بررسی بیوشیمیایی و ژنتیکی انتروکک های جداشده از فاضلاب شهری تهران با تأکید بر سویه های دارای ژن vanA و vanB

فاتح رحیمی[۱]، ملیحه طالبی[۲]، مهناز سیفی[۲]، محمد رضا پورشفیع[۳*]

۱. دانشجوی Ph.D میکروبیولوژی، عضو مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
۲. Ph.D میکروب شناسی، عضو مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
۳. Ph.D میکروبشناسی، دانشیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** : تهران، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات میکروب شناسی . تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵ ، Pour@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: بهمن هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *انتروککها فلور نرمال دستگاه گوارش بوده که مستقیما یا از طریق فاضلاب وارد محیط می شوند. نقش آنها در ایجاد عفونت های بیمارستانی به سبب توانایی کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی بسیار حائز اهمیت می باشد. این پژوهش جهت تعیین تنوع بیوشیمیایی، ژنتیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی مقایسه ای میان آزمونهای بیوشیمیایی و ژنتیکی جهت شناسایی گونه های مختلف انتروکک در فاضلاب شهری تهران صورت گرفته است .*

مواد و روشها: *۷۱۲ ایزوله انتروکک بر روی محیط mEnterococcus agar جداسازی و با آزمونهای مختلف بیوشیمیایی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه با آزمون PCR شناسایی شدند. آزمونهای تعیین حساسیت دارویی سویه ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک به انجام رسید. MIC سویه های مقاوم یا دارای مقاومت بینابینی به ونکومایسین بروش Etest تعیین گردید. الگوی پلاسمیدی و سویه های دارای ژن vanA و vanB معین گردیدند.*

یافته ها: *۴۰۲، ۱۷۰، ۸۲، ۲۵، ۱۶، ۱۱، ۳، ۲ و ۱ سویه بترتیب E. faecium، E. hirae، E. faecalis، E. gallinarum، E. casseliflavus، E. mundtii، E. raffinossus، E. dispar و E. avium بودند.*

مقاومت به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین و کلرامفنیکل بترتیب ۴، ۴، ۱۸، ۲۰، ۳۰ و ۶٪ بود. ۱۹ ایزوله مقاوم (MIC≥512 µg/ml) به ونکومایسین بوده و دارای ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف بودند. ۱۰۰٪ دارای ژن vanA و ۳۲٪ نیز دارای ژن vanB بودند. نتایج آزمون PCR در مورد تمامی گونه ها بطور ۱۰۰٪ منطبق بر نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بودند.

نتیجه گیری: *علیرغم تنوع بسیار بالای انتروککها در فاضلاب شهری تهران اما سویه های مقاوم تماما محدود به E. faecium بودند. تمامی سویه های مقاوم دارای ژن vanA بودند و فراوانی ژن vanB بیشتر از گزارشات دیگر بود. PCR برای شناسایی سویه های مختلف انتروکوکوس، روشی اختصاصی، سریع، مطمئن و برتر در مقایسه با آزمونهای بیوشیمیایی بوده و از اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ برخوردار می باشند.*

واژگان کلیدی: ***انتروکک، vanA، vanB، پلاسمید، فاضلاب، تهران***

مقدمه

انتروکوک ها فلور همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات بوده که مستقیما یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند نقش مهمی در ایجاد و تداوم عفونتهای بیمارستانی داشته باشند (۱و۲). این باکتریها از مهمترین عوامل ایجاد اندوکاردیت و عفونتهای ادراری بوده؛ همچنین از دهه ۱۹۷۰ به عنوان عامل رایـــج عفونتهای دستگاه تنفسی محسوب می شوند. این باکتریها زمانیکه از طریق فاضلاب وارد محیط شوند می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند (۴-۱).

E. faecalis و E. faecium به ترتیب عامل حدود ۹۰-۸۰ درصد و ۱۵-۵ درصـــــد کل عفونتهای انتروکوکی هستند سایر انتروکوک ها مثل E. avium و E. raffinosus به ندرت عفونتهای انتروکوکی ایجاد می کنند (۷-۳).

انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین نخستین بار از انگلیس و فرانسه در سال ۱۹۸۸ گزارش شدند، اما امروزه از بسیاری از نقاط دنیا نیز گزارش می شوند. اولین گزارشات در مورد انتروکک های مقاوم به ونکومایسین (دارای ژنوتایپ vanA) در E. faecium مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین بود (۵). سپس E. faecium مقاوم به ونکومایسن که واجد ژنوتایپ vanB بود از بیماران در ایالت میسوری در سال ۱۹۸۷ جدا شد. در سال ۱۹۹۰ عفونت های ناشی از انتروکک های مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان هایی در شمال شرق و غرب امریکا گزارش گردید. تا سال ۱۹۹۴ بسیاری از بیمارستانهای امریکا این سویه های مقاوم را جدا سازی نمودند (۵). فنوتایپ vanA به مقادیر بالای ونکومایسین و مقادیرمتوسط تا زیاد تیکوپلانین مقاوم است، که این مقاومت قابل انتقال می باشد. در فنوتایپ vanB مقاومت به مقادیر کم تا زیاد ونکومایسین و حساسیت به تیکوپلانین مشاهده می شود. این مقاومت هم القایی و هم انتقال پذیر می باشد (۴-۱).

در مواردیکه میزان شیوع عفونتهای انتروکوکی پایین است، غربالگری Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) در نمونه های روده ای بمنظور بررسی میزان شیوع گونه های انتروکوکی رایج در جامعه و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها، یک پروسه بسیار مشکل می باشد (۲و۴). با در نظر گرفتن این مطلب که فاضلاب مجموعه ای از مدفوع هر یک از ساکنین آن منطقه در یک شبانه روز می باشد بنابراین جستجو در نمونه های فاضلاب شهری و بیمارستانی بعنوان یک روش جایگزین جهت غربالگری سویه های انتروکوک می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. فاضلاب حاوی تعداد بسیار زیادی از باکتری های با منشاء روده ای بوده و سهولت نمونه گیری باعث افزایش شانس جدا سازی سویه ها با تنوع بیشتر می گردد، پس بطور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرند (۴).

انتروکک ها دارای قابلیت کسب مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف می باشند. وجود مقاومت ذاتی انتروکک ها به بسیاری از آنتی بیوتیک های معمول، سبب می شود که در زمان درمان عفونت های سایر باکتری ها و عفونت های انتروککی، سویه های با مقاومت چندگانه (MDR) در روده زیاد شده و جمعیت غالب موجود در آن منطقه را به خود اختصاص دهند. بنابراین امکان دریافت ژنهای مقاومت به مقادیر بالای آمینوگلیکوزیدها، پنی سیلین، تتراساکلین و ونکومایسین برای آنها فراهم می گردد (۸).

انتشار انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین باعث انتشار کلونال یک سویه مقاوم واحد و انتقال ژنتیکی ترانسپوزونها و پلاسمیدهای مقاومت بین سویه‌ها و حتی بین گونه‌های مختلف می شود. چنانکه سویه های استاف اورئوس مقاوم به ونکومایسین با ژنوتایپ vanA در امریکا گزارش شده است (۹و۱۰).

وجود مکانیسم های مختلف برای Conjugation (هم یوغی) می تواند از دلایل کسب مقاومتهای چند گانه آنتی بیوتیکی در انتروکک ها باشد (۳و۱۱). پلاسمید ها عوامل خارج کروموزومی هستند که در طی فرآیند کانجوگاسیون موجب انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک ها می گردند. اکثر موارد مقاومت در E. faecium مشاهده می‌شود که اغلب به آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام‌ها و نیز ونکومایسین مقاوم است. البته مقاومت ضد میکروبی به مقدار کمتر در سویه‌های دیگر مثل E. faecalis نیز به چشم می‌خورد.

این پژوهش جهت تعیین تنوع بیوشیمیایی و ژنتیکی انتروککهای موجود در فاضلاب شهر تهران و بررسی میزان مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف بویژه ونکومایسین و همچنین بررسی مقاسیه ای میان آزمونهای بیوشیمیایی و ژنتیکی در میان گونه های مختلف انتروکک؛ جهت استفاده از یک روش سریع و اختصاصی بمنظور شناسایی گونه های مختلف صورت گرفته است.

روش کار

جهت انجام این بررسی در طی ۲۱ ماه از مهر ماه سال ۱۳۸۳ لغایت خرداد ماه ۱۳۸۵، ۱۰ مرتبه نمونه گیری از چهار تصفیه خانه فاضلاب شهر تهران بنامهای شهرک اکباتان، شوش، صاحبقرانیه و جنوب انجام گرفت؛ و در مجموع ۲۸۲ نمونه از فاضلاب ورودی، ۲۱۱ نمونه از فاضلاب لجن و ۲۱۹ نمونه از فاضلاب خروجی بدست آمد.

برای جدا سازی و شناسایی ایزوله ها ۲۰۰ میلی لیتر نمونه از عمق ۱۰۰-۳۰ سانتیمتری هر یک از حوضچه های فاضلاب ورودی، خروجی و لجن گرفته شده و در بطری های استریل ۲۵۰ میلی لیتر جمع آوری شد. تمامی نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران منتقل؛ و در کمتر از ۲ ساعت مورد بررسی های بعدی قرار گرفتند (۱و۴).

سپس بر اساس روشی که توسط Mollby و همکاران سابقا شرح داده شده (۲و۴)، ابتدا نمونه های بدست آمده از تمامی حوضچه های فاضلاب رقیق شده و از هر رقت نیز به اندازه ۱۰۰ میلی لیتر نمونه تهیه گردید. در این روش از سیستم فیلتراسیون (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) و فیلترهایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استفاده گردید و رقتهای بدست آمده از هر نمونه با کمک این سیستم فیلتر شدند. سپس فیلترها به محیط اختصاصی mEnterococcus agar (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) منتقل شده و بمدت ۴۸ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

سپس فیلترها به پلیتهای حاوی محیط bile esculin agar منتقل شده و بمدت ۲ ساعت در در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند (۱و۲و۴). ۲۴ کلنی سیاه رنگ در هر پلیت حاوی محیط bile esculin agar انتخاب و جهت بررسی های بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند.

تمامی ایزوله ها با استفاده از آزمونهای قابلیت رشد در دماهای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد و محیط نمک ۶/۵٪، همچنین آزمون های کاتالاز و PYR (L-pyrrolidonyl-B-naphtyl amide) جهت شناسایی جنس انتروکوکوس مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲و۱۳). بنابراین ایزوله هایی که Bile esculin و PYR مثبت و کاتالاز منفی بودند و همچنین قابلیت رشد در محیط نمک ۶/۵٪ و دماهای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد را داشتند، تحت عنوان جنس انتروکوکوس انتخاب گردیدند.

سپس این سویه ها با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی تخمیر قندهای L-arabinose, D-sorbitol, D-manitol, L-sorbose, lactose, sucrose, methyl-α-D-glucopyranoside ، هیدرولیز اسید آمینه Arginine، هیدرولیز Hippurate، همولیز، آزمون حرکت، آزمون بررسی وجود یا عدم وجود پیگمان ، آزمون احیاء Tetrazolium شناسایی شده و گونه های آنها نیز معین گردید (۱۲و۱۳).

در تمامی آزمونهای فوق الذکر از کنترلهای مثبت و منفی E. faecalis ATCC 29212, E. faecium BM4147 E. gallinarum BM14974, E. hirae, E. casseliflavus, E. mundtii جهت حصول اطمینان از صحت عملکرد هر یک از آزمونها استفاده شد.

با استفاده از ۶ آنتی بیوتیک vancomycin (۳۰ میکروگرم)، tetracycline (۳۰ میکروگرم)، gentamicin (۱۲۰ میکروگرم)، erythromycin (۱۵ میکروگرم)، ciprofloxacin (۵ میکروگرم) و chloramphenicol (۳۰ میکروگرم) BBL (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA) بروش disk diffusion و با استفاده از استانداردهای CLSI (Clinical Laboratory and Standard Institute)، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی هر سویه مشخص گردید(۱۴). سپس سویه هایی که نسبت به آنتی بیوتیک vancomycin مقاوم و یا دارای مقاومت بینابینی بودند؛ جهت انجام آزمون MIC انتخاب گردیدند(۱۵) و هم چنین مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها نسبت به سه آنتی بیوتیکamikacin (۳۰ میکروگرم)، ampicillin (۱۲۰ میکروگرم) و streptomycin (۳۰۰ میکروگرم) نیز بروش disk diffusion تعیین گردید.بر اساس استانداردهای CLSI؛ MIC سویه های منتخب به روش Etest انجام شد، و سویه های مقاوم (MIC ≥32 µg/ml، دارای مقاومت بینابینی (MIC= 8-16 µg/ml) و حساس (MIC≤4 µg/ml) تعیین گردیدند (۱۵).در انجام آزمونهای disk diffusionو MIC از دو سویه استاندارد E. faecalis ATCC 51299 و E. faecalis ATCC 29212, بعنوان شاخصهای مقاومت و حساسیت به ونکومایسین استفاده گردید.در این مطالعه استخراج پلاسمید به روش کیت QIA Prep Spin (QIA GENE, Hilden, Germany) انجام شد. سپس محصولات در یک ژل آگارز ۰/۸٪ و همچنین Tris-۰/۵ X borate-EDTA (TBE) buffer الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم برماید با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت.جهت شناسایی وجود ژنهای مقاومت vanA و vanB که بر روی پلاسمید قرار دارند، از پلاسمید استخراج شده بعنوان الگوی DNA استفاده گردید و ۲ میکرولیتر از پلاسمید به Master Mix اضافه شد.جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی جنس و همچنین گونه های مختلف انتروکوکوس و ژنهای مقاومت به ونکومایسین، استخراج DNA بروش Boiling انجام گرفت (۱۶). بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ورتکس شده و بمدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی جهت انجام آزمون PCR به Master Mix متشکل از مواد زیر اضافه شد:۱۰ X PCR Buffer، ۰/۵ Unit taq DNA polymerase (HT Biotechnology, Cambridge, United Kingdom)، ۱/۲ µM $MgCl_2$، ۰/۶۴ µM dNTP، ۱/۶ µM each primer. جهت انجام آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی (ژن آنزیم superoxide dismutase و همچنین ژن کد کننده آنزیم D-alanine-D-alanine ligases) (جدول شماره ۱) و برنامه حرارتی (4 95°C min), 30 cycles [95°C (30s), 52°C (1 min), 72°C (1 min)], 72°C for 7 min. (Mastercycler, در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf, Hamburg, Germany) استفاده شد (۱۷). سپس محصولات در یک ژل آگارز ۱/۵٪ و همچنین Tris-borate-EDTA ۰/۵ X buffer (TBE)الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم برماید با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت.در این مطالعه از سویه های E. faecalis V583 (vanB) and E. faecium BM4147 (vanA) و همچنین E. faecalis ATCC 29212, E. gallinarum BM14974, E. hirae, E. casseliflavus, E. mundtii بعنوان سویه های کنترلی استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

گونه	Sequence (5'-3')	منبع	اندازه محصول (bp)
E. faecium	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	۱۷	۶۵۸
E. faecalis	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	۱۷	۹۴۱
vanA	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	۱۷	۱۰۳۰
vanB	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	۱۷	۴۳۳
E. faecium	CGAATTTAAATTCAGCAATTGA CTTTCCTTCCATCAATGGAG	این مطالعه	۳۵۹
E. faecalis	ATGTGACTAACTTAAACGCAG AATCTTGGTTTGGTGTTGAA	این مطالعه	۳۴۷
E. gallinarum	TTACTTGCTGATTTTGATTCG TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	۱۷	۱۸۹
E. hirae	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG CTTTCTGATATGGATGCTGT	۱۸ این مطالعه	۱۸۶
E. casseliflavus	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG TTAGCAGACTTTTCTTCTGTAC	۱۸ این مطالعه	۲۵۳
E. mundtii	CAGACATGGATGCTATTCCATCT AGGTTTCTTGCCTTCCATCAAT	۱۸ این مطالعه	۳۰۱
Enterococcus genus	TTAAAACCATTAGGCGATCG CCCATNCCCATNGANGGRTCCAT	۱۹	۱۰۰

یافته ها

بر اساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی مختلف مربوط به تعیین جنس و گونه انتروکوکوس، از ۷۱۲ ایزوله انتروکوکوس بدست آمده در طی ۱۰ مرتبه نمونه گیری از چهار تصفیه خانه بزرگ شهر تهران در طی این مطالعه، در مجموع ۹ گونه مختلف انتروکوکوس شناسایی گردید. توزیع فراوانی کلیه سویه های مختلف متعلق به جنس انتروکوکوس در جدول شماره ۲ آورده شده است.تمامی سویه های مورد بررسی در این پایان نامه از چهار تصفیه خانه شهرک اکباتان، صاحبقرانیه، شوش و جنوب در سه نقطه شمال، جنوب و غرب شهر تهران جداسازی شده است. در جدول شماره ۳ نیز درصد فراوانی هر یک از گونه های مختلف انتروکوکس در چهار تصفیه خانه فاضلاب دیده می شود. اختلاف معنی داری در میزان آلودگی و شیوع باکتری در تصفیه خانه های مختلف دیده نشد. تمامی ۷۱۲ ایزوله مختلف انتروکوکوس در طی ۱۰ مرتبه نمونه گیری در بازه های زمانی مختلف از مهرماه ۱۳۸۳ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ جداسازی شده اند. در جدول شماره ۴ میزان شیوع سویه های مختلف انتروکوکوس بر حسب بازه زمانی در تصفیه خانه های مختلف نشان داده شده است. بر اساس اطلاعات بدست آمده از این جدول، مشخص گردید که E. faecium در تمامی نمونه گیریها وجود داشته است و بعنوان سویه غالب در این ۱۰ مرتبه نمونه گیری مطرح بوده است. پس از آن، E. faecalis در ۹ مرتبه ، E. hirae در ۶ مرتبه ، E. gallinarum ، E. mundtii و E. casseliflavus در ۵ مرتبه و گونه های E. raffinosus، E. dispar و E. avium نیز هر کدام تنها در یک مرتبه نمونه گیری جداسازی شده اند. اختلاف معنی داری در میزان شیوع گونه های مختلف باکتری در دفعات مختلف نمونه گیری مشاهده شد.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بروش disk diffusion نشان داد که ۳۴٪ نمونه ها مقاوم به اریترومایسین، ۲۰٪ مقاوم به تتراسایکلین، ۱۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۶٪ مقاوم به کلرامفنیکل، و ۳٪ نمونه ها نیز مقاوم به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامیسین بودند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین مشاهده می گردد. آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامیسین نیز از پایینترین میزان مقاومت برخوردار می باشند. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از گونه های مختلف انتروکوکوس در جدول شماره ۵ آورده شده است. همانگونه که از این جدول بر می آید، تمامی گونه های مختلف انتروکوکوس باستثناء E. faecium فاقد مقاومت به ونکومایسین بودند. E. avium تنها گونه ای بود که نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مذکور حساس بود و E. dispar نیز تنها نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بود. E. raffinosus و E. hirae نیز بترتیب نسبت به ۲ و ۳ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. علیرغم اینکه E. hirae دومین گونه غالب در فاضلاب شهری تهران بوده است اما با این وجود از حساسیت فوق العاده بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف برخوردار بود. علیرغم اینکه بیشتر گونه های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل حساس بودند اما سه گونه E. gallinarum و E. casseliflavus و E. mundtii نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین بالاترین میزان مقاومت نسبت به جنتامیسین در میان گونه های مختلف نیز متعلق به E. mundtii بود.پس از بررسی مقاومتهای آنتی بیوتیکی مختلف در میان ۷۱۲ سویه انتروکوکوس ، معین گردید که ۱۹ سویه مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومایسین بودند. پس از شناسایی سویه های مقاوم به ونکومایسین، میزان مقاومت آنها نسبت به سه آنتی بیوتیک ampicilln, amikacin , streptomycin نیز بروش دیسک دیفیوژن معین گردید ۱۰۰٪ سویه های E. faecium مقاوم به ونکومایسین، نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین، ۸۹٪ سویه های نیز مقاوم به آنتی بیوتی کهای آمپی سیلین و جنتامیسین، ۵۸٪ سویه ها مقاوم به کلرامفنیکل و ۵۳٪ نیز مقاوم به استرپتومایسین بودند. پایینترین مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین دیده شد (۳۳٪). ۶۵ سویه مختلف انتروکوکوس بروش Disc Difusion انتخاب و MIC آنها مشخص شد. سویه هایی که MIC آنها برابر یا بیش از ۳۲ میکرگرم در میلی لیتر بود، جهت بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. پس از انجام آزمون MIC معین گردید که ۱۹ سویه دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به ونکومایسین بودند. (MIC≥ 512 µg/ml) . همچنین ۸ سویه نیز مقاومت بینابینی نسبت به ونکومایسین داشتند. MIC= (8µg/ml). و ۳۸ سویه نیز حساس به ونکومایسین بودند (MIC>4 µg/ml). در تمامی سویه هایی که دارای مقاومت بینابینی بودند میزان MIC آنها 8 µg/ml بود. در میان سویه های حساس نیز ۱۲ سویه دارای MIC<2 µg/ml و ۲۵ سویه نیز دارای MIC<4 µg/ml بودند.در این پژوهش، پلاسمید مربوط به ۶۵ سویه مختلف انتروکوکوس (مقاوم به ونکومایسین یا دارای مقاومت بینابینی) استخراج گردید. نکته قابل توجه در این میان، وجود الگوی متنوع پلاسمیدی در میان سویه های E. faecium مقاوم به ونکومایسین بود. در حالیکه در میان سویه های حساس به ونکومایسین هیچگونه باند پلاسمیدی مشاهده نگردید. همانگونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می گردد، ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف در میان ۱۹ سویه مقاوم به ونکومایسین دیده می شود.

پس از شناسایی جنس و گونه های مختلف انتروکوکوس با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی، صحت عملکرد آزمونهای بیوشیمیایی با استفاده از آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از این آزمون نیز کاملا و بطور ۱۰۰٪ منطبق بر نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بود (شکل شماره ۲).پس از بهینه سازی و انجام آزمون PCR بر روی سویه های فوق، محصول PCR ژن vanA با وزن ملکولی ۱۰۳۳ جفت باز و محصول PCR ژن vanB با وزن مولکولی ۴۳۳ جفت باز حاصل گردید (شکل شماره ۳). جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی ژنهای مقاومت، از دو الگوی DNA استفاده گردید. ۱. پلاسمید استخراج شده با استفاده از کیت، ۲. DNA استخراج شده بروش boiling. در ابتدا آزمون PCR در مورد تمامی سویه های VRE با استفاده از پلاسمید حاصل بعنوان الگوی DNA ، انجام گرفت. تمامی سویه های VRE واجد ژن vanA بودند. سپس آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج شده بروش boiling انجام گرفت. در بررسی ژن مقاومت vanB معین گردید که این ژن در برخی از سویه ها کروموزومی و در برخی نیز پلاسمیدی بود.

جدول ۲. توزیع فراوانی گونه های مختلف مربوط به جنس انتروکوکوس

گونه های مختلف / گونه انتروکوکوس	تعداد	درصد
E. faecium	۴۰۲	۵۶
E. hirae	۱۷۰	۲۴
E. faecalis	۸۲	۱۲
E. gallinarum	۲۵	۳/۵
E. casseliflavus	۱۶	۲
E. mundtii	۱۱	۱/۵
E. raffinosus	۳	۰/۵
E. dispar	۲	۰/۳
E. avium	۱	۰/۲
جمع	۷۱۲	۱۰۰

جدول ۳. درصد فراوانی گونه های مختلف جنس انتروکوکوس بر حسب تصفیه خانه محل جداسازی

تصفیه خانه / گونه های انتروکوکوس	جنوب	شوش	صاحبقرانیه	شهرک اکباتان	انحراف معیار
E. faecium	۶۴/۸	۶۳/۸	۴۷/۹	۵۵/۳	۷/۹
E. hirae	۲/۹	۱۳/۷	۲۵/۳	۳۰/۱	۱۲/۱
E. faecalis	۸/۸	۱۵/۳	۱۸/۵	۸/۷	۴/۸
E. gallinarum	۱۹/۱	۰	۱/۷	۲/۵	۸/۹
E. casseliflavus	۱/۵	۵/۶	۰/۸	۱/۸	۲/۱
E. mundtii	۲/۹	۰	۳/۳	۱/۳	۱/۵
E. raffinosus	۰	۰	۲/۵	۰	۱/۲
E. dispar	۰	۱/۶	۰	۰	۰/۸
E. avium	۰	۰	۰	۰/۳	۰/۱

جدول ۵. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از گونه های مختلف انتروکوکوس

آنتی بیوتیک / گونه های انتروکوکوس	کلرامفنیکل	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جنتامیسین	تتراسایکلین	ونکومایسین
E. faecium	۱۰	۲۴	۵۴	۴	۲۲	۵
E. hirae	۰	۳	۲	۰	۲	۰
E. faecalis	۲	۱۲	۹	۲	۴۱	۰
E. gallinarum	۴	۱۲	۱۲	۰	۱۶	۰
E. casseliflavus	۶	۱۳	۵۰	۰	۲۵	۰

بحث

با انجام این تحقیق مشخص گردید که، شیوع گونه های انتروککی درسیستم فاضلاب شهر تهران از تنوع بسیار بالایی برخوردار می باشد. این تنوع جداسازی گونه ها در مطالعات مشابه نیز دیده می شود (۱و۳و۴و۱۶و۲۰).

در این مطالعه بیشترین سویه جدا شده E. faecium بود، این نتایج منطبق بر مطالعات مشابه می باشد. در بیشتر مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان نیز همواره E. faecium بالاترین شیوع را داشته است (۱و۳و۴و۱۶و۲۰). اما در مواردی نیز عکس این قضیه دیده می شود (۲۱). E. hirae دومین سویه غالب در فاضلاب شهری تهران بوده است؛ در سایر مطالعات انجام گرفته، کمتر دیده شده است که E. hirae از شیوع بالایی برخوردار باشد. اما در برخی از مطالعات نیز گزارشاتی از شیوع این سویه مشاهده شده است (۲و۲۲و۲۳).

بطور کلی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در فاضلاب شهری تهران در حدود ۳٪ می باشد. میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین در سایر کشورها نیز تا حدودی متفاوت می باشد. بعنوان مثال میزان مقاومت در کشورهای اسپانیا، زلاندنو، فرانسه، آمریکا و پرتغال بترتیب ۰/۴، ۶، ۴، ۶ و ۲۰٪ گزارش شده است (۱و۱۶و۲۱و۲۴و۲۵). Kuhn و Iversen نیز نشان دادند که میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین بترتیب در کشورهای اروپایی و همچنین سوئد بترتیب ۱۱-۸ و ۳٪ بود (۲و۴).

تمامی این اطلاعات نشان دهنده وجود اختلاف در فرکانس VREها در کشورهای مختلف و محلهای جداسازی مختلف می باشد. علیرغم اینکه در تمامی کشورهای جهان گزارشاتی از وجود گونه های مختلف انتروکک مقاوم به ونکومایسین نظیر E. faecalis و E. hirae وجود دارد (۱و۲و۴و۲۳و۲۶)، اما در این بررسی و در فاضلاب شهری تهران ما تنها توانستیم گونه E. faecium را جداسازی نماییم. که این امر خود می تواند نشان دهنده عدم جود انتقال ژنهای مقاومت به ونکومایسین در میان گونه های مختلف انتروکوکوس باشد که در کشورهای مختلف گزارش شده است (۲۷).

از نظر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف، مشابه با دیگر کشورها مقاومت نسبت به کلرامفنیکل (۲۰و۲۴و۲۶) با درصد پایین و مقاومت نسبت به جنتامایسین با درصد بالا در این مطالعه مشاهده می شود (۲۲و۲۴). همچنین مقاومت به اریترومایسین از شیوع بالایی برخوردار بوده و فراتر از سایر کشورها می باشد (۱۲و۲۰و۲۱و۲۲و۲۴و۲۶) که بنظر می رسد که ناشی از مصرف بالای این آنتی بیوتیک در خوراک دامها باشد.

در ارتباط با الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و همچنین محل جداسازی نمونه ها ارتباط معنی داری با الگوی پلاسمیدی مشاهده می گردد. به این ترتیب، الگوی پلاسمیدی خاصی در نمونه هایی که از یک تصفیه خانه بدست آمده، تکرار شده است. این مسأله در مورد الگوهای مقاومتی خاصی نظیر مقاومت به ونکومایسین، شکل دیگری بخود گرفته است. بطور کلی از آنجایی که ۴ الگوی پلاسمیدی مختلف در این ۱۹ سویه مشاهده می گردد، الگوهای این سویه ها که از تصفیه خانه های مختلف جداسازی شده اند با یکدیگر متفاوت می باشد. به این ترتیب احتمال گسترش کلونال این سویه ها درک می گردد. در ارتباط با تصفیه خانه های مختلف نیز اگر تعداد سویه های مقاوم بدست آمده از همه یکسان بود، امکان قضاوت صحیح تری وجود داشت. در این مطالعه بیشتر نمونه ها متعلق به تصفیه خانه شهرک اکباتان می باشد.

آنچه از بررسی استخراج پلاسمید سویه ها استنباط می گردد، این است که روش استخراج پلاسمید با توجه به حساسیت این روش، تکرار پذیری و دقت آن می تواند بعنوان یک روش قابل قبول در بررسی های اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. در مورد تکرار پذیری آن، با انجام استخراج پلاسمید در دفعات مختلف بر روی سویه های فاقد پلاسمید و یا سویه های دارای چندین باند پلاسمیدی مختلف و مشاهده الگوی یکسان در تمامی دفعات تکرار، می توان گفت که با رعایت شرایط می توان به الگوهای بدست آمده استناد نمود.

امروزه در کشورهای مختلف جهان روشهای بیوشیمیایی بعنوان معمولترین و ساده ترین روشها جهت شناسایی باکتریها مورد استفاده قرار می گیرند. این روشها علیرغم ساده و قابل دسترس بودن و همچنین عدم نیاز به امکانات پیچیده و دستگاه های خاص در عین حال دارای معایبی نیز می باشند. از آنجمله، این روشها زمانبر بوده و از دقت کافی نیز برخوردار نمی باشند (۱۸). این اشکال در مورد سویه های بدست آمده از نمونه های محیطی و مواد غذایی بیشتر نمایان می گردد. در طبیعت باکتریها بر خلاف محیط داخلی بدن و آزمایشگاه از تمامی امکانات لازم جهت رشد و تکثیر خود برخوردار نیستند و تقریبا همواره به حالت گرسنه بسر می برند. بنابراین سیستمهای تخمیری قندهای مختلف را که بصورت اپرونی می باشند را خاموش و روشن می نمایند.

اما در مقابل، PCR بدلیل سرعت و دقت بالا روش بهتری جهت تشخیص می باشد. البته باید توجه داشت که PCR نیز روشی هزینه بر بوده و نیازمند استفاده از مواد و دستگاه های خاصی می باشد. همچنین جهت استخراج DNA کلنی باکتری مورد نظر باید خالص باشد؛ زیرا در غیر اینصورت و در صورت آلودگی ممکن است که در هنگام آزمون باعث ایجاد باندهای اضافی و ناخواسته در واکنش شود (۱۸). اما علیرغم تمامی موارد گفته شده، PCR یک روش بسیار اختصاصی است و با سرعت بسیار زیادی در مقایسه با آزمونهای بیوشیمیایی می تواند با شناسایی ژن مورد نظر، منجر به شناسایی جنس یا گونه باکتری گردد.

در بیشتر مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان، بیشتر سویه ها یا دارای ژن vanA بودند یا ژن vanB و کمتر این دو ژنوتایپ با یکدیگر گزارش شده است. میزان شیوع ژن vanA در کشورهای مختلف در حدود ۱۰۰-۵۷٪ گزارش شده است (۲و۴و۱۶و۲۰و۲۱و۲۲و۲۴و۲۸). همچنین میزان شیوع ژن مقاومت vanB نیز در کشورهای پرتغال، سوییس و ایتالیا بترتیب در حدود ۱۳، ۱۴ و ۲۳٪ گزارش شده (۴و۲۲و۲۸) و در سایر نقاط نیز گزارشی از شیوع آن وجود ندارد (۲و۱۶و۲۱و۲۲). در سال ۲۰۰۵ در آمریکا از مجموع ۲۴۸ سویه مورد بررسی، دو سویه واجد هر دو ژن vanA و vanB بودند (۲۹).

نتیجه گیری

به رغم اینکه فاضلاب از طریق سیستم های لوله کشی و جمع آوری مرکزی جمع آوری می شود؛ اما کوچکترین نقصی در این سیستم و یا ترکیدگی و پوسیدگی لوله ها منجر به راه یافتن فاضلاب و ارگانیسمهای پاتوژن همراه آن به آبهای زیر زمینی و سطحی می گردد. با انتقال VRE به آبهای سطحی و همچنین مصرف این آبها سلامت عمومی جامعه نیز ممکن است در معرض تهدید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی کشور به انجام رسیده است. همچنین نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از Dr. Patrice Courvalin از انستیتو پاستور فرانسه که در تهیه سوشهای کنترلی همکاری نمودند، اعلام می نماید.

REFERENCES

1. Harwood JV, Brownell M, Perusek W, et al. Vancomycin-Resistant Enterococcus spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. Appl Environ Microbiol. 2001; 67:4930-4933.

2. Kuhn I, Iversen I, Finn M, et al. Occurrence and relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci in Animals, Humans, and the Environment in Different European regions. Appl Environ Microbiol. 2005; 7:5383-5390.

3. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:513-522.

4. Iversen A, Kuhn I, Franklin A, et al. High Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Swedish Sewage. Appl Environ Microbiol. 2002; 68:2838-2842.

5. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin Resistant Enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:686-707.

6. Wood, JJA. Vancomycin Resistant Enterococci. N Eng J Med. . 2000; 342:710-721.

7. Magi G, Capretti R, Paolletti, C, et al. Presence of vanA-carrying pheromone response plasmid (PBRG1)in a clinical isolate of Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:1571-1576.

8. Noble WC, Virani K Cree RGA. Co-tranfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 1992; 93:195-198.

9. Erdem I, Cicek-senturk G, Yucesoy-dede B, et al. In vitro effect of levofloxacin and vancomycin combination against high-level aminoglycoside-resistant enterococci. Int J Antimicrob Agents. 2004; 23:92-94.

10. Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, et al. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50:428–438.

11. Wirth R. Sex pheromones and gene transfer in Enterococcus faecalis. Res Microbiol. 2000; 151:493-496.

12. Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus Species Isolated from Human Infections by a conventional Test Scheme. J Clin Microbiol. 1998; 27:731-734.

13. Manero A, Blanch AR. Indentification of Enterococcus Spp. With a Biochemical key. Apple Environ Microbiol. 1999; 65:4425-4430.

14. National committee for clinical Laboratory standard. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerubically. Approved standard. M7-A5. MIC testing. NCCLS.Villanova, Pa.

15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement, vol. 21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

16. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. J Clin Microbiol. 2000; 38:620-635.

17. Kariyama R., Mitsuhata R, Chow jw, et al. Simple and reliable Multiplex PCR for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2000; 38:3092-3095.

18. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol. 2004; 42:3558-3565.

19. Teng LJ, Hsueh P, Wang YH., et al. Determination of Enterococcus faecalis groESL Full-Length Sequence and Application for Species Identification . J Clin Microbiol. 2001; 9:3326-3331.

20. Stobringh E, Bogaard A, London N, et al. 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 Agents Chemother. 1999; 43:2215-2221.

21. Manson JM., Smith JMB, Cook GM. Persistence of Vancomycin-Resistant Enterococci in New Zealand Broilers after Discontinuation of avoparcin use. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:5764-5768.

22. Liassine N, Frei R, Jan I, et al. Charactrization of glycopeptide-resistant enterococci from Swiss hospital. . J Clin Microbiol. 1998; 36:1853-1858.

23. Blanch AR, Caplin JL, Iversen A, et al. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. J Appl Microbiol. 2003; 94:994-1002.

24. Novais C, Couque TM, Ferreira H, et al. Environmental contamination with Vancomycin- Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. Appl Environ Microbiol. 2005; 71:3364-3368.

25. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, et al. vanA- mediated vancomycin-resistant Enterococcus spp. In sewage. J. Antimicrob. Chemother. 1994; 33:553-561.

26. Khan SA, Nawaz MS., Khan AA, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant Enterococcus spp. From poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Mol Cel probes. 2005; 19:27-34.

27. Murray BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerg Infect Dis. 1998; 4:37-47.

28. Miele A, Bandera M, Doldestein B. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in Enterococci and to study gene organization in vanA isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:1772-1778.

29. Domingo MC, Huletsky A, Giroux R, et al. High prevalence of glycopeptide resistance genes vanB, vanD, and vanG not associate eith Enterococci in human fecal flora. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:4784-47.