مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹۰ صفحات ۸۵- ۷۸

شیوع انتروکوک مقاوم به آمپی سیلین، جنتامیسین و ونکومایسین در نمونه های مدفوع بیماران بستری شده و سرپائی در سه بیمارستان آموزشی –درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

ابوالفضل وهابی: گروه میکروب و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران : نویسنده رابط
E. mail: a.vahhabi@yahoo.com
آلکا حسنی: گروه میکروب و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و طب گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد رضا نهائی: گروه میکروب و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
صفر فرج نیا: گروه میکروب و ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و طب گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۲/ ۸۸/۹ ، پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و اهداف: عفونت بیمارستانی بوسیله انتروکوک یک معضل مهم در بسیاری از بیمارستان های سراسر دنیا است. درمان انتخابی عفونت های انتروکوکی بطور معمول، بکارگیری ترکیب هم افزائی یک پنی سیلین یا گلیکوپپتید همراه با یک آمینوگلیکوزید (جنتامیسین یا استرپتومایسین) می باشد. کارآئی این درمان ترکیبی با فراوانی سویه های انتروکوک مقاوم به چند دارو مورد تردید است. هدف اصلی این مطالعه تعیین میزان کلونیزاسیون روده ای بوسیله انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک در بیماران بستری شده و همچنین بیماران سرپائی بود.

مواد و روش ها: این مطالعه با گرفتن نمونه مدفوع یا رکتال سوآب اجرا شده است. ایزوله های بدست آمده، بعنوان انتروکوک اثبات شده و تا سطح گونه شناسائی گردیدند. MIC آمپی سیلین، جنتامیسین و ونکومایسین با تکنیک رقیق سازی در آگار و یا E-test تعیین گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت شناسایی ژن های (*vanA* و *vanB*) و همچنین (*انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم*)، اجرا شد.

یافته ها: از میان ۲۹۱ سویه انتروکوک بررسی شده، ۲۴۰ (۸۲/۴٪) از سویه ها مقاوم به جنتامیسین و ۸۴ (۲۸/۸٪) از سویه ها مقاوم به آمپی سیلین بودند. از میان آنها ۱۲ (۱۴/۲٪) از سویه ها مقاومت سطح بالا به آمپی سیلین نشان دادند (MICs, ≥ 256 µg/ml). ۶۳ سویه انتروکوک مقاومت کامل (MICs, ≥ 32 µg/ml) یا حد واسط (MICs, 8-16 µg/ml) به ونکومایسین داشتند. از میان آنها ۱۵ سویه با مقاومت سطح بالا به ونکومایسین (MICs, ≥ 256 µg/ml) و حامل ژن های *vanB* (۳ سویه) /*vanA* (۱۲ سویه) بودند.

نتیجه گیری: فراوانی کلونیزاسیون روده ای انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک بویژه در میان بیماران بخش های پرخطر همچون هماتولوژی/انکولوژی و ICU معضل بزرگ پزشکی است که بهبود فرایند های درمانی را پیشنهاد می‌کند.

کلید واژه ها: انتروکوک، ونکومایسین، مقاومت به آنتی بیوتیک، کلونیزاسیون روده ای

مقدمه

از زمان اولین شناسائی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE) در سال ۱۹۸۸، این باکتری از بیماران بستری شده، افراد سالم و گونه های متعددی از پستانداران، حشرات و منابع طبیعی ایزوله شده است (۱). انتروکوک یکی از عوامل اصلی بیماری و مرگ و میر در میان بیماران بستری شده در ایالات متحده می باشد و سویه های انتروکوک بعنوان دومین پاتوژن شایع در بیمارستان های ایالات متحده در سال های ۲۰۰۷-۲۰۰۶ شناخته شده اند (۲). انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین باکتری های کلونیزه کننده مجرای معده ای-روده ای هستند که بدلیل توانائی مقاومت به آنتی بیوتیک های متعدد، یکی از عوامل مهم در عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند (۳). میزان فراوانی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین به همراه عفونت های بالینی جدی آن در طول ۱۵ سال گذشته در سراسر دنیا افزایش یافته و بنابراین جهت جلوگیری از انتشار بیشتر آن روش های فعال کنترل بصورت روزافزون در بیمارستان ها توسعه پیدا کرده است (۴).

یکی از دلایل اصلی حیات این باکتری در محیط های بیمارستانی، مقاومت ذاتی این ارگانیسم به بسیاری از آنتی بیوتیک های معمول و شاید مهم تر از آن توانائی این ارگانیسم جهت کسب مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد مصرف، بوسیله موتاسیون و یا دریافت ماده ژنتیکی خارجی از طریق انتقال پلاسمید یا ترانسپوزون می باشد (۵). با توجه به اینکه انتروکوک ها نسبت به فعالیت باکتریسیدال آنتی بیوتیک های بتالاکتام و گلیکوپپتید تحمل یا تولرانس نشان می دهند، لذا خاصیت سینرژیسم یا هم افزائی بین یکی از این آنتی بیوتیک ها و یک آمینوگلیکوزید برای درمان عفونت های وخیم و جدی انتروکوکی همچون اندوکاردیت و منتژیت بکار گرفته می شود. البته در صورت وجود مقاومت سطح بالا به هریک از این آنتی بیوتیک ها، ویژگی هم افزائی بین آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید و بتالاکتام یا گلیکوپپتید از میان خواهد رفت (۶، ۵).

مقاومت کامل و یا نسبی به بتالاکتام ها یک ویژگی شناخته شده برای جنس انتروکوک می باشد. مکانیسم اصلی برای این مقاومت، تولید یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین بنام Penicillin Binding Protein-5 (PBP-5)، با میل ترکیبی پائین به پنی سیلین می باشد (۷). مقاومت انتروکوک به آمینوگلیکوزیدها مربوط به حضور یک آنزیم با دو عملکرد مختلف (آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز و آمینوگلیکوزید فسفوترانسفراز) می باشد. این آنزیم، مقاومت سطح بالا به جنتامیسین وآمینوگلیکوزیدهای دیگر غیر از استرپتومایسین را القاء می کند (۸). مقاومت انتروکوک به ونکومایسین، با حضور گروه های ژنی مختلفی همچون *vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG* ایجاد می شود. *vanA*، ژنوتیپ غالب مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین محسوب شده و توانائی انتقال ویژگی (مقاومت به ونکومایسین) را به پاتوژن های دیگر همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین دارد. ژنوتیپ *vanB* سطوح مختلفی از مقاومت به ونکومایسین را القاء می کند در حالیکه این سویه ها نسبت به تیکوپلانین حساس می باشند (۹،۱۰). با توجه به اینکه انتروکوک بخشی از فلور طبیعی روده انسان و همچنین فلور دستگاه تناسلی خانم ها محسوب می شود لذا اکثر عفونت های ایجاد شده بوسیله این ارگانیسم را با فلور اندوژن بیمار مرتبط می دانند (۱۱)، لذا کمیته های کنترل عفونت بیمارستانی، بررسی نمونه های مدفوع و یا رکتال سوآب بیماران بستری شده در بخش های پرخطر بیمارستانی (High Risk Wards)، را جهت شناسائی اولیه بیماران کلونیزه شده با انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک و پیشگیری از انتقال های شخص به شخص و انتشار عفونت های بیمارستانی با این باکتری ها ضروری

می‌دانند (۸). بنظر می رسد تاکنون، مطالعه مستندی در موضوع اپیدمیولوژی و فراوانی انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک در داخل و یا خارج محیط های بیمارستانی در شهر تبریز و منطقه شمال غرب کشور انجام نشده است. از اینرو این طرح تحقیقاتی، جهت ارزیابی میزان کلونیزاسیون روده ای توسط انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک در میان بیماران بستری شده در بخش‌های پرخطر بیمارستانی و همچنین گروهی از بیماران سرپائی در دانشگاه علوم پزشکی تبریز برنامه ریزی و اجراء گردید. مطابق اطلاعات موجود، این اولین مطالعه ای است که جهت ارزیابی میزان کلونیزاسیون و تعیین فراوانی ناقلین روده ای انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک در دانشگاه علوم پزشکی تبریز اجرا می‌شود.

مواد و روش‌ها

بررسی میزان فراوانی: این مطالعه با گرفتن نمونه مدفوع یا رکتال سوآب از بیماران بستری شده در مراکز آموزشی درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (سینا، کودکان و شهید قاضی طباطبائی) آغاز گردید. در مدت ۹ ماه (از خرداد ماه ۱۳۸۶ تا فروردین ماه ۱۳۸۷)، از تمام بیمارانی که حداقل ۷۲ ساعت در بخش های ICU (۹۳ نفر)، هماتولوژی/انکولوژی (۱۰۸ نفر) و سوختگی (۹۹ نفر) در بیمارستان های هدف، بستری شده بودند نمونه مدفوع یا رکتال سوآب گرفته شد. بیماران بخش همودیالیز (۴۰ نفر)، بیماران مراجعه کننده به درمانگاه هماتولوژی/انکولوژی (۵۵ نفر) و درمانگاه عفونی (۳۷ نفر) بعنوان بیمار سرپائی در نظر گرفته شده و نمونه برداری گردیدند. نمونه های رکتال سوآب (۳۰۹ نمونه) و یا مدفوع (۱۲۳ نمونه) تهیه شده از بیماران، جهت ایزولاسیون انتخابی انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد نظر به آزمایشگاه میکروب شناسی انتقال داده شد. در این مطالعه از بیمارانی که مبتلا به اسهال بودند نمونه برداری انجام نشد و این بیماران از مطالعه حذف گردیدند.

جداسازی انتروکوک از مدفوع و تعیین هویت بیوشیمیائی: با هدف ایزولاسیون اختصاصی انتروکوک، نمونه های مدفوع و یا رکتال سوآب اخذ شده از بیماران، در محیط های کشت انتخابی شامل (بایل اسکولین آزاید آگار و بایل اسکولین آزاید براث) تلقیح شدند. در این مرحله، تکنیک های کشت مستقیم نمونه در محیط جامد (Direct plating)، و روش غنی سازی نمونه در محیط مایع (Enrichment)، بصورت موازی و همزمان برای تمام نمونه ها اجرا گردید. تمامی پلیت ها و لوله های تلقیح شده در شرایط هوازی و دمای ۳۷–۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، لوله های دارای واکنش بایل اسکولین مثبت (سیاه رنگ شدن محیط براث) بر روی پلیت های محتوی محیط جامد ساب کالچر شدند (۱۲،۱۳،۱۴). در نهایت از هر پلیت، کلنی های شبیه به انتروکوک با ویژگی (هاله سیاه رنگ اطراف کلنی)، با بکارگیری آزمون های مقدماتی مثل رنگ آمیزی گرم، واکنش کاتالاز، رشد در ۶/۵٪ نمک و واکنش بایل اسکولین بطور اولیه بعنوان انتروکوک شناسائی شدند. این کلنی ها با بررسی ویژگی های فیزیولوژیک مختلف همچون: موتیلیتی، واکنش PYR ، تولید اسید از قند های گلوکز، مانیتول، سوربیتول، آرابینوز، رافینوز و سوکروز، هیدرولیز آرژینین و تحمل تلوریت بعنوان کلنی انتروکوک تائید شده و بر اساس نتایج تست های میکروبیولوژیک انجام گرفته تا حد گونه شناسائی شدند (۱۵،۱۶).

تکنیک غربالگری: پلیت های بایل اسکولین آزاید آگار حاوی غلظت های انتخابی شامل 8 ,16 µg/ml آمپی سیلین،120 µg/ml جنتامیسین و 4 , 6 , 8 µg/ml ونکومایسین با شرایط استاندارد توصیه شده توسط CLSI بصورت جداگانه تهیه گردید. با هدف ارزیابی اولیه میزان حساسیت سویه های انتروکوک ایزوله شده از نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب به آنتی بیوتیک های مورد بررسی و غربالگری مقدماتی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، کلنی های ۲۴ ساعته و جوان انتروکوک بر روی پلیت های محتوی آنتی بیوتیک بصورت جداگانه تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند (۱۴،۱۷،۱۸). پس از پایان انکوباسیون، سویه های انتروکوک رشد کرده در محیط کشت حاوی 16 µg/ml آمپی سیلین (۹۶ سویه)، 120 µg/ml جنتامیسین (۲۶۸ سویه) و 8 µg/mlونکومایسین (۱۴۲ سویه) بصورت اولیه بعنوان سویه های انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد بررسی انتخاب شدند تا در مراحل بعد، مقاومت آنها با آزمون های اختصاصی همچون تعیین MIC و تکنیک PCR تایید و اثبات گردد.

ارزیابی حساسیت به آنتی بیوتیک: با تهیه رقت های سریال بین ۰/۵ تا ۲۵۶ میلی گرم در لیتر از ونکومایسین و آمپی سیلین و رقت های سریال بین ۰/۵ تا ۱۰۲۴ میلی گرم در لیتر از جنتامیسین، حداقل غلظت مهاری (MIC) این آنتی بیوتیک ها برای سویه های انتروکوک ایزوله شده، با تکنیک استاندارد رقیق سازی در آگار تعیین گردید. نتایج MIC بدست آمده برای سویه های مقاوم، با استفاده از روش E-test نیز آزموده شده و مقاومت این سویه ها مورد تائید قرار گرفت (۱۷،۱۸).

جستجوی ژن های اختصاصی *vanA, vanB, E. faecalis, E. faecium*: برای تکثیر ژنهای *vanA* و *vanB* و همچنین ژن های اختصاصی گونه های *E. faecalis, E. faecium* الگوی پرایمر های الیگونوکلئوتیدی بکار رفته و منتشر شده در مطالعه Kariyema و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). جهت استخراج DNA، از روش جوشاندن سوسپانسیون باکتریائی و سپس سانتریفوژ آن به مدت ۱۵ دقیقه در 1500 g استفاده گردید. مایع روئی حاصل از سانتریفوژ، محتوی DNA باکتری بوده و بعنوان الگو برای انجام واکنش PCR بکار گرفته شد (۱۳). برای انجام واکنش PCR، در این مطالعه کمپلکس PCR با ترکیب زیر طراحی گردید:

PCR buffer (سیناژن–ایران)، 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (سیناژن–ایران)، 0.5 µM از هریک از پرایمر های مستقیم و معکوس (بیونر–کره)، 1.5 mM MgCl2، 2.5 U Taq DNA polymerase (سیناژن–ایران) و ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده از سویه انتروکوک بعنوان DNA الگو.

فرایند آمپلیفیکاسیون DNA بر روی دستگاه ترمال سیکلر مدل (ASTEC) و مطابق برنامه زیر به اجرا درآمد: دناتوراسیون اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، سیکل اصلی با ۴۰ بار تکرار شامل (دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه برای ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه برای ۶۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۲ دقیقه. محصول بدست آمده از فرایند آمپلیفیکاسیون بر روی ژل آگاروز ۱٪ در 0.5X TBE در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندهای اختصاصی *vanA* (۱۰۳۰ bp)، *vanB* (۴۳۳ bp)، *انتروکوکوس فکالیس* (۹۴۱ bp) و *انتروکوکوس فیسیوم* (۶۵۸ bp) درکنار سایز مارکر (1Kb DNA Ladder) جستجو و شناسائی شدند. لازم به ذکر است که نتایج بدست آمده در مراحل مختلف مطالعه با بهره گیری از نرم افزار آماری SPSS –۱۴ مورد بررسی قرار گرفته و بصورت توصیفی (گزارش فراوانی و درصد) ارائه گردید.

یافته‌ها

جداسازی انتروکوک: در این مطالعه، مجموعا" ۴۳۲ بیمار از بخش های مختلف شرکت داشتند که شامل ۳۰۰ بیمار بستری شده و ۱۳۲ بیمار سرپائی بودند. با توجه به اینکه بیشتر بیماران شرکت کننده در این مطالعه، بیماران بستری بدحال بودند لذا اکثر موارد نمونه برداری بصورت رکتال سوآب (۳۰۹ مورد) بوده و تهیه نمونه مدفوع (۱۲۳ مورد)، محدود به تعداد اندکی از بیماران می شد. بیشترین افراد بررسی شده در این مطالعه، بیماران بخش هماتولوژی/انکولوژی بودند. ارگانیسم های شبیه انتروکوک با

ویژگی هاله سیاه رنگ اطراف کلنی بر روی محیط کشت جامد بایل اسکولین آزاید آگار از ۳۰۰ (۷۶٪) نمونه مدفوع و یا رکتال سوآب ایزوله گردید. در ادامه کار، با بکارگیری تست های میکروبیولوژیک مختلف، ۹ ایزوله بعنوان (کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی غیر انتروکوک) شناسائی شده و از ادامه مطالعه حذف گردیدند.

شناسائی: تمام ۲۹۱ سویه انتروکوک در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و محیط حاوی ۶/۵٪ NaCl رشد کرده و واکنش های PYR و آرژینین دهیدرولاز مثبت داشتند و هیچیک از سویه ها پیگمان زرد رنگ تولید نکردند. نزدیک به ۷۰٪ سویه های انتروکوک قادر به تحمل تلوریت بوده و پس از کشت در محیط حاوی تلوریت پتاسیم کلنی های کوچک تیره رنگ ایجاد کردند. در مجموع با اجرای تست های میکروبیولوژیک متعدد، ۱۸۹(۶۴/۹٪) سویه بعنوان *انتروکوکوس فکالیس* و ۸۶(۲۹/۵٪) سویه بعنوان *انتروکوکوس فیسیوم* شناسائی شدند. شناسائی و تعیین گونه برای ۱۶ (۵/۵٪) سویه انتروکوک، با تست های میکروبیولوژیک انجام گرفته در این مطالعه ممکن نشد و لذا این سویه ها به عنوان سویه های *انتروکوکوس غیرفکالیس/غیر فیسیوم* مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی حساسیت به آنتی بیوتیک: جهت بررسی و اثبات مقاومت سویه های انتروکوک به آنتی بیوتیک های مورد نظر، تعیین MIC با روش های رقیق سازی در آگار و یا E-test انجام شد. از میان ۲۹۱ سویه انتروکوک ایزوله شده در این طرح، ۸۴ سویه (۲۸/۸٪) مقاومت کامل به آمپی سیلین را نشان دادند (MICs, ≥ 16 µg/ml) که از این تعداد، ۱۲ سویه مقاومت سطح بالا به آمپی سیلین داشتند (MICs, ≥ 256 µg/ml). بیشترین سویه های مقاوم به آمپی سیلین از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه انکولوژی بیمارستان کودکان ایزوله گردید (۴۵ سویه مقاوم به آمپی سیلین از مجموع ۹۹ سویه انتروکوک). ۲۴۰ سویه (۸۲/۴٪) مقاوم به جنتامیسین بودند (MICs, ≥ 16 µg/ml)، که بیماران بخش های دیالیز بیمارستان سینا (۲۴ سویه مقاوم)، ICU سوختگی بیمارستان سینا (۱۵ سویه مقاوم) و NICU بیمارستان کودکان (۶ سویه مقاوم) بیشترین مقاومت را به جنتامیسین داشتند بطوریکه تمام سویه های انتروکوک ایزوله شده از این بخش ها مقاوم به جنتامیسین بودند. نتایج تعیین MIC، مقاومت به ونکومایسین را برای ۶۳ سویه انتروکوک جدا شده نشان داد که از این تعداد، ۱۵ سویه مقاومت کامل به ونکومایسین داشتند (MICs, ≥ 32 µg/ml) شامل (۹ سویه مقاوم از انکولوژی بیمارستان کودکان)، (۳ سویه مقاوم از PICU بیمارستان کودکان) و (۳ سویه مقاوم از ICU سوختگی بیمارستان سینا). ۴۸ سویه دیگر سویه های دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین بودند (MICs, 8-16 µg/ml)، (شکل ۱، جدول ۱، جدول ۲).

تعیین مکانیسم مقاومت به ونکومایسین: جستجوی ژنوتیپ های عامل مقاومت به گلیکوپپتید، با بکارگیری تکنیک PCR، مقاومت به ونکومایسین را در ۶۳ سویه انتروکوک که مقاومت آنها با روش های فنوتیپی (تعیین MIC) نیز مشخص شده بود اثبات کرد. این سویه ها شامل ۱۵ سویه *انتروکوکوس فیسیوم* با ژنوتیپ *vanA* (۱۲ سویه) و *vanB* (۳ سویه) بودند که مقاومت کامل به ونکومایسین داشتند (MICs, ≥ 32 µg/ml). ۴۸ سویه دیگر که مقاومت حد واسط به ونکومایسین نشان داده بودند دارای ژنوتیپ های *vanA* یا *vanB* و متعلق به سویه های *انتروکوکوس فکالیس* یا *انتروکوکوس فیسیوم* بودند. در این میان، ۹ سویه انتروکوک که با روش های فنوتیپی، مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند با روش PCR حامل ژن های *vanA* یا *vanB* نبودند. در مجموع، تکنیک PCR، وجود ۲۴ ژنوتیپ *vanA* و ۳۰ ژنوتیپ *vanB* را در۶۳ سویه VRE ایزوله شده از نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب اثبات کرد (شکل ۲).

جدول ۱: نتیجه تعیین MICs برای آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، جنتامیسین و ونکومایسین

آنتی بیوتیک	حساس	حد واسط	مقاوم
آمپی سیلین	۲۰۷ (۷۱/۱)	_	۸۴ (۲۸/۸)
جنتامیسین	۳۹ (۱۳/۴)	۱۲ (۴/۱)	۲۴۰ (۸۲/۴)
ونکومایسین	۲۲۸ (۷۸/۳)	۴۸ (۱۶/۵)	۱۵ (۵/۱)

اعداد بصورت فراوانی (درصد) نمایش داده شده است.

جدول ۲: مقایسه سویه های انتروکوک مقاوم به آمپی سیلین، جنتامیسین و ونکومایسین براساس تعیین MICs

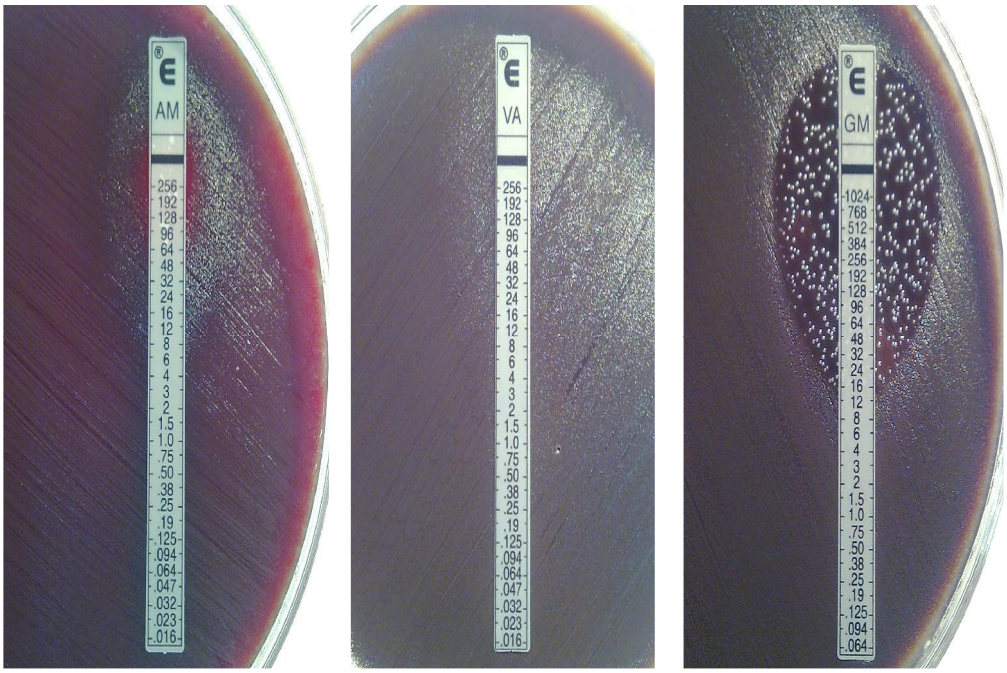
انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک	ARE	GRE	VRE
ARE (۸۴)	_	۷۸(۹۲/۸)	۱۵(۱۷/۸)
GRE (۲۴۰)	۷۸(۳۲/۵)	_	۱۲(۵/۰)
VRE (۱۵)	۱۵(۱۰۰)	۱۲(۸۰)	_

* اعداد بصورت فراوانی (درصد) نمایش داده شده است.
ARE : انتروکوک مقاوم به آمپی سیلین
GRE : انتروکوک مقاوم به جنتامیسین
VRE : انتروکوک مقاوم به ونکومایسین

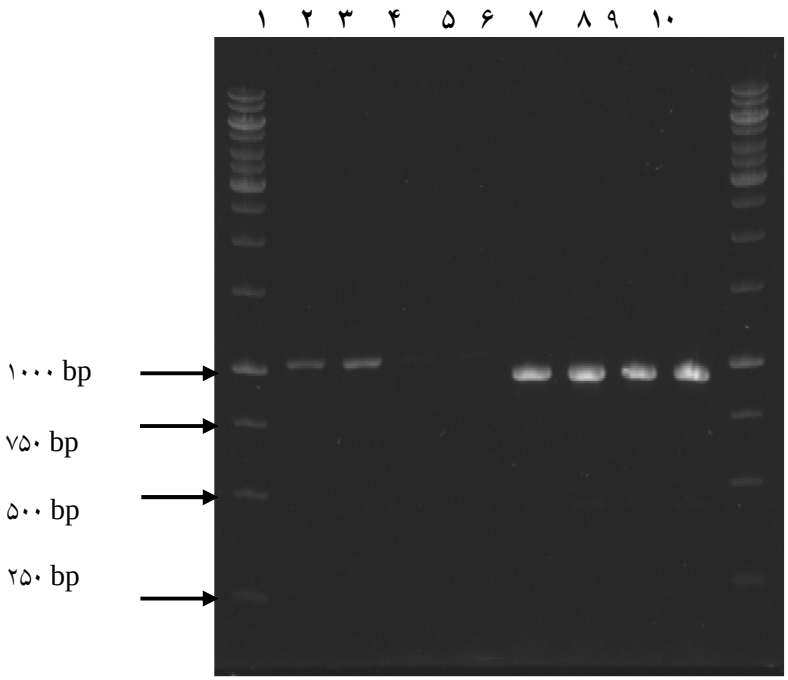
جدول ۳: فراوانی انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک در میان بیماران بستری شده و سرپائی

بیماران بررسی شد ه	ARE	GRE	VRE
(۲۲۱) بیماران بستری شده	۷۲(۳۲/۵)	۱۸۲(۸۲/۳)	۱۵(۶/۷)
(۷۰) بیماران سرپائی	۱۲(۱۷/۱	۵۸(۸۲/۸)	_
(۲۹۱) کل بیماران مورد مطالعه	۸۴(۲۸/۸)	۲۴۰(۸۲/۴)	۱۵(۵/۱)

* اعداد بصورت فراوانی (درصد) نمایش داده شده است.
ARE : انتروکوک مقاوم به آمپی سیلین
VRE : انتروکوک مقاوم به ونکومایسین
GRE : انتروکوک مقاوم به جنتامیسین



شکل ۱: انتروکوک مقاوم به آمپی سیلین، ونکومایسین و جنتامیسین
بر اساس تعیین MICs به روشE-test



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد: ستون های یک و ده، سایز مارکر(۱Kb)، ستون های دو و سه *vanA* (۱۰۳۰bp)، ستون های چهار و پنج، ایزوله های *vanA/vanB* منفی، ستون های *شش* ، *هفت و هشت* *انتروکوکوس فکالیس* (۹۴۱bp)، ستون نه ، سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212) (۹۴۱bp)

بحث

بنظر می‌رسد اطلاعات کمی از اپیدمیولوژی و میزان کلونیزاسیون روده ای و یا عفونت های انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک بویژه آنتی بیوتیک های انتخابی همچون (پنی سیلین ها، آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها) در داخل و خارج محیط های بیمارستانی در ایران در دسترس می باشد. از اینرو درمان عفونت های انتروکوکی معمولا" بدون اطلاع از میزان واقعی مقاومت

باکتری به آنتی بیوتیک مورد استفاده و صرفا" بصورت درمان تجربی و بکارگیری آنتی بیوتیک های انتخابی انجام می شود. نتیجه تجربیات مختلف نشان می دهد از آنجا که سویه های انتروکوک مقاوم به درمان می توانند بعنوان بخشی از فلور طبیعی در روده بیماران بستری در بیمارستان و یا بیماران غیر بستری مستقر شوند لذا می توان ادعا کرد که کلونیزاسیون روده ای مهمترین و معمول ترین مسیر انتشار این باکتری ها محسوب می گردد (۱۱).

در این مطالعه، میزان کلونیزاسیون روده ای یا به عبارت بهتر، فراوانی ناقلین روده ای انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک های (آمپی سیلین، جنتامیسین و ونکومایسین) که در درمان ترکیبی عفونت های انتروکوکی بکار گرفته می شوند در میان بیماران بستری شده و همچنین گروهی از بیماران سرپائی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این طرح تحقیقاتی نشان می دهد که میزان حساسیت به هر سه آنتی بیوتیک مورد بررسی در سویه های انتروکوک ایزوله شده از نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب کاهش قابل توجهی داشته است. با وجود اینکه در مجموع سویه های ایزوله شده از بیماران بستری شده و سرپائی، مقاومت متوسط (۲۸/۸٪) به آمپی سیلین مشاهده شد، اما سویه های انتروکوک ایزوله شده از هر دو گروه بیماران بستری شده و سرپائی، مقاومت بسیار بالای بیش از ۸۰ درصدی به جنتامیسین از خود نشان دادند. مقاومت کامل این سویه ها به ونکومایسین بعنوان یک آنتی بیوتیک اصلی و بسیار مهم در درمان عفونت های انتروکوکی با اجرای روش فنوتیپی تعیین MIC، حدود ۵٪ بود با اینحال تعداد بیشتری از سویه های انتروکوک، مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند. بررسی مقاومت به ونکومایسین با روش ژنوتیپی و جستجوی ژن های اختصاصی *vanA* و *vanB* با تکنیک PCR، وجود مقاومت کامل به ونکومایسین را در ۱۵ سویه انتروکوک ثابت کرد که همگی آنها *انتروکوکوس فیسیوم* و دارای ۱۲ ژنوتیپ *vanA* و ۳ ژنوتیپ *vanB* بودند.

با وجود اینکه بررسی نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب در بیماران بخش های پرخطر جهت شناسائی اولیه انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک بویژه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE)، توسط سازمان های بهداشتی و مقالات معتبر بین المللی مورد تاکید قرار گرفته است و علیرغم اهمیت بررسی نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب بیماران بستری در بخش های پرخطر جهت شناسائی کلونیزاسیون روده ای بوسیله این باکتری ها، تکنیک استاندارد و مورد توافقی جهت اجرای آن وجود ندارد از اینرو در مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا تکنیک ها و متدهای مختلفی جهت بررسی بکار رفته است (۵،۹،۱۱،۱۲،۱۴،۱۹،۲۰،۲۱) و همین امر مقایسه نتایج بدست آمده در تحقیقات مختلف را با مشکل مواجه می کند. با اینحال مطالعات متعدد، کاهش روزافزون حساسیت به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها بویژه آنتی بیوتیک های انتخابی را در سویه های انتروکوک تائید می کنند. Gordts و همکاران در بلژیک در سال ۱۹۹۵، ناقلین روده ای VRE را ۳/۵٪ گزارش کردند که ۸۲٪ سویه ها مقاومت سطح بالا و ۱۸٪ مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند، در این مطالعه مقاومت سویه های VRE به آمپی سیلین و جنتامیسین نیز بررسی شده است که نشان می دهد ۶۳٪ از سویه های VRE مقاوم به آمپی سیلین و ۱۰۰٪ سویه های VRE مقاوم به جنتامیسین بوده اند (۱۱). Gamborattoo و همکاران در سال ۲۰۰۰ کلونیزاسیون روده ای VRE را در فرانسه بررسی کرده وفراوانی آن را ۳۷٪ در بیماران بستری شده در بخش هماتولوژی و ۱۱/۸٪ در میان بیماران سرپائی گزارش کرده اند (۱۳). Iven و همکاران در سال ۱۹۹۹ در بلژیک، ناقلین روده ای VRE را ۱۲/۸٪ گزارش کردند (۱۴)، همان سال در انگلستان Taylor و همکاران کلونیزاسیون روده ای VRE را ۱۲/۲٪ گزارش کردند که شامل ۵۹٪ ژنوتیپ *vanA* و ۴۱٪ ژنوتیپ *vanB* می باشد. در این مطالعه مقاومت در بیماران بستری ۷۳٪ و در بیماران سرپائی ۲۷٪ گزارش شده است (۲۰). Gikas و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۵، ناقلین روده ای VRE را ۲۰/۵٪ گزارش کردند (۲۱). در سال ۲۰۰۳ در یک تحقیق گسترده در سطح اروپا، میزان فراوانی انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک، در نمونه های رکتال سوآب و نمونه های مختلف بالینی ارزیابی شده است این تحقیق میزان متوسط مقاومت به ونکومایسین را درسطح کشورهای مورد مطالعه، (در نمونه های بالینی ۲/۹٪ و در نمونه های مدفوع ۳/۵٪) برآورد کرده است که مقاومت در نمونه های مدفوع شامل ۳/۳٪ ژنوتیپ *vanA* و ۰/۳٪ ژنوتیپ *vanB* بوده است. در این مطالعه مقاومت سویه های *vanA* ایزوله شده از نمونه های مدفوع، به آمپی سیلین ۸۹٪ و مقاومت این سویه ها به جنتامیسین ۸۰٪ بوده است (۲۲).

در ایران مطالعات کم شمار موجود در این زمینه عمدتا" بر روی انتروکوک های ایزوله شده از نمونه های بالینی و گاهی بر روی سویه های ایزوله شده از نمونه های فاضلاب شهری متمرکز بوده (۲۳،۲۴)، و بررسی ناقلین روده ای انتروکوک در محیط های بیمارستانی و یا افراد جامعه، بسیار محدود بوده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده، کلونیزاسیون روده ای سویه های VRE در میان بیماران بستری شده در بخش های مختلف بیمارستان نمازی شیراز، با تعیین MIC به روش رقیق سازی در آگار بررسی شده و ۱۴/۱٪ از این بیماران ناقل روده ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین شناخته شده اند که البته تمام ۹۹ سویه مقاوم به ونکومایسین، مقاوم به پنی سیلین، آمپی سیلین و جنتامیسین نیز بوده اند (۲۵). در مطالعه حاضر در دانشگاه علوم پزشکی تبریز، میزان ناقلین روده ای VRE براساس انجام PCR و شناسائی ژن های *vanA* و *vanB* ، ۱۸/۵ بوده که ۳۸٪ این سویه ها ژنوتیپ *vanA* و ۴۷٪ آنها ژنوتیپ *vanB* داشتند. مقاومت کامل به ونکومایسین عمدتا" در ژنوتیپ *vanA*، مشاهده گردید واکثر سویه های *vanB*، مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند واین موضوع یعنی فراوانی سویه های *vanB* که مقاومت

پائین تا مقاومت سطح بالا به ونکومایسین را القاء می کنند در سال های اخیر، در مطالعات مشابه دیگر نیز مورد تاکید واقع شده است. در بررسی مقاومت به آمپی سیلین وجنتامیسین در میان سویه های VRE ایزوله شده، ۱۰۰٪ این سویه ها مقاوم به آمپی سیلین و ۸۰٪ آنها مقاوم به جنتامیسین بودند که با نتایج مطالعات مشابه همخوانی دارد (۱۱،۲۲). توزیع سویه های انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک، در بخش های بیمارستانی مورد بررسی در این مطالعه، یکنواخت نبود. تمام سویه های انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین از بیماران بستری شده در بخش های هماتولوژی/ انکولوژی و ICU ایزوله گردید و میزان فراوانی این سویه ها در مجموع بیماران مورد مطالعه، ۵/۱ ٪ بود همچنانکه اکثر مطالعات انجام شده در محیط های بیمارستانی، فراوانی بالای سویه های انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک را در بخش های هماتولوژی/انکولوژی، بخش های مراقبت ویژه و در میان بیماران دریافت کننده بافت پیوندی اثبات کرده اند (۱۰،۱۱،۱۳،۲۲). در این مطالعه مقاومت کامل به ونکومایسین در بخش های عفونی، سوختگی و در میان بیمارانی که تحت عنوان بیمار سرپائی مورد بررسی قرار گرفتند مشاهده نشد با اینحال سویه هایی با مقاومت حد واسط به ونکومایسین از این بیماران ایزوله گردید. مقاومت به آمپی سیلین در بیماران بستری شده در بخش های مورد بررسی و بیماران سرپائی تفاوت آشکاری داشت بطوریکه مقاومت در میان بیماران سرپائی (۱۸/۵٪)، بوضوح از بیماران بستری شده (۳۲/۵٪)، کمتر بود. در مقابل، مقاومت به جنتامیسین در میان بیماران بستری شده و سرپائی نسبت بالای بیش از ۸۰ درصدی داشت و تقریبا" بطور یکنواخت در تمام بیماران مورد مطالعه مشاهده گردید. نسبت بالای مقاومت به جنتامیسین در میان سویه های انتروکوکوک بویژه سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در مطالعات مشابه دیگر نیز تائید شده است (۲۵، ۲۲، ۱۱).

نتیجه گیری

همانطور که پیشتر اشاره گردید انتروکوک فلور طبیعی روده انسان بوده و لذا اکثر عفونت های این باکتری، ممکن است از فلور روده ای بیمار منشاء بگیرند لذا کلونیزاسیون روده ای می تواند مهمترین و معمول ترین مسیر برای انتشار این باکتری ها محسوب شود، از سوی دیگر شرایط خاص بیماران کلونیزه شده یا مبتلا به عفونت انتروکوکی بگونه ای است که در اکثر موارد بدلیل دارا بودن بیماری زمینه ای وخیم و شرایط بحرانی، نیازمند درمان سریع و قطعی عفونت انتروکوکی می باشند، از اینرو با آگاهی از مشکلات خاص بیماران و لزوم انجام تدابیر درمانی ویژه در عفونت های انتروکوکی، افزایش میزان ناقلین روده ای این باکتری در بیمارستان ها (بعنوان یک منبع بالقوه از باکتری های مقاوم) می تواند هشداری بسیار جدی برای انتشار این سویه ها و فراوانی اپیدمی های بیمارستانی توسط آنها بویژه در میان بیماران پرخطر باشد. لذا اجرای برنامه های دوره ای و منظم کشت نظارتی توسط کمیته های کنترل عفونت بیمارستانی بر روی نمونه های مدفوع یا رکتال سوآب بیماران بستری شده در بیمارستان بویژه بیماران دارای شرایط خاص همچون بیماران بخش های مراقبت های ویژه، انکولوژی، همودیالیز، بیماران با دوره طولانی بستری در بیمارستان و یا دوره های طولانی مصرف آنتی بیوتیک، و ایجاد شرایط لازم جهت اجرای این طرح در آزمایشگاه های بیمارستانی جهت آگاهی از میزان کلونیزاسیون روده ای انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک ضروری بنظر می رسد.

References

1. Novais C, Freitas AR, Sousa JC, Baquero F, Coque TM, Peixe1 LV. Diversity of Tn1546 and Its Role in the Dissemination of Vancomycin-Resistant Enterococci in Portugal. *Antimicrob Agent Chemother* 2008; **52**(3): 1001-1008.
2. Donabedian SM, Perri MB, Abdujamilova N, Gordoncillo MJ, Naqvi A, Reyes KC, etal. Characterization of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from Swine in Three Michigan Counties. American Society for Microbiology and/or the Listed Authors/Institutions, 2010, *J Clin Microbio*, doi:10.1128/JCM.02346-09. (JCM Accepts, published online ahead of print on 25 August 2010).
3. Mak A, Miller MA, Chong G, Monczak Y. Comparison of PCR and Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enterococci: Highly Disparate Results for vanA and vanB. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(12): 4136-4137.
4. Peltroche-Llacsahuanga H, Top J, Weber-Heynemann J, Lutticken R, Haase G. Comparison of Two Chromogenic Media for Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci from Stool Specimens. *J Clin Microbial* 2009; **47**(12): 4113-4116.
5. Clevel DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbial Infect Dis* 1990; **9**: 90-102.
6. Murray BE. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clin Microbial Rev* 1990; **3**(1): 45-65.
7. Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJL. Molecular Characterization of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Hospitalized Patients in Norway. *J Clin Microbial* 2003; **41**(6): 2330-2336.
8. Daikos GL, Bamias G, Kattamis C, Zervos MJ, Chow JW, Christakis G, etal. Structures, Locations, and Transfer Frequencies of Genetic Elements Conferring High-Level Gentamicin Resistance in

Enterococcus faecalis Isolates in Greece. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; **47**(12): 3950-3953.
9. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbial* 1995; **33**(1): 24-27.
10. Cetinkaya Y, FAlk P, Glen Mayhall C. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbial Rev* 2000; **13**(4): 686-707.
11. Gordst B, VanLanduyt H, Ieven M, VanDamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbial* 1995; **33**(11): 2842-2846.
12. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbial* 1997; **35**(9): 2325-2330.
13. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, 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**(2): 620-624.
14. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, VanLaer F, Goossens H. Comparision of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999; **37**(5): 1436-1440.
15. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbial* 1989; **27**: 731-734.
16. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Envirom Microbio* 1999; **65**(10): 4425-4430.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard: 6th ed. CLSI document M7-A7, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne 2006; 69-78.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests: 16th informational supplement. CLSI document M100-S16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne 2006; 95.
19. 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; **38**(8): 3093-3095.
20. Taylor ME, Oppenheim BA, Chadwick PR, Weston D, Palepout MFI, Woodford N, et al. Detection of glycopeptide-resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. *J Hosp Infect* 1990; **43**: 25-32.
21. Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikoladis P, Skoutelis A, levidiotou S, etal. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant Enterococci in Greek hospitals. *J Clin Microbial* 2005; **43**(11): 5796-5799.
22. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrobiol Chem* 2003; **51** Suppl 3: 35-42.
23. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie R. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistant genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal* 2007; **11**(3): 161-167.
24. Feizabadi MM, Asadi S, Zohari M, Gharavi S, Etemadi G. Genetic characterization of high-level gentamicin resistant strains of *Enterococcus facials* in Iran. *Canadian J Microbiol* 2004*;* **50**: 869-872.
25. Askarian M, Afkhamzadeh R, Monabbati A, Daxboek F, Assadian O. Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. *Inter J Infect Dis* 2008; **12**: 171-175.