

## مقاله اصلی

# فراوانی ژن های ermA,B,C در انتروکوک های مقاوم به اریترومايسين جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان های دانشگاهی شهر قزوین و تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۱

### خلاصه

#### مقدمه

انتروکوکها از عوامل مهم عفونت دستگاه ادراری هستند که مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی دارند، این مطالعه تعیین فراوانی ژن های ermA,B,C در انتروکوکهای مقاوم به اریترومايسين جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهر قزوین و تهران را هدف قرار داده است.

#### روش کار

در این مطالعه اپیدمیولوژی- توصیفی که از سال ۱۳۹۱-۱۳۹۲ در دو بیمارستان آموزشی در قزوین و سه بیمارستان در تهران صورت گرفت، تعداد ۱۶۵ ایزوله انتروکوک مورد مطالعه قرار داده شدند، مقاومت به اریترومايسين با روش انتشار دیسک و رقت سازی در آگار برای تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) براساس استانداردهای CLSI (Standard Institute Clinical and Laboratory) تعیین گردید و با انجام PCR حضور ژنهای ermA,B,C بررسی شدند.

#### نتایج

از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک ۱۴۲ ایزوله (۸۶٪) انتروکوکوس فکالیس و ۲۳ ایزوله (۱۳/۹٪) انتروکوکوس فاسیوم بودند. نتایج تست های حساسیت دارویی نشان داد که در مجموع ۱۵۸ (۹۵٪) ایزوله ها دارای مقاومت و یا حساسیت حد واسط نسبت به اریترومايسين بوده و همچنین نتایج نشانگر قرابت معنادار نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن با آگار دایلوژن بود. از مجموع ۱۶۵ سویه مورد مطالعه تعداد ۱۴۷ (۸۹٪) ایزوله مقاوم به اریترومايسين ( $MIC \geq 8 \mu g/ml$ ) و ۱۱ (۶/۶٪) ایزوله دارای مقاومت حد واسط ( $1-4 \mu g/ml$ ) و ۷ (۴/۲٪) ایزوله حساس به اریترومايسين ( $MIC \leq 0.5 \mu g/ml$ ) بودند.

#### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنهای ermA,B,C در سویه های مقاوم به اریترومايسين انتروکوک از شیوع بالایی برخوردار بوده و فراوان ترین ژن عامل مقاومت ژن ermB می باشد.

**کلمات کلیدی:** انتروکوک، erm، اریترومايسين، مقاومت ماکرولیدها، مقاومت آنتی بیوتیکی

**پی نوشت:** بدین وسیله از معاونت و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین برای تأمین هزینه انجام این طرح، از جناب آقای دکتر عینی جهت تأمین سویه های استاندارد، کارشناسان و کارکنان آزمایشگاه مرجع و گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و کلیه کسانی که در امر جمع آوری نمونه ها و انجام این تحقیق کمک کردند، تشکر می شود.

۱ معصومه اصلانی مهر  
۲ امیر پیمانی  
۳ داود درزی رامندی\*  
۴ تقی ناصرپور فریور

۱- استادیار میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران  
۲- استادیار گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران  
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه میکروب شناسی، قزوین، ایران  
۴- استادیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروب شناسی قزوین، ایران

\* قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

تلفن: ۰۹۱۲۴۸۱۲۳۳۱

Email: d.darzir@gmail.com

## Original Article

### Frequency of erm A, B, C genes in Erythromycin resistant Enterococci isolated from Clinical samples of inpatients of Teaching Hospitals in Qazvin & Tehran

Received: April 6 2014- Accepted: July 12 2014

- 1- Masoumeh Aslanimehr
- 2- Amir Peymani
- 3- Davood Darzi Ramandi\*
- 4- Taghi Naserpour-Farivar

1- Assistant Professor in Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran

2- Assistant Professor in Qazvin University of Medical, Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

3- MSc. In Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran

4- Professor in Microbiology, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

\* Qazvin University of Medical Sciences, Cellular & Molecular Research Centre, Department of Microbiology, Qazvin, Iran  
Tel: 09124812231  
Email: d.darzir@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** *Enterococci* are among the most important causes of urinary tract infections. The aim of this study was to assess the frequency of *erm A*, *B*, and *C* genes in erythromycin-resistant *Enterococci* isolated from the clinical samples of inpatients of university teaching hospitals in Qazvin and Tehran.

**Methods:** From 2012 to 2013, a total of 165 samples of *enterococci* were isolated from the clinical samples of inpatients. Susceptibility to erythromycin in *enterococci* isolates was performed by agar dilution and disk diffusion methods according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Erythromycin resistance genes (*ermA*, *B*, and *C*) were identified by PCR.

**Result:** Out of 165 clinical isolates of *enterococci*, 142 (86%) isolates were *Enterococcus faecalis* and 23 (13.9%) isolates *Enterococcus faecium*. The results of susceptibility test showed that 158 (% 95) isolates were resistant or with intermediate sensitivity to erythromycin. There was a good correlation between the results of disk diffusion and agar dilution methods. Of total samples, 147 (89%) isolates were resistant to erythromycin (MIC $\geq$ 8  $\mu$ g/ml), 11 (6.6%) isolates with intermediate sensitivity (MIC 1-4  $\mu$ g/ml), and 7 (4.2%) isolates with complete sensitivity to erythromycin (MIC  $\leq$  0.5  $\mu$ g/ml).

**Conclusion:** The results of this study showed high prevalence of *ermA*, *B*, and *C* genes in erythromycin-resistant strains with *ermB* as the most common resistance gene among these isolates.

**Key words:** *Enterococci*, *Erm*, Erythromycin, Macrolides Resistance, Antibiotic resistance

**Acknowledgement:** The author would like to thank the research division of Qazvin University of Medical Sciences for funding the current study. Also our thank goes to Dr Emaneini who kindly provided us with the standard strains.

## مقدمه

انتروکوک ها از جمله شایع ترین عوامل عفونت بیمارستانی، به ویژه در بخش های مراقبت ویژه (ICU) هستند. عفونت ناشی از این باکتری هنگام تجویز سفالوسپورین ها و دیگر آنتی بیوتیک هایی که انتروکوک ها نسبت به آنها مقاومند ایجاد می شود. انتروکوک ها عمدتاً از یک بیمار به بیمار دیگر از طریق دست کارکنان بیمارستان که برخی از آنها نیز ناقل هستند منتقل می شوند. حدود ۱۲ گونه انتروکوک وجود دارد. انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) شایع ترین گونه بوده و عامل ۸۵-۹۰٪ عفونت های انتروکوکوی است و انتروکوکوس فسیوم (*E. faecium*) عامل ۵-۱۰٪ عفونت ها می باشد (۱). در ایالات متحده تخمین زده می شود که سالانه ۸۰۰۰۰۰ عفونت انتروکوکوی رخ می دهد که هزینه درمان برای هر مورد حدود ۵۰۰ دلار می باشد (۲). در این گروه از باکتری ها مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مشاهده می گردد از جمله این مقاومت ها می توان به مقاومت ذاتی به ماکرولیدها، کلرامفنیکل، پنی سیلین، تتراسایکلین و آمینوگلیکوزیدها اشاره کرد. مقاومت چندگانه (<sup>1</sup>MDR) یکی از خصوصیات انتروکوک ها می باشد (۳-۶). ماکرولیدها محصول متابولیسم ثانویه بسیاری از گونه های اکتینومیسیت ها هستند. اریترومایسین، آنتی بیوتیک شاخص این گروه می باشد که از یک حلقه لاکتون متصل به دو قند دیسوسامین<sup>۲</sup> و کلادینوز<sup>۳</sup> تشکیل شده است. ماکرولیدهای دیگر از اریترومایسین مشتق شده اند و شامل کلاریترومایسین، آزیترومایسین، دیریترومایسین<sup>۴</sup> و رکسیترومایسین<sup>۵</sup> هستند (۷-۹). دو مکانیسم مهم در مقاومت به ماکرولیدها وجود دارد که مهمترین آن تغییر جایگاه هدف که به واسطه ژن های *erm*<sup>۷</sup> کد شده و مقاومت به ماکرولیدها و لینکوزامیدها، استرپتوگرامین B (MLS<sub>B</sub>) را سبب می شود و یک سیستم پمپ افلاکس که در غشا واقع شده که ژن های *mef*(A/E)، *msr*، *mef*(A/E) آن را کد می کنند و سبب خروج دارو از سلول باکتری می گردد (۱۰). ژن

های *erm* مسئول کد کردن متیل ترانسفرازها می باشند. این آنزیم ها سبب القاء دیمیلاسیون یک گروه آدنین (A2058/A2059) از دومین V در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز زیر واحد ۲۳S ریبوزومی می گردد که در نهایت سبب کاهش میل ترکیبی اتصال و ایجاد مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامین ها و استرپتوگرامین B (MLS<sub>B</sub>) می گردد. ژن های *erm* در بسیاری از ترانسپوزون ها شناسایی شده اند (۱۱-۱۳). پمپ های یونی از دوازده بخش تشکیل شده اند که از عرض غشای سیتوپلاسمی عبور نموده و در ایجاد انرژی و نیروی محرکه پروتونی دخالت دارند. پمپ یونی *mefA* سوبستراهای متعددی مانند اریترومایسین و مشتقات آن مانند آزیترومایسین را دارد (۱۴، ۱۵). در مطالعات اخیر که بر انتروکوک ها انجام شده، نشان داده که مقاومت انتروکوک ها به اریترومایسین (ERY) بالاتر از ۷۰٪-۸۰٪ می باشد (۶). اکثر ایزوله های انتروکوکوی جدا شده ی مقاوم به اریترومایسین که تا کنون مطالعه شده اند دارای ژن ها *ermA, B, C* می باشند و فراوانی ژن *ermB* بیش از همه (بالتر از ۷۰٪) بوده و فراوانی ژن های *ermA* و *ermC* وابسته به منطقه جغرافیایی متفاوت می باشند. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و مکانیسم های مولکولی آن از جمله مقاومت به ماکرولیدها در انتروکوک ها از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا در این مطالعه به بررسی مقاومت به اریترومایسین و فراوانی ژن های *erm A*، *B* و *C* در ایزوله های بالینی انتروکوک جدا شده از بیماران بستری پرداخته شده است.

## روش کار

تعداد ۱۶۵ ایزوله انتروکوکوی جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در دو بیمارستان آموزشی شهر قزوین و بیمارستان های شریعتی، سینا و مسیح دانشوری تهران از اردیبهشت ماه ۱۳۹۱- خرداد ماه ۱۳۹۲ جمع آوری گردید. پس از آن تمامی نمونه ها به منظور ذخیره کردن در محیط TSB + گلیسرول ۱۰٪ برده و دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریز گردید.

تمامی نمونه ها بر اساس تست های تشخیصی رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد در ۶/۵٪ نمک، آزید مالتوز آگارو

<sup>1</sup> Multi Drug Resistance<sup>2</sup> Dysosamin<sup>3</sup> Cladinose<sup>4</sup> Dirithromycin<sup>5</sup> Roxithromycin<sup>6</sup> Erythromycin (ERY) ribosomal methylases

بایل اسکولین تأیید گردیدند.

تست های افتراقی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، تست تخمیر قند و تولید پیگمان می باشد. در این بررسی از قند های سوربیتول، آرابینوز و رافینوز استفاده شد.

در روش دیسک دیفیوژن، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیون معادل نیم McFarland تهیه و بر روی محیط Muller-Hinton آگار به روش کشت جارویی تلقیح شد، سپس دیسک اریترومايسين ۱۵ µg (ساخت شرکت Mast) بر روی محیط قرار داده شد آن گاه پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و در نهایت پلیت ها از نظر قطر هاله مطابق استاندارد ۲۰۱۳ CLSI مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت. برای انجام کنترل کیفی دیسک اریترومايسين و محیط مولر هیتون آگار از سویه استاندارد

*Enterococcus faecalis ATCC ۲۹۲۱۲* مطابق با

استاندارد های پیشنهادی CLSI استفاده گردید.

در این مرحله حداقل غلظت مهاري اریترومايسين ( $MIC^1$ ) کلیه ایزوله های انتروکوک های به روش آگار دایلوژن مورد بررسی قرار گرفت. تعیین MIC انتروکوک هایی که در غلظت  $\mu g/ml$   $MIC \geq 8$  از آنتی بیوتیک اریترومايسين رشدشان مهار شد، انتروکوک مقاوم به اریترومايسين، انتروکوک هایی در غلظت  $MIC 1-4 \mu g/ml$  به عنوان حد واسط و انتروکوک هایی که در غلظت  $MIC \leq 0.5 \mu g/ml$  از آنتی بیوتیک اریترومايسين رشد داشتند حساس در نظر گرفته شدند.

در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت استخراج (USA) / *Life Technologies* استفاده شد و مراحل آن مطابق با دستورالعمل کیت انجام گرفت.

برای شناسایی ژن های *ermA,B,C* از آزمایش PCR استفاده شد تا حضور ژن ها در انتروکوک های مقاوم مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق از سه جفت پرایمر برای شناسایی این ژن ها استفاده شد. روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسا یکلر (ABI Biosystem / USA) با شرایط بهینه سازی شده به شکل زیر انجام گرفت. واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به

مدت ۵ دقیقه (Hot start) و در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Denaturation)، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Extension) و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای این منظور ۸ میکرولیتر Master Mix Red 1.5Mm Mgcl2 2X، Taq، ۰/۷ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۶ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به منظور مشاهده محصول PCR از ژل الکتروفورز (max pure agarose /spain) با غلظت ۱٪ آماده سازی شد و نتایج با دستگاه ژل داکت (USA) / 212 pro GEL LOGIC ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت ژن های *ermA,B,C* از سویه های سکانس شده جناب آقای دکتر عینی استفاده گردید (۱۳). اطلاعات با نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

### نتایج

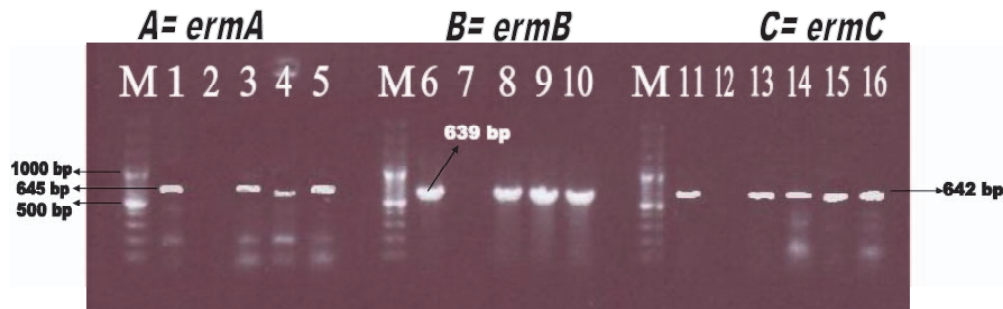
با استفاده از توانایی تخمیر قند سوربیتول، آرابینوز و رافینوز و رشد در ۴ درجه تمامی نمونه ها به منظور جداسازی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم و تمایز آنها انجام گردید. از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک ، انتروکوک فکالیس ۱۴۲ (۸۶٪) و انتروکوک فاسیوم ۲۳ (۱۳/۹٪) نمونه بوده، ایزوله های بالینی به ترتیب فراوانی، ۱۱۳ (۶۸/۴٪) از ادار، ۱۸ (۱۰/۹٪) از زخم، ۱۵ (۹٪) از خون، ۵ (۳٪) از آسیت و ۱۴ (۸/۴٪) از نمونه های کلینیکی دیگر وجود داشت. همچنین فراوانی ایزوله ها به تفکیک بخش های بیمارستانی، بخش مراقبت های ویژه ۶۸ (۴۱/۲٪)، بخش کودکان ۴۷ (۲۸/۴٪)، بخش داخلی ۵۰ (۳۰/۳٪) بودند. طبق دستورالعمل CLSI، نتایج به دست آمده از MIC به روش آگار

### جدول شماره ۱- لیست پرایمرها جهت بررسی ژن های erm

ژن	توالی پرایمر	طول قطعه	مرجع
<i>erm(A)</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAAAAGAA	۶۴۵ bp	۱۱
	R: CTTTCGATAGTTTATTAATATTAGT		
<i>erm(B)</i>	F: GAAAAGGTACTCAACCAATA	۶۳۹bp	۱۱
	R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>erm(C)</i>	F: TCAAAAACATAATATAGATAAA	۶۴۲ bp	۱۱
	R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT		

R: Reverse F: Forward

<sup>1</sup> Minimum inhibitory concentration



**شکل ۱- قسمت (A)** - DNA مارکر (ladder 100 bp): ۱: کنترل مثبت ژن *ermA* (۶۴۵ bp): ۲: کنترل منفی ژن *ermA*. ۳-۵: نمونه های بالینی مثبت *ermA*. **قسمت (B)** - ۶: کنترل مثبت ژن *ermB* (۶۳۹ bp): ۷: کنترل منفی ژن *ermB*. ۸-۱۰: نمونه های بالینی مثبت ژن *ermB*. **قسمت (C)** - ۱۱: کنترل مثبت ژن *ermC* (۶۴۲ bp): ۱۲: کنترل منفی ژن *ermC*. ۱۳-۱۶: نمونه های بالینی مثبت ژن *ermC*

مهمترین مشکل انتروکوک ها مقاومت نسبی و مطلق آنها در برابر آنتی بیوتیک ها است. از عوامل خطر برای انتروکوک های MDR شامل کلونیزاسیون گاستروانستینال انتروکوک ها، سن بالا، بیماری زمینه ای شدید، سرکوب سیستم ایمنی، اقامت در ICU، جراحی (مخصوصاً دستگاه گوارش، قلبی عروقی و پیوند)، ابزارهای داخل عروقی و در تماس بودن مداوم با آنتی بیوتیک های دیگر می باشد (۱۶). آنتی بیوتیک های مصرفی در محیط های بیمارستانی، انتخاب انتروکوک های پاتوژن راتحت تاثیر قرار داده، به گونه ای که بر تعداد سویه های دارای مقاومت چنددارویی و بعضاً سویه های مقاوم به همه آنتی بیوتیک ها افزوده می شود. مقاومت به ماکرولیدها در انتروکوک ها اهمیت اپیدمیولوژیکی زیادی در مناطق مختلف دنیا داشته است. در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و جدید متفاوت می باشد. با این وجود افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری یک پدیده جهانی است (۱۷). این باکتری سومین عامل باکتریی و دومین عامل عفونت دستگاه ادراری<sup>۱</sup> به شمار می آید و همچنین به دلیل عدم اطلاع کافی به مقاومت آنتی بیوتیکی به ویژه در اپیدمی انتروکوک ها بعضی از اطلاعات برای درمان مناسب عفونت های انتروکوکی

دایلوژن، ۷ (۴/۲)٪ ایزوله حساس به اریتروماسین ( $MIC \leq \mu g/ml$ ) ۱۱ (۶/۶)٪ ایزوله حدواسط ( $MIC 1-4 \mu g/ml$ ) و ۱۴۷ (۸۹)٪ ایزوله مقاوم به اریتروماسین ( $MIC \geq 8 \mu g/ml$ ) بودند که در نتایج دیسک دیفیوژن و آگار دایلوژن هم خوانی کامل وجود داشت. از بین ۲۳ ایزوله انتروکوکوس فسیوم تعداد ۲۱ ایزوله (۹۱/۳)٪ مقاوم به اریتروماسین بودند که بیانگر مقاومت آنتی بیوتیکی بیشتر انتروکوکوس فسیوم نسبت به فکالین می باشد. در ۱۶۵ ایزوله انتروکوک، تعداد ۱۸ سویه (۱۰/۹)٪ دارای  $MIC$  پایین تر از  $128 \mu g/ml$  بودند و تعداد ۱۴۷ سویه (۸۹)٪ دارای  $MIC$  بالا تر از  $128 \mu g/ml$  بودند. مقادیر  $MIC_{50}$  و  $MIC_{90}$  برای ایزوله های انتروکوکوس فکالین و فسیوم بالاتر از  $128 \mu g/ml$  بود. فراوانی ژن های *ermA, B, C* در ۱۵۸ ایزوله غیر حساس (ایزوله های مقاوم و حد واسط) به اریتروماسین بدین ترتیب می باشد، ۴۱ (۲۵/۹)٪ ایزوله دارای ژن *ermB* ۶۴ (۴۰/۵)٪ ایزوله دارای ژن *ermB, C* ۱۴ (۸/۸)٪ ایزوله دارای ژن *ermA, B* و ۳۹ (۲۴/۶)٪ ایزوله دارای ژن *ermA, B, C* بودند. ژن های *ermA* و *ermC* به تنهایی در هیچ کدام از ایزوله ها مشاهده نشد. در مجموع *ermB* با ۹۵٪ به عنوان فراوانترین ژن و ژن های *ermC* (۶۳)٪ و *ermA* (۳۲)٪ به ترتیب در رتبه های بعدی قرار گرفتند.

## بحث

انتروکوک ها گروه مهم و متنوعی از باکتری ها هستند که اهمیت ویژه ای از نظر مقاومت دارویی چند گانه (*MDR*) دارند.

<sup>1</sup> urinary tract infections

در مناطق جغرافیایی مختلف باشد. مطالعه دیگری در اسپانیا در سال ۲۰۱۰ توسط لویز<sup>۲</sup> و همکارانش برای تشخیص مقاومت MLSB در انتروکوک ها بر اساس حضور ژن های میتلاز *rRNA* با روش *PCR* و تعیین حداقل غلظت مهاري نشان داد که از ۱۴۸ ایزوله مورد بررسی، ۹۴٪ از ایزوله ها دارای مقاومت به اریترومايسين بوده و *MIC 50*, *MIC 90* برای این ایزوله ها ۲۵۶ μg/ml تعیین گردید و ۸۹٪ از ایزوله ها فقط دارای ژن *ermB* بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ یک از ایزوله ها دارای مقاومت به لینوزولید، تیکوپلایین نمی باشند (۲۰). ارسترپ<sup>۳</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۰-۱۹۹۹ بر روی ۹۸ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ۶۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم در دانمارک مطالعه کردند. این مطالعه نشان داد که ۷۲ سویه از انتروکوکوس فکالیس (۷۳/۵٪) و همچنین ۹۶/۹٪ از سویه های انتروکوکوس فسیوم مقاوم به اریترومايسين بودند. فراوانی ژن *ermB* در انتروکوکوس فکالیس (۸۴/۷٪) و در انتروکوکوس فسیوم (۶۱/۷٪) گزارش شده بود (۲۱). با توجه به اینکه انتروکوک ها در دستگاه گوارش انسان و حیوانات کلنیزه شده و باعث بیماری می شوند لذا این باکتری ها از نظر دامپزشکی و بیماری های مربوط به دام نیز حائز اهمیت می باشند. این باکتری ها با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در حیوانات مولد غذا مقاومت را کسب کرده و باعث آلودگی گوشت و فرآورده های گوشتی شده و از این طریق به دستگاه انسان راه می یابند. در سال های اخیر مطالعات مشابه زیادی در دامپزشکی بر روی مقاومت به انتروکوک ها انجام شده است. اوبنگ<sup>۴</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۸-۲۰۰۹ بر ایزوله های انتروکوک جمع آوری شده از جوجه ها در واحدهای پرورش مرغ استرالیا به بررسی پرداختند. از روش فنوتیپی آگاردایلویشن و روش ژنوتیپی *PCR* برای تشخیص ژن های مقاومت به اریترومايسين استفاده شده بود. مهمترین عامل مقاومت ژن *ermB* گزارش شده بود که مقاومت متقاطع با تایلوزین و لینکوزامین ایجاد می کرد (۲۲). مطالعه دیگر در چین توسط لیو<sup>۵</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر ۴۵۳ ایزوله انتروکوک از حیوانات مولد غذا انجام

مورد نیاز هستند (۱۸،۱۹). در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی بیوتیک اریترومايسين بررسی شد که بیان کننده مقاومت ذاتی و بالا به ماکرولیدها در سویه های انتروکوک می باشد. از بین ۱۶۵ ایزوله انتروکوک مورد بررسی، مقاومت به اریترومايسين در ۱۴۷ ایزوله (۸۹٪) بوده که بیانگر مقاومت بالای انتروکوک ها به اریترومايسين است. در این مقاومت *ermB* بیشترین فراوانی را داشته که ۱۵۸ (۹۵٪) ایزوله، ژن *ermC* ۱۰۴ (۶۳٪) ایزوله و ژن *ermA* ۵۳ (۳۲/۱٪) ایزوله بودند. در مطالعه حاضر از MIC به روش آگاردایلویشن با رقت های ۱۲۸-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شده بود که ۷ (۴/۲٪) ایزوله حساس به اریترومايسين، ۱۱ (۶/۶٪) ایزوله حدواسط و ۱۴۷ (۸۹٪) ایزوله مقاوم به اریترومايسين بودند. *MIC90* و *MIC50* برای ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و فسیوم بالاتر از  $128 \mu\text{g/ml}$  بود. در این مطالعه سویه های بالینی از ادارار ۱۱۳ (۶۸/۴٪)، زخم ۱۸ (۱۰/۹٪)، خون ۱۵ (۹٪) بیشترین تعداد نمونه کلینیکی را تشکیل دادند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۹ در چین توسط زو<sup>۱</sup> و همکارانش صورت گرفت از ۱۱۷ ایزوله انتروکوکوس فکالیس جدا شده از بیماران، ۷۸ (۶۶/۶٪) ایزوله مقاومت به اریترومايسين گزارش شد. ۵۸ (۷۴/۳٪) ایزوله دارای *ermB* و ۳۷ (۴۷/۴٪) ایزوله دارای *ermA* بودند. ۱۷٪ از ایزوله ها هر دو ژن *ermB* و *ermA* و ۲/۵٪ ایزوله ها دارای *ermC* بودند. از بین ۷۸ ایزوله مقاوم به اریترومايسين، ۷۵ ایزوله با  $\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g/ml}$  بودند که مشابه مطالعه حاضر بود (۱۱). در مطالعه ای دیگری که توسط عینی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر ۳۲۶ ایزوله بیمارستانی انتروکوک در بیمارستان های تهران انجام شد، مقاومت به اریترومايسين ۴۵٪ گزارش گردید و ۴۱٪ ایزوله های مقاوم به اریترومايسين حاوی ژن *ermB*، ۵٪ ایزوله ها حاوی *ermA* بوده و *ermC* در هیچ ایزوله ای مشاهده نشد (۱۳) *ermB* در این مطالعه مشابه با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بیشترین فراوانی را داشته در حالیکه فراوانی *ermC* با مطالعه حاضر که (۶۳٪) بوده متفاوت می باشد، که این تفاوت می تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی بیوتیک

<sup>2</sup> Lopez<sup>3</sup> Aarestrup<sup>4</sup> Obeng<sup>5</sup> Liu<sup>1</sup> Zou



و مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های انتروکوک نسبت به سایر باکتری های گرم مثبت؛ شناسایی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط های کلینیکی می تواند به عنوان یک خطر جدی تلقی گردد. همچنین نیاز به آنتی بیوتیک های جدید جهت جایگزینی آنتی بیوتیک های موثر فعلی برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها در آینده ای نزدیک دور از انتظار نیست. استخراج الگوی مقاومت و تعیین مکانیسم های مولکولی آن از طرف دیگر می تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چند گانه و همچنین از نظر بررسی های اپیدمیولوژی و نیز از جنبه اقتصادی برای کاهش هزینه درمان می تواند موثر باشد.

شد که مقاومت به اریترومايسين به روش آگار دایلو شن و PCR، ۷۲/۸٪ گزارش شده بود (۲۳).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه و پژوهش مقاومت بسیار بالای انتروکوک های جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری را به اریترومايسين و شیوع بسیار زیاد ژن های *erm* به ویژه *ermB* را نشان می دهد. هر چند مقاومت دارویی به تنهایی توجیه کننده بیماری زایی انتروکوک ها نمی باشد و سایر خصوصیات بیماریزایی مانند توانایی اتصال، انتشار و فرار از سیستم ایمنی در کنار شاخص های مقاومت دارویی می تواند در این امر دخالت داشته باشد ولیکن باتوجه به سهولت انتقال ژن های بیماریزایی

### References

1. Geo FB, Karen CC, Janet SB, Stephen AM. Jawetz- Melnick & Adelborg's Medical Microbiology. 26<sup>th</sup> ed. United state: McGraw-Hill; 2013.
2. Harbarth S, Cosgrove S, Carmeli Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant *enterococci*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(6):1619-1628.
3. Feizabadi MM, Sayadi S, Shokrzadeh L, Parvin M, Yadegarynia D. Increase in prevalence of vancomycin resistant isolates of *Enterococcus faecium* at Labbafinejad hospital. Iranian J Clin Infect Dis 2008; 3(2):73-77.
4. Lucia MT, Maria DA, Patricia LS. *Enterococcus*. In: JAMES V, KAREN C, CARROL GF, JAMES H (editors). Manual of clinical microbiology, Vol 1. 10th ed. Washington D.C. ASM Press; 2011.350-364
5. Arias CA, Murray BE: *Enterococcus species, Streptococcus bovis* group, and *Leuconostoc species*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Elsevier, 2010.
6. Murray PA, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Saunders. Mosby: ELSEVIER Inc; 2013.
7. Schonfeld W, Kirst HA. Macrolide Antibiotics. Milestones in drug therapy. Birkhauser, Germany, 2002
8. Louis B. Rice, Robert A. Bonomo. Genetic and Biochemical mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Victor Lorian M.D (editor). Antibiotics in Laboratory medicine. 5<sup>th</sup> ed. edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 440-470.
9. Joseph DC, Yao, Robert C, Moellering JR. *Antibacterial agents*. In: JAMES V, KAREN C, CARROL GF, JAMES H (editors). Manual of clinical microbiology, Vol 1. 10th ed. Washington D.C. ASM Press; 2011. 1053-1055.
10. Sutcliffe J, Amelia TK, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob Agents Chemother 1996 Aug;40(8):1817-1824.
11. Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. New Microbiol 2011; 34(1):73-80.

12. Cauwerts K, Decostere A, De Graef EM, Haesebrouck F, Pasmans F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm(B) gene. *Avian Pathol* 2007; 36(5):395-399.
13. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Pol J Microbiol* 2008;57(2):173-178.
14. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(4): 967-971.
15. Lim JA, Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 49(3):489-495.
16. McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerg Infect Dis*. 1997 Jul-Sep;3(3):311-317.
17. Kim J, Lee S, Choi S. Copper resistance and its relationship to erythromycin resistance in *Enterococcus* isolates from bovine milk samples in Korea. *J Microbiol* 2012, 50(3):540-543.
18. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes gene among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microb Drug Resist* 2006;12(2):256-268.
19. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall C.G. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Clin. Microbiol Rev* 2000;13: 680-707
20. Lopez F, Culebras E, Betriú C, Rodríguez-Avial I, Gómez M, Picazo JJ. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin-dalfopristin: level of quinupristin-dalfopristin resistance is not dependent on erm(B) attenuator region sequence. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(1):73-77.
21. 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; 37(2):127-137.
22. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Comparison of antimicrobial resistance patterns in *enterococci* from intensive and free range chickens in Australia. *Avian Pathol* 2013;42(1):45-54.
23. Liu Y, Liu K, Lai J, Wu C, Shen J, Wang Y. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. *J Appl Microbiol* 2013;114(2):555-563.