بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین ژنهای مقاومت vanA و vanB در میان سویه های انتروککی جدا شده از مراکز درمانی و آزمایشگاه های شهر تهران

فاتح رحیمی[1*]، مجید بوذری[2]، لیلی اربابی[3]، فرمیسک رحیمی[4]، زهره ملکی[5]، جلیل وندیوسفی[6]

۱ . دانشجوی دکتری میکروبیولوژی گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان و عضو استعداد درخشان باشگاه پژوهشگران جوان
۲. ویروس شناس، استادیار دانشگاه اصفهان
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۴. دانشجوی مهندسی کامپیوتر-سخت افزار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی
۵. پاتولوژیست، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶. میکروب شناس، استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات میکروب شناسی، تلفن و نمابر: ۶۶۴۰۵۵۳۵-۰۲۱ ، fateh_rahimi@biol.ui.ac.ir

دریافت مقاله: فروردین هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: تیر هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوک ها فلور همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات بوده و نقش مهمی در ایجاد اندوکاردیت و عفونتهای ادراری دارند؛ همچنین این باکتریها مستقیما یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند. بواسطه توانایی کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی که درمان آنها را با سختی مواجه می سازد، اهمیت این باکتریها بطور فزاینده ای در حال گسترش می باشد. این مطالعه با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین سویه های مقاوم به ونکومایسین و همچنین جداسازی و شناسایی ژنهای مقاومت vanA و vanB در میان ایزوله های انتروکوکوس جدا شده از بیمارستانهای شهر تهران به انجام رسیده است.*

روش کار: *۵۴۰ ایزوله انتروکک در حد فاصل سالهای ۱۳۸۶-۱۳۸۴ از ۲ آزمایشگاه و ۲ بیمارستان شهر تهران جداسازی و با آزمونهای مختلف بیوشیمیایی تا حد جنس و گونه شناسایی شدند. آزمونهای تعیین حساسیت دارویی سویه ها نسبت به ۷ آنتی بیوتیک اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، آکپی سیلین و ونکومایسین به انجام رسید. MIC سویه های مقاوم یا دارای مقاومت بینابینی به ونکومایسین بروش broth micro dilution انتخاب و نهایتا سویه های دارای ژن vanA و vanB در میان این سویه ها شناسایی گردید.*

یافته ها: *از مجموع ۵۴۰ ایزوله بدست آمده، ۶۸٪ E. faecalis و ۳۲٪ E. faecium شناسایی گردید. مقاومت به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل بترتیب ۸، ۵۳، ۵۰، ۶۵، ۵۲ و ۲۹٪ بود. ۴۶ ایزوله مقاوم به مقادیر بالای ونکومایسین (MIC≥512 µg/ml) بودند. ۱۰۰٪ سویه های مقاوم دارای ژن vanA و ۲٪ نیز دارای ژن vanB بودند.*

نتیجه گیری: *تنوع گونه های انتروکک در ایزوله های بیماران در شهر تهران تنها محدود به گونه های E. faecalis و E. faecium بود. بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین و آمپی سیلین و کمترین مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامایسین مشاهده گردید. فراوانی ژنهای مقاومت vanA و vanB منطبق بر سایر گزارشات می باشد.*

واژگان کلیدی: انتروکک، vanA، vanB، تهران

مقدمه

انتروکوک ها فلور همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات بوده و نقش مهمی در ایجاد اندوکاردیت و عفونتهای ادراری دارند؛ همچنین این باکتریها از دهه ۱۹۷۰ به عنوان عامل شایع ایجاد عفونتهای دستگاه تنفسی محسوب می شوند (۳-۱). انتروکوک ها از عوامل مـــــــؤثر ایجاد کننده عفونت های اکتسابی در جوامع، از جمله عفونت دستگاه های تنفسی و ادراری، اندوکاردیت، باکتریمی، نواحی پائین شکم و لگن، بافتهای نرم و سپتی سمی نوزادان بشمار می آیند. این باکتریها مستقیما یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند (۹-۴).

با وجود اینکه نزدیک به بیش از بیست گونه انتروکک تاکنون شناسایی شده است؛ اما تنها دو گونه از این تعداد از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری در انسان محسوب می گردند. تاکنون Enterococcus faecalis ، سویه انتروککی غالب بوده و در حدود ۹۰-۸۰٪ ایزوله های کلینیکی جدا شده را بخود اختصاص داده است، Enterococcus faecium نیز در ۱۵-۵٪ از سویه های جدا شده دیده می شود. سایر گونه های انتروککی نظیر Enterococcus gallinarum, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus durans, Enterococcus avium, Enterococcus raffinosus نیز بندرت جدا می شوند، و تنها احتمال دارد که در ۵٪ از ایزوله های بالینی یافت شوند (۱۰و۱۱). بواسطه توانایی کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی که درمان آنها را با سختی مواجه می سازد، اهمیت این باکتریها بطور فزاینده ای در حال گسترش می باشد (۷). یکی از دلایل اصلی بقای این ارگانیسمها در محیط بیمارستان؛ وجود مقاومت ذاتی این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج و مهمتر از آن، توانایی کسب مقاومت نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای موجود می باشد. پیدایش این مقاومت می تواند ناشی از موتاسیون و یا دریافت اجزاء ژنتیکی از طریق انتقال پلاسمیدها یا ترانسپوزونها باشد(۱۲و۱۳). از آنجایی که دوره درمانی عفونتهای انتروککی طولانی تر و سمیت داروهای ترکیبی آنها نیز در مقایسه با عفونتهای استرپتوککی بیشتر می باشد، بنابراین انتروککها را از لحاظ درمان آنتی بیوتیکی، ارگانیسمهای مشکل سازی بحساب می آورند. تاکنون، ونکومایسین تقریبا تنها دارویی بوده است که می توانست بطور دائم جهت درمان عفونتهای ناشی از انتروککهای مقاوم به چند دارو بکار برده شود (۴و۵).ونکومایسین بمدت بیش از ۳۰ سال است که در موارد کلینیکی بدون هیچگونه مقاومت مشخصی مورد استفاده قرار می گیرد. این آنتی بیوتیک بعنوان آخرین سلاح در درمان عفونتهای استافیلوککهای مقاوم به متی سیلین و همچنین انتروککهای مقاوم به سایر آنتی بیوتیکها مورد استفاده قرار می گیرد(۷). تیکوپلانین نیز یکی دیگر از آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی است که در آمریکا مورد استفاده قرار نمی گیرد، اما در اروپا قابل دسترسی می باشد. ونکومایسین خوراکی که بمیزان بسیار کمی جذب می گردد، جهت درمان انتروکولیت کلستریدیوم دیفیسیل بکار می رود (۴و۵).نخستین سویه E. faecalis, E. faecium مقاوم به ونکومایسین در سال ۱۹۸۸ در انگلستان گزارش شدند. کمی پس از نخستین گزارش، ایزوله های VRE (Vancomycin-Resistant Enterococci) توسط محققین در بریتانیا و فرانسه و همچنین سویه های مشابهی نیز در بیمارستانهایی در غرب ایالات متحده جداسازی و تشخیص داده شدند. متعاقبا، انتروککهای مقاوم به ونکومایسین با سرعتی غیر قابل پیش بینی گسترش پیدا کرده اند و در بسیاری از بیمارستانها در بسیاری از مناطق دنیا مواجهه با آنها وجود دارد (۱۰). تا کنون هفت نوع فنوتیپ مقاومت به ونکومایسین در جهان گزارش شده است (vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanF, vanG) . در انتروککها پیش سازهای نرمال پپتیدوگلیکان دارای انتهای D-ALa-D-ALa هستند که به شدت به ونکومایسین اتصال می‌یابند، در حالیکه در انتروکوکوس‌های مقاوم در برابر ونکومایسین، مسیرهای بیوسنتزی دیگری را طی می‌کنند که پیش‌سازهای انتهایی(D-ALa-D-Lac) را دارا می‌باشد که بطور ضعیف به ونکومایسین اتصال می‌یابند . ژن‌های vanB, vanA لیگاندها-D-ALa D-Lac را کد می‌کنند و مسئول مقاومت متوسط تا سطح بالای اکتسابی می‌باشند که عمدتاً در E. faecalis و E. faecium یافت می‌شود (۱۴) . ژنوتایپ vanA، مقاومت سطح بالا نسبت به ونکومایسین و تیکوپلانین و ژنوتایپ vanB مقاومت سطح بالا نسبت ونکومایسین و حساسیت به تیکوپلانین را کد می کند (۴و۶). مقاومت سطح بالا به گلیکوپپتیدها معمولاً از طریق انتقال پلاسمیدی Conjugation براحتی قابل انتقال به انتروکوکوس‌های حساس می‌باشد . اخیراً نشان داده شده است که ژن‌های لازم و کافی برای تظاهر فنوتیپ vanA توسط یک ترانسپوزون به نام Tn1546 حمل می‌شوند . به نظر می‌رسد انتشار این ترانسپوزون مسئول گسترش مقاومت گلیکوپپتیدی سطح بالا بین ایزوله‌های بالینی انتروککها است. (۱۴و۱۵). این مطالعه با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین سویه های مقاوم به ونکومایسین و همچنین جداسازی و شناسایی ژنهای مقاومت vanA و vanB در میان ایزوله های انتروکوکوس جدا شده از بیمارستانهای شهر تهران به انجام رسیده است.

روش کار

در این مطالعه در مجموع ۵۴۰ ایزوله مختلف انتروکوکوس از ۲ بیمارستان و ۲ آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر تهران، بیمارستانهای امام خمینی و مهر و آزمایشگاه های نگین و مرکزی، در حد فاصل سالهای ۱۳۸۶-۱۳۸۴ جداسازی و تهیه گردید. ۷۵٪ ایزوله ها از نمونه های ادراری، ۱۴٪ از نمونه های خون و ۱۱٪ از نمونه های زخم جداسازی شدند.جهت شناسایی هر یک از ایزوله ها، ابتدا کشت خالص از نمونه تهیه گردید، و سپس با استفاده از آزمونهای رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، هیدرولیز bile esculin، آزمون Pyrrolidonyl aminopeptidase (PYR)، رشد در محیط NaCl۶/۵٪ و همچنین رشد در در دماهای ۱۰°C و ۴۵ ایزوله های مربوط به جنس انتروکوکوس مشخص شدند. بدین ترتیب ایزوله هایی که کاتالاز منفی، bile esculin و PYR مثبت و قابلیت رشد در محیط محیط NaCl ۶/۵٪ و در دماهای ۱۰°C و ۴۵ را داشتند بعنوان جنس Enterococcus انتخاب و با استفاده از آزمونهای تخمیر قندهای L-arabinose, D-sorbitol, D-manitol, L-sorbose, lactose, sucrose, methyl-α-D-glucopyranoside و هیدرولیز اسید آمینه Arginine، هیدرولیز Hippurate، همولیز، آزمون حرکت، آزمون بررسی وجود یا عدم وجود پیگمان ، آزمون احیاء Tetrazolium زیر تا حد گونه شناسایی شدند (۷و۱۶و۱۷). در تمامی آزمونهای فوق الذکر از کنترلهای مثبت و منفی E. faecalis ATCC 29212, E. faecium BM4147 Enterococcus gallinarum BM14974, Enterococcus hirae, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus mundtii جهت حصول اطمینان از صحت عملکرد هر یک از آزمونها استفاده شد. (۱۶و۱۷)با استفاده از ۶ آنتی بیوتیک vancomycin (۳۰ میکروگرم)، tetracycline (۳۰ میکروگرم)، gentamicin (۱۲۰ میکروگرم)، erythromycin (۱۵ میکروگرم)، ciprofloxacin (۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ 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 (۱۸). سپس سویه هایی که نسبت به آنتی بیوتیک vancomycin مقاوم و یا دارای مقاومت بینابینی بودند؛ جهت انجام آزمون MIC انتخاب گردیدند (۱۹).

بر اساس استانداردهای CLSI، MIC سویه های منتخب به روش broth macro dilution 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 (۱۹).

در انجام آزمونهای disk diffusion و MIC از دو سویه استاندارد E. faecalis ATCC 29212, E. faecalis ATCC 51299 بعنوان شاخصهای مقاومت و حساسیت به ونکومایسین استفاده گردید. (۷)

جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی جنس و همچنین گونه های مختلف انتروکوکوس و ژنهای مقاومت به ونکومایسین، استخراج DNA بروش Boiling انجام گرفت (۷). بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ورتکس شده بمدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی بعنوان جهت انجام آزمون PCR به Master Mix متشکل از مواد زیر اضافه شد:

taq DNA polymerase (HT ۰/۵ Unit ،PCR Buffer ۱۰ X ۱/۲ µM ،Biotechnology, Cambridge, United Kingdom) .each primer ۱/۶ µM ،dNTP ۰/۶۴ µM ،$MgCl_2$

جهت انجام آزمون PCR از پرایمرها (۷) و برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) استفاده شد (۷):

vanA : CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA
CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA
vanB : GTGACAAACCGGAGGCGAGGA
CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA

95°C (4 min), 30 cycles [95°C (30s), 52°C (1 min), 72°C (1 min)], 72°C for 7 min. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel in a 0.5 X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and stained in ethidium bromide.

سپس محصولات در یک ژل آگارز ۱/۵٪ 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.

در این مطالعه از سویه های E. faecalis V583 (vanB) and E. faecium BM4147 (vanA) بعنوان سویه های کنترلی استفاده شد (۷).

یافته ها

بر اساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی مختلف مربوط به تعیین جنس و گونه انتروکوکوس، از ۵۱۲ ایزوله انتروکوکوس بدست آمده از ۲ بیمارستان و ۲ آزمایشگاه شهر تهران در طی این مطالعه، تنها ۲ گونه E. faecalis و E. faecium شناسایی گردید. بدین ترتیب مشخص گردید که ۶۸٪ ایزوله ها E. faecalis و ۳۲٪ E. faecium بودند.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بروش disk diffusion نشان داد که ۶۵٪ نمونه ها به اریترومایسین، ۵۴٪ تتراسایکلین، ۵۳٪ آمپی سیلین، ۵۰٪ سیپروفلوکساسین، ۲۹٪ کلرامفنیکل، و ۸٪ سویه ها نیز به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامیسین مقاوم بودند.

پس از بررسی مقاومتهای آنتی بیوتیکی مختلف در میان ۵۴۰ ایزوله انتروکوکوس، معین گردید که ۴۶ سویه مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومایسین بودند (جدول ۱) . ۱۰۰٪ سویه های E. faecium مقاوم به ونکومایسین، نسبت به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین، ۸۹٪ سویه های نیز مقاوم به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و جنتامیسین و ۶۰٪ نیز مقاوم به کلرامفنیکل بودند. پایینترین مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین دیده شد (۳۳٪). اما در میان سویه های E. faecalis مقاوم به ونکومایسین، تمامی سویه ها (۱۰۰٪) نسبت به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین و آمپی سیلین مقاوم بودند. ۶۶٪ مقاوم به کلرامفنیکل و ۳۳٪ نیز مقاوم به تتراسایکلین بودند.

بطور کلی ۶٪ سویه ها نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در این مطالعه مقاوم و ۳۵٪ نیز نسبت به تمامی آنتی بیوتیکها حساس بودند. ۱۳٪ نسبت به ۶ آنتی بیوتیک باستثناء ونکومایسین مقاوم بودند.

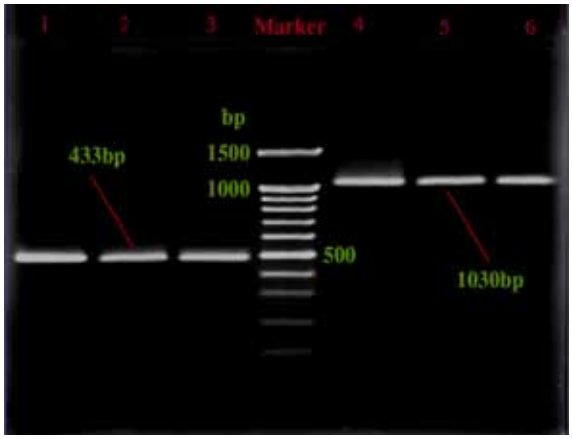
۶۵ سویه مختلف انتروکوکوس بروش Disc Diffusion انتخاب و MIC آنها مشخص شد. سویه هایی که MIC آنها بیش از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر بود، جهت بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. پس از انجام آزمون MIC معین گردید که ۴۶ سویه دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به ونکومایسین بودند (MIC بیش از ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر). همچنین ۱۱۱ سویه نیز مقاومت بینابینی (MIC برابر ۸ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به ونکومایسین داشتند و ۳۸۳ سویه نیز حساس (MIC کمتر از ۴ میکروگرم در میلی لیتر) به ونکومایسین بودند.

در تمامی سویه هایی که دارای مقاومت بینابینی بودند میزان MIC آنها 8 µg/ml بود. در میان سویه های حساس نیز ۲۷۰ سویه دارای MIC<2 µg/ml و ۱۱۳ سویه نیز دارای MIC<4 µg/ml بودند.

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 ۱). در این مطالعه تمام ۴۶ سویه مقاوم به ونکومایسین واجد ژن vanA و ۲٪ سویه ها نیز واجد ژن vanB بودند.

جدول ۱. توزیع سویه های E. faecalis و E. faecium مقاوم به ونکومایسین بر اساس مقاومت به سایر آنتی بیوتیکها.

گونه آنتی بیوتیک	E. faecalis		E. faecium	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
اریترومایسین	۳	۱۰۰	۴۳	۹۳
سیپروفلوکساسین	۳	۱۰۰	۴۳	۹۳
تتراسایکلین	۲	۶۶	۲۶	۶۰
جنتامایسین	۳	۱۰۰	۳۸	۸۹
آمپی سیلین	۳	۱۰۰	۳۸	۸۹
ونکومایسین	۳	۱۰۰	۱۱	۲۵
کلرامفنیکل	۱	۳۳	۱۴	۳۳
تعداد	۳		۴۳	



شکل ۱: PCR جهت شناسایی ژنهای vanA و vanB. ژن vanB (۳-۱)، 100 bp DNA ladderss(Marker)، ژن vanA (۶-۴)

بحث

با انجام این تحقیق مشخص گردید که، شیوع گونه های انتروککی در بیمارستانها و آزمایشگاههای شهر تهران تنها محدود به دو گونه E. faecalis و E. faecium می باشد، در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در سراسر جهان در ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی، فاضلاب و محیطی نیز این دو گونه غالب بوده و از شیوع بالایی برخوردار می باشند (۹-۵و ۲۵-۲۰). در نمونه های بالینی، E. faecalis از شیوع بسیار بالاتری نسبت به E. faecium و سایر گونه ها برخوردار است. دلیل این امر دقیقا مشخص نیست. اما می توان اینگونه استدلال کرد که غالب بودن تعداد E. faecalis در فلور نرمال دستگاه گوارش در مقایسه با سایر گونه ها و مجهز بودن آنها به انواع متنوعی از فاکتورهای ویرولانس نسبت به سایر گونه های انتـــروکک تا حدی توجیه کننده شیوع گسترده تر آن نسبت به سایر انتروکوک ها می باشد (۲۰). اما افزایش حضور گونه E. faecium در میان نمونه های محیطی تقریبا در تمام جهان دیده شده است. گزارش شده است که سویه های E. faecium از توانایی بیشتری در جهت کسب مقاومت نسبت به داروهای مختلف برخوردار می باشد؛ و همین امر E. faecium را مبدل به یک پاتوژن قوی بیمارستانی در سراسر جهان نموده و این در حالی است که E. faecalis حداقل به یکی از آنتی بیوتیکهای مؤثر بر علیه عفونتهای انتروککی حساس باقی مانده است (۴). با وجود شیوع بیشتر E. faecalis، گسترش گونه E. faecium به طور چشمگیری رو به افزایش است و دلیل آن را وجود مقاومت های آنتی بیوتیکی مـــــوجود در این گونه می دانند که باعث گسترش بیشتر آنها و به خصوص سویه های با مقـــاومت دارویی می شود. میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین در این مطالعه در حدود ۶۵٪ بوده است. اما در میان سویه های VRE میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین ۱۰۰٪ بوده است. در مورد این آنتی بیوتیک نیز گزارشات متعددی از نقاط مختلف جهان دیده می شود. اما بطور کلی در کشورهای مختلف نیز اغلب مقاومت به این آنتی بیوتیک در سطح بالایی قرار دارد (۵و ۲۴-۲۱). مهمترین دلیل بالاتر بودن میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین در ایران می تواند ناشی از استفاده گسترده از این آنتی بیوتیک در موارد درمانی باشد. همچنین اریترومایسین بطور گسترده ای جهت تیمار دامها نیز به غذای آنها افزوده می گردد.میزان مقاومت نسبت سیپروفلوکساسین در میان تمامی سویه ها و همچنین سویه های مقاوم به ونکومایسین بترتیب ۵۰ و ۱۰۰٪ بود. این در حالیست که میزان مقاومت در آمریکا بسیار کمتر و در پرتغال نیز مشابه این مطالعه بوده است (۲۱و۲۴). Stobberingh نیز میزان مقاومت را در تمامی سویه ها و همچنین سویه های مقاوم به ونکومایسین بدست آمده از نمونه های بوقلمون را بترتیب ۱۲٪ و ۱۲٪ گزارش نمود (۲۵).در این بررسی میزان مقاومت به تتراسایکلین ۵۴٪ بوده است. در سراسر جهان گزارشات متفاوتی از مقاومت به این آنتی بیوتیک گزارش شده است (۴و۸و۲۲و۲۴). مقاومت در پرتغال پایینتر و در آمریکا تا حدودی منطبق بر این مطالعه بود. میزان مقاومت در آمریکا و سوییس بسیار بیشتر بوده است. بطور کلی این آنتی بیوتیک در مورد باکتریهای گرم مثبت بندرت مورد استفاده قرار می گیرد، زیرا پیدایش سویه های مقاوم از یک طرف و در دسترس بودن داروهای ضد میکروبی برتر باعث شده که از این آنتی بیوتیک کمتر استفاده گردد.بطور کلی آزمون MIC نشان داد که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در فاضلاب شهری تهران در حدود ۸٪ می باشد. این مقاومت نسبت به برخی از کشورها مانند پرتغال از شیوع پایینتری برخوردار است (۲۴)؛ اما می توان گفت که این مقاومت تقریبا با کشورهایی نظیر آمریکا، زلاندنو و فرانسه برابری می کند (۴و۲۳و۲۶). همچنین میزان مقاومت بالاتری نسبت به اسپانیا بدست آمده است (۲۷). همچنین Kuhn میزان مقاومت به ونکومایسین را در کشورهای اروپایی ۱۱-۸٪ گزارش نمودند (۶). میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین در فاضلاب سوئد در حدود ۳٪ و در نمونه های بدست آمده از مزارع پرورش بوقلمون متغیر بوده و در حدود ۴-۲٪ گزارش شده است (۱۳و۲۵). در مورد مقاومت سویه های جدا شده از فاضلاب نیز در ایران، این مقاومت در حدود ۵٪ بوده است (۹-۷). همانگونه که پیشتر گفته شد، ۱۰۰٪ سویه ها واجد ژن vanA بودند و بالطبع از MIC بالایی نیز نسبت به ونکومایسین برخوردار بودند. همچنین ۲٪ سویه ها نیز واجد هر دو هر دو ژن بودند. نتایج حاصل از این مطالعه تا حدودی منطبق بر سایر گزارشات است. در سایر مطالعات نیز بیشتر مقاومت ناشی از ژن vanA است (۵و۶و۲۵-۲۲) و کمتر هر دو ژنوتایپ با یکدیگر دیده می شوند (۹-۷). در این پژوهش میزان مقاومت نسبت به کلرامفنیکل ۲۹٪ می باشد. در سایر مطالعات مقاومت نسبت به کلرامفنیکل پایینتر بود (۷و۲۱و۲۴). البته باید توجه داشت که این آنتی بیوتیک امروزه در کشور بمیزان گسترده ای مورد استفاده قرار نمی گیرد، و بیشترین مورد استفاده آن جهت درمان مننژیت است؛ و شاید یکی از دلایل پایین بودن میزان مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک همین امر باشد.بر طبق شواهد موجود از یک طرف اعتقاد بر انتقال افقی VRE از حیوان به انسان وجود دارد (۴)؛ و از طرفی دیگر انواع گونه های انتروکوکی توانایی تکثیر و بقاء در خاک و آب را دارند و این مقاومت در محیط برای مبارزه با آنها بسیار مشکل ساز است؛ بنابراین بایستی که توجه زیادی را به جلوگیری از انتقال و پخش میکروارگانیسمها در طبیعت معطوف داشت. سلامت عمومی جامعه ممکن است با انتقال VRE بویژه اگر میکروارگانیسم به آبهای سطحی انتقال یابد، در معرض تهدید قرار گیرد. زیرا این آبها ممکن است بدون هیچگونه توجهی مورد مصرف قرار گیرند (۴). بواسطه وجود انتروککهای مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب شهری و همچنین فاضلابهای بیمارستانی در ایران (۹-۷)، بررسی مولکولار اپیدمیولوژی و تایپینگ ایزوله های جداسازی شده از فاضلاب شهری، بیمارستانی و نمونه های بالینی ضروری بنظر می رسد.بنظر می رسد که بواسطه مقاومت انتروککها در حال حاضر در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیکهای رایج، ظهور مقاومت در برابر ونکومایسین می تواند بسیار مشکل ساز باشد. بنابراین بنظر می رسد که پژوهشهای دیگری جهت تعیین الگوی کامل مقاومت آنتی بیوتیکی انتروککها در برابر آنتی بیوتیکهای رایج و همچین آنتی بیوتیکهای جدیدی نظیر لینزولید و سینرسید بایستی در سراسر کشور انجام پذیرد.

نتیجه گیری

تنوع گونه های انتروکک در ایزوله های بیماران در شهر تهران تنها محدود به گونه های E. faecalis و E. faecium بود. بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای اریترومایسین و آمپی سیلین و کمترین مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و جنتامایسین مشاهده گردید. فراوانی ژنهای مقاومت vanA و vanB منطبق بر سایر گزارشات می باشد.

REFERENCES

1. Hayes JR, McIntosh AC, Qaiyami S, Jhonson JA, English LL, Carr LE, et al. High-frequency recovery of quinupristin-dalfopristin-esistant Enterococcus faecium isolates from poultry production envirоonment. J Clin Microbiol. 2001; 39:2298-2299.

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

3. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothaki V. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 45:277-283.

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

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

6. Kuhn I, Iversen I, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, 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.

7. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of Enterococcal Species and Detection of Vancomycin Resistance Genes by Multiplex PCR in Tehran Sewage. Iran Biomed J. 2007; 11:161-167.

8. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kuhn I, Mollby I, Eshraghi S, Pourshafie MR. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococcal Species in Sewage Treatment Plants in Iran. Water Air Soil Pollut. 2007; 185:111-119.

9. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Mollby R. Pourshafie MR. Epidemiological Link Between Wastewater and Human Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolates. Cur Microbiol. 2008; 56:468-473.

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

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

12. Flores RM, Haley JA, Roos TW. Vancomycin-resistant enterococci: approach to treatment and control. Cancer Cont J. 2000; 3:N:1.

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

14. Michel A, Richard Q. Regulation of vanA –and vanB type glycopeptide resistance in enterococci . J Antimicrob Agent Chemother. 2001; 45:375-387.

15. Daniel FS, Jessica A, Kissinger M, Gilmore S. In vitro susceptibility studies of vancomycin –resistant Enterococcus faccalis. J Antimicrob Agent Chemother. 1989; 33:1588-1591.

16. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus Spp. With a Biochemical key. Appl Environ Microbiol. 1999; 65:4425-4430.

17. Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol. 1998; 27:731-734.

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

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

20. Arthur M, Molinas C, Depardicu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3–related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. J Bacteriol. 1993; 174:2582-2591.

21. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multi drug-resistant Enterococcus spp. From poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Molecul. Cell Probes. 2005; 19:27-34.

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

23. 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.

24. Novais C, Couque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. Appl Environ Microbiol. 2005; 71:3364-3368.

25. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, Denis F. 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; 38:620-624.

26. 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 Agents Chemother. 1999; 43:2215-2221.

27. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, Perezdiaz JC, Baquero F. vanA- mediated vancomycin-resistant Enterococcus spp. in sewage. J Antimicrob Chemother. 1994; 33:553-561.