

## Isolation and Antibiotic Susceptibility Pattern among Vancomycin Resistant Enterococci Isolated from Clinical Samples of Different Parts of Rasoul-E-Akram Hospital

Arbabi L<sup>1</sup>, Boustanshenas M<sup>1</sup>, Adabi M<sup>1</sup>, Fathizadeh S<sup>1</sup>, Rasouli koohi S<sup>1</sup>, Afshar M<sup>1</sup>, Rahbar M<sup>1,2</sup>, Majidpour A<sup>1,3</sup>, Talebi M<sup>4</sup>, Talebi-Taher M<sup>\*1</sup>

1. Antimicrobial Resistance Research Center, Rasoul-e-Akram Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Iranian Reference Health Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

3. Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* **Corresponding author.** Tel: +982166507056 Fax: +982166506864 E-mail: mtalebitaher2000@yahoo.com

Received: Apr 11, 2015

Accepted: Sep 27, 2015

### ABSTRACT

**Background & objectives:** *Enterococci* are among the normal microbial flora in human and animals digestive tract. The nosocomial pathogenicity of enterococci has emerged in recent years and has caused great concern due to developing resistance to many antimicrobial agents. The aim of this study was to investigate and identify the prevalence of VRE (vancomycin resistant enterococcus) within *Enterococci* isolates obtained from different parts of the hospital.

**Methods:** Putative *Enterococci* (n=120) were isolated on Membrane Filter *Enterococcus* Selective Agar Medium and supplemented with 2, 4 and 8 µgr/ml vancomycin in medical samples. A total isolates passed the standard biochemistry tests for the genus and species as well as their specific primers. The antibiotic susceptibility was determined by the disc diffusion method for 8 antibiotics. Microbiologically-influenced corrosion (MIC) of vancomycin was also done using Agar-dilution assay by CLSI recommendations.

**Results:** Results showed that 38 and 84 of the isolates were *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively. According to antimicrobial susceptibility tests 45, 88, 103, 42, 83, 73, 54 and 95 of the isolates were resistant to vancomycin, tetracycline, gentamicin, chloramphenicol, ciprofloxacin, penicillin, ampicillin and erythromycin, respectively. MIC test on 70% of the isolates was >256 µgr/ml.

**Conclusion:** Despite the fact that the prevalence of VRE strains belongs to two species, *E. faecium* had high resistance to a broad range of antibiotics. The results of this study indicate the important role of medical samples as reservoirs of resistance elements. Early detection of VRE with their virulence trait will help in preventing the spread of vancomycin resistant enterococcus species and urgent infection control is required in hospital setting.

**Keywords:** Enterococcus; VRE; Tehran.

# جداسازی و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین از نمونه‌های بدست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستان رسول اکرم (ص) تهران

لیلا اربابی<sup>۱</sup>، مینا بوستان شناس<sup>۱</sup>، مریم آدابی<sup>۱</sup>، سارا فتحی زاده<sup>۱</sup>، سمیرا رسولی کوهی<sup>۱</sup>، مستانه افشار<sup>۱</sup>، محمد رهبر<sup>۲</sup>، علی مجیدپور<sup>۳</sup>، ملیحه طالبی<sup>۴</sup>، مهشید طالبی طاهر<sup>۱\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، بیمارستان رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران ایران ۲. گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران ۳. گروه بیماری‌های عفونی و طب گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران ۴. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران \* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱ ۶۶۵۰۷۰۵۶ فاکس: ۰۲۱ ۶۶۵۰۶۸۶۴ پست الکترونیک: mtalebitaheer2000@yahoo.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** انتروکوک‌ها فلور نرمال دستگاه گوارش انسان، پرندگان و سایر حیوانات هستند که از مهم‌ترین عوامل رایج در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند. توانایی ایجاد مقاومت به چندین آنتی بیوتیک و ظرفیت بالای آنها برای انتقال افقی ژن‌ها؛ این گروه از باکتری‌ها را به یک گروه مناسب و ایده آل برای تحقیق، جهت بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک تبدیل نموده است در تحقیق حاضر مقاومت دارویی گونه‌های مختلف انتروکوک بر علیه ونکومایسین و ۷ آنتی بیوتیک اختصاصی دیگر تعیین گردید.

**روش کار:** ۱۲۰ سوش انتروکوک جدا شده از بیمارستان رسول اکرم شهر تهران جمع آوری گردید. انتروکوک‌ها با روش‌های استاندارد تشخیص داده شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه شناسایی گردیدند. آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها طبق روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI انجام شد. مقاومت دارویی (MIC) با روش آگار دایلووشن بر روی نمونه‌های مقاوم به ونکومایسین تعیین گردید.

**یافته‌ها:** از ۱۲۰ سویه انتروکوک جدا شده از بیماران بخش‌های مختلف بیمارستان رسول اکرم ۷۴ سویه (۶۱٪) *Enterococcus faecalis* و ۴۶ سویه (۳۸٪) *Enterococcus faecium* بودند. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، پنی سیلین، آمپی سیلین و اریترومایسین بترتیب ۳۷٪، ۷۳٪، ۸۶٪، ۳۵٪، ۶۹٪، ۳۱٪، ۴۵٪ و ۷۹٪ بود. ۴۵ سویه (۳۷٪) مقاوم به ونکومایسین بودند. ۷۰٪ از سویه‌ها نیز دارای MIC 256 µg/ml بودند. علیرغم اینکه شیوع سویه‌های VRE متعلق به هر دو گونه بود، اما *E. faecium* بالاترین میزان مقاومت به ونکومایسین را داشت.

**نتیجه گیری:** افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک به خصوص ونکومایسین در میان انتروکوک‌ها، تهدید جدی برای بیمارستان‌های ایران بوده و موجب محدودیت در گزینه‌های درمانی برای بیماران مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان دهنده نقش بسیار مهم نمونه‌های بیمارستانی بعنوان مخازن شاخص‌های مقاومت است، بنابراین باید نسبت به نظارت دقیق بر سیستم بهداشتی و کنترل عفونت جهت جلوگیری از انتشار آن توجه شایانی مبذول داشت.

**واژه‌های کلیدی:** انتروکوک، VRE، تهران

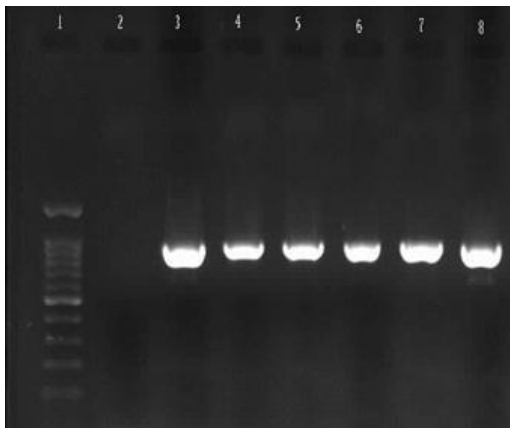
دریافت: ۹۴/۱/۲۲ پذیرش: ۹۴/۷/۵

**مقدمه**

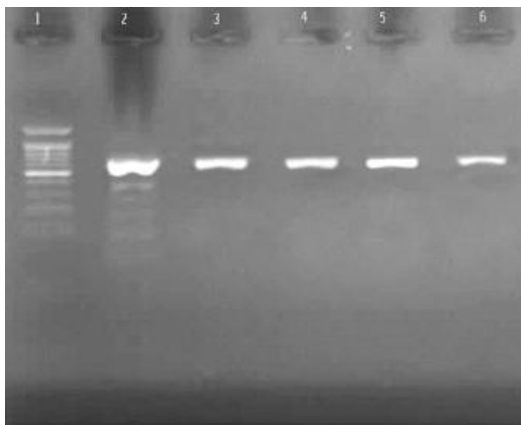
حضور دائمی انتروکوک در دستگاه گوارش انسان و حیوانات به عنوان فلور نرمال، اهمیت بالینی آنها در ایجاد عفونت، توانایی ایجاد مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک و ظرفیت بالای آنها برای انتقال افقی ژن‌ها؛ این گروه از باکتری‌ها را به یک گروه مناسب و ایده‌آل برای تحقیقات اکولوژیک جهت ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تبدیل نموده است (۱،۲). حداقل ۱۲ گونه از انتروکوک‌ها وجود دارند، *E. faecalis* شایعترین آنها بوده و حدود ۸۵ تا ۹۰ درصد از عفونت‌های با انتروکوک را ایجاد می‌نماید (۱،۲). در حالی که *E. faecium* حدود ۱۰-۵٪ از عفونت‌ها را بوجود می‌آورد و ۲-۱٪ از عفونت‌ها توسط *E. gallinarum* و *E. casseliflavus* بوجود می‌آید (۳،۴). انتروکوک‌ها عوامل شایع در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در بخش‌های مراقبت ویژه می‌باشند. از سال ۱۹۷۰ تا کنون انتروکوک‌ها به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی مطرح شده‌اند. حداقل ۱۶ اپیدمی ناشی از انتروکوک‌های چند مقاومتی از سال ۱۹۸۹ تا سال ۱۹۹۸ گزارش شده است که همه آنها به جز دو مورد به دلیل *E. faecium* بوده‌اند. مصرف بی‌رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین استفاده از این داروها در غذای دام و طیور (مانند آووپارسیس، باسیتراسین، ویرجینیامایسین، تتراسیکلین و آمپی‌سیلین) به عنوان فاکتور افزایش‌دهنده رشد، می‌تواند یکی از عوامل ظهور انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین یا VRE باشند، سهولت در تبادل ژن‌های مقاوم و بیروولانت بین سویه‌های انتروکوک و توانایی بالای ارگانیزم در انتقال بین افراد و بیماران و محیط، فراوانی قابلیت انتشار این سویه‌ها را در بین محیط‌های مختلف تأیید می‌کند. انتروکوک‌های حساس و مقاوم به ونکومایسین برای مدت ۳۰ دقیقه در دست افراد زنده باقی می‌ماند. شستشو با آب و صابون قادر به از بین بردن آنها نیست. این باکتری‌ها

به کلرهگزیدین آبدار نیز مقاومند و تنها الکل و کلرهگزیدین الکلی می‌توانند انتروکوک‌ها را از بین ببرند. یکی از شایع‌ترین راه‌های انتقال انتروکوک‌ها از طریق دست‌های پرسنل بیمارستان است (۵). مواردی همچون اقامت طولانی مدت در بیمارستان، استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر نسل سوم سفالوسپورین‌ها، ونکومایسین، استفاده از آووپارسیس در غذای حیوانات، پیوند اعضا، مصرف مترونیدازول، اعمال جراحی، دیابت، لوسمی‌ها، ضعف سیستم ایمنی به هر دلیل و نارسایی کلیه به عنوان عوامل مستعدکننده در کلونیزاسیون یا عفونت بیماران با این میکروارگانیزم‌ها مطرح هستند (۷-۵). تاکنون ونکومایسین تقریباً تنها دارویی بود که می‌توانست به طور دائم جهت درمان عفونت‌های ناشی از انتروکوک‌های مقاوم به چند دارو به کار برده شود (۹،۸). ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که به جای پنی‌سیلین همراه با آمینو‌گلیکوزیدها در درمان عفونت‌های انتروکوک‌ها تجویز می‌شود. به دلیل فعالیت این آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین و سایر باکتری‌های گرم مثبت، این داروها به طور گسترده‌ای جهت درمان و پیشگیری بر علیه عفونت‌های ناشی از این ارگانیزم‌ها به کار برده می‌شوند (۱۱،۱۰). در بسیاری از مطالعات از انتروکوک‌ها به عنوان یکی از منابع مهم ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک نام برده شده است، ولی در مورد میزان حضور آنها در بیمارستان‌ها اطلاعات کمی گردآوری شده است. کاملاً واضح است که استفاده بی‌رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان و یا کنترل عفونت در انسان و یا به عنوان فاکتورهای رشد در غذای حیوانات یکی از دلایل شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. این مطالعه با هدف شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین جداشده از نمونه‌های بدست آمده از

آزمون بررسی وجود یا عدم وجود پیگمان، تا حد گونه شناسایی شدند (۱۲-۱۰). پس از شناسایی اولیه گونه‌های مختلف، جهت تأیید این گونه‌ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و برنامه حرارتی زیر استفاده شد (۱۳-۱۰)، از روش boiling جهت استخراج DNA استفاده گردید (۱۳).  
 95°C (4 min), 30 cycles {95°C (30 s), 52°C (1 min), 72°C (1 min)}, 72°C for 7 min  
 (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. ستون ۱-مارکر ۱۰۰bp. ستون ۳-۶ نمونه های *Enterococcus faecalis*



شکل ۲. ستون ۱-مارکر ۱۰۰bp. ستون ۳-۶ نمونه های *Enterococcus faecium*

### تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مختلف نسبت به ۸ آنتی بیوتیک (Vancomycin (30mg); erythromycin(15mg); gentamicin(10mg); tetracycline(30mg); chloramphenicol(30mg).

بخش‌های مختلف بیمارستان رسول اکرم تهران به انجام رسیده است.

### روش کار

در این مطالعه که از نوع توصیفی- مقطعی می‌باشد، در مجموع ۱۲۰ ایزوله مختلف انتروکوک در فصل‌های بهار، تابستان و پاییز در سال ۱۳۹۲ از بخش‌های مختلف بیمارستان رسول اکرم شهر تهران، نظیر اورژانس، ICU، جراحی داخلی و عفونی، بخش زنان و بخش اطفال همراه با اطلاعات بیمار شامل جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن جمع آوری شد. در هر بار نمونه‌گیری، از نمونه‌های سواپ رکتال، مدفوع، ادرار و زخم، واژینال و... نمونه‌برداری شد. جهت غربالگری اولیه، از آزمایشگاه همکار درخواست شد که پلیت اولیه کشت داده شده را در اختیار محققین قرار دهند، سپس برای اینکه سویه‌ای از دست نرود و تمام باکتری‌های موجود در کلنی‌ها ارزیابی شوند، سواپ استریل با تمام سطح پلیت تماس داده شده و سواپ به محیط *Enterococcus Selective Agar* حاوی ۶۴ µg/ml پورد آنتی بیوتیک ونکومايسين برده شد تا حتی یک کلنی حاوی VRE از دست نرود. کلنی‌های بدست آمده به پلیت‌های حاوی محیط *bile esculin agar* (Germany, Merck,) منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵°C قرار گرفتند (۱۲-۱۰). پس از این مرحله، کلنی‌های سیاه رنگی مشخص گردیدند که جهت انجام آزمون‌های کاتالاز، *Pyrrolidonylaminopeptidase* (PYR) رشد در محیط ۵/۶٪ NaCl مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین سویه‌های کاتالاز منفی، بایل اسکولین و PYR مثبت که قابلیت رشد در محیط ۵/۶٪ NaCl و دمای ۴۵°C را داشتند، بعنوان جنس انتروکوک انتخاب و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی حرکت، تخمیر قندهای ال-آرابینوز، لاکتوز، متیل آلفا-دی کلوکوپیرانوزید، مانیتول و ال- سوربوز و همچنین

بیوشیمیایی همخوانی داشت. تمامی ۱۲۰ سویه انتروکوک جدا شده به روش دیسک دیفیوژن، جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نام برده مورد بررسی قرار گرفته‌اند که نتایج آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام در مورد ۸ آنتی‌بیوتیک، نشان‌دهنده مقاومت‌های چندگانه سویه‌های مختلف می‌باشد.

جدول ۱. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	سویه‌های VRE (درصد)	سویه‌های غیر VRE (درصد)
ونکومايسين	۱۰۰	۰
پنیسیلین	۲۲٪	۱۱٪
آمپی‌سیلین	۳۰٪	۱۵٪
جنتامایسین	۷۶٪	۱۰٪
سیپروفلوکساسین	۴۷٪	۲۲٪
اریترومايسين	۵۱٪	۲۸٪
کلرامفنیکل	۲۱٪	۱۴٪
تتراسیکلین	۵۸٪	۱۵٪

همانگونه که در این جدول نشان داده شده، بالاترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بوده و پس از آن اریترومايسين و تتراسایکلین در مراتب بعدی قرار داشتند. کمترین مقاومت نیز نسبت به ونکومايسين مشاهده گردید. بر اساس نتایج مشاهده‌شده، ۱۳ سویه نسبت به تمامی ۸ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، اما ۲ سویه نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک ونکومايسين، تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و اریترومايسين مقاوم بودند. همچنین ۹ سویه نیز نسبت به ۴ دسته آنتی‌بیوتیک مختلف مقاوم بودند. ۱۰ سویه نسبت به ۲ آنتی‌بیوتیک، ۱۱ سویه نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک و ۷ سویه نیز تنها نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومايسين مقاوم بودند و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند (جدول ۲).

penicillin(10 mg)، ciprofloxacin (5mg)، ampicillin(10mg) unit) به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از استانداردهای Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI) تعیین گردید (۱۱-۱۳). سپس سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ونکومايسين جهت انجام آزمون MIC به روش Agar-dilution بر اساس استانداردهای CLSI انتخاب شدند و MIC آنها تعیین گردید (۱۳، ۱۴).

### یافته‌ها

از میان ۱۲۰ نمونه جمع‌آوری شده، در مجموع ۱۰۰ نمونه ادرار، ۹ نمونه خون، ۹ نمونه مدفوع و ۲ نمونه واژینال جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به ۶۴ مرد و ۷۴ زن می‌باشد. ۲۰٪ نمونه‌ها مربوط به گروه سنی ۰ تا ۱۶ سال، ۲۹٪ گروه سنی ۱۷-۵۵ سال و ۳۳٪ مربوط به گروه سنی بالای ۵۶ سال است. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی مختلف جهت تعیین جنس و گونه ایزوله‌های مختلف انتروکوک، در مجموع از ۱۲۰ ایزوله جداسازی شده ۲ گونه مختلف شناسایی شد. بدین ترتیب که ۷۴ ایزوله بعنوان *E. faecalis* و ۴۶ ایزوله بعنوان *E. faecium* شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که در میان این دو گونه، *E. faecalis* گونه غالب بود و پس از آن گونه *E. faecium* در رتبه بعدی قرار داشت. روش‌های کلاسیک تشخیص انتروکوک‌ها که در آن از تست‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود، بسیار وقت‌گیر و پرهزینه هستند و در برخی موارد از تشخیص دقیق گونه‌های انتروکوک‌ها عاجزند، ولی روش PCR سریع و دقیق است و استفاده از آن در حجم بالای نمونه‌ها مقرون به صرفه می‌باشد. در این مطالعه نیز تعیین جنس و گونه به هر دو روش کلاسیک و مولکولی انجام گرفت و در تمام موارد نتایج حاصل از روش PCR با نتایج تست‌های

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان ایزوله‌ها

الگوی مقاومت	تعداد ایزوله‌ها	درصد ایزوله‌ها
Van, Tet, Gen, Cip, Ery, Amp, Pen, Chl	۱۳	۱۱
Van, Tet, Gen, Cip, Ery	۲	۱/۵
Tet, Gen, Cip, Ery	۹	۷/۵
Chl, Tet, Gen	۱۱	۹/۱
Tet, Gen	۱۰	۸/۳
Gen	۷	۵/۸

\* Van: ونکومايسين, Tet: تتراسايكلين, Gen: جنتاميسين, Cip: سيپروفلوکساسين, Ery: اريترومايسين, Amp: آمپي سيلين, Pen: پني سيلين, Chl: کلرامفنيکل

مطالعه دیگر نشان داده شد که آمار *انتروکوک فکالیس* در ایجاد عفونت نسبت به سایر *انتروکوک‌ها* غلبه دارد و نیز میزان مقاومت *انتروکوک فاسیوم* بیشتر از *انتروکوک فکالیس* می‌باشد (۱۴-۱۲). با انجام این تحقیقات مشخص شد که در ایران شیوع گونه‌های VRE در میان نمونه‌های بیمارستانی از تنوع کمتری نسبت به نمونه‌های ماکیان، نمونه‌های موادغذایی و فاضلابی برخوردار است و شامل ۲ گونه *E. faecium* و *E. faecalis* می‌باشد، اما بطور کلی و بدون در نظر گرفتن مقاومت نسبت به ونکومايسين نیز شیوع گونه‌های مختلف *انتروکوک* محدود به دو گونه *فکالیس* و *فاسیوم* بود که از این نظر تنوع پایین‌تری را نسبت به نمونه‌های فاضلابی نشان داد (۱،۲). همانگونه که انتظار می‌رفت در این مطالعه گونه *E. faecalis* گونه غالب بود و بالاترین شیوع را داشت و پس از آن *E. faecium* در مرتبه دوم قرار داشت. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱-۱۹۹۹ در کویت صورت گرفت نیز از ۴۱۵ *انتروکوک* جدا شده ۸۵/۳ درصد *انتروکوک فکالیس* و ۷/۷ درصد *انتروکوک فاسیوم* و ۷ درصد نیز سایر *انتروکوک‌ها* گزارش شد (۱۵)، اما در مورد سویه‌های VRE علیرغم استفاده از محیط‌های واجد غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک ونکومايسين گونه *E. faecium* بیشترین شیوع را داشت و از بالاترین مقاومت نسبت به ونکومايسين برخوردار بود، که این نتایج منطبق بر سایر مطالعاتی است که در ایران و در مورد نمونه‌های محیطی انجام گرفته است

از ۴۵ سویه *E. faecium*, VRE تقریباً بیش از نیمی از سویه‌های مقاوم را به خود اختصاص داده است و پس از آن *E. faecalis* در جایگاه بعدی قرار داشت. همچنین مشاهده شد که گونه *E. faecium* بالاترین تعداد سویه‌های مقاوم را نسبت به بیشتر آنتی بیوتیک‌ها در اختیار دارد. هر دو گونه *E. faecium* و *E. faecalis* بالاترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین نشان می‌دهد.

پس از انجام آزمون MIC نسبت به آنتی بیوتیک ونکومايسين بر روی ۴۵ سویه VRE مشخص گردید که ۷۰٪ سویه‌ها از مقاومت بالایی (MIC 256) ( $\mu\text{g/ml}$ ) نسبت به ونکومايسين برخوردار بودند و همچنین در ۲۲٪ از سویه‌ها MIC 64  $\mu\text{g/ml}$  و در ۸٪ از سویه‌های VRE نیز MIC 32  $\mu\text{g/ml}$  بود.

### بحث

به دلیل تغییرات ژنتیکی در میان سویه‌ها، تفاوت در فلور نرمال، تفاوت در نوع تجویز آنتی بیوتیک و مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف و همچنین تفاوت در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک‌ها در میان اقشار مختلف جامعه، مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، از فراوانی متفاوتی در ایران و دیگر نقاط جهان برخوردار است. از آنجا که نمونه‌های بیمارستانی به عنوان یکی از مخازن عمده انتشار آلودگی در محیط مطرح می‌باشد، میزان شیوع مقاومت در آن می‌تواند با نمونه‌های محیطی مقایسه گردد (۱،۲). در این مطالعه همانند چندین

(۱۱،۱۳،۱۴). این امر می‌تواند ناشی از قابلیت و توانایی بالای گونه فسیوم در کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی و همچنین شرایط نامساعد باشد که بواسطه این عوامل این سویه را تبدیل به یکی از قویترین پاتوژن‌های فرصت طلب نموده است (۱،۲). *انتروکوکوس فسیوم* به صورت ذاتی مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد و توانایی کسب ژن‌های مقاومت را نیز از طریق پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها<sup>۱</sup> دارد؛ به طوری که امروزه مشاهده شده است، مقاومت آنتی‌بیوتیکی گلیکوپپتیدی (ونکومايسين و تیکوپلانین) در بین انتروکوک‌ها به خصوص فسیوم رو به افزایش است (۱۵،۱۶). مواردی همچون اقامت طولانی در بیمارستان، استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌هایی چون نسل سوم سفالوسپورین‌ها و ونکومايسين، استفاده از اوپاراسین<sup>۲</sup> در غذای حیوانات، پیوند اعضا، مصرف مترونیدازول<sup>۳</sup> اعمال جراحی، دیابت، لوسمی‌ها، ضعف سیستم ایمنی به هر دلیل و نارسایی کلیه به عنوان عوامل مستعدکننده در کلونیزاسیون یا عفونت بیماران با این میکروارگانیسم‌ها مطرح هستند (۵). در مقایسه با سایر مطالعاتی که در ایران بر روی نمونه‌های محیطی و بالینی انجام گرفته است، میزان شیوع مقاومت به ونکومايسين در این بیمارستان بسیار بالاتر از حد انتظار است، شاید دلیل این امر استفاده از محیط‌هایی واجد غلظت‌های متفاوتی از ونکومايسين جهت غربالگری سویه‌ها بوده است. اما در هر صورت مقاومت به ونکومايسين ۳۷٪ بود که در مقایسه با سایر مطالعاتی که در سراسر دنیا انجام گرفته است این میزان متفاوت و متغیر است. همچنین کوهن<sup>۴</sup> در مطالعه خود در سال ۲۰۰۵ بر روی نمونه‌های بالینی، دامی و محیطی در اروپا میزان مقاومت به ونکومايسين را ۸-۱۱٪ گزارش

نموده است (۱۷). علت انتشار سویه‌های مقاوم به ونکومايسين در اروپا و امریکا مربوط به استفاده بی‌رویه گلیکوپپتیدها در مراکز درمانی و به دنبال آن انتخاب این سویه‌ها در دستگاه گوارش انسان و کلونیزه کردن دستگاه گوارش افراد و یا انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های ساکن دستگاه گوارش، در حین عبور و نیز مصرف ترکیباتی مثل آووپاراسین به عنوان مکمل غذای دام و محرک رشد ماکیان می‌باشد (۱،۲،۱۸). مقاومت نسبت به اریترومايسين در این تحقیق ۷۹٪ بود که میزان ۵۱٪ از این سویه انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين (VRE) بوده است. این میزان مقاومت به اریترومايسين به دلیل مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک در ایران است. اریترومايسين یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در صنایع غذایی نیز هست که در ایجاد مقاومت در انتروکوک‌ها موثر است (۱۸،۱۹). مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۹٪ و در سویه‌های مقاوم به ونکومايسين (VRE)، ۴۷٪ است. به واسطه موفقیت در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری، این آنتی‌بیوتیک بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد و همانند سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت در *E. faecium* رایجتر از *E. faecalis* و گونه‌های دیگر است. در گزارشی از یونان در سال ۲۰۰۰ این مقاومت در *E. faecium* سه برابر مقاومت مشاهده شده در *E. faecalis* بوده است (۲۰). استابرینگ<sup>۵</sup> نیز میزان مقاومت را در تمامی سویه‌ها و همچنین سویه‌های مقاوم به ونکومايسين بدست آمده از نمونه‌های مدفوع ۱۲٪ گزارش نموده است (۲۱). به طور کلی میزان مقاومت به جنتامایسین ۸۶٪ و در سویه‌های VRE حدود ۷۶٪ است. در این میان ۹۳٪ از *E. faecium* مقاوم به جنتامایسین بودند. لیاسین<sup>۶</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۸ در سویه‌های یافت شده در فاضلاب بیمارستانی در سوئیس، میزان

<sup>1</sup> Transposons

<sup>2</sup> Avoparcin

<sup>3</sup> Metronidazole

<sup>4</sup> Kuhn

<sup>5</sup> Stobberingh

<sup>6</sup> Liassine

آب‌های سطحی انتقال یابد، در معرض تهدید قرار گیرد. زیرا این آبها ممکن است بدون هیچگونه توجهی مورد مصرف قرار گیرند (۲۷-۲۵).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد شایع‌ترین مکان جداسازی انتروکوک‌ها دستگاه ادراری می‌باشد و اکثر عفونت‌های انتروکوک‌ی منشأ داخلی دارند. انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين به دلیل پخش سریع، همراه بودن با عفونت‌ها و میزان مرگ و میر بالا، محدودیت داشتن برای درمان و امکان انتقال ژن‌های مقاومت به ونکومايسين به دیگر پاتوژن‌های بیماری‌زا و شایع‌تر مانند *استافیلوکوک اورئوس*، به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل شده است. میزان مقاومت به ونکومايسين اهمیت توجه به شیوع VRE را در بیمارستان‌های شهر تهران جلب می‌نماید. ریشه‌کشی حتی یک انتروکوک مقاوم به ونکومايسين از یک بیمارستان دشوار است.

### تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران با شماره گرنت ۲۳۱۳۹ و در مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی انجام گرفت.

مقاومت را در حدود ۴٪ گزارش دادند (۶). از طرفی خان<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آمریکا میزان مقاومت به جنتامایسین را حدود ۹۶٪ گزارش نمودند (۷).

در این مطالعه پایین‌ترین مقاومت نسبت به ونکومايسين مشاهده شد که در حدود ۳۷٪ بود. این میزان هرچند که بالاتر از مقاومت سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های محیطی و بالینی است، اما در مجموع مقاومت به این آنتی‌بیوتیک پایین است، که این امر شاید دلیل استفاده پایین از این آنتی‌بیوتیک بواسطه اثرات سوء آن در شرایط *in vivo* باشد. افزایش انتروکوک مقاوم به ونکومايسين مشکل جدی در درمان عفونت‌های انتروکوک‌ی ایجاد کرده است. از سوی دیگر خطر افزایش انتقال عامل این مقاومت به بقیه گونه‌های حساس به ونکومايسين وجود دارد (۲۲،۲۳)؛ و از طرفی دیگر انواع گونه‌های انتروکوک توانایی تکثیر و بقا در خاک و آب را دارند و این مقاومت در محیط برای مبارزه با آنها بسیار مشکل‌ساز است (۲۴)؛ بنابراین بایستی توجه زیادی را به جلوگیری از انتقال و پخش میکروارگانیزم‌ها بخصوص انواع مقاوم آنها در طبیعت معطوف داشت. سلامت عمومی جامعه ممکن است با انتقال VRE بویژه اگر میکروارگانیزم از طریق مدفوعی به

<sup>1</sup> Khan

### References

- 1-Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J. 2007 Jul pg 161-7.
- 2- Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Curr Microbiol. 2008 May pg 468-73
- 3- Magi G, Capretti R, Paoletti C, Pietrella M, Ferrante L, Biavasco F, et al. Presence of a vanA-carrying pheromone response plasmid (pBRG1) in a clinical isolate of *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 2003 May ;47(5):1571-6.
- 4- Pootoolal J, Neu J, Wright GD. Glycopeptide antibiotic resistance. Annual review of pharmacology and toxicology. 2002;42(1):381-408.
- 5- Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, FitzGerald S, Fox U, Boyle B, et al. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother 2015 Jul :dkv185.



- 6- Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul; 36(7):1853-8.
- 7- Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and cellular probes.* 2005 Feb;19(1):27-34.
- 8- Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jun;68(6):2838-42.
- 9- Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *JCM.* 1997 Sep;35(9):2325-30.
- 10- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Jun;37(2):127-37.
- 11- Wood AJ, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med.* 2000; 342(10):710-21.
- 12- Farrell D, Morrissey I, De Rubeis D, Robbins M, Felmingham D. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *J Infect.* 2003 Feb ;46(2):94-100.
- 13- Wikler MA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition 2003.
- 14- Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikolaidis P, Skoutelis A, Levidiotou S, et al. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in Greek hospitals. *JCM.* 2005 Nov ;43(11):5796-9.
- 15- Leblank DJ, Lee LN, Inamin M. Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991 Sep;35:18
- 16- Simjee S, White D, McDermott P, Wagner D, Zervos M, Donabedian S, et al. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *JCM.* 2002 Dec ;40(12):4659-65.
- 17- Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Sep ;71(9):5383-90.
- 18- Fatholahzadeh B, Hashemi FB, Emanei M, Aligholi M, Nakhjavani FA, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. *Daru J Pharm Sci.* 2006 Sep;14(3):141-5.
- 19- Rafiei Tabatabaei S, Karimi A, Navidinia M, Fallah F, Tavakkoly Fard A, Rahbar M. A study on prevalence of vancomycin-resistant enterococci carriers admitted in a children hospital in Iran. *Ann Biol Res.* 2012 Oct ;3(12):5441-45.
- 20- Platsouka ED, Dimopoulou H, Miriagou V, Paniara O. The first clinical isolates of *Enterococcus faecium* with the VanA phenotype in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Jan. 46:1039–1040
- 21- Stobberingh E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Sep;43(9):2215-21
- 22- Kawalec M, Pietras Z, Daniłowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *JCM.* 2007 Jan;45(1):147-53.
- 23- Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jun ;71(6):3364-8.
- 24- El Amin N, Wretling B, Wenger A, Brandt V, Bille J. Ampicillin-sensitive, imipenem-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb ;40(2):738-.

- 25- Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kühn I, Möllby R, Eshraghi S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. *Water Air Soil Poll.* 2007 Jun; 185(1-4):111-9.
- 26- Mundy L, Sahm D, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *CMR.* 2000 Oct ;13(4):513-22.
- 27- Popiel KY, Miller MA. Evaluation of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)-associated morbidity following relaxation of VRE screening and isolation precautions in a Tertiary Care Hospital. *Infection Control.* 2014 May ;35(07):818-25.