فاضلاب در گونه فکالیس ۶۴٪ و در گونه فیسوم ۹۴٪ بود. بر طبق گزارش costa Martin de در برزیل

1. Kahn

مقاومت به سه گروه اصلی دارویی (گلیکو پپتیدها، آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتامها) پزشکان اغلب از این دو دارو کمک می‌گیرند.

با ایجاد مقاومت دارویی، روده با سویه‌های مقاوم انتروکوک‌های 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 انتروکوک‌های 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 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 بیشتر دیده 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 بازار شده است اثر بسیار خوبی بر روی عفونتهای انتروکوک‌های مخصوص 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 دارو جدید و همچنین ناشناخته بودن آن برای برخی از پزشکان در درمان عفونتهای انتروکوک‌های در ایران است. اگرچه در ایران نیز اخیراً در مورد

جنتامایسین بسیار متفاوت است (۲۸-۲۶، ۲۱).

کنترل عفونتهای انتروکوکوی 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 شده‌اند که شامل استفاده از روشهای بیوشیمیایی، آنتی‌سرمها، حساسیت به باکتریوفاز، تولید باکتریوسین، پروفایل پروتئینهای غشای خارجی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. یکی از روشهای فنوتایپینگ جدیدی که در مطالعه جمعیت‌های 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، لاکتوز و ملی بیوز بود.

در بین ۱۰۲ سویه انتروکوکوس فسیوم 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 $MIC > 2000 \mu g/ml$ مشخص می‌شود (۲۵). در مطالعه ما تمام سویه‌های HLGR دارای

$MIC > 1024 \mu g/ml$ بودند.

در بررسی ما ژن $aac(6')-Ie-$ $aph(2'')-Ia$ در (۱۰۲) ۱۰۰٪ از سویه‌های فسیوم و (۳۶) ۹۵٪ درصد از سویه‌های فکالیس جدا شده از نمونه‌های فاضلاب دیده شد. درصد بالایی فراوانی این ژن در ایزوله‌های HLGR فاضلاب بیانگر نقش ویژه و همچنین پراکندگی زیاد این ژن در ایران می‌باشد. مخازن 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 فسیوم که از فاضلاب جدا شده بود و برای ژن $aph(2'')$ مثبت بود بقیه ایزوله‌ها از نظر دیگر ژنهای ایجادکننده مقاومت به جنتامایسین شامل ژنهای $aph(2'')-Id$ ، $aph(2'')-Ic$ و $Ib-aph(2'')$ منفی بودند. در مورد منفی بودن نتیجه PCR برای سویه‌های 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 پرایمرها 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

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 فسیوم 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 فسیوم بدین معناست که در ایزوله‌های فاضلاب، ما با جمعیت متنوع‌تری از سویه‌های فسیوم روبرو هستیم. بنظر می‌آید که در سیستم فاضلاب با توجه به دینامیک بودن شرایط محیطی تنها استرین‌هایی بقا پیدا می‌کنند که مقاوم‌ترند و از آنجاییکه سویه‌های انتروکوکوس

فسیوم 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 انتروکوکوی 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 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 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 انتروکوکوی 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 انتروکوکوی باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از نظر پراکندگی زیاد سویه‌های HLGR انتروکوکوی به نظر می‌رسد که

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

فاضلاب تهران می‌تواند نقش یک مخزن احتمالی را برای چرخش سویه های HLGR انتروکوکوی 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, Mitsuhata 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. 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, 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.