ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به ونکومایسین جداشده از بیماران بستری در تهران

کتایون برهانی[۱] ، ملیحه طالبی[۲]، فاتح رحیمی[۳]، محمد رضا پورشفیع[۴*]

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، محقق مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران
۲. دکترای باکتری شناسی، محقق مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران
۳.دانشجوی دکترای تخصصی میکروب شناسی دانشگاه اصفهان، محقق مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران
۴.دکترای باکتری شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران

***نشانی برای مکاتبه:** برای مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب شناسی، تلفن ونمابر ۶۶۴۰۵۵۳۵، pour@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: فروردین هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و هشت

چکیده

سابقه و هدف : *ظهور سویه های انتروکک با مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک ها ازجمله به آمینوگلیکوزیدها، مشکلات زیادی را در درمان به خصوص بیماران بستری که به عفونت های بیمارستانی نیز مبتلا شده اند ایجاد کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در این دسته از بیماران می باشد.*

روش کار: *۵۰ نمونه انتروکوکوس فسیوم مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران بستری مورد بررسی قرار گرفتند.روش انتشار در دیسک برای تعیین حساسیت میکروبی به ۹ آنتی بیوتیک معمول مورد استفاده قرار گرفت. از آزمون PCR جهت تأیید مولکولی وجود ژنهای ایجاد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ونکومایسین استفاده شد.*

یافته ها : *مقاومت چندگانه در تمام ایزوله ها مشاهده گردید. تمام ایزوله ها نسبت به آمپی سیلین و۹۶٪ آنها نسبت به جنتامیسین مقاوم بودند. آزمون PCR این نتایج را تأیید کرد. علاوه براین، تمام ایزوله ها به لینزولید و سینرسید حساس بودند.*

نتیجه گیری: *تغییر سیاست های دارویی در درمان این بیماران لازم و ضروری است. استفاده از سینرسید و لینزولید در درمان این عفونت ها میتواند به کار گرفته شود.*

واژگان کلیدی : ***انتروکوکوس فسیوم، عفونت های مجاری ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی***

مقدمه

انتروکک ها، بخشی از فلور نرمال لوله گوارش را تشکیل می دهند (۱). این باکتری ها، امروزه به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مطرح می باشند (۲و۳). اغلب عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری، عفونت در مجاری ادراری می باشد (۴و۵). بالاترین میزان عفونت ادراری انتروککی به ترتیب از کانادا، آمریکا و اروپا گزارش شده است (۴). دو گونه انترو کوکوس فکالیس (٪۹۰ـ ۸۰) و انتروکوکوس فسیوم (٪۱۰ـ ۵) عامل بیشتر عفونت ها در انسان هستند (۱و۳). درمان انتخابی برای این عفونت ها معمولاً ترکیب سینرژیکی از مواد ضد دیواره سلولی (پنی سیلین، آمپی سیلین یا ونکومایسین) یا یک گلیکوپپتید همراه با یک آمینوگلیکوزید عمدتاً جنتامیسین است (۴و۶). با پیدایش انتروکک هایی با مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه از جمله مقاومت بالا به آمینوگلیکوزید ها و پنی سیلین ها یا گلیکوپپتیدها، اثرات این درمان دارویی رابه مخاطره انداخته است. اولین بار، انتروکک با مقاومت بالا به جنتامیسین (HLGR) در دهه ۱۹۸۰ مشاهده شد(۶). ظهور این مقاومت به واسطه آنزیم های تغییر یافته آمینوگلیکوزیدی (AMEs) است که اثر باکتریسیدی سینرژیک مذکور را از بین می برد.

مقاومت بالا به جنتامیسین (MIC≥500 mg) عموماً به واسطه ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia ، کد کننده آنزیم AAC(6')-APH(2") است. علاوه بر این، سه ژن aph(2")-Ib, aph(2")-Ic , aph(2")-Id نیزبه عنوان عوامل ایجاد کننده مقاومت حد واسط به جنتامیسین شناخته شده اند. علاوه بر این، ژن aph(3")-IIIa و ant(4') که آنزیم های APH(3') و ANT(4')را کد می کنند، به ترتیب غیر فعال کننده آنتی بیوتیک های کانامایسین ، آمیکاسین و کانامایسین ، آمیکاسین، توبرامایسین هستند (۶). از سوی دیگر، طی سالیان اخیر میزان مقاومت انتروکک ها به ونکومایسین افزایش یافته است (۷). سویه های جداشده با فنوتیپ VanA که مقاومت بالایی را به ونکومایسین و تئی کوپلانین نشان میدهند، اهمیت بالایی از لحاظ بالینی در میان انواع عوامل ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین دارند (۸). بنابر این، سویه هایی با مقاومت بالا به جنتامیسین (HLGR) و مقاوم به ونکومایسین (VRE) مشکلات بزرگی را برای پزشکان جهت درمان این عفونت ها ایجاد کرده است (۴). این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به ونکومایسین جداشده از بیماران بستری در تهران انجام شد.

روش کار

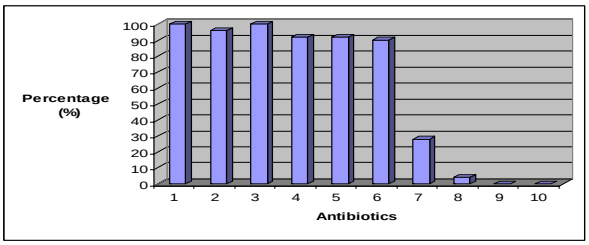
۵۰ نمونه انتروکوکوس فسیوم مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومایسین جداشده از بیماران بستری در سه بیمارستان تهران در سال ۱۳۸۵، از نظر مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها مورد بررسی قرار گرفت. عمده این ایزوله ها (۴۱ نمونه) از ادرار و مابقی از زخم (۳ نمونه) بوده و از هر کدام ازنمونه های تراشه، آبسه مغزی، ترشحات شش، آسیت، خون وCSF یک نمونه جدا شد. آزمایش تعیین حساسیت نسبت به مواد ضد میکروبی برای نه آنتی بیوتیک معمول با استفاده از روش انتشار در دیسک انجام گردید. این آنتی بیوتیک ها شامل آمپی سیلین (۱۰µg)، جنتامیسین با دوز بالا(۱۲۰µg)، سیپروفلوکسازین (۵ µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)،اریترومایسین (۱۵ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، تیی کوپلانین (۳۰µg)، لینزولید (۳۰µg) و سینرسید (۱۵µg) (BBL, Sensi Dhsk,USA) بودند. همچنین تست تعیین حداقل دوز بازدارنده رشد (MIC) برای ونکومایسین و تیی کوپلانین با استفاده از روش میکروپلیت انجام شد. هر دو روش مذکور بر اساس دستورالعمل (CLSI) انجام گرفت (۹ و۱۰). به منظور مشاهده ژنهای ایجاد کننده مقاومت، ابتدا DNA کل سویه ها استخراج گردید. به این منظور، کل سویه ها در محیط BHI براث کشت داده شدند. پس از سانتریفوژ، رسوب دربرگیرنده سلول های میکروبی در۳۰۰ µl محلول TES (Tris-HCl 10mM , EDTA 1mM , Sucrose 50%, pH 7.5)حاوی۲۰mg/ml لیزوزیم حل شدند. نمونه ها بیست دقیقه در۳۷ ^{o}C گذاشته شده، به آنها ۲۴µl محلول SDS10% اضافه گردید. پس از قرار دادن در یخ و سانتریفوژ با دور بالا ، به محلول رویی دو مرحله فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۵: ۲۴: ۱) و یک مرحله کلروفرم اضافه شدند. به محلول رویی حاصل از سانتریفوژ ، اتانل سرد هم حجم اضافه گردید. نهایتاً پس از سانتریفوژ نهایی، به رسوب حاصل µl ۵۰ محلول TE حاوی RNAase اضافه شد. برای اثبات وجود ژنهای ایجاد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ونکومایسین ، آزمون PCR انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. این آزمون در حجم نهایی µl ۲۵ شامل: ۴۰pM از هر پرایمر، ۱,۵mM $MgCl_2$، ۰,۲mM از هر dNTP، (mM Tris-HCl (pH 8.3 ۱۰ پلیمراز Taq DNA(۰,۵ U) (HT Biotechnology, Cambridge, United Kingdom). آزمون PCR طی این مراحل انجام گرفت : دینچر شدن ابتدایی در۹۴^{o} C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ بار (دینچر شدن در ۹۴^{o}C به مدت ۱دقیقه و انیلینگ در ۵۴^{o}C به مدت۱ دقیقه) و مرحله تکثیر نهایی در ۷۲^{o}C به مدت۱۰ دقیقه. بعد از انجام این مراحل محصولات PCR توسط الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۹۰ V مورد استفاده قرار گرفت. سپس ژل حاصل با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید (۱۱و۱۲).

جدول ۱: سکانسهای نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای مشاهده ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی

Resistance genes	Product size (bp)	Primer sequences (5' 3')
aac(6')-Ie-aph(2")-Ia	369	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC
aph(2")-Ib	867	CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC
aph(2")-Ic	444	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG
aph(2")-Id	641	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC
aph(3')-IIIa	523	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG
ant(4')-Ia	294	CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT
vanA	1030	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA

یافته ها

آزمایشهای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمام نمونه ها به امپی سیلین مقاوم بودند. همچنین۹۶٪ از ایزوله ها نیز به جنتامایسین مقاوم بودند. درصد بالایی از مقاومت (۹۲٪) نسبت به سیپروفلوکساین و اریترومایسین مشاهده شد. مقاومت به تتراسیکلین (۲۸٪) و کلرامفنیکل (۴٪) نسبتا پایین بود و هیچگونه مقاومتی نسبت به سینرسید و لینزولید مشاهده نشد. متأسفانه تمام ایزوله ها مقاومت چند دارویی نشان دادند. ۹۰٪ ایزوله ها نسبت به تئی کوپلانین مقاومت نشان دادند(نمودار ۱). آزمایش تعیین حداقل دوز مهار کننده مقاومت در سطح بالا نسبت به ونکومایسین (MIC≥۱۲۸) و تیکوپلانین (MIC≥ ۳۲) را نشان دادند. بر اساس آزمون PCR انجام شده، ژنهای aac(6')-Ie-aph(2")-Ia و aph(3')-IIIa به ترتیب در ۶۶٪ و ۵۶٪ از کل ایزوله ها مشاهده گردیدند. در ضمن ۳۶٪ از ایزوله ها، هر دو ژن را دارا بودند. ژنهای aph(2")-Ib ، aph(2")-Ic ، aph(2")-Id و ant(4')-Ia در هیچ یک از ایزوله ها دیده نشد. ژن vanA در هر ۵۰ نمونه مشاهده شدند.



نمودار۱ . میزان مقاومت آنتی بیوتیکی ۵۰ ایزوله انتروکوکوس فسیوم. ۱. ونکومایسین ۲. جنتامیسین ۳. آمپیسیلین ۴. اریترومایسین ۵. سیپروفلوکسازین ۶. تئی کوپلانین ۷. تتراسایکلین ۸. کلرامفنیکل ۹. سینرزید ۱۰. لینزولید

بحث

منشأ بیشترعفونت های ادراری فلور دستگاه گوارش است. علاوه بر آن، عوامل محیطی مانند کاتترهای مورد استفاده برای بیماران بستری هم در بروز این عفونتها نقش دارد. میزان بالای ابتلا به این عفونتها باعث استفاده زیاد از آنتی بیوتیکها و به دنبال آن ظهور انواع مقاومت آنتی بیوتیکی گردیده بطوریکه در چند دهه اخیر، ظهور سویه های مقاوم در باکتری های جداشده از ادرار افزایش چشمگیری یافته است. این باکتری های مقاوم، اغلب در افرادی که به مدت طولانی تحت درمان آنتی بیوتیکی قرار گرفته اند، بیشتر است. انتروککهای مقاوم، از جمله باکتری هایی هستند که اغلب در این نوع عفونتها یافت می شوند (۵). مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیکها خصوصاً به جنتامیسین و ونکومایسین در این باکتریها مشاهده شده است. سویه های HLGR و VRE در عفونت های انتروککی در بیمارستانهای مکزیک گزارش شده بطوری که ۸۰٪ ازایزوله های انتروکوکوس فسیوم از عفونت های ادراری جدا شده اند (۱۳) . در استرالیا نیز منشأ ۷۴٪ ازاین ایزوله ها، عفونت ادراری بوده است (۱).جنتامیسین آمینوگلیکوزیدی است که به طور وسیعی همراه با یک آنتی بیوتیک ضد دیواره سلولی در درمان عفونت های جدی انتروککی به کار رفته است(۴). در واقع آنتی بیوتیک دوم دیواره سلولی را از بین می برد تا جنتامیسین به راحتی وارد شده و اثر ضد باکتریایی خود را اعمال کند (۱۴). در صورتیکه ارگانیسم مقاومت بالایی را به جنتامیسین نشان دهد (MIC≥ ۵۰۰)، این سینرژی انجام نخواهد شد (۱). به همین علت، غربال گری وبررسی میزان مقاومت خصوصاً مقاومت بالا به جنتامیسین (HLGR) از اهمیت زیادی برخوردار است (۴). از سوی دیگر، سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به ونکومایسین نیزبه شدت افزایش یافته است. در واقع درسال ۱۹۸۸ مقاومت به ونکومایسین ظاهر شد و در اروپا ، امریکا و به تبع آن در سراسر دنیا گسترش یافت (۱).علاوه بر این، اگر چه به لحاظ تاریخی عفونت های ناشی ازانتروکوکوس فکالیس در مقایسه با انتروکوکوس فسیوم بسیار بیشتربوده است (۱:۱۰)، این نسبت در سال ۱۹۹۹ به میزان (۱:۱,۹) کاهش یافته و در طی ۲۰ سال گذشته، مقاومت آنتی بیوتیکی انتروککی مخصوصاً نسبت به این سویه افزایش چشمگیری یافته است (۴و۱۴).

نتایج بدست آمده در این تحقیق مطالب فوق الذکر را تأیید می کند بطوریکه تمام ایزوله ها، سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به ونکومایسین بودند که همگی به استثناء دو نمونه، مقاومت بالایی را به جنتامیسین (مقاومت به دیسک با دوز بالا) نشان دادند. این نتایج در مورد جنتامیسین مشابه بعضی از کشورها از جمله انگلستان، سنگاپور، ایرلند و آمریکا است که سویه های HLGR را بیشتر در انتروکوکوس فسیوم یافته اند (۲و۶). همچنین، کریستین سن و همکاران، انتروکوکوس فسیوم (HLGR) را در استرالیا به میزان ۵۲٪ گزارش کرده اند (۱).

مطالعات مولکولی نتایج فنوتیپی بدست آمده را تأیید کرده، در تعیین دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی و انتخاب داروهای مؤثر دیگر کمک زیادی می کند. در این مطالعه درصد بالایی از ایزوله ها (۶۶٪) ، ژن aac(6')-Ie-aph(2")-Ia را دارا بودند ولی ژنهای aph(2")-Ib , aph(2")-Id , aph(2")-Ic که مقاومت حد واسط به جنتامیسین را ایجاد می کنند، مشاهده نشدند. می توان گفت در سال های اخیرظهور سویه های HLGR در ایران به طور چشمگیری رو به افزایش است. بطوری که درمطالعه ای که در سالهای ۱۳۸۱-۱۳۸۳ در سه بیمارستان تهران انجام گرفت، این میزان به ۵۲٪ رسید (۱۵). در مطالعه ای دیگر که در سالهای ۱۳۸۴- ۱۳۸۵ در نمونه های ادراری (UTI) نه مرکز درمانی در تهران صورت گرفت، این تعداد به ۸۲٪ از ایزوله های انتروکوکوس فسیوم رسید (۱۶). علاوه بر این، ژن aph(3')-IIIa نیز که عامل مقاومت به کانامایسین و آمیکاسین است، به میزان ۵۶٪ در ایزوله ها مشاهده گردیدند که روی هم رفته نشاندهنده مقاومت بالا به آمینوگلیکوزیدها می باشد. نتایج بدست آمده در تأیید نتایج دیگر محققینی است که ژنهای aac(6')-Ie-aph(2")-Ia و aph(3')-IIIa را به ترتیب شایع ترین ژن در بروز مقاومت به جنتامیسین و آمیکاسین دانسته اند(۶). شاید بتوان گفت علت مشاهده این افزایش مقاومت حتی در کشورمان، انتقال ژنهای مقاومت بین سویه های انتروکوکوس فسیوم موجود در عفونتها و همچنین ابزار و وسایلی باشد که برای بیماران بستری شده استفاده می گردد.

نتیجه گیری

متأسفانه استفاده بی رویه ازآنتی بیوتیکها خصوصاً در مورد عفونت های ادراری که در بیمارستان ها بسیار شایع است، باعث ایجاد مقاومت های چندگانه دارویی بالاخص آمینوگلیکوزیدها و حتی ونکومایسین که داروهای انتخابی برای درمان این عفونتها می باشند گردیده است. این نتایج زنگ خطری هستند که تغییر سیاست های تجویز دارویی را لازم و ضروری می گردانند. با توجه به حساسیت این باکتریها به لینزولید و سینرزید، استفاده از این داروها در درمان این نوع عفونتها توصیه می گردد.

REFERENCES

1. Christiansen KJ, Turnidge JD, Bell JM, George NM, Pearson JC. Prevalence of antimicrobial resistance in Enterococcus isolates in Australia, CDI. 2007; 31(4): 392- 7

2. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legatic NJ, Kalapothaki V. Diversity among high- level aminoglycoside- resistant enterococci. J Antimicrob Chemother. 2000; 45: 277-83

3. Chou Y, Lin T, Lin J, Wang N, Peng M, Chang F. Vancomycin resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. J Microbiol immunol Infect. 2008; 41: 124- 9

4. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med res. 2008; 111- 21

5. Lindsay E, Nicolle MD. Resistant pathogens in urinary tract infections. JAGS 2002; 50: S230- S235.

6. Zarrilli R, Tripodi M, Popolo AD, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M, Florio A, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of high- level aminoglycoside- resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 827- 35

7. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, Manero A, Taylor H, Caplin J, Domínguez L, Herrero IA, Moreno MA, Möllby R. Occurrence and relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 5383–90

8. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1781–87

9. National Committee for clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, approved Standard. 7th edn ۲۰۰۰ (M2-A7). Villanoa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

10. National Committee for clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that aerobically, 5th edn. 2000 Approved Standards M7- A5, vol. 20. Wayne; Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

11.Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 1423- 6

12.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; 138: 3092-5

13.Galindo JA, Tejada YG, Cerezo SG, Salazar OM, Reyes EAP. High- level aminoglycoside resistance Enterococcus SPP ina tertiary care hospital in Mexico. Electron J Biomed. 2005; 1: 40- 45

14.Moaddab SR, Rafi A. Prevelance of vancomycin and high level aminoglycoside resistant entercocci among high- risk patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34: 849- 54.

15.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: 265-8

16.Saifi M, Pourshafie MR, Eshraghian MR, Soltan Dallal MM. Anti- microbial resistance of enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. Iran Biomed J. 2008; 185- 90