

## بررسی ژن $aac(6')Ie-aph(2'')Ia$ در میان سویه های بالینی انتروکوک و تشخیص سویه های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین

نرگس دادفرما\*، دکتر مهوش اسکویی\*\*، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی\*\*\*، پریسا فرخ\*\*\*\*

دریافت: ۸۹/۲/۲۳، پذیرش: ۸۹/۵/۲۶

### چکیده:

مقدمه و هدف: انتروکوکها بعنوان یکی از مهمترین پاتوژنهای عامل عفونتهای بیمارستانی ظاهر شده اند. علاوه بر مقاومت های ذاتی به بسیاری از عوامل ضد میکروبی، مقاومت های وابسته به پلاسمید و ترانسپوزون را ایجاد می کنند که مقاومت به سطح بالای جنتامایسین (HLGR) از جمله آنها است. HLGR در انتروکوک ها باعث شکست سینرژیسیم دارویی یک آمینو گلیکوزید به همراه یک عامل فعال بر علیه دیواره سلولی می شود. معمولاً پیدایش سویه های HLGR ( $MIC \geq 500 \mu g/ml$ ) در اثر حضور ژن  $aac(6')Ie-aph(2'')Ia$  است.

روش کار: در این مطالعه تجربی در مجموع ۱۴۲ انتروکوک از بیماران جدا شد. تشخیص گونه انتروکوکها بر اساس تستهای بیوشیمیایی صورت گرفت و تست های حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک انجام شد. برای جدا کردن انتروکوکهای HLGR از دیسکهای جنتامایسین ( $120 \mu g$ ) استفاده شد. MIC برای جنتامایسین به روش برات میکرو دیلوشن تعیین شد. PCR برای شناسایی ژن  $aac(6')Ie-aph(2'')Ia$  و واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالتر Sca1 انجام شد. یکی از محصولات PCR تعیین توالی و با سویه استاندارد BLAST شد.

نتایج: از ۱۴۲ سویه ۶۲ (۴۳/۷٪) آنها HLGR بودند. ۵۵ سویه HLGR، دارای MIC برابر با ۱۰۲۴-۵۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر داشتند. همه سویه های HLGR بجز یکی از آنها دارای ژن  $aac(6')Ie-aph(2'')Ia$  بودند. ۴۲٪ از مجموع E. faecalis ها و ۴۴٪ از مجموع E. faecium ها، HLGR بودند. در سویه های HLGR شیوع مقاومت به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی و مقاومت های چند دارویی (MDR) در مقایسه با non-HLGR بیشتر بود. شیوع این مقاومتها در گونه های فسیوم بیشتر از فکالیسها بود. محصول PCR تعیین توالی شده با توالی موجود در Genebank مقایسه و تایید شد.

نتیجه نهایی: شیوع بالای MDR و HLGR مشکل عمده ای در مراکز درمانی در ایران می باشد و گسترش ژن  $aac(6')Ie-aph(2'')Ia$  مسئول ایجاد این مقاومت در تهران است.

کلید واژه ها: انتروکوک / جنتامایسین / مقاومت آنتی بیوتیکی

### مقدمه:

سطوح مختلف محیطی قابل جداسازی هستند و از طریق فاضلاب در محیط رها می شوند. غذاهایی که منشاء حیوانی دارند گاهی با آلودگی توسط گونه های انتروکوک همراهند. (۲)

اکثر مقاومت های آنتی بیوتیکی در پاتوژنهای بیمارستانی مربوط به باکتریهای گرم مثبت است، که

انتروکوکها جزء فلور نرمال روده اند، عفونتهای انتروکوکوی رایج ترین عفونتی است که توسط فلور کومنسال انسان ایجاد می شود و فراوانترین کوکسی گرم مثبت در مدفوع انسان می باشند (۱).

انتروکوکها از منابع مختلف انسانی، حیوانی، گیاهی و

\* کارشناس ارشد گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

\*\* استادیار بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

\*\*\* استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (imanifouladi.a@gmail.com)

\*\*\*\* کارشناس ارشد بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

E. faecium وجود می آیند. E. faecalis در عفونتهای انسانی شیوع بیشتری نسبت به E. faecium دارد ولی توانایی E. faecium برای کسب مقاومت دارویی بیشتر است (۷).

ویژگی های ذاتی انتروکوک ها موجب می شود که آنها قادر به بقاء در شرایط نامساعد برای مدت طولانی باشند. از دلایل اصلی در پایداری و گسترش انتروکوک ها در محیط بیمارستان شامل: مقاومت ذاتی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکهای رایج در درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم مثبت، توانایی این باکتری برای کسب ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک از طریق موتاسیون و یا اکتساب ماده ژنتیکی خارجی (پلاسمید، ترانسپوزون و شاخص های متحرک ژنتیک)، انتقال ژن مقاومت از طریق کونژوگاسیون و یا روش های انتقالی دیگر می باشد (۸، ۹).

مصرف بالای ونکومایسین و جنتامایسین در مراکز کلینیکی باعث افزایش مقاومت در پاتوژن ها و همچنین در میکروارگانیسم های فلور نرمال بدن حیوانات و انسانها می شود. باکتری های فلور نرمال مقاوم محل ذخیره مناسبی برای انتقال ژنهای مقاومت به باکتری های پاتوژن می باشند. انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف قادرند از طریق مواد غذایی تهیه شده با منشاء حیوانی، فاضلاب های بیمارستانی و یا از طریق کلونیزه شدن در روده بیماران بیمارستانی به افراد سالم جامعه منتقل شوند. افراد ناقل با سویه های چند مقاومتی، در اثر بستری شدن در بیمارستان احتمال انتقال مقاومت به بیماران دیگر را از طریق دست آلوده پرسنل بیمارستان و یا وسایل آلوده، افزایش می دهند. طولانی تر شدن مدت بستری بیماران چرخش این سویه های مقاوم را در بیمارستان بیشتر خواهد کرد (۱۰).

تعیین گونه های انتروکوک، بررسی شیوع مقاومتیهای آنتی بیوتیکی و به کارگیری تکنیک های تایپینگ مولکولی مانند شناسایی ژنهای عامل ایجاد مقاومت در یافتن راههای کنترل این باکتریها موثر است، و باعث کاهش عفونتهای بیمارستانی ایجاد شده توسط انتروکوکها میشود. لذا در جلوگیری از گسترش میکروارگانیسمها در محیط بیمارستان، در تجویز آنتی بیوتیک مناسب برای درمان سویه های مقاوم، جلوگیری از افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها، کاهش مرگ و میر بیماران و کاهش هزینه ها اهمیت به سزایی دارند (۳). هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی در

(MRSA)، انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین (VRE) انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین (HLGR) و انتروکوک هایی با مقاومت های چندگانه اشاره کرد که مشکلات عمده ای را در درمان بیماران ایجاد کرده اند (۳). عفونتهای انتروکوکی شامل عفونتهای مجاری ادراری، اندوکاردیت، آبسه های داخل شکمی، عفونتهای زخم، باکتری می، سپسیس نوزادان و ... هستند. قدرت بیماریزایی انتروکوک ها بیش از آنکه به علت فاکتورهای ویرولانسی آن باشد به علت وجود مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف است. انتروکوک ها به عنوان دومین ارگانیسم معمول در ایجاد عفونت دستگاه ادراری و زخم و سومین عامل ایجاد کننده باکتری می در بیمارستان ها می باشند (۴).

HLGR در انتروکوکسی ابتدا در ۱۹۷۹ در فرانسه گزارش شد (۵). انتروکوک هایی با  $MIC \geq 50.0 \mu g/ml$  که مقاومت به سطح بالای جنتامایسین دارند توجه ویژه ای را برای درمان عفونتهای شدید انتروکوکی مانند اندوکاردیتیس به خود جلب کرده اند و یکی از معضلات عمده درمان آنتی میکروبی عفونتهای انتروکوکی هستند. در صورت بروز چنین مقاومتی حتی درمان بکمک اثر سینرژیسمی یک داروی آمینوگلیکوزید (ترجیحا جنتامایسین) به همراه یک عامل فعال بر علیه دیواره سلولی (پنی سیلین یا گلیکوپپتید)، با شکست روبرو می شود و این انتروکوک ها به درمان ترکیبی نیز بی اثر هستند. HLGR عموماً در اثر کسب ژنهای کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) وجود می آیند. ژنهای رمزگذاری AMEs که سبب HLGR میشوند، شامل چندین ژن است که توسط پلاسمید و ترانسپوزون انتقال می یابند. در انتروکوک ها ژن  $aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia$  نقش اصلی را در پیدایش مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامایسین بازی می کند و یک آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید با دو عملکرد (استیل ترانسفراز و فسفو ترانسفراز) را کد می کند، لذا باعث مقاومت به همه آمینوگلیکوزیدهای مورد استفاده بالینی بجز استریتومایسین می شود. در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر از جمله ژنهای  $aph(2'')-Ic$ ،  $aph(2'')-Ib$  و  $aph(2'')-dI$  نیز در ایجاد این مقاومت مشخص شده است (۶).

حدود ۲۰ گونه انتروکوک وجود دارد ولی اغلب عفونتهای انتروکوکی در انسان توسط ۲ گونه E. faecalis

NCCLS (Laboratory Standards) سنجش شد (۱۲). دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل دوز بالای جنتامایسین (۱۲۰ μg)، آمپی سیلین (۱۰ μg)، و نکومایسین (۳۰ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg)، سیپروفلوکسازین (۵ μg)، کلرامفنیکل (30 μg) و تتراسایکلین (30 μg) از شرکت (Bootle, Mast Mersey Side, UK) بودند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای جنتامایسین با روش microdilution و از غلظت آنتی بیوتیکی ۸ g μ/ml تا ۱۰۲۴ g μ/ml انجام شد (۱۲). استخراج DNA: از کشت شبانه باکتری ها (سویه های مقاوم به جنتامایسین)، رسوب تهیه شد و طبق روش ارائه شده توسط Belanger مراحل استخراج DNA انجام گردید (۱۳). ۳۷۰ μl از محلول حاوی آنزیم های لیز کننده (Tris ۱M, EDTA ۰/۵M, Sucrose) به همراه ۹۷ μl از لیزوزیم ۱۰ mg/ml (sigma) و ۲۰% SDS (۲۰ μg/ml) جهت لیز کردن دیواره باکتری و پروتئیناز K و Rnase به منظور حذف ناخالصی ها اضافه شد. پس از ورتکس، سوسپانسیون حاصله ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس ۲۰۰ μl از محلول ۷/۵ مولار استات آمونیوم اضافه و سانتیفریوژ شد، تا بقایای سلول های لیز شده رسوب کنند. مایع رویی را به ویال دیگر منتقل کرده و با افزودن ایزوپروپانل سرد به میزان هم حجم سوپرناتانت و سانتریفیوژ آن، کلاف DNA تشکیل شد. رسوب را در الکل اتانول شستشو و سانتریفیوژ کرده و بعد از دور ریختن الکل، رسوب را در TE حل کرده و در فریزر ۲۰- نگهداری و از آن در واکنش PCR استفاده گردید.

PCR جهت تشخیص ژن اصلی مقاومت به جنتامایسین در ایزوله های HLGR: ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia عامل ایجاد مقاومت به سطح بالای جنتامایسین، در انتروکوک های HLGR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی تکثیر گردید (۱۴) (جدول ۱).

انتروکوک ها و بررسی حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia در سویه های HLGR و مقایسه این مقاومت ها در بین سویه های HLGR و non-HLGR جدا شده از نمونه های بالینی در تهران می باشد تا اطلاعات دقیق تر در زمینه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها و در نتیجه کنترل بهتر عفونتهای انتروکوک بدست آید.

## روش کار:

نمونه گیری و شناسایی در سطح جنس و گونه: در این مطالعه تجربی ۱۴۲ نمونه انتروکوک از بیماران بستری و سرپایی در مدت ۶ ماه فروردین تا شهریور ۱۳۸۸ از بیمارستان بقیه الله (عج) در تهران، جداسازی و جمع آوری شد و ادامه مطالعه در بخش میکروبی شناسی انستیتو پاستور ایران صورت گرفت. پس از تهیه کشت خالص از نمونه ها، سویه های انتروکوک جهت تعیین جنس و گونه مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین جنس با استفاده از آزمایش های کاتالاز، رشد در حضور 6.5% NaCl، هیدرولیز بایل اسکولین و PYR (L-pyrrolidonyl-β-naphthylamidase) صورت گرفت. برای شناسایی گونه انتروکوک ها از واکنش های بیوشیمیایی تخمیر قندهای آرابینوز، سوربیتول، مانیتول، سوربوز و ساکاروز، هیدرولیز اسید آمینه آرژنین و تست حرکت استفاده شد (۱۱). در تمام مراحل انجام تست های شناسایی، تعیین مقاومت و PCR، از سویه استاندارد E. faecalis (JH 22) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: کلیه گونه های انتروکوک شامل E. faecium، E. faecalis و گونه های دیگر با روش Disk diffusion (کربی- بائر) و با استفاده از محیط کشت مولر هینتون و سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید. اندازه گیری قطر هاله عدم رشد طبق استانداردهای National Committee for Clinical

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia

Sequence Nucleotid (5'-3')	Product size (bp)	Genbank assession of number		References
		nucleotide used	sequences de- sign primer in	
5'-GAGCAATAAGGGCATAACCAAAAATC-3'	505		M13771	14
5'-CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG-3'				

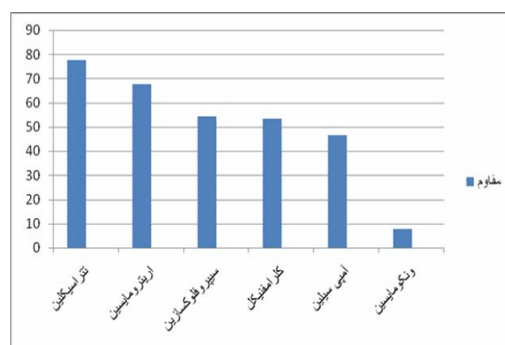
۳۸ (*E. faecalis*)/۶۱(۳)، ۲۱ (*E. faecium*)/۳۳(۹)، ۱ (*E. coli*)/۱(۶) و *E. sulitarius* و *E. casseliflavus* (۳/۲) بودند.

توزیع جنسیت بطور مساوی ۷۱ سویه جدا شده از زنان و ۷۱ سویه از مردان بود ولی سویه های HLGR مردان بیشتر بود. مقاومت ها در سنین بالا بیشتر دیده می شد. توزیع فراوانی سویه های مقاوم در گروه های سنی مختلف در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: فراوانی انتروکوک های HLGR در گروه های سنی مختلف

ردیف	گروه های سنی (سال)	تعداد	درصد
۱	۰-۱۵	۲	۳/۲
۲	۱۶-۳۰	۶	۹/۶
۳	۳۱-۴۵	۱۴	۲۲/۴
۴	۴۶-۶۰	۱۴	۲۲/۴
۵	بالتر از ۶۰	۲۶	۴۱/۶

بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک اریترومایسین و تتراسیکلین بود و در رده بعدی آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین و کلرامفنیکل قرار داشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد مقاومت آنتروکوک های آنتی بیوتیک های مختلف به روش دیسک دیفیوژن

درصد این مقاومت ها به تفکیک گونه در جدول ۴ مشخص شده است.

جدول ۴: تعداد و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف بر حسب گونه در نمونه های انتروکوک

آنتی بیوتیک	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. sulitarius</i>
آمپی سیلین	۳۵ (۳۹)	۲۸ (۵۹/۶)	۰ (۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	۳۷ (۴۱)	۲۳ (۴۹)	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)
سیپروفلوکسازین	۴۷ (۵۲/۲)	۲۶ (۵۵/۳)	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)
اریترومایسین	۶۱ (۶۸)	۳۲ (۶۸)	۰ (۰)	۱ (۵۰)	۰ (۰)
تتراسیکلین	۷۲ (۸۰)	۳۲ (۶۸)	۱ (۱۰۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)
ونکومایسین	۰ (۰)	۱۱ (۲۳/۴)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)

مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۰۱ μl شامل ۲۱ μl (۱۰mM) MgCl<sub>2</sub> (۲.5mM) (۱۰X PCR buffer)، ۱ μl (۱۰mM) MgCl<sub>2</sub>، ۰.۵ μl dNTPs، ۰.۴ μl Taq Polymerase (با غلظت ۱۰ pmol/μl)، ۰.۲ μl Taq DNA Polymerase (با غلظت ۵U/l) تهیه شده از شرکت Genet Bio و DNA استخراج شده (۱۰۰ ng) و آب مقطر دیونیزه می باشد. سیکل حرارتی برای تکثیر ژن به این صورت بود: دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه، سپس در ۳۲ سیکل شامل (۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۵°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه) و دمای Extention نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید و جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید (با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه استفاده شد.

جهت تایید این ژن از آنزیم محدود کننده Scal (Roche) استفاده و واکنش تعیین الگوی هضم آنزیمی محصول PCR توسط این آنزیم تعیین شد. یکی از محصولات PCR ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* از یک گونه *E. faecium* جهت تعیین توالی به شرکت (Macrogen Research, Seoul, Korea) فرستاده شد.

### نتایج:

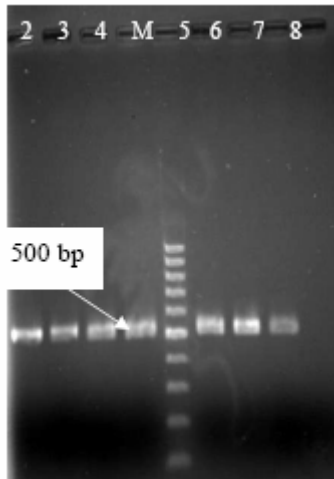
نمونه های جدا شده از بیماران بر اساس محل جداسازی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: فراوانی انتروکوک های جدا شده به تفکیک محل جداسازی

نمونه	تعداد	درصد
ادار	۱۰۵	۷۴
زخم	۲۰	۱۴
خون	۴	۲/۸
مایعات استریل	۵	۳/۵
ترشحات ریوی	۵	۳/۵
آبسه	۲	۱/۴
سوند	۱	۰/۷

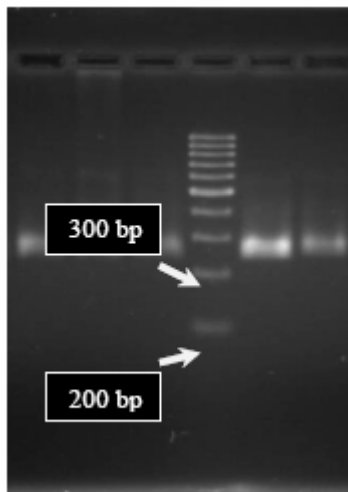
نتایج تعیین گونه نشان داد که تعداد ۹۰ (۶۳٪) سویه به گونه *E. faecalis*، ۴۷ (۳۳٪) به گونه *E. faecium*، ۱ (۷٪) به گونه *E. gallinarum*، ۲ (۱/۴٪) به گونه *E. casseliflavus* و ۲ (۱/۴٪) به گونه *E. sulitarius* تعلق داشت. از کل ۱۴۲ سویه، تعداد ۶۲ (۴۳/۷٪) از سویه ها HLGR بودند. نتایج تعیین گونه در میان ۶۲ سویه HLGR

رؤیت باند ۵۰۵pb برای تشخیص ژن در حضور مارکر  $aac(6')-Ie-$  بررسی حضور ژن  $aph(2'')-Ia$  انجام شد. بررسی پرایمرهای اختصاصی نشان داد که این ژن در همه سویه های HLGR به غیر از یک سویه ( $E. faecalis$  با  $MIC=512 \mu g/ml$ ) وجود داشت (تصویر ۱).



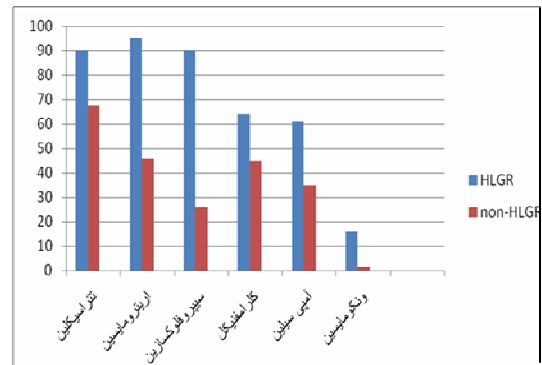
تصویر ۱: PCR ژن  $aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia$ ، ۷-۱  
سویه های HLGR و ۸ سویه کنترل منفی

تایید وجود این ژن با استفاده از الگوی هضم آنزیمی  $Sca1$  مورد آزمایش قرار گرفت. این آنزیم دارای یک سایت برش در ناحیه مورد تکثیر از ژن می باشد و دو قطعه ۲۴۲ و ۲۶۳ جفت باز (با توجه به نرم افزار VEB Cutter2) مورد انتظار بود که به علت فاصله کم و اندازه تقریباً نزدیک این دو قطعه حاصل از برش، به صورت دو باند منطبق بر روی هم مشاهده شد (با وجود اینکه الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد و با ولتاژ ۴۰۷ انجام گرفت) (تصویر ۲).



تصویر ۲: هضم آنزیمی ژن  $aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia$

۴۵/۷٪ از سویه ها به بیش از ۳ آنتی بیوتیک مختلف مقاومت نشان دادند. ۱۶ سویه از  $E. faecium$  (۷۰٪) و ۲۲ سویه از  $E. faecalis$  (۵۷/۸٪)، MDR بودند. در سویه های HLGR شیوع مقاومت به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی و مقاومتهای چند دارویی (MDR) در مقایسه با سویه های non-HLGR بیشتر بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی به تفکیک سویه های HLGR و non-HLGR به روش دیسک دیفیوژن

همه ۱۱ (۷/۷٪) سویه مقاوم به ونکومایسین،  $E. faecium$  بودند و همه این سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE)، به آمپی سیلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین نیز مقاوم بودند. گونه های  $E. faecium$  الگوهای مقاومت متفاوت تری نسبت به گونه های  $E. faecalis$  داشتند.

آزمایش تعیین MIC جنتامایسین نشان داد که ۵۵ (۸۹٪) از سویه های HLGR دارای MIC بیشتر از  $500 \mu g/ml$  و ۷ سویه دارای MIC کمتر از این مقدار بودند. محدوده MIC جنتامایسین در سویه های انتروکوک مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵: تعداد و درصد سویه های HLGR جدا شده بر حسب

گونه	میزان MIC		
	$\geq 1024$	۵۱۲	۲۵۶
$E. faecalis$	۲۳ (۶۰/۵)	۹ (۲۳/۷)	۶ (۱۵/۸)
$E. faecium$	۱۹ (۹۰/۵)	۲ (۹/۵)	۰ (۰)
$E. sulitarius$	۱ (۵۰)	۰ (۰)	۱ (۵۰)
$E. casseliflavus$	۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)

بالای جنتامایسین ۴۳/۷٪ مشاهده شد. شیوع انتروکوکهای HLGR در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت و از ۶۵-۷/۵٪ متغیر است. در بین کشورهای اروپایی بالاترین شیوع HLGR در انتروکوکهای جدا شده از نمونه های کلینیکی در یونان (۴۸/۹٪) و سپس در ترکیه (۴۸/۱٪) گزارش شده که نسبت به ایران بیشتر است ولی این شیوع در سایر کشورهای اروپایی در مقایسه با ایران بسیار کمتر می باشد ولی در بعضی کشورهای آسیایی بیشتر از ایران گزارش شده است (۱۹).

در این مطالعه در مقاومت به سطح بالای جنتامایسین بین دو گونه *E. faecalis* و *E. faecium* اختلاف معنی داری وجود نداشت. در اروپا مقاومت به سطح بالای آمینوگلیکوزیدها در سویه های *E. faecium* رایج تر است (۱۵).

مطالعات بر روی ژنهای مختلف ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین در سویه های HLGR در ایران و جهان، حضور ژن *Ia-Ic-aph(2'')-Ie-aac(6')* را به میزان بالا گزارش کرده اند (۱۶،۲۰). در نمونه های انتروکوک با مقاومت به سطح بالای جنتامایسین جدا شده از مواد غذایی و حیوانات و نمونه های فلور طبیعی و فاضلاب نیز این ژن شایع ترین عامل HLGR است (۲۱). در این بررسی نیز ژن *Ia-Ic-aph(2'')-Ie-aac(6')* در ۶۱ (۹۸٪) از سویه های مقاوم وجود داشت. درصد بالای این ژن در سویه های HLGR بیانگر نقش ویژه و پراکندگی زیاد آن در ایران می باشد. حضور این ژن همچنین در انتروکوک هایی با  $MIC < 500 \mu g/ml$  برای جنتامایسین نیز به اثبات رسیده است (۶). در مطالعه حاضر ۷ سویه *E. faecalis* و دارای  $MIC < 500 \mu g/ml$  حامل این ژن بودند که نشان دهنده حضور این ژن در انتروکوک هایی با سطح متوسط مقاومت به جنتامایسین می باشد. فقط در یک سویه *E. faecalis* که از نظر فنوتیپی مقاوم بود، این ژن شناسایی نشد که مقاومت در این سویه ممکن است به علت وجود یکی از سه ژن دیگر عامل مقاومت به جنتامایسین یعنی *Ic-aph(2'')*، *Ib-aph(2'')* و *dI-aph(2'')* باشد ولی تا کنون ژن های *Ib-aph(2'')* و *dI-aph(2'')* در ایران گزارش نشده اند. تایپ و انتشار این سه ژن دیگر مقاومت به جنتامایسین در انتروکوک های مقاوم در ایران متفاوت با سایر نقاط جهان است (۱۶). دو ژن ذکر شده فوق که در ایران گزارش نشده اند در

محصول PCR مربوط به یک سویه حامل ژن مقاومت تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی DNA محصول PCR مربوط به یک سویه حامل ژن مقاومت، ژن سکانس شده با ژن سویه استاندارد M13771، BLAST شد و توسط نرم افزار MEGA 4 همولوژی بین آنها ۹۹٪ بود.

### بحث:

در بین انتروکوکها، انتروکوکوس فکالیس و فسیوم دو گونه غالب جداسازی شده از عفونت های انسانی می باشند. انتروکوکوس فکالیس به دلیل قدرت اتصال بالا و تکثیر در روده، نقش بیشتری در عفونتهای انتروکوکوی دارد، ولی فسیوم به دلیل پتانسیل بالا در کسب مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها، درصد بالایی از مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را نشان می دهد (۱۵،۱۶). توزیع گونه ای در این بررسی ۶۳٪ به گونه *E. faecalis* و ۳۳٪ به گونه *E. faecium* تعلق داشت. این توزیع گونه ای در مناطق جغرافیایی مختلف، بعلاوه اختلافات آب و هوایی و موقعیت باکتری در هر منطقه متفاوت است. در هند و ژاپن *E. faecium* درصد بیشتری از انتروکوک ها را به خود اختصاص می دهند ولی در کشورهایمانند ایران، آمریکا، انگلیس و بسیاری از کشورهای اروپایی *E. faecalis* گونه غالب جدا شده می باشد. در سویه های جدا شده از فاضلاب درصد *E. faecium* ها به دلیل بقا و پایداری آنها در فاضلاب بیشتر است (۱۷).

بیشتر بودن تعداد نمونه های جدا شده از ادرار نسبت به نمونه های دیگر دلیلی بر شایع بودن انتروکوک ها به عنوان عامل عفونتهای ادراری می باشد. مطالعات مختلف انجام شده حاکی از غالب بودن گونه *E. faecium* در بین انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین می باشد (۱۸). در این مطالعه همه سویه های مقاوم به ونکومایسین جدا شده *E. faecium* شناسایی شدند که نشان دهنده اهمیت نقش اینگونه انتروکوک در انتشار مقاومت به ونکومایسین از طریق کلونیزه شدن آنها در روده بیماران بستری در بیمارستانها و همچنین از طریق فاضلاب های بیمارستانی و شهری می باشد و مقاومت به ونکومایسین باعث نفوذ جمعیت های *E. faecium* در مراکز درمانی و اجتماع شده است.

در مطالعه انجام شده توسط فیض آبادی و همکاران شیوع HLGR در انتروکوکهای جدا شده از نمونه های بالینی به ترتیب ۳۰٪ و ۵۲٪ گزارش شد (۱۶). در این بررسی میزان انتروکوک هایی با مقاومت به سطح

می‌دهند که مقاومت‌های چند دارویی معمولاً در افرادی که اخیراً تحت درمان با آنتی‌بیوتیک بوده‌اند دیده می‌شود، و از آنجا که در درمان آنتی‌بیوتیکی سویه‌های حساس حذف می‌شوند، سویه‌های مقاوم و خصوصاً مقاوم به چند دارو در دستگاه گوارش این افراد کلونیزه می‌شوند بدین ترتیب سرعت انتقال مستقیم و غیر مستقیم سویه‌های مقاوم افزایش می‌یابد (۲۰).

کنترل عفونتهای انتروکوک‌کی چند مقاومتی بسیار مشکل است و در این حالت کنترل گسترش این قبیل میکروارگانیسم‌ها اهمیت زیادی دارد.

طی سه دهه اخیر آمینوگلیکوزیدها از جمله جنتامایسین در سطح وسیع جهت درمان عفونتهای مختلف در بیماران دچار عفونت بیمارستانی و غیر بیمارستانی در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد و این امر می‌تواند مهمترین عامل شیوع مقاومت باشد.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که اغلب موارد VRE دارای مقاومت به مقادیر بالای آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام‌ها نیز می‌باشند. در مطالعه‌ای که بر روی پلاسمیدهای انتقال دهنده مقاومت انجام شده است مشاهده شده که پلاسمیدهای حامل مقاومت به ونکومایسین همراه با پلاسمیدهای مقاومت به جنتامایسین منتقل می‌شوند (۲۴). ولی شیوع VRE و HLGR ارتباطی با هم ندارد بطوریکه یونان با بالاترین میزان شیوع HLGR در بین کشورهای اروپایی، هیچ گزارشی از شیوع VRE نداشته است (۱۹).

### نتیجه نهایی:

در این مطالعه با توجه به کمتر بودن تعداد *E. faecium* مقاومت‌های چندگانه و تنوع الگوی مقاومت دارویی در *E. faecium* بیشتر می‌باشد. بالا بودن درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در سویه‌های HLGR و همراهی سایر مقاومت‌ها و مقاومت به بیش از ۳ آنتی‌بیوتیک در این سویه‌ها یک هشدار و زنگ خطر جدی است زیرا در اینصورت درمان این قبیل سویه‌ها بسیار مشکل خواهد بود و لزوم راه‌های کنترل و پیشگیری از افزایش چنین مقاومتی را در انتروکوک‌ها با بررسی اپیدمیولوژی مقاومتها و بکارگیری روشهای تایپینگ مولکولی آشکار می‌سازد. استفاده از دیسک‌های آمینوگلیکوزیدی حاوی دوز بالای آنتی‌بیوتیک و انجام MIC برای آنها در آزمایشگاه‌ها ضروری است. احتیاط در

انتروکوک‌های جدا شده از حیوانات منبع غذایی شایع ترند و از طریق غذاهایی با منشأ حیوانی آلوده به باکتری، به انسان منتقل می‌شوند (۲۲). از آنجائیکه در ایران از جنتامایسین در طیور و حیوانات کمتر استفاده می‌شود، احتمالاً این ژن‌ها در سویه‌های حیوانی نیز شیوع کمی دارند.

انتروکوک‌ها نقش مهمی در انتشار و پایداری ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق عناصر ژنتیکی قابل انتقال دارند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها معمولاً در اثر تغییرات آنزیماتیک دارو بوسیله آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید رخ می‌دهد. هادل و مورای تشخیص دادند که ژن  $\text{aac}(6'')\text{-Ic-aph}(2'')\text{-Ia}$  قسمتی از ترانسپوزون Tn5281 می‌باشد که وجود این ژن بر روی ترانسپوزون توجیهی برای انتشار سریع مقاومت و شیوع بالای HLGR در انتروکوک‌ها است و احتمال انتقال افقی ژن را افزایش می‌دهد. این ژن همچنین بر روی ترانسپوزون Tn4001 که به جنس استافیلوکوکوس نسبت داده شده و ترانسپوزون‌های مشابه Tn4001 قرار دارد (۲۳).

ترانسپوزون‌هایی که در کروموزوم باکتری جای دارند انتقال عوامل مقاومت را با سرعت پایین تری نسبت به ترانسپوزون‌های موجود در پلاسمیدهای کونژوگیتیو سبب می‌شوند. اندازه پلاسمید حامل ژن نیز در سرعت انتقال آن تاثیرگذار است. در بررسی بر روی ژنوم یک گونه فکالیس مشخص گردید که قسمتی از ژنوم از DNA اگزوژنوس و متحرک تشکیل شده است که دلیلی بر اکتساب ژن‌ها می‌باشد (۲۱).

از آنجائیکه مقاومت انتروکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و جنتامایسین از مکانیسم‌های متفاوتی ایجاد می‌شود، تعیین میزان حساسیت سویه‌ها به هر دو آنتی‌بیوتیک الزامی به نظر می‌رسد.

اکثریت سویه‌های دارای مقاومت‌های چندگانه یا MDR به سطح بالای جنتامایسین نیز مقاوم بودند به این صورت که ۳۱٪ از سویه‌های HLGR و ۱۴٪ از سویه‌های non-HLGR دارای مقاومت‌های چندگانه بودند (۶).

عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروکوک‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک مختلف به طور همزمان در حال افزایش است. ونکومایسین داروی انتخابی عفونت‌های حاصل از سویه‌های چند مقاومتی است. گزارشات نشان

- 2000.
13. Belanger AE, Lai A, Brackman MA, Le Blanc DJ. PCR-based ordered genomic libraries: a new approach to drug target identification for streptococcus pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(8): 2507-2512.
  14. Ting-Ting Qu, Ya-Gang Chen, Yun-Song Yu, Ze-Qing Wei, Zhi-Hui Zhou, Lan-Juan Li. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant Enterococcus in a Chinese hospital. *J Infect* 2006; 52: 124-130.
  15. Zarrilli R, Tripodi MF, Popolo AD, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. (2005). *J Antimicrob Chemother* 2005;56: 827-835.
  16. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, 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.
  17. 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.
  18. Billstrom H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Agents* 2008;32 :374-377.
  19. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19 :816-822.
  20. Saifi M, Pourshafie MR, Eshraghian MR. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. *Iran Biomed J* 2008; 12:185-90.
  21. Zarrilli R, Tripodi MF, Fortunato R, Bagattini M. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:827-835.
  22. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E. 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.
  23. Hodel-Christian SL, Murray BE. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1147-1152.
  24. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430-450.
- استفاده از آنتی بیوتیک ها بسیار مؤثر بوده و مطالعات بر روی میانکنش بین انتروکوک ها و ارتباط بین سویه های جدا شده از محیط بیمارستان و سویه های بالینی از نظر قرابت ژنتیکی اطلاعات با ارزشی در اختیار پزشکان قرار خواهد داد.
- منابع :**
1. Abriouel H, Omar NB, Cobo Molinos A, Lopez R. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *J Food Microbiol* 2008; 123: 38-49.
  2. Silva Lopes MF, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *J Food Microbiol* 2005; 103:191-198.
  3. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(3):512-530.
  4. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009: 155;1749-1757.
  5. Thal LA, Chow JW, Patterson J. Molecular characterization of highly gentamicin-resistant enterococcus faecalis isolates lacking high-level streptomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(1): 134-137.
  6. Chow JW. Aminoglycoside resistance in Enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31:586-9.
  7. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance-an overview. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23(4):214-9.
  8. Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect* 2002; 4: 215-224.
  9. Rodriguez-Bano J, Ramirez E, Muniain MA, Santos J, Joyanes P. Colonization by high-level aminoglycoside resistant enterococci in intensive care unit patients: epidemiology and clinical relevance. *J Hosp Infect* 2005; 60: 353-359.
  10. Huycke MM, Sahn 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.
  11. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4425-4430.
  12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. 7<sup>th</sup> ed (M2-A7). Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards.