تنوع ژنتیکی سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین جداشده از نمونه های بالینی به روش پالسد فیلد ژل الکتروفورزیس

مهسا معینیان [1]، محمد رضا پورشفیع[2]، اکرم عیدی[3]، الهام صفرپور[4]، مهناز سیفی[5*]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
2. متخصص میکروب شناسی، استاد گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
3. فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
4. کارشناس میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
5. متخصص باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، خیابان پاستور، انستیتوپاستور ایران گروه باکتری شناسی، تلفن و نمابر: 66968853، mahsaifi@yahoo.com

دریافت مقاله: دی نود و یک پذیرش برای چاپ: اسفند نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *مقاومت به سیپروفلوکسازین درایزوله های انتروکوکوس فکالیس بخصوص در عفونت های ادراری باعث بروزمشکلات درمانی شده است. در این تحقیق به تعیین ژن های مقاومت به سیپروفلوکسازین gyrA ، gyrB ، parC و parE با روش PCR و بررسی تنوع ژنتیکی سویه های مقاوم انتروکوکوس فکالیس توسط روش پالسد فیلد ژل الکتروفورزیس پرداخته شده است.*

روش بررسی: *تعداد 384 ایزوله انتروککی از 6 بیمارستان و 3 آزمایشگاه خصوصی در تهران جمع آوری شد وازبین آنها 50 سویه مقاوم به سیپروفلوکسازین بدست آمد.تعیین جنس و گونه و هم چنین ژن های مقاومت به سیپروفلوکسازین با روش PCR وتست حساسیت آنتی بیوتیکی و MIC سویه ها نیز با استفاده ازروش های استاندارد و در نهایت ژنوتایپینگ سویه های مقاوم به روش PFGE انجام شد.*

یافته ها: *تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین دارای MIC 16 تا 512 میکروگرم بر میلی لیتر بودند. همه سویه ها از نظر وجود ژن parC ، 98 درصد از نظر ژن های gyrA و gyrB و80 درصد از نظر ژن parE مثبت بودند .استفاده از روش PFGE تعداد 43 سویه را در قالب 11 Common Type و7 Single Type دسته بندی نمود وتایپهای P4، P9 و P10 در بین ایزوله های بیمارستانی و سرپایی مشترک بودند.*

نتیجه گیری: *سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین کلونالیتی متنوعی دارند. از آن جایی که وجود مقادیر MIC بالادر پالسوتایپ های مشترک بیمارستانی و سرپایی و هم چنین پالسوتایپ های شایع و غیر شایع دیده میشود یعنی توزیع یک نواختی نداشته و نشان دهنده انتقال ژن های مقاومت به میزان بالا در جمعیت انتروککی می باشد. در حقیقت افراد کلونیزه شده با این سویه ها مخازنی برای انتشار ژن های مقاومت در جامعه به حساب می آیند که نیازمند اجرای برنامه های مراقبتی بیشتری است.*

واژگان کلیدی: ***انتروکوکوس فکالیس، سیپروفلوکسازین، ژنوتایپینگ.***

مقدمه

در دو دهه اخیر، انتروکک ها به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های انسانی شناخته شده اند.این ارگانیسم ها به طور ذاتی به تعداد زیادی از آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند و علاوه براین،توانایی کسب مقاومت های جدید را نیز به طور فزاینده ای دارند. انتروکوکوس فکالیس به عنوان رایج ترین گونه، بیش از هشتاد در صد از عفونت های ناشی از انتروکک ها مانند اندوکاردیت، باکتریمی، عفونت های ادراری، بیمارستانی ، نوزادان و سیستم اعصاب مرکزی را به خود اختصاص داده است(1). دلایل افزایش نقش انتروکک ها در عفونت های بیمارستانیمی تواند ناشی از افزایش اثر فشارانتخابی ناشی از استفاده بی رویه آنتی بیوتیک های مختلف باشد.

یکی از داروهایی که برای درمان عفونت های انتروککی به خصوص عفونت های ادراری استفاده میشود، آنتی بیوتیک های فلوروکوئینولونی است که سیپروفلوکسازین از رایج ترین آنها است. از آنجایی که مصرف آنتی بیوتیک ها در ایران محدودیت خاصی ندارد و به دلیل این که انتروکوکوس فکالیس به راحتی ژن های مقاومت را کسب می کند، سویه های این باکتری، درجات مختلف و افزایش یافته ای از مقاومت نسبت به سیپروفلوکسازین نشان داده اند. مقاومت به سیپروفلوکسازین در بین نمونه های بالینی، به دلیل مصرف زیاد این دارو، درمان عفونت های انتروککی را دچار مشکل کرده است. کنترل عفونت های انتروکوکوس فکالیس، به خصوص انواع چند مقاومتی آن، بسیار مشکل می باشد و راه درمان مشخصی هم برای آن وجود ندارد. بنابراین کنترل سرایت و شیوع بیماری این میکروارگانیسم ها از اهمیت بالایی برخوردار است.روش های ژنوتایپینگ همانند PFGE در تشخیص کلونالیتی، تنوع ژنتیکی سویه ها منشایابی عفونت ها و کنترل بهتر آنها کمک می کند(2).

در این تحقیق به بررسی وجود ژن های مقاومت به سیپروفلوکسازین gyrA ، gyrB ، parC و parE با روش PCR و بررسی تنوع ژنتیکی این سویه هابا روش پالسد فیلد ژل الکتروفورزیس پرداخته می شود .

روش کار

نمونه های کلینیکی(384 نمونه) ازشش بیمارستان و 3 آزمایشگاه خصوصی در سطح تهران جهت به دست آوردن سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین جمع آوری شد. برای استخراج DNA از روش boiling استفاده شد. به این صورت که ازچند کلنی در 200 میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه سوسپانسیون تهیه و به مدت نیم ساعت در آب جوش قرار داده شد و بعد از آن درrpm 10000 به مدت 15 دقیقه و در دمای 4 درجه سانتریفوژ شد.پس از سانتریفوژ10 میکرولیتراز مایع رویی به عنوان DNA الگو استفاده شد. سکانس پرایمرهای جنس F: TTAAAACCATTAGGCGATCG ، و R: CCCATNCCCATNGANGGRTCCAT و سکانس پرایمرهای گونه، F: ATCAAGTACAGTTAGTCT و R: ACGATTCAAAGCTAACTG بودند(3).

واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیترانجام شد و ترکیب آن شامل: PCR buffer(10X) 2.5 µl ، $Mgcl_2$(50 mM) 0.6 µl، (1.2 mM) dNTP 0.4 µl، هر یک از Primers(100 pM/ µl) 0.4 µl ، Taq DNA polymerase(5 U/µl) 0.1 µl ، DNA 1 µl و ddH_2O 20.5 µl بود. سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلربرای تکثیر ژن اختصاصی جنس شامل مراحل: Initial denaturation (94°C , 5') ، Denaturation (94°C, 1') ، Annealing(54°C, 1')، Extension , (72°C,1') و Final extension(72°C, 7') در مورد گونه هم برنامه دمایی همانند جنس و فقط دمای annealing به جای54 °C ، 50 °C ، به تعداد 30 سیکل بود(3).

پس از تعیین جنس و گونه باکتری، سویه ها با روش disk diffusion توسط دیسک سیپروفلوکسازین 5 µg شرکت (BD BBL, Sparks, BD MD, USA) غربال گری شدند و سپس سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین مورد سنجش حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC قرارگرفتند. MIC سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین مطابق با استانداردهای CLSI و از رقت 2 تا 2048 µg/ml به روش میکرودایلوشن وبا استفاده از میکروپلیت های استریل انجام شد(4و5).

برای تشخیص ژنهای مقاومت با روش PCR وجود چهار ژن مقاومت gyrA ، gyrB ، parC و parE توسط PCR بررسی شد. سکانس پرایمرها در جدول 1 ذکر شده است(9-6). واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیترانجام شد و ترکیب آن شامل: PCR buffer(10X) 2.5 µl ، $Mgcl_2$ (50 mM) 0.8 µl، dNTP (1.2 mM) 0.5 µl، هر یک از پرایمرها(100 pM/ µl) 0.1 µl ، Taq DNA polymerase(5 U/µl) 0.5 µl ، DNA 7 µl و ddH_2O 13.5 µl بود.

سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلربرای تکثیر ژن های مقاومت gyrA ، gyrB ، parC و parE به ترتیب 35 ، 30 ، 30 و 40 سیکل و به صورت زیر بود:

gyrA : Initial denaturation , 94°C , 3' ، Denaturation, 94°C, 60" ، Annealing, 58°C, 60" ، Extension , 72°C, 60" .

gyrB : Denaturation, 94°C, 15" ، Annealing, 55°C, 30" ،Extension , 72°C, 1' .

parC : Denaturation, 94°C, 1' ، Annealing, 48.7°C, 1' ، Extension , 72°C, 1' .

parE : Initial Denaturation , 94°C , 4' ، Denaturation, 94°C, 1" ، Annealing, 52°C, 1' ، Extension , 70°C, 1'.

جدول 1- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ژنهای مقاومت به سیپروفلوکسازین

Gene	Sequence of primer	Product size(bp)
gyrA	GCAATGAGTGTTATCGT TCTGGTCCAGGTAACACTTCC	575
gyrB	CAACTTGCCAGGGAA TGGAATTCACGGCTACGTCC	123
Parr	AATGAATAAAGATGGCAATA CGCCATCCATACTTCCGTTG	191
Par	GGAAAATTAACACCGGCTCA AAAGTGGTGGTAAGGCAATG	388

برای انجام Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) در10 میلی لیتر از محیط کشت BHI برات که از روز قبل جهت استریلیتی کنترل شده بود کشت خالص از سویه انتروکک تهیه و پنج میلی لیتر از محیط کشت حاوی میکروب درrpm 6000 بمدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل با 2/5 میلی لیتر بافر TE x1 مخلوط گردید تا سوسپانسیون یک نواختی حاصل گردد. جهت تهیه پلاک نسبت مساوی از سوسپانسیون باکتری و Low melting %2agarose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)LMA با هم مخلوط شده ودرقالبهای مخصوص ریخته شد. سپس به پلاک های تهیه شده در دو مرحله 30 میلی لیتر از بافر لیزاضافه و به مدت 24 ساعت درانکوباتور 37 درجه قرار داده شد. سپس با 10 میلی لیترازبافر1 TEx 3 بارو در هر بار بمدت یک ساعت پلاک ها را شستشو داده شد. جهت هضم آنزیمی از آنزیم smaI استفاده شد و در نهایت الکتروفورز به روشPFGE در دستگاه CHEF DR III (شرکت Bio-Rad) طبق برنامه: Initial Run Time : 23h, Final switch time : 35 S, Angle switch time: 5 S, Voltage : 6 v/cm. 120^o: انجام شد(10).

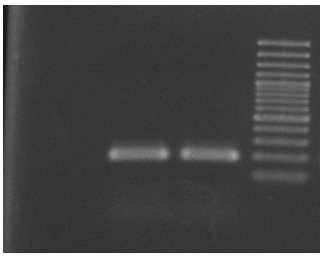
پس از انجام الکتروفورز بر روی کلیه ایزوله ها و رنگ آمیزی آنها دراتیدیوم بروماید نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار GelcomparII بررسی شد.

یافته ها

در این مطالعه 384 سویه انتروکک جمع آوری شدند که موضع جداسازی این سویه های انتروککی دراکثریت موارد (80%) ادرار و بقیه نمونه ها شامل (12%) زخم، (6%) خون و (2%) مجرای ادراری بود.

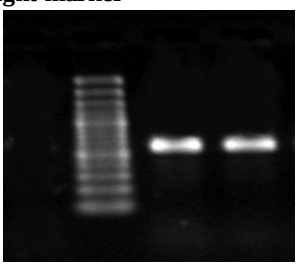
به منظور تعیین جنس و گونه انتروکک ها، PCR انجام شد ونتایج حاصل ازآن در تشخیص جنس و گونه انتروککی ملاک انتخاب سویه ها برای آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از دیسک 5 میکروگرم سیپرو فلوکسازین برای غربالگری سویه های مقاوم بود که نهایت منجر به شناسایی 50 سویه انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین گردید. در این میان (14%) 7 ، (2%) 1 و (6%) 3 سویه به ترتیب دارای MIC برابر 16، 256 و 512 میکرگرم در میلی لیتر بود و برای MIC برای 32، 64 و 128 میکروگرم در میلی لیتر ، هر کدام، (26%) 13 سویه شناسایی شد. با توجه به MIC بزرگ تر یا مساوی 4 µg/ml برای سیپروفلوکسازین، به عنوان انتروکک مقاوم، (11) کلیه سویه ها مقاوم در نظر گرفته شدند.

از 50 سویه آنتروکک فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین، 100 درصد سویه ها از نظر ژن parC ،(تصویر 1) 98 درصد از نظر ژن های gyrA و gyrB (تصاویر 2و 3) و80 درصد از نظر ژن parE (تصویر4) مثبت بودند.



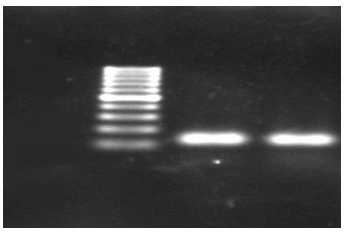
تصویر1: PCR اختصاصی ژن مقاومت parC

1: negative control
2,3 : PCR product of parC genes
M : molecular weight marker



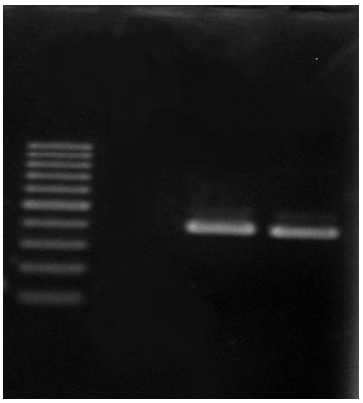
تصویر2: PCR اختصاصی ژن gyrA

1: negative control
2,3 : PCR producy of gyrB genes
M: molecular weight marker



تصویر3:PCR اختصاصی ژن مقاومت gyrB

1: negative control
2,3 : PCR product of gyrB genes
M : molecular weight marker

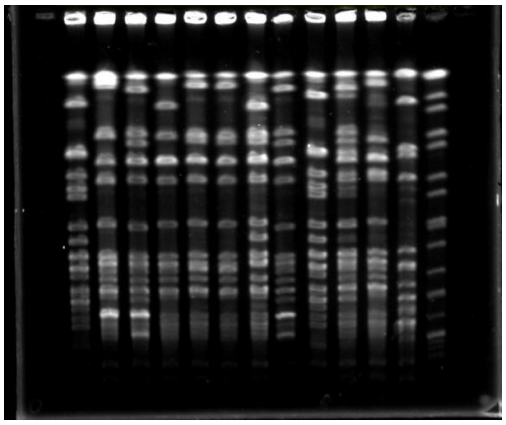


تصویر4: PCR اختصاصی ژن مقاومت parE

M :molecular weight marker
1: negative control
2,3:PCR product of parE genes

پس از انجام الکتروفورز برای تمام 50 سویه مقاوم به سیپروفلوکسازین (تصویر 5) نتایج با استفاده از نرم افزار GelcomparII آنالیز شد و دندروگرام شباهت ژنتیکی ایزوله ها رسم شد(تصویر 6) ودر مجموع 18 پالسوتایپ (P1-P18) شامل 11 common type و 7 single type در بین 50 سویه بدست آمد.

شایع ترین پالسوتایپ، P4 دارای 8 سویه و پس از آن P10 و P9 قرار داشتند که به ترتیب دارای 7 و 5 سویه بودند. در P4 ، محدوده MIC از 16 تا 256 و در P10 ، P9 از 16 تا 512 میکروگرم بر میلی لیتر بود. در بین پالسوتایپ های شایع فقط در P9 همه ژن های مقاومت در تمام ایزوله ها وجودداشتند ودر P4 و P10 برخی از ژن های مقاومت تشخیص داده نشدند. به بیان بهتر ارتباط خاصی بین پالسوتایپ های شایع و مقادیر MIC و هم چنین وجود ژن های مقاومت دیده نشد.



تصویر5: ژل رنگ آمیزی شده در روش PFGE

Pulsotype	MIC	gyrA	gyrB	parC	parE
P1	64	+	+	+	+
	64	+	+	+	-
P2	64	+	+	+	+
	64	+	+	+	+
	128	+	+	+	-
P3	64	+	+	+	+
	128	+	+	+	-
	128	+	+	+	-
P4	32	+	+	+	+
	32	+	+	+	+
	64	+	+	+	+
	16	+	+	+	+
	64	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
	256	+	+	+	-
	32	+	+	+	+
P5	16	+	+	+	+
P6	32	+	+	+	+
P7	64	+	+	+	+
P8	32	+	+	+	-
P9	512	+	+	+	+
	16	+	+	+	+
	64	+	+	+	+
	16	+	+	+	+
	32	+	+	+	+
P10	64	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
	512	+	-	+	+
	32	+	+	+	+
	32	+	+	+	+
	16	+	+	+	-
	16	-	+	+	+
P11	64	+	+	+	+
P12	32	+	+	+	+
P13	32	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
P14	128	+	+	+	+
	512	+	+	+	-
	32	+	+	+	+
P15	16	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
	32	+	+	+	+
	64	+	+	+	+
P16	32	+	+	+	-
P17	128	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
	64	+	+	+	-
P18	128	+	+	+	+
	128	+	+	+	+
	128	+	+	+	+

تصویر 6: دندروگرام تنوع ژنتیکی سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین

بحث

تا سال های6- 1985 مقاومت به سیپروفلوکسازین در انتروکک ها شایع نبود(1/4 درصد) ولی در سال1990 مقاومت به طور معناداری به 15/2 درصد افزایش پیدا کرد(12) . مقاومت در بین سویه های فکالیس جداشده درسال های بعد نسبت به سیپروفلوکسازین 31/5 % شد(13).

بر اساس مطالعه سیفی در سال 2008 ، مقاومت بالا(حدود 40%) به سیپروفلوکسازین در بین ایزوله های کلینیکی و فاضلاب مشاهده شد که می تواند به دلیل استفاده زیاد از این دارو در درمان انواع عفونت ها و بخصوص عفونت های ادراری بعنوان یکی از اولین انتخاب های درمانی باشد(14).در انتروکوکوس فکالیس موتاسیون در ژن های gyrA و gyrB ، که ساب یونیت های آنزیم DNA ژیراز هستند، و ژن های parC و parE ، که ساب یونیت های توپوایزومراز IV میباشند، عامل اصلی مقاومت بالا به سیپروفلوکسازین میباشند(17-15). در بررسی حاضر100 % ژن parC ، 98 % ژن های gyrA و gyrB و 80 درصد ژن parE در سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین مشاهده شد. درصد بالای فراوانی این ژن ها در ایزوله های کلینیکی بیانگر نقش ویژه و هم چنین پراکندگی زیاد این ژن ها درایران می باشد.در مطالعه Jacques و هم کاران در سال 1996 ، 54 % از سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین دارای ژن parC (18) و در مطالعه Torell و هم کاران در سال 2003 ، 100 % از سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین دارای ژن parC و 17 درصد دارای ژن gyrA بوده اند(19).منفی بودن نتایج برخی بررسی ها از طریق PCR به این معنی است که برخی سویه ها آن ژن، یا ژن های مقاومت را نداشته و یا شاید به دلیل اینکه موتاسیون های احتمالی در این سویه ها رخ داده است، اتصال پرایمرها به مناطق مورد نظر بر روی DNA هدف با مشکل مواجه میگردد و در نتیجه واکنش PCR منفی خواهد بود. در این صورت مطالعه تنوع این موتاسیون ها نیز به نوبه خود ارزش زیادی خواهد داشت(7و18).در سویه هایی که ژن parE را نداشتند، تفاوتی از نظر MIC و مقاومت آنتی بیوتیکی با سویه هایی که تمام ژنهای مورد نظر را داشتند، مشاهده نشد. هم چنین در P10 و P14 ،در سویه هایی که MIC 512 µg/ml داشتند ژن parE مشاهده نشد در نتیجه شاید بتوان نتیجه گرفت که این ژن تاثیر چندانی در بروز مقاومت بالا و MIC افزایش یافته در سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین ندارد.

در این بررسی دربین 50 سویه از انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین با استفاده از روش PFGE تعداد 43 سویه در قالب Common Type 11 دسته بندی شد و بقیه 7 سویه نیز هر کدام نماینده یک Single Type بودند. با استفاده از نتایج حاصل از ژنوتایپینگ در این مطالعه میتوان اظهار نمود که سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین در جامعه مورد بررسی کلونالیتی متنوعی دارند.ازآنجاییکه انتروکک ها به راحتی درپوست و غشاهای مخاطی کلنیزه شده و در محیط بیرون نیز قدرت سازگاری بالایی دارند و به دلیل انتقال فرد به فرد به عنوان پاتوژن های چند مقاومتی که از نظر بالینی اهمیت زیادی پیدا کرده اند در نظر گرفته میشوند و از طرف دیگر بطور ذاتی نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها از جمله سفالوسپورین ها، فلوروکین ها و آمینوگلیکوزیدها مقاومت دارند. انتروکک ها می توانند ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را براحتی بدست آورند و آنها را از طریق پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و یا تبادلات کروموزومی به دیگر گونه ها نیز منتقل نمایند. از آنجائیکه انتروکک ها فلور نرمال روده انسان و حیوانات خون گرم هستند از طریق مدفوع به راحتی به محیط راه پیدا می کنند و به وفور در محیط بیرون از موادغذایی خام، سبزیجات، آب های سطحی و فاضلاب جدا میشوند.سویه های مقاوم انتروکک ها نیز میتوانند در این زنجیره انتقال به فلورنرمال روده افراد راه پیداکنند(18) .دلایل افزایش نقش انتروککها در عفونتهای بیمارستانی ، میتواند ناشی از استفاده از آنتی بیوتیکهایی که نسبت به آنها مقاوم هستند باشد(21و20). یکی از داروهایی که برای درمان عفونتهای انتروککی استفاده میشود، آنتی بیوتیکهای فلوروکوئینولونی است که سیپروفلوکسازین از رایجترین آنهاست که خصوصا در عفونتهای ادراری انتروککی تجویز میشود.مصرف این آنتی بیوتیک در ایران محدودیت خاصی ندارد و به طور نامناسب صورت میگیرد، بنابراین از آنجایی که انتروکوکوس فکالیس به راحتی ژنهای مقاومت را کسب میکند، این باکتری سطوح مقاومت بالایی را نسبت به سیپروفلوکسازین نشان داده است و این امر موجب مشکل شدن راه های کنترل درمان و شیوع عفونتهای انتروککی شده است. مقادیر MIC بالاتر از 4 میکروگرم بر میلی لیتر از سیپروفلوکسازین در انتروکوکوس فکالیس به عنوان مقاوم در نظر گرفته میشود(11) ودر جمعیت مورد مطالعه کلیه موارد MIC بین 16 تا 512 میکروگرم در میلی لیتر بوده اند لذا میتوان نتیجه گیری نمود که این مسئله حاکی از فشار انتخابی ناشی از مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در جامعه است. ایران کشوری است که از یک طرف مصرف آنتی بیوتیک در آن محدودیتهای خاصی ندارد واز طرف دیگر آنتی بیوتیکها نابجا و ناکافی مصرف میشوند. با ایجاد مقاومت دارویی، روده با سویه های مقاوم انتروککی کلونیزه میشود و انتقال این مقاومت به سویه های حساس هم صورت میگیرد. وجود این سویه های مقاوم درمدفوع منجر به آلودگی فاضلابها و انتشار ژنهای مقاومت میشود. چنانچه افراد کلونیزه با این سویه ها به دلایلی در بیمارستانها بستری شوند احتمال انتقال سویه های مقاوم به سایر بیماران هم وجود خواهد داشت. راه این انتقال میتواند از طریق دست آلوده پرسنل بیمارستان ویا وسایل آلوده باشد. هر چه زمان بستری شدن افراد در بیمارستانها طولانی تر باشد چرخش این سویه های مقاوم در کلیه قسمتهای بیمارستانها بیشتر و خطرناکتر خواهد بود و در نهایت پس از ترخیص این بیماران نیز آزادسازی این سویه ها به جامعه اتفاق می افتد.

نکته حائز اهمیت دیگر در این مطالعه MIC افزایش یافته در بین سویه های مقاوم به سیپروفلوکسازین بود که از حداقل 16 تا512 µg/ml مشاهده شد.در تحقیقاتی مشابه حداکثر MIC گزارش شده در بین سویه های انتروکوکوس فکالیس در محدوده µg/ml 16 تا 256 قرار داشته است(22) .از طرف دیگراطلاعات مفید اپیدمیولوژیک در زمینه بیماریهای عفونی با تعیین تیپ سویه ها به محققین کمک میکند تا به راههای کنترل آنها راحت تر دست بیابند. از روشهای دقیق وباارزش تایپینگ سویه های میکروبی با استفاده از ژنوم باکتری میتوان از PFGE نام برد.این روشها در مورد تشابه ویا تنوع کلنال بین سویه های جداشده ازیک منطقه اطلاعات مفیدی را ارائه میدهد ودرپیش بینی روشهای کنترل و جلوگیری از شیوع عفونت کمک شایانی مینماید(25و24و23).

از آنجاییکه وجود مقادیر MIC بالا در پالسوتایپهای مشترک شامل سویه های بیمارستانی و سرپایی و همچنین پالسوتایپهای شایع و غیر شایع دیده میشود یعنی توزیع یکنواختی نداشته و نشان دهنده انتقال ژنهای مقاومت به میزان بالا در جمعیت انتروککی می باشد. در حقیقت افراد کلونیزه شده با این سویه ها مخازنی برای انتشار ژنهای مقاومت در جامعه بحساب می آیند.

در مورد کلونهای شایع،در P4، 7 سویه از 8 مورد و در P9، 4 سویه از 5 مورد از بیمارستانها و یک سویه باقیمانده از آزمایشگاه خصوصی که مراجعه بیماران سرپایی دارد جداسازی شده بودند و در P10 ،4 مورد از بیمارستانهاو دو سویه از آزمایشگاه خصوصی جدا شده بودند.

وجود ایزوله های مقاوم بیمارستانی و سرپایی در داخل یک کلون زنگ خطری است که باید شدیدا مورد توجه سیستم مراقبت بهداشتی قرار گیرد.کلونهای شایع که قبلا فقط به بیمارستان محدود بوده اند، به دلایل مختلف وعدم رعایت بهداشت مناسب، از بیمارستانها به جامعه منتقل شده اند که این مسئله به دلیل چرخش سویه های مقاوم در جامعه بسیار خطرناک میباشد. در بیمارستانها باید پروتوکلهای پیشگیرانه اجرا شود تا از انتقال کلونهای مقاوم به درون جامعه و چرخش آنها جلوگیری به عمل آید زیرا در غیر این صورت، با افزایش سویه های مقاوم در جامعه، با طیف وسیعی از عفونتهای انتروککی مقاوم به درمان مواجه خواهیم شد و همچنین به دلیل انتقال ژنهای مقاومت به سویه های مشابه یا غیر مشابه و جنسهای دیگر باکتریها، خطر بالقوه ایجاد عفونتهای باکتریایی دیگر نیز پیش می آید.

کلنیزاسیون و عفونت با انتروککها ، روند رو به افزایش شدیدی پیدا کرده است. درچنین شرایطی کنترل عفونت بسیارمشکل است ودرمان چنین عفونتهایی بسیار مهم میباشد . در این حالت کنترل سرایت این قبیل میکروارگانیزمها اهمیت زیادی دارد و روشهای ژنوتایپینگ در تشخیص کلونالیتی سویه ها و کنترل بهتر آنها بسیار موثر میباشد. سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه باید عوامل مهم و شایع پاتوژنهای بیمارستانی را بدرستی شناسایی کرده و الگوی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی آنها را مشخص نماید تا روشهای پیشگیری ودرمان موثری جهت کنترل آنها بکار گرفته شود.

نتیجه گیری

سویه های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به سیپروفلوکسازین کلونالیتی متنوعی دارند. از آن جایی که وجود مقادیر MIC بالادر پالسوتایپ های مشترک بیمارستانی و سرپایی و هم چنین پالسوتایپ های شایع و غیر شایع دیده میشود یعنی توزیع یک نواختی نداشته و نشان دهنده انتقال ژن های مقاومت به میزان بالا در جمعیت انتروککی می باشد. در حقیقت افراد کلونیزه شده با این سویه ها مخازنی برای انتشار ژن های مقاومت در جامعه به حساب می آیند که نیازمند اجرای برنامه های مراقبتی بیشتری است.

REFERENCES

1. Huycke MM, Sahm DF ,Gilmore MS. Multiple drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for future. Emerg Infect Dis. 1998 Jun; 4(2): 239-249.

2. Gordillo ME, Sing KV , Murray BE. Comparison of Ribotyping and Pulsed- Field Gel Electrophoresis for subspecies differentiation of strains of Enterococcus facalis. J Clin Microbiol. 1993 Jun; 31(6): 1570-4.

3. Kariyama R. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance of vancomycin- resistant Enterococci. J Clin Microbiol. 2000 Aug; 38(8): 3092-5.

4. Andrews JM . Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. J Antimicrobial Chemother. 2001 Jul;(48): 5-16.

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility tests,approved standard 7th edn. Villaona: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000.

6. Nagawa E , Jalal S. Alterations in GyrA and ParC associated with flouroquinolone resistance in Enterococcus faecium. Antimicrobial agents and Chemother. 1999 Apr; 43(4): 947-9.

7. Piekarska K,Gierszinski R,Paciorek M , Kochman M . Novel gyrase mutations and characterization of ciprofloxacin-resistant clinical strains of Entetococcus faecalis isolated in Poland. Polish J of Microbiol. 2008 Mar; 57(2): 121-4.

8. Patrick G,Hussaye S , Aubert A, Gutmann L, Varon E. Invitro activities of garenoxin against Streptococcus Pnumoniae,Viridans group Streptococci and Enterococcus faecalis compared to those of six other quinolones. Antimicrobial Agents Chemother. .2003 Nov; 47 (11): 3542-7.

9. Hung-Chin K, Chi-Chung C, Ching-Dong C, Shuen-Rong C, Ming-Heng W, Shao-Kuang C. Characterization of quinolone resistant Enterococcus faecalis isolates from healthy chickens and pigs in Taiwan. J Food and drug Analysis. 2009 Oct; 17(6): 443-50.

10. Opera SF, Zaidi N, Donabedim SM, Balasubramaniam M , Hershberger E. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Feb; 53(4): 626- 30.

11. Leavis HL, Willems RJ , Bonten MJ. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in gyrA and parC confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of Enterococcus faecium. J Clinl Microbiol. 2006 Mar; 44(3): 1059-64.
12. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among gram positive cocci. The Lancet Infec Dis. 2002 Sep; 2(9): 530-6.

13. Schaberg DR , Dillon W, Terpenning MS, Robinson KA, Bardley SF . Increasing resistance of Enterococci to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 1992 Nov; 36(11): 2533- 5.

14. Saifi M ,Soltan Dalal MM, Pourshafie MR , Eshraghian MR,Salari MH,Shirazi MH. High-level resistance of Enteroccus faecium and E.faecalis isolates from municipal sewage treatment plants to gentamycin. Iranian J Pub Health. 2008 Dec; 37(1):103-7.

15. Onodera Y , Okuda J , Tanaka M, Sato K . Inhibitory activities of quinolones against DNA Gyase and Topoisomerase IV of Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Jun; 46(6): 1800-4.

16. Korten V , Huang W, Murray B Analysis by PCR and Direct DNA Sequencing of gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in Enterococcus faecalis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994 Sep; 38(9):2091-4.

17. Zervos MJ, Bacon AE, Patterson JE, Schaberg DR, Kauffman CA. Enterococcal superinfection in patients treated with ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Jan; 21(1): 113- 5.

18. Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclerco R. Development of fluoroquinolone resistance Enterococcus faecalis and role of mutations in the DNA Gyrase gyrA gene. Antimicrobial Agents Chemother. 1996 Nov; 40(11): 2558-61.

19. Torell E, Kuhn I, Olsson-Liljequist B, Haeggman S, Hoffman B.M, Lindahl C, et al. Clonality among ampicillin-resistant Enterococcus Faecium isolates and relationship with ciprofloxacin resistance. J Clin Microbiol. Infect 2003 Oct; 9(10): 1011-19.

20. Waar K. Pathogenesis of nosocomial infections with Enterococcus faecalis. 2004;Chapter1:13-27.

21. Saunders GL , Bodonaik NC . Resistance in clinical isolates of Enterococcus faecalis encountered at the university hospital of the West Indies, Jamaica. West Indian Med J. 2006 Jun; 55(3): 194-6.

22. Yu D , Yi X , Ma Y , Yin B , Zhou H , Li J ,et al . Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of Enterococcus faecalis in aquatic ecosystems. Chemosphere. 2009 Aug; 76(7): 915-20.

23. Woodford N, Reynolds R , Turton J، Scott F, Sinclair A, Williams A et al. Two widely disseminated strains of Enterococcus faecalis highly resistant to gentamycin and ciprofloxacin from bacteraemias in the UK and Ireland. Antimicrob Agents Chemother 2003 Oct; 52(4): 711-4.

24. Tomayko JF , Murray BE . Analysis of Enterococcus faecalis isolates from intercontinental sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol. 1995 Nov; 33(11): 2903-7.

25. Turabelidze D ,Kotetishvili M, Kreger A , Morris J ,Sulakvelidze A. Improved Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing vancomycin-resistant Enterococci. J Clin Microbiol . 2000 Nov; 38(11): 4242-1