بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های کلینیکی و محیطی انتروکوکوس فکالیس

زینب مموئی[1]، ملیحه طالبی[2]، مهناز سیفی[3*]، غلامحسین ابراهیمی پور[4]، محمدرضا پورشفیع [5]، عباس زواره ای[6]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی
2. دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار دانشکده بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
3. دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار بخش سل و عفونتهای ریوی، انستیتو پاستور ایران
4. دکترای تخصصی میکروب شناسی، دانشیار میکروبشناسی دانشگاه شهید بهشتی
5. دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد بخش میکروبشناسی، انستیتو پاستور ایران
6. دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار بیمارستان قلب شهید رجایی

* نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان 13 فروردین جنوبی، انستیتو پاستور ایران، بخش سل و تحقیقات ریوی، mahsaifi@yahoo.com
دریافت مقاله:اسفند هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: خرداد نود

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوک ها فلور نرمال بدن انسان بوده و از سوی دیگر پاتوژنی فرصت طلب محسوب می‌شوند که نقش عمده‌ای را در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارند. انتروکوک‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیرزنده می‌باشند که این امر یکی از عوامل مهم بیماری زایی آنها محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین میزان تشکیل بیوفیلم و نیز میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های کلینیکی و نمونه‌های جدا شده از محیط بستری بیماران در بیمارستان می‌باشد.*

روش کار: *در مجموع 90 ایزوله انتروکوکوس فکالیس شامل 58 ایزوله کلینیکی و 32 ایزوله محیطی از دو بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری گردید. تمامی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس توسط PCR اختصاصی گونه شناسایی شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها توسط روش انتشار در آگار بر اساس دستورالعمل CLSI مشخص شد و تشکیل بیوفیلم در سویه های انتروکوکوس فکالیس توسط روش کمی میکروتیترپلیت مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *بالاترین درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های کلینیکی نسبت به تتراسایکلین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکسازین و جنتامایسین به ترتیب با ارقام 86٪، 62٪، 69٪، 69٪ و 64٪ دیده شد. در ایزوله های محیطی نیز این درصدها به ترتیب 75٪، 44٪، 25٪، 22٪ و 25٪ بود. 72٪ از نمونه‌های کلینیکی و 84/5٪ از نمونه‌های محیطی قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. نمونه‌هایی که قادر به تشکیل بیوفیلم بودند مقاومت بیشتری را نسبت به نمونه‌های بیوفیلم منفی نشان دادند.*

نتیجه گیری: *نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و نیز قابلیت این باکتری در تشکیل بیوفیلم می‌باشد. با توجه به نقش بیوفیلم در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز قدرت بیماریزایی، انجام اقدامات لازم در جهت رفع شرایط مناسب تشکیل بیوفیلم توسط باکتریها که به عنوان یک پوشش محافظ در برابر شرایط مختلف از جمله سیستم ایمنی میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کند ضروری به نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، آنتی‌بیوتیک، بیوفیلم

مقدمه

انتروکوک، باکتری گرم مثبتی است که به طور طبیعی میکروفلور دهان، روده و مجرای تناسلی بوده و نیز به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب شناخته شده و عامل عفونت هایی مانند عفونت مجرای ادراری، باکتریمی، اندکاردیت، عفونت زخم‌های جراحی، عفونت سیستم اعصاب مرکزی می باشد(1و2). جنس انتروکوکوس دارای سویه‌های مختلفی است که از میان آنها انتروکوکوس فکالیس شایع‌ترین سویه بوده و مسئول 90-80 درصد عفونت های انتروکوکی انسانی می‌باشد. سویه دیگر، انتروکوکوس فیسیوم، عامل سایر عفونت های انتروکوکی است(3-1).

این باکتری ها در میان سه عامل عمده عفونت های بیمارستانی شناخته شده‌اند. انتروکوک‌ها برروی ابزارهای پزشکی جاسازی شده در بدن، از جمله کاتترهای ادراری، کاتترهای درون رگی، اندام‌های مصنوعی و لنزهای تماسی با تشکیل بیوفیلم قادر به رشد هستند(1و2).

بیوفیلم شامل جمعیتی از سلول های میکروبی است که به صورت غیرقابل تغییری بر روی سطوح زنده و غیرزنده متصل و توسط ماتریکس خارج سلولی هیدراته شده، که ترکیبی از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و نوکلئیک اسیدها می‌باشد، پوشیده می‌شوند. بیوفیلم‌های میکروبی طی یک سری مراحل پیچیده و تنظیم شده بوجود می‌آیند که به طور خلاصه شامل اتصال باکتری به سطح، ثابت سازی، برهمکنش سلولهای یک گونه ویا گونه‌های مختلف با یکدیگر، تشکیل میکروکلنی، تشکیل یک بیوفیلم توده-ای و توسعه ساختار بیوفیلم بصورت سه بعدی می‌باشد(5-1).انتروکوک‌ها به طور ذاتی به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند و همچنین می‌توانند مکانیسم‌های جدید مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز کسب کنند که این از طریق تبادل عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، ترانسپوزونها و جزایر پاتوژنیسیتی (PAI) امکان پذیر است. از سوی دیگر امکان انتقال این عناصر به دیگر پاتوژن ها از جمله استافیلوکوکوس ارئوس زمانی که در یک بیوفیلم چند سویه‌ای رشد می‌کنند نیز وجود دارد(3).

رفتار باکتریها در بیوفیلم کاملا متفاوت از باکتریهای همتای خود در حالت پلانکتونی می‌باشد. بر طبق گزارشهای مراکز ملی سلامت، بیوفیلم‌ها عامل بیش از 80٪ عفونتهای میکروبی در بدن انسان می‌باشند. رشد در حالت بیوفیلم امتیازات زیادی را به باکتری های ساکن آن می‌دهد که شامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیش از 1000-10 برابر درمقایسه با سلول های پلانکتونی و مقاومت نسبت به فاگوسیت ها می‌باشد که هر دو امکان رشد را به سلولهای باکتری در بدن میزبان می‌دهد(1و3).این مطالعه با هدف تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی و نیز ایزوله‌هایی که از محیط بستری بیماران از دو بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری شده‌اند صورت گرفته است.

روش کار

در این مطالعه در مجموع 90 ایزوله مختلف انتروکوکوس فکالیس در طی 7 ماه از آبان 1388 تا اردیبهشت 1389 از 2 بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری گردید که شامل 58 ایزوله کلینیکی و 32 ایزوله محیطی می-باشد. نمونه‌های کلینیکی شامل 50 نمونه جدا شده از خون، ترشحات ساکشن و مایعات استریل بدن و ادرار بیمارانی که در طی بستری در بیمارستان سوندهای ادراری استفاده می‌کردند و 8 ایزوله جدا شده از سوندهای ادراری است. نمونه‌های محیطی نیز از محیط بستری بیماران در بیمارستان از جمله سرویس بهداشتی بیمار، سرویس بهداشتی پرسنل، تخت بیمار، میز جلو تخت بیمار، میز پرسنل، دستگاه ونتیلاتور، پمپ اکسیژن و پایه سرم جمع‌آوری گردید.

به منظور جمع‌آوری نمونه‌های محیطی از سواب استریل و محیط تایوگلیکولات استفاده شد. بعد از انجام نمونه‌گیری نمونه‌ها حداکثر تا یک ساعت بعد، در انکوباتور 37°C به مدت 48-24 ساعت قرار داده شدند. کشت و جداسازی: جهت کشت از محیط تایوگلیکولات بر روی محیط اختصاصی انتروکوکوس، m Enterococcus Agar (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) انتقال داده شدند و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. پس از این مدت پیدایش کلنی‌های قرمز رنگ بر روی این محیط نشان دهنده وجود انتروکوکوس است. بعد از تهیه کشت خالص از کلنی‌های موجود، جهت شناسایی نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس از آزمون PCR استفاده گردید. استخراجDNA : استخراج DNA به روش boiling صورت گرفت به این ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در 200 میکرولیتر آب مقطر استریل ورتکس شده و به مدت 15 دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ 10 میکرولیتر از مایع رویی جهت انجام آزمون PCR استفاده شد. تست PCR:Master Mix حاوی 0/4 µM از هر پرایمر، 0/6 µM MgCl2، 0/4 µM dNTP، 2/5 µM بافر و 0/2 واحد از آنزیم Taq polymerase بود. آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (ژن آنزیم superoxide dismutase) با توالی ATGTGACTAACTTAAACGCAG و AATCTTGGTTTGGTGTTGAA 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 صورت گرفت. اندازه قطعه مورد نظر 347bp بود. در نهایت محصولات PCR در یک ژل آگارز 1٪ و (TBE) Buffer Tris-Borate-EDTA 0.5X الکتروفورز شده و پس از رنگامیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از سویه E. faecalis ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید(6).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به 10 آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (30میکروگرم)، تیکوپلانین (30 میکروگرم)، لینه‌زولید (30 میکروگرم)، تتراسایکلین (30 میکروگرم)، سینرسید (15 میکروگرم)، اریترومایسین (15 میکروگرم)، کوتریموکسازول (25 میکروگرم)، آمپی-سیلین (10 میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (5 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم) به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از استانداردهای Clinical Laboratory and Standard Institute(CLSI) تعیین گردید(7).

به منظور ارزیابی تشکیل بیوفیلم توسط نمونه‌های مورد مطالعه از روش فنوتیپی میکروتیترپلیت استفاده شد که یک روش کمی بوده و بر اساس میزان چسبندگی کلنی‌های باکتری به سطوح پلی استیرن ته چاهک‌ها و رنگ آمیزی و خواندن OD آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه می‌شود. به منظور انجام این تست به محیط تازه TSB حاوی 0/25٪ گلوکز نیاز است که پس از آماده کردن آن، 5 میلی لیتر از این محیط را درون لوله‌های درپیچ دار استریل تقسیم کرده و به منظور کنترل و اطمینان از عدم آلودگی، به مدت یک شبانه روز درون انکوباتور 37°C قرار داده شد. سپس از کشت تازه سویه‌های باکتری به لوله‌ها تلقیح نموده و به مدت 18 ساعت درون انکوباتور شیکر دار با دور (rpm 40-30) در دمای 37°C گذاشته شد. بعد از آن لوله‌ها خوب تکان داده شدند تا سوسپانسیون به صورت یکنواخت درآمد. با استفاده از محیط تازه TSB رقت 1:100 از باکتریها بدست آمد سپس از رقت‌های تهیه شده از سویه-های باکتریایی بصورت سه تایی (Triplicate) به میزان µl 200 درون چاهک‌های میکروپلیت پلی‌استیرن ته صاف تلقیح شد. در هر آزمون میکروپلیت، در سه چاهک فقط محیط گلوکزدار تلقیح شد و در مرحله خواندن به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. میکروپلیت تلقیح شده به مدت 18 ساعت درون انکوباتور 37°C قرار داده شد. در مرحله بعد پس از تخلیه کردن کامل محتویات درون چاهک‌ها، ابتدا سه مرحله شستشو با محلول PBS انجام گرفت و پس از آن µl 200 رنگ کریستال ویوله 1٪ درون چاهک‌ها ریخته شد و به مدت 5 دقیقه داخل چاهک‌ها باقی ماند. پس از تخلیه رنگ، سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. پس از خشک کردن میکروپلیت در محیط آزمایشگاه µl 200 محلول الکل-استون 70٪ درون هر چاهک افزوده شد و به مدت 3 دقیقه باقی ماند.

رنگی که در مرحله قبل توسط باکتریهای چسبیده به ته چاهک جذب شده بود، در این مرحله از دیواره باکتریها خارج شده و درون محلول الکل-استون حل گردید. سپس محلول رنگی درون چاهک‌ها به چاهک‌های معادل درون میکروپلیت دیگر انتقال داده شدند و جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت با استفاده از دستگاه الیزاریدر (ELISA Reader) در طول موج 570 nm خوانده شد. این آزمایش برای هر سویه بصورت Triplate و سه بار انجام گرفت و در نهایت یک OD میانگین برای هر ایزوله در نظر گرفته شد. در پایان به منظور تفسیر نتایج بدست آمده از این تست لازم است که یک Cut-off طبق فرمول (OD = Cut-off +OD Blank) mean ± 3SD) به دست آید. در این فرمول میانه و انحراف معیار مربوط به 8 تا 10 سویه از سویه هایی است که از نظر تولید بیوفیلم، منفی می‌باشند. بلانک (Blank) نیز میانگین OD چاهک هایی می باشد که فقط دارای محیط کشت گلوکزدار می باشند. برای محاسبه Cut-off، سه بار آزمون میکروتیتر پلیت برای سویه ها و هر بار به صورت سه تایی (triplicate) انجام گرفت. بر اساس cut-off محاسبه شده، سویه هایی که OD آنها زیر 0/45 باشد غیرچسبنده (non-adherent)، نمونه هایی که OD آنها بین 0/45 تا 0/55باشد، چسبنده ضعیف (weakly adherent) و نمونه هایی که OD آنها بالاتراز 0/55 باشد، چسبنده قوی (strongly adherent) در نظر گرفته می شوند(10-8).

یافته‌ها

از کل نمونه‌های بالینی مورد مطالعه 27٪ از ادرار، 24٪ از خون، 19٪ از زخم، 14٪ از سوند، 9٪ از ترشحات ساکشن و 7٪ از مایعات استریل گرفته شد. از میان نمونه‌های محیطی 22٪ از سرویس بهداشتی پرسنل، 16٪ از سرویس بهداشتی بیماران، 16٪ از تخت بیمار، 16٪ از میز پرسنل، 12٪ از ونتیلاتور، 9٪ از میز جلو تخت بیماران، 6٪ از پمپ اکسیژن و 3٪ از پایه سرم به دست آمد.

تمامی 90 ایزوله انتروکوکوس فکالیس جدا شده به منظور بررسی حساسیت آنتی-بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نام برده به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت بالای 60٪ در میان نمونه‌های کلینیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، سینرسید، اریترومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکسازین و جنتامایسین مشاهده شد. در حالی که نمونه‌های محیطی تنها به تتراسایکلین و سینرسید مقاومت بالای 60 درصد را نشان دادند. مقاومت نسبت به ونکومایسین در مورد نمونه‌های کلینیکی 9٪ بود در حالی که نمونه محیطی مقاوم به ونکومایسین مشاهده نشد (جدول 1).

جدول 1. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در میان نمونه های کلینیکی و محیطی

آنتی بیوتیک ها	نمونه های کلینیکی(٪)	نمونه های محیطی(٪)
ونکومایسین	٪9	٪0
تیکوپلانین	٪3	٪0
لینه زولید	٪9	٪0
تتراسایکلین	٪86	٪75
سینرسید	٪83	٪84
اریترومایسین	٪62	٪44
کوتریموکسازول	٪69	٪25
آمپی سیلین	٪9	٪0
سیپروفلوکسازین	٪69	٪22
جنتامایسین	٪64	٪25

به منظور بررسی نقش بیوفیلم در مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها، درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان نمونه‌های بیوفیلم مثبت و بیوفیلم منفی جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کلینیکی که قادر به تشکیل بیوفیلم بودند به ترتیب، 95٪ به تتراسایکلین، 93٪ به سینرسید، 67٪ به اریترومایسین، 76٪ به کوتریموکسازول، 71٪ به سیپروفلوکسازین و71٪ به جنتامایسین مقاومت نشان دادند در حالی که این ارقام در مورد نمونه‌های کلینیکی بیوفیلم منفی به ترتیب، 62٪، 56٪، 50٪، 50٪، 63٪ و 44٪ بود. نمونه‌های کلینیکی بیوفیلم مثبت مقاومتی را نسبت به تیکوپلانین و آمپی‌سیلین نشان ندادند و 5٪ از آنها به ونکومایسین مقاوم بودند در حالی که نمونه‌های بیوفیلم منفی به ترتیب، 13٪ نسبت به تیکوپلانین، 31٪ به آمپی‌سیلین و 19٪ به ونکومایسین مقاوم بودند (جدول2).

جدول 2. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در میان نمونه های کلینیکی

آنتی بیوتیک ها	نمونه های بیوفیلم مثبت(٪)	نمونه های بیوفیلم منفی(٪)
ونکومایسین	٪5	٪19
تیکوپلانین	٪0	٪13
لینه زولید	٪10	٪6
تتراسایکلین	٪95	٪62
سینرسید	٪93	٪56
اریترومایسین	٪67	٪50
کوتریموکسازول	٪76	٪50
آمپی سیلین	٪0	٪31
سیپروفلوکسازین	٪71	٪63
جنتامایسین	٪71	٪44

نمونه‌های محیطی بیوفیلم مثبت مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری در مقایسه با نمونه‌های بیوفیلم منفی داشتند به طوری که 81٪ نسبت به تتراسایکلین، 85٪ به سینرسید، 48٪ به اریترومایسین، 26٪ به کوتریموکسازول، 26٪ به سیپروفلوکسازین و 30٪ به جنتامایسین مقاومت داشتند اما نمونه‌های بیوفیلم منفی 40٪ به تتراسایکلین، 80٪ به سینرسید، 20٪ به اریترومایسین و 20٪ به کوتریموکسازول مقاومت داشتند و مقاومتی نسبت به سیپروفلوکسازین و جنتامایسین نشان ندادند (جدول3).

جدول 3. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در میان نمونه های محیطی

آنتی بیوتیک ها	نمونه های بیوفیلم مثبت(٪)	نمونه های بیوفیلم منفی(٪)
ونکومایسین	٪0	٪0
تیکوپلانین	٪0	٪0
لینه زولید	٪0	٪0
تتراسایکلین	٪81	٪40
سینرسید	٪85	٪80
اریترومایسین	٪48	٪20
کوتریموکسازول	٪26	٪20
آمپی سیلین	٪0	٪0
سیپروفلوکسازین	٪26	٪0
جنتامایسین	٪30	٪0

با توجه به Cut-off محاسبه شده، 72، 12/5 و 15/5 درصد نمونه های محیطی و 62، 10 و 28 درصد نمونه های کلینیکی به ترتیب چسبنده قوی، چسبنده ضعیف و غیرچسبنده طبقه بندی شدند.

بحث

شیوع عفونتهای بیمارستانی ناشی از سویه‌های انتروکوکوس فکالیس، یکی از مشکلات جدی در مراکز درمانی محسوب می شود. یکی از عوامل موثر در افزایش بیماریزایی این سویه ها، تولید بیوفیلم می باشد. حضور باکتری در بیوفیلم از یک سو باعث مقاومت آن نسبت به سیستم ایمنی میزبان و از سوی دیگر مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی می‌گردد. همچنین احتمال انتقال ژنهای مقاومتی در میان سویه‌ها و نیز در بین باکتریهای مختلف در بیوفیلم افزایش می‌یابد. نکته قابل تامل دیگر در این زمینه استفاده از سوندهای ادراری در مراکز درمانی می‌باشد که احتمال آلودگی بیماران به عفونتهای ادراری ناشی از انتروکوکها را افزایش می‌دهد. لذا تلاش برای شناسایی عوامل ژنتیکی و محیطی موثر در تشکیل بیوفیلم در این باکتری ضروری به نظر می‌رسد(4-1).

در مطالعه حاضر سویه‌های انتروکوکوس فکالیس از ادرار با 32٪، خون 28٪ و زخم 22٪ جدا شدند. در مطالعه‌ای که در سال 2006 در برزیل صورت گرفت، از 422 ایزوله انتروکوکوس فکالیس جدا شده، 73٪ از ادرار، 20٪ از ترشحات، 3٪ از خون و 2٪ از کاتتر جدا گردیدند(11). در مطالعه دیگری که در همان سال در پاکستان صورت گرفت از میان 112 نمونه کلینیکی جمع‌آوری شده به ترتیب بیشترین سویه‌های انتروکوکی از ادرار با 70٪، ترشحات چرک 16٪ و خون 11٪ جداسازی شدند(12).

در میان نمونه‌های جدا شده از محیط بیمارستان بیشترین ایزوله‌ها از سرویس بهداشتی پرسنل با 22٪، سرویس بهداشتی بیمار16٪، تخت بیمار 16٪ و میز پرسنل 16٪ جداسازی گردید. با توجه به شیوع این باکتری در سایتهای مختلف بیمارستان بویژه سرویس بهداشتی و تخت بیمار، احتمال انتقال سویه‌های محیطی از طریق تماس با محیط‌های آلوده به بیماران افزایش می‌یابد. از سوی دیگر میزان بالای آلودگی سرویس بهداشتی و میز پرسنل، نقش پرسنل در انتقال سویه‌های محیطی به بیماران و چرخش این سویه‌ها در میان بیماران مختلف را نشان می‌دهد. از آنجا که چرخش سویه‌های انتروکوکوس فکالیس در محیط‌های بیمارستانی منجر به بالا رفتن احتمال تبادل ژنتیکی در خصوص انواع ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویرولانس می‌گردد، لذا توجه به پاکسازی بهینه محیط بستری بیماران امری ضروری و حیاتی به نظر می‌رسد.

نمونه‌های کلینیکی مورد مطالعه مقاومت بالای 60٪ را نسبت به تتراسایکلین، سینرسید، اریترومایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکسازین و جنتامیسین نشان دادند. در مطالعه‌ای که توسط سیفی و همکاران در سال 1386 در ایران صورت گرفت، مقاومت در بین سویه‌های فکالیس جدا شده نسبت به تتراسایکلین 60٪، سینرسید 100٪، اریترومایسین 36/5٪، کوتریموکسازول 30/5٪ و سیپروفلوکسازین 24/5٪ مشاهده شد(13). در مطالعه دیگری که در پاکستان در سال 2006 انجام شده است، میزان مقاومت به اریترومایسین 80٪، کوتریموکسازول 79٪، سیپروفلوکسازین 62٪ و جنتامایسین 77٪ مشاهده شده است(12). به نظر می رسد افزایش میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیکها به دلیل مصرف بی‌رویه آنها می‌باشد.

در مطالعه سیفی و همکاران میزان مقاومت به ونکومایسین 7/5٪ گزارش شده است(13)، این رقم در مطالعه ما 9٪ می‌باشد. همچنین Kuhn در مطالعه خود در سال 2005 بر روی نمونه‌های بالینی، دامی و محیطی در اروپا میزان مقاومت به ونکومایسین را 11-8٪ گزارش نموده است(14).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های جدا شده از محیط بیمارستان نیز مورد بررسی قرار گرفت که در این میان مقاومت بالای 60٪ تنها نسبت به تتراسایکلین 75٪ و سینرسید 84٪ مشاهده گردید. همچنین مقاومتی نسبت به ونکومایسین، تیکوپلانین، لینه‌زولید و آمپی‌سیلین مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که در سال 2010 در نیجریه صورت گرفت، 568 ایزوله انتروکوکوس فکالیس از دست پرسنل بیمارستان جداسازی گردید که در این میان میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به تتراسایکلین 78٪، اریترومایسین 74٪، کوتریموکسازول 91٪، جنتامایسین 45٪، ونکومایسین 17٪ و سیپروفلوکسازین 38٪ گزارش شده است(15).

در تحقیقی که در سال 2004 در آمریکا بر روی میزان تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس با استفاده از روش میکروتیتر پلیت انجام شد 78/5٪ از نمونه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند(8) و در تحقیقی که در سال 2005 در ژاپن صورت گرفت این میزان 62/5٪ گزارش شد(10). همچنین در مطالعه‌ای که در اسپانیا در سال 2001 انجام شد 62٪ از نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس، قادر به تشکیل بیوفیلم بودند(9). در مطالعه ما 72٪ از نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که شامل نمونه‌های چسبنده قوی و چسبنده ضعیف می‌باشند. در صورتی که این میزان برای نمونه‌های محیطی مورد مطالعه 84/5٪ بود. از آنجا که تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح غیر زنده و ناصاف راحت‌تر از سطوح زنده صورت می‌گیرد احتمال اینکه نمونه‌های محیطی قابلیت بیشتری در تشکیل بیوفیلم داشته باشند بالاست و این قضیه در مطالعه حاضر با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها نیز همراه بوده است که می‌تواند زنگ خطری برای پیشگیری از گسترش و چرخش این سویه‌ها از طریق محیط‌های بیمارستانی به بیماران باشد.

در مطالعه‌ای که در سال 2007 در ایتالیا صورت گرفت 98٪ از نمونه‌های کلینیکی انتروکوکوس فکالیس قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان نمونه‌های مذکور به صورت 47٪ مقاومت به اریترومایسین، 86٪ به تتراسایکلین، 35٪ به جنتامایسین و 12٪ به سیپروفلوکسازین گزارش شده است(16). در حالی که نمونه‌های کلینیکی مورد مطالعه ما به ترتیب 67٪ نسبت به اریترومایسین، 95٪ به تتراسایکلین، 71٪ به جنتامایسین و 71٪ به سیپروفلوکسازین مقاومت داشتند.

همان گونه که نتایج به دست آمده نشان می‌دهند میزان مقاومت آنتی-بیوتیکی در میان نمونه‌های کلینیکی بسیار بیشتر از نمونه‌های محیطی می‌باشد و این امر می‌تواند ناشی از انتقال ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میان سویه‌های کلینیکی در مراکز درمانی باشد از سوی دیگر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در افزایش میزان مقاومت نقش عمده‌ای را ایفاء می-کند. همچنین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان نمونه‌هایی که قادر به تشکیل بیوفیلم بودند نسبت به نمونه‌های بیوفیلم منفی بالاتر بود که این امر نقش تشکیل بیوفیلم را در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریها تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و نیز قابلیت بالای این باکتری در تشکیل بیوفیلم می‌باشد. با توجه به این عوامل و نیز نقش عمده بیوفیلم درافزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، انجام اقدامات لازم در جهت کاهش یا

REFERENCES

1. Mohamed JA, and David BH. Biofilm Formation by Enterococci. J Med Microbiol. 2007; 56:1581-8.

2. Tendolkar PM, Baghdayan AS, and Shankar N. Pathogenic Enterococci: New Developments in the 21st Century. CMLS. 2003 Jun; 60:2622-36.

3. Ballering KS. Identification and Characterization of Novel Genetic Determinants of Biofilm Formation in Enterococcus faecalis. Minnesota University; 2010.

4. Vu B, Chen M, Crawford RJ, and Ivanova EP. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. Molecules. 2009 Jul; 14:2535-54.

5. Pavithra D, and Doble M. Biofilm Formation, Bacterial Adhesion and Host Response on Polymeric Implants-Issues and Prevention. Biomed Mater. 2008; 3:20-33

6. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Biochemical and Genetic Investigation among Enterococcal Isolates from Sewage Treatment Plants in Tehran with Emphasize on Strains with VanA and VanB Genes. Iranian J Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2008. 42:31-7. (Full text in Persian)

7. National committee for clinical Laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 11th informational supplement. NCCLS. Wayne, Pa. 2001.

8. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, and Murray BE. Influence of Origin of Isolates, Especially Endocarditis Isolates, and various Genes on Biofilm Formation by Enterococcus faecalis. Infection and Immunity. 2004; 72(6):3658-63.

9. Arana AT, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M., et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in Enterococcus faecalis Biofilm Formation. Appl and Env Microbiol. 2001; 67(10):4538-45.

10. Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K, and Kumon H. Clinical Implications of Biofilm Formation by Enterococcus faecalis in the Urinary Tract. Acta Medica Okayama. 2005; (59)3:79-87.

11. Azevedo PA, Dias CAG, and Teixeira LM. Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Enterococcal Isolates from Southern Region of Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo. 2006; 48(1):11-16.

12. Abdulla FE, Abdulla EM. Antibiotic Options for Eterococcus faecalis Infection. Pak J Med Sci. 2006; 3:286-90.

13. Saifi M, Pourshafie MR, Borhani K, Rahimi F, Soltan Dallal MM. Investigation of aac(6□)-le-aph(2□□)-la Gene among Multidrug and High Level Gentamycin resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Strains. Iranian Biomedical J. 2007. 1:33-8. (Full text in Persian)

14. 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 region. Appl Env Microbiol. 2005; 7:5383-90.

15. David OM, Oluduro AO, Olawale AK, Osuntoyinbo RT, Olowe OA, and Famurewa O. Incidence of Multiple Antibiotic resistance and Plasmid Carriage among Enterococcus faecalis Isolated from the Hands of Health Care Workers in Selected Hospitals in Ekiti, Ondo and Osun States, Nigeria. Int J Acad R. 2010Jan; 2(1):43-47.

16. Arciola CR, Baldassarri L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J, et al. Strong Biofilm Production, Antibiotic Multi-Resistance and High GelE Expression in Epidemic Clones of Enterococcus faecalis from Orthopaedic Implant Infections. Biomaterials. 2008; 29:580-6.