DOI: 10.48305/jims.v40.i700.1044

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۷۰۰/هفته‌ی چهارم بهمن ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۵ تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۱/۲۸

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بایوسایدی و شیوع ژن‌های *qacAB*، *smr* و *norA* در *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران مراکز آموزشی درمانی اصفهان

نفیسه جعفری کندری[۱]، داود منصوری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین (VRE (Vancomycin-resistant *Enterococci* به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بایوسایدی، از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی می‌باشند که به یکی از مشکلات عمده در بیمارستان‌ها تبدیل شده‌اند. این مطالعه به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حداقل غلظت مهارکنندگی کلرهگزیدین و بنزالکنیوم کلراید، بررسی میزان شیوع ژن‌های مقاومت بایوسایدی *norA*، *smr* و *qacAB* و سنجش زمان کشندگی بایوسایدها در ایزوله‌های VRE انجام شده است.

روش‌ها: در این مطالعه، ۵۰ ایزوله‌ی VRE از بیمارستان‌های آموزشی شهر اصفهان جمع‌آوری و با تست‌های فنوتایپیک تأیید شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین با روش براث میکرودایلوشن تعیین گردید. شیوع ژن‌های مقاومت بایوسایدی و تعیین قدرت کشندگی بایوسایدها با روش PCR و Time-kill assay بررسی شد.

یافته‌ها: از ۵۰ ایزوله‌ی بالینی، تمام ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و اریترومایسین مقاوم و به لینزولید حساس بودند. محدوده‌ی (Minimum inhibitory concentration) MIC بنزالکنیوم کلراید و کلرهگزیدین به ترتیب ۸-۴ و ۸-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. ژن‌های *norA*، *smr* و *qacAB* به ترتیب در ۸۴، ۵۶ و ۲۴ درصد از ایزوله‌ها شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که علاوه بر لینزولید به عنوان داروی انتخابی ایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین، بایوسایدهای کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید نیز اثر کشندگی بسیار خوبی بر روی این ایزوله‌ها داشتند. اما با توجه به مقاومت بالا نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها، انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی لازم به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ *انتروکوکوس*؛ ونکومایسین؛ ترکیبات بنزالکنیوم کلراید؛ کلرهگزیدین

ارجاع: جعفری کندری نفیسه، منصوری داود. **مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بایوسایدی و شیوع ژن‌های *qacAB*، *smr* و *norA* در *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران مراکز آموزشی درمانی اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۷۰۰): ۱۰۵۱-۱۰۴۴

مقدمه

انتروکوک‌ها (*Enterococci*) ارگانیسم‌های گرم مثبتی هستند که اکنون به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی شایع شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها، کاتالاز منفی هستند و در محدوده‌ی دمایی ۴۰-۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۰ درصد نمک‌های صفراوی و ۶/۵ درصد سدیم کلرید رشد می‌کنند (۱). *انتروکوک*‌ها به دلیل داشتن فاکتورهای بیماری‌زایی و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یکی از مشکلات جدی در بیمارستان‌ها تبدیل شده‌اند (۲).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یک تهدید بزرگ برای سلامت انسان در سراسر جهان است و هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. *انتروکوک*‌ها به دلیل مقاومت ذاتی به چند آنتی‌بیوتیک و توانایی مقاومت به داروهای متعدد به عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی شناخته می‌شوند. از زمان شناسایی اولین *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin-resistant *Enterococci*) VRE در سال ۱۹۸۰، عفونت با این باکتری اثر جدی بر بهداشت عمومی گذاشته است (۳، ٤). این باکتری پاتوژن فرصت‌طلبی است

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: داود منصوری: گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mansuryd@med.mui.ac.ir

کـه عامـل عفونـت‌هـای مجـاری ادراری، بـاکتریمی، سپسـیس و انـدوکاردیت مـی‌باشـد، بـه ویـژه، دو گونـه‌ی مهـم ایـن جـنس کـه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* می‌باشند (۵).

ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که باعث مهار سنتز دیواره‌ی سلولی می‌گردد و برای درمان عفونت‌هـای باکتریـایی گرم مثبت، از جمله *انتروکوک*‌ها اسـتفاده مـی‌شـود و تـاکنون ۹ تیـپ (van A, B, C, D, E, G, L, M and N) از شاخص‌هـای مقاومـت گلیکوپپتیدی در این باکتری گزارش شده است (۵).

عملاً هر پاتوژنی پتانسیل ایجـاد عفونـت در بیمـاران را دارد امـا فقـط شـمار محـدودی از گونـه‌هـای باکتریـایی مسـؤول اکثریـت عفونت‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان هسـتند و در ایـن بـین بایوسایدها نقش بزرگی را در کنتـرل عفونـت و پیشـگیری از انتشـار بیمارستانی پاتوژن‌ها بازی می‌کنند (۶، ۷).

بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین دی گلوکونـات از شـایع‌تـرین عواملی هستند که به طور گسترده در بیمارستان‌هـا و مراکـز بهداشـتی برای کنترل رشد یا مرگ باکتری‌ها استفاده می‌شوند (۸). در باکتری‌هـا کاهش حساسیت به بایوسایدها اکثراً مربوط به فعالیت پمـپ افلاکـس و ژن‌های مقاومت بایوسایدی می‌باشد (۳). پمپ‌هـای افلاکـس چنـد دارویی باعث انتقال طیف گسترده‌ای از ترکیبات به بیرون از باکتری و منجر به گسترش سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی می‌شـوند. سـوپر خانواده تسهیل‌کننده‌ی بـزرگ (Major facilitator superfamily) و خانواده‌ی مقاومت چند دارویـی کوچـک (Small multidrug resistance) دو خـانواده از پمـپ‌هـای افلاکـس چنـد دارویـی هسـتند کـه در *انتروکوک*‌ها شناسایی شده‌اند (۸).

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های *انتروکوکی* در بیمارستان‌ها بـه دلیـل افـزایش مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی و بایوسـایدی و عـدم انجـام مطالعات در زمینه‌ی مقاومت بایوسایدی ایزوله‌های *انتروکوک* در شهر اصفهان، برآن شدیم تا مطالعه‌ای در این زمینه انجام دهیم. در ایـن مطالعـه، نمونه‌های *انتروکـوک* از بیمارسـتان‌هـای آموزشـی اصـفهان جمع‌آوری و نمونه‌ها از طریق تست‌های تشخیصـی تأییـد شـدند. تسـت آنتـی‌بیـوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت این باکتری‌ها انجـام و *انتروکـوک*‌هـای مقـاوم به ونکومایسین شناسایی گردیـد. سـپس بـا روش میکرودایلوشـن بـراث، حداقل غلظت مهـاری (Minimum inhibitory concentration) MIC ایزولـه‌هـای *انتروکـوک* مقـاوم بـه ونکومایسـین بـه بایوسـایدهای بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین تعیـین و در نهایـت شـیوع ژن‌هـای مقاومت بایوسایدی و زمان کشندگی دو بایوساید ارزیابی شد.

روش‌ها

نمونه‌گیری و تشخیص ایزوله‌های انتروکـوک: در ایـن مطالعـه، تعـداد ۴۲۰ نمونه‌ی بالینی طی مدت ۸ ماه در سال ۱۴۰۰ از بیمارسـتان‌هـای منتخب آموزشی شهر اصفهان جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها ابتـدا بـر روی محیط بلاد آگار کشت داده و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گـراد انکوبـه شدند و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از تسـت‌هـای میکروبـی مرسـوم مثل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتـالاز، بایـل اسـکولین آگـار و رشـد در محـیط BHI (Brain Heart Infusion) حـاوی ۶/۵ درصـد نمـک تشخیص داده شدند (۴).

تعیـین انتروکـوک مقـاوم بـه ونکومایسـین (VRE): بـرای تعیـین ایزولـه‌هـای VRE، بعـد از کشـت، دیسـک‌هـای ۳۰ میکروگرمـی ونکومایسین و تیکوپلانین بر روی محیط کشت مولرهینتـون آگـار قـرار داده شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت کامل، بـرای تعیـین دقیـق مقاومـت انکوبـه شدند. بر اسـاس (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI 2021، هاله‌ی عدم رشد مساوی یا کمتر از ۱۴ میلی‌متـر بـرای ونکومایسین و مساوی یا کمتر از ۱۰ میلـی‌متـر بـرای تیکـوپلانین بـه عنوان ایزوله‌های VRE در نظر گرفته شدند.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزولـه‌هـای انتروکـوک مقـاوم بـه ونکومایسین (VRE): بعد از تشخیص ایزوله‌های *انتروکوک* مقـاوم بـه ونکومایسین، تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیـوژن (Kirby-Bauer) بـر اسـاس دسـتورالعمل CLSI بـا اسـتفاده از دیسـک‌هـای اریترومایسـین (۱۵ µg)، داکسـی‌سـیکلین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، لینزولیـد (۳۰ µg) و پنـی‌سـیلین بـر روی محیط مولرهینتون آگار انجام و بعد از ۱۸–۱۶ ساعت انکوبـه‌گـذاری، بر اساس قطر هاله‌ی عدم رشد به سه دسـته مقـاوم، حسـاس و نیمـه حساس گزارش شدند (۹).

تعیین حداقل غلظت مهارکننـدگی (MIC) بنزالکونیـوم کلرایـد و کلرهگزیـدین: تعیـین MIC بـه روش میکرودایلوشـن بـراث بـرای بایوسایدهای کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلرید بـا سـه بـار تکـرار در پلیت‌های ۹۶ خانه بر اساس دستورالعمل CLSI انجام شـد. بـه طـور خلاصه ابتدا به تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محـیط مولرهینتـون براث ریخته و سپس با بایوساید مورد نظر رقیق‌سازی انجـام (بـه جـز چاهک کنترل مثبت) و پـس از آن از کشـت‌هـای ۲۴ سـاعته، غلظتـی معادل با نـیم مـک فارلنـد تهیـه و ۱ بـه ۱۰ رقیـق شـد. در نهایـت ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی رقیق شده به هر چاهک (بـه جـز چاهـک کنتـرل منفـی) اضـافه گردیـد (5×10^5 CFU/mL). سـپس پلیت‌ها به مدت ۱۶–۲۰ سـاعت در ۳۷ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد انکوبـه شدند. MIC به عنوان کم‌ترین غلظتی که رشدی نداشته باشد در نظـر گرفته شد (۵).

استخراج DNA و شناسـایی ژن‌هـای qacAB, norA و smr توسـط روش PCR (Polymerase chain reaction): اسـتخراج

DNA به روش جوشاندن انجام شد. به منظور بررسی حضور ژن‌های مقاومت بایوسایدی از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل مسترمیکس، پرایمر ۱۰ پیکومول Forward و Reverse، آب مقطر و DNA استخراج شده انجام شد. در ادامه واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه دناتوراسیون در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در ٤٥ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Green viewer منتقل و الکتروفورز و سپس محصولات با دستگاه ژل داک بررسی گردید (۹).

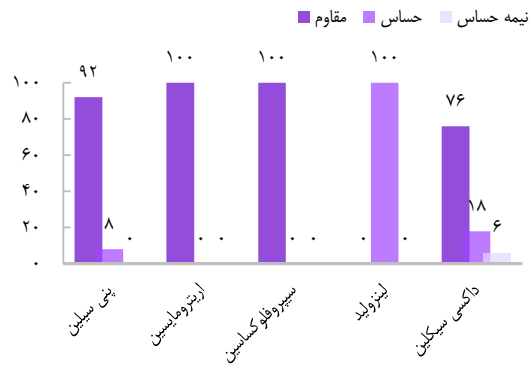
آزمایش زمان کشتن (Time kill assay): این آزمایش برای تعیین قدرت کشندگی بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین بر روی ایزوله‌های VRE در بازه‌های زمانی مختلف انجام گرفت. دو ایزوله با MIC بالا برای این دو بایوساید انتخاب شد. از کشت ٢٤ ساعته، غلظتی معادل نیم مک فارلند تهیه و ۱ به ۱۰ رقیق گردید. لوله‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط مولرهینتون براث به طور جداگانه با غلظت‌های نیم، یک و دو برابر MIC به دست آمده از بایوساید، رقیق‌سازی و سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده تلقیح و در انکوباتور شیکردار در ۱۲۰ دور در دقیقه و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. ۱۰ میکرولیتر از هر رقت سریالی در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ٤٥، ٦٠ و ۱۲۰ دقیقه برداشته و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق و در نهایت ۵۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شد. این پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٢٤–۱۸ ساعت انکوبه و پس از آن تعداد کلنی‌ها بر اساس CFU/ml محاسبه گردید (۵).

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین معنی‌داری داده‌ها از آزمون Chi-square استفاده شد. مقادیر P < ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از بین ٤٢٠ نمونه‌ی *انتروکوک* که طی مدت ۸ ماه از بیمارستان‌های منتخب آموزشی اصفهان جمع‌آوری شد، ۵۰ نمونه *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین جداسازی گردید. از بین ۵۰ نمونه‌ی بالینی *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین مورد مطالعه، بیشترین نمونه مربوط به نمونه‌ی ادرار (۲۸ نمونه) با ٥٦ درصد، و بعد از آن مربوط به نمونه‌ی خون (٤ نمونه) و تراکئال (٤ نمونه) با ۸ درصد بود. بخش ICU (۱۰ نمونه) با ۲۰ درصد و بخش اورژانس (۹ نمونه) با ۱۸ درصد، بیشترین بخش‌ها با نمونه‌ی *انتروکوک* شناسایی شدند و بعد از آن بخش نفرولوژی، نورولوژی و جراحی (۷، ٦ و ٦ نمونه) با ١٤، ۱۲ و ۱۲ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند. ۵۰ درصد از ایزوله‌ها از بیماران زن و ۵۰ درصد از بیماران مرد بودند.

بر اساس تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ۵۰ ایزوله‌ی *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین، تمام ایزوله‌ها به لینزولید حساس و به اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و ٧٦ درصد از ایزوله‌ها دارای مقاومت به داکسی‌سیکلین و ۹۲درصد هم به پنی‌سیلین مقاوم بودند (شکل ۱).



شکل ۱. درصد الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین (VRE) به روش دیسک دیفیوژن

جدول ۱. پرایمرهای به کار رفته جهت انجام PCR

منبع	اندازه‌ی محصول	پرایمر	توالی پرایمر
(۱۷)	361 bp	*qac A/B*	R: CCAGTCCAATCATGCCTG F: GCAGAAAGTGCAGTTCG
(۱۹)	157 bp	*smr*	R: GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT F: GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA
(۱۹)	314 bp	*nor A*	R: ACGCACCTGCGATTAAAGGA F: GGCGGTATATTTGGGGCACT

جدول ۲. تعیین MIC بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین در *انتروکوک*های مقاوم به ونکومایسین

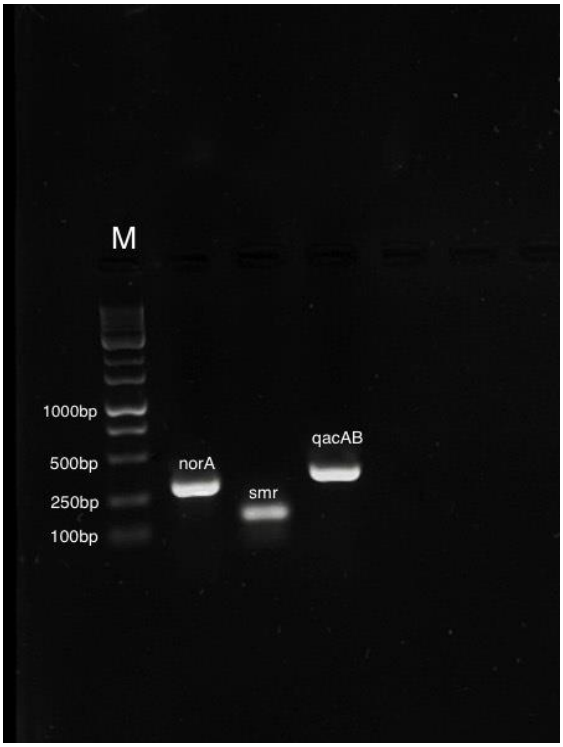
MIC		بنزالکونیوم کلرید		کلرهگزیدین			
		٤ (درصد)	٨ (درصد)	١ (درصد)	٢ (درصد)	٤ (درصد)	٨ (درصد)
نوع نمونه	ادرار	۴۲/۰	۱۴/۰	۲/۰	۲/۰	۳۸/۰	۱۴/۰
	برونش	۲/۰	۲/۰		۲/۰		۲/۰
	نای	۴/۰	۴/۰			۶/۰	۲/۰
	زخم	۲/۰	۴/۰			۶/۰	
	مایع مغزی نخاعی	۲/۰					۲/۰
	خون	۶/۰	۲/۰			۶/۰	۲/۰
	جنب	۴/۰			۲/۰	۲/۰	
	کاتتر	۲/۰				۲/۰	
	باکتک	۴/۰	۲/۰			۲/۰	۴/۰
	ترشح	۲/۰				۲/۰	
	بافت	۲/۰					۲/۰
مجموع		۷۲/۰	۲۸/۰	۲/۰	۶/۰	۶۴/۰	۲۸/۰

MIC: Minimum inhibitory concentration

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی بایوسایدها نشان داد که از مجموع ۵۰ ایزوله‌ی بالینی، ۷۲ درصد از ایزوله‌ها، میزان MIC برابر ٤ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۸ درصد هم MIC ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای بنزالکونیوم کلرید نشان دادند. محدوده‌ی MIC کلرهگزیدین هم ۱–۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که به ترتیب ۲، ٦، ٦٤ و ۲۸ درصد از ایزوله‌ها MIC ۱، ۲، ٤ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان دادند (جدول ۲).

همچنین آنالیز آماری، ارتباط معنی‌داری بین نوع نمونه، سن و جنس افراد و مقادیر MIC بنزالکنیوم کلراید و کلرهگزیدین نشان نداد ($P > ۰/۰۵$).

ژن‌های *norA*، *smr* و *qacAB* از شایع‌ترین ژن‌های مقاومت بایوسایدی هستند که شیوع آن‌ها در این مطالعه با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). بر اساس نتایج PCR برای سه ژن *norA*، *smr* و *qacAB* از مجموع ۵۰ ایزوله انتروکوک مقاوم به ونکومایسین، فراوان‌ترین ژن در بین ایزوله‌های VRE، ژن norA با ۸٤ درصد بود و بعد از آن، ژن‌های smr و *qacAB* با ٥٦ و ٢٤ درصد بودند (جدول ۳). از بین ۵۰ ایزوله‌ی بالینی، ٦ نمونه دارای هر سه ژن *qacAB*، *smr* و *norA* بودند که الگوی مقاومت مشابهی به آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌ی ما داشتند و به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها جز لینزولید مقاوم بودند و فقط دو نمونه وجود داشت که هیچ ژن مقاومت بیوسایدی در آن ردیابی نشد. در این خصوص ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن‌های مقاومت بیوسایدی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌ها مشاهده نگردید ($P > ۰/۰۵$).



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی ژن‌های *norA*، *smr* و *qacAB* در ایزوله‌های VRE

M: مارکر 1kb، *norA*: 314 bp ، *smr*: 157 bp، *qacAB*: 361 bp

VRE: Vancomycin-resistant *Enterococci*

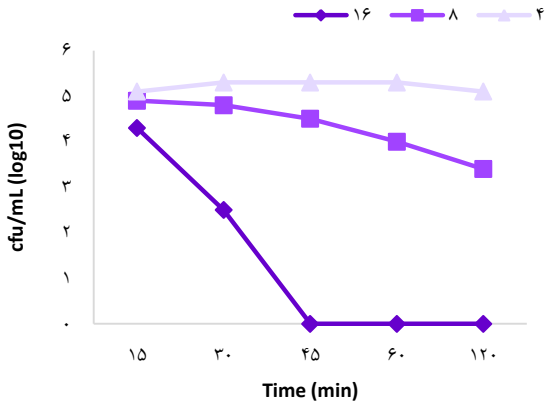
آزمایش زمان کشندگی (Time kill assay) بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین بر روی دو ایزوله از *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین که بالاترین مقادیر MIC را در مطالعه‌ی ما داشتند انجام گرفت. ایزوله‌ها

در معرض غلظت MIC، دو برابر MIC، و نصف MIC قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان داد که ایزوله VRE با MIC ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای بنزالکونیوم کلرید، در غلظت MIC (۸)، دو برابر (۱۶) و غلظت نصف (٤) اثر کشندگی و کاهشی بر روی تعداد کلنی در فاصله‌ی زمانی ۱۲۰ دقیقه داشته است (شکل ۳).

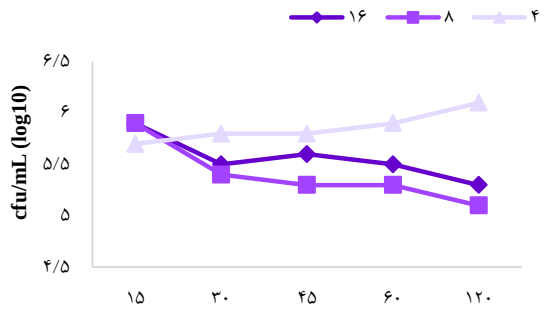
جدول ۳. فراوانی ژن‌های مقاومت بایوسایدی در *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومایسین بر اساس نوع نمونه

ژن		*qacAB* (درصد)	*norA* (درصد)	*Smr* (درصد)
نمونه	ادرار	۱۴/۰	۴۸/۰	۳۰/۰
	برونش		۴/۰	۲/۰
	نای	۲/۰	۶/۰	۴/۰
	زخم	۲/۰	۶/۰	۲/۰
	CSF		۲/۰	۲/۰
	خون	۲/۰	۴/۰	۴/۰
	پلورال		۴/۰	۲/۰
	کاتتر		۲/۰	۲/۰
	باکتک	۲/۰	۶/۰	۶/۰
	ترشح	۲/۰	۲/۰	۲/۰
	بافت		۰	
مجموع		۲۴/۰	۸۴/۰	۵۶/۰

ایزوله‌ی دیگر با MIC ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کلرهگزیدین، در غلظت MIC (۸) و غلظت دو برابر (۱۶) اثر کشندگی آن در فواصل زمانی به تدریج افزایش و CFU کاهش پیدا کرده است ولی در غلظت نصف MIC (٤) افزایش CFU مشاهده شد (شکل ٤).



شکل ۳. زمان کشندگی بنزالکونیوم کلرید در *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین



شکل ٤. زمان کشندگی کلرهگزیدین در *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین

بحث

در دهه‌های اخیر، اکثر پاتوژن‌ها مثل *انتروکوک‌ها* که عامل انواع عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت‌های فرصت‌طلب می‌باشند، مقاومت زیادی به آنتی‌بیوتیک‌های موجود کسب کرده‌اند (٤). از سوی دیگر، استفاده‌ی گسترده از عوامل بایوسایدی، منجر به کاهش حساسیت بایوسایدی در باکتری‌ها شده است. اگرچه ثابت نشده، اما ممکن است از بقای سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک حمایت کند و در نتیجه انتقال ژن‌های مرتبط با مقاومت را تسهیل نماید (۸).

مطالعه‌ی حاضر، اولین مطالعه‌ای است که با موضوع بررسی مقاومت بایوسایدی و توزیع ژن‌های مقاومت بایوسایدی *norA*، *smr* و *qacAB* در ایزوله‌های VRE در شهر اصفهان انجام گرفته است.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های VRE توسط روش دیسک دیفیوژن مورد مطالعه قرار گرفت. در بین ۵۰ ایزوله VRE که در مطالعه‌ی ما جداسازی شد، همه‌ی ایزوله‌ها به لینزولید حساس بودند و مقاومت کامل به اریترومایسین و سیپروفلوکساسین نشان دادند. مقاومت به داکسی‌سیکلین و پنی‌سیلین هم در ۷٦ و ۹۲ درصد ایزوله‌ها وجود داشت.

در مطالعه‌ی زنگنه کمالی و همکاران که در سال ۱٤۰۰ در اصفهان انجام شد، بیشترین حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک لینزولید بود (۲). در مطالعه‌ی دیگری که در تهران انجام گرفت، تمامی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و اریترومایسین مقاوم و به لینزولید حساس بودند (۱۰).

رزاز رحمتی و همکاران هم در مطالعه‌ی خود نشان دادند که از ۲۰۳ ایزوله‌ی *انتروکوک*، همه به لینزولید حساس بودند (۱۱). نتایج مطالعات ما و دیگر مطالعات نشان داد که در حال حاضر مناسب‌ترین آنتی‌بیوتیک برای درمان *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومایسین، لینزولید می‌باشد.

در مطالعه‌ای که در کشور اتیوپی انجام شد، از بین ۱۱٤ ایزوله‌ی *انتروکوک*، ۳٦ درصد ایزوله‌ها به آمپی‌سیلین، ٥٤ درصد به

استرپتومایسین، ۳٤ درصد به جنتامایسین، ۵۰ درصد به سیپروفلوکساسین و ٦۳ درصد به اریترومایسین مقاوم بودند (۱۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱٦ انجام شد، سطح بالایی از مقاومت به جنتامایسین (٤۵/٦ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۹/۰۳ درصد) و اریترومایسین (۷٦/۱۹ درصد) مشاهده شد که به نتایج مطالعه‌ی ما نزدیک بود (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری هم که در هند انجام گرفت، سطح مقاومت به سیپروفلوکساسین، ۵۰ درصد بود که نسبت به مطالعه‌ی ما، سطح مقاومت کمتری مشاهده شد (۱٤). بر اساس الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، درصد مقاومت در کشورهای مختلف ممکن است متفاوت باشد اما با این وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی به شدت از سال‌های گذشته افزایش پیدا کرده است و آنتی‌بیوتیکی مثل سیپروفلوکساسین، درصد مقاومت بالایی در ایران و کشورهای دیگر دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، فعالیت بایوسایدها با اندازه‌گیری MIC آن‌ها در برابر ایزوله‌های VRE مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج MIC ایزوله‌های VRE در مطالعه‌ی ما نشان داد که MIC بنزالکونیوم کلراید در محدوده‌ی ۸-٤ میکروگرم در میلی‌لیتر و MIC کلرهگزیدین در محدوده‌ی ۸-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

مقادیر MIC در مطالعات مختلف ممکن است تفاوت‌های کمی داشته باشند که عوامل متعددی از جمله موقعیت جغرافیایی و شرایط بهداشتی بیمارستان دخیل هستند. در دو مطالعه‌ای که در ایران انجام شد، مقادیر MIC کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید در اردبیل ۸ میکروگرم و ۱٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مطالعه‌ای که در کرمان انجام شد MIC کلرهگزیدین و بنزالکونیوم ۱٦ تا ۱۲۸ و ۲ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است که تقریباً در محدوده‌ی MIC ایزوله‌های مطالعه‌ی ما بود اما مقادیر MIC کلرهگزیدین در کرمان بالاتر از نتایج ما بود (۸، ۱۵).

در پژوهش Bhardwaj و همکاران در تگزاس، MIC کلرهگزیدین ۰/۵ تا ۱٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱٦). در مطالعات Schwalbe و همکاران (۵) و Ignak و همکاران (۱۷) که در دانمارک و ترکیه انجام شد، MIC بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین را ۸ و ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۸-۱٦ و ٦-۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند.

نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که بیشترین فراوانی در بین ژن‌های مقاومت بایوسایدی مربوط به ژن norA با ۸٤ درصد بود. ژن‌های smr و qacAB با ۵٦ و ۲٤ درصد فراوانی کمتری در بین ایزوله‌های VRE داشتند.

در مطالعه‌ای که Sobhanipoor و همکاران در سال ۲۰۲۱ در کرمان به منظور بررسی کاهش حساسیت به بایوسایدها در ایزوله‌های *انتروکوک* انجام دادند، هیچ ژن *qacAB* ردیابی نشد (۸).

شیوع ژن *qacAB* در مطالعه‌ی Namaki Kheljan و همکاران که در سال ۲۰۲۱ در اردبیل انجام شد در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، ۱۹/٤ و ۱۰/۳ درصد بود (۱۵).

در مطالعه‌ی Ignak و همکاران هم ژن *qacAB* شناسایی نشد (۱۷).

Bischoff و همکاران هم در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند از بین ٤۲ نمونه‌ی خون و ۱۰۹ نمونه‌ی مدفوع، فقط یک ایزوله دارای ژن *qacAB* و یک ایزوله از نمونه‌ی مدفوع دارای ژن *smr* بود (۱۸).

بررسی شیوع ژن‌های مقاومت بایوسایدی در ایزوله‌های *انتروکوکوس* با توجه به شیوع گسترده‌ی آن در بیمارستان‌ها به عنوان یکی از پاتوژن‌های بیمارستانی، کم‌تر در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گرفته است و بیشتر بر روی باکتری‌هایی چون MRSA (Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus) انجام شده است که این موضوع یکی از دلایلی است که ایزوله‌های VRE بیشتر از قبل شیوع پیدا کرده‌اند و مقاومت بایوسایدی در آن‌ها افزایش یافته است.

Time kill assay (آزمایش زمان کشتن) که بر روی دو ایزوله با مقادیر MIC بالا انجام شد، اثر کشندگی بنزالکونیوم کلرید و کلرهگزیدین در غلظت MIC و غلظت دو برابر آن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ دقیقه تا ۱۲۰ دقیقه به تدریج افزایش پیدا کرد و نشان‌دهنده‌ی این موضوع می‌باشد که استفاده از غلظت دقیق و درست، در زمان کوتاه‌تری، پاتوژن را از بین می‌برد و مانع شیوع باکتری‌های مقاوم می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با بررسی موضوع مقاومت در *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیمارستان‌های منتخب آموزشی شهر اصفهان، مشاهده شد که مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده وجود داشت که نشان داد، موضوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌هایی مثل VRE یکی از مشکلات جدی در بیمارستان‌ها می‌باشد. با توجه به نقش باکتری *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و افزایش شیوع آن در محیط بیمارستان، انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تعیین این ایزوله‌ها و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها لازم به نظر می‌رسد. با این حال نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که علاوه بر لینزولید به عنوان داروی انتخابی ایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین، بایوسایدهای کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید نیز اثر کشندگی بسیار خوبی بر روی این ایزوله‌ها داشتند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته

میکروب‌شناسی پزشکی می‌باشد که در دانشگاه علوم‌پزشکی اصفهان به تصویب رسیده و با حمایت مالی دانشگاه به انجام رسیده است.

بدین وسیله از زحمات گروه باکتری و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی تقدیر و تشکر می‌نماییم.

References

1. Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. J Pak Med Assoc 2018; 68(5): 768-72.
2. Zanganeh-Kamali B, Shokri D, Ghasemi SM. Isolation and Identification of Probiotics with Antagonistic Effect on Vancomycin Resistant Enterococci [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2022; 40(680): 532-8.
3. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. Microb Drug Resist 2018; 24(5): 590-606.
4. Elahi Y, Javdani Shahedin G, Nejati A, Ashrafi I, Asadian M, Mazaheri Nezhad Fard R. Whole-Genome Sequencing of a Clinically Isolated Antibiotic-Resistant Enterococcus faecium EntfacYE. Iran J Med Microbiol 2021; 15(6): 692-9.
5. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 1st ed. Florida, US: CRC Press; 2007.
6. Suchomel M, Lenhardt A, Kampf G, Grisold A. Enterococcus hirae, Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis show different sensitivities to typical biocidal agents used for disinfection. J Hosp Infect 2019; 103(4): 435-40.
7. Wieland N, Boss J, Lettmann S, Fritz B, Schwaiger K, Bauer J, et al. Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and-susceptible isolates of Escherichia coli, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from poultry–ESBL/AmpC-phenotype of E. coli is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. J Appl Microbiol 2017; 122(6): 1508-17.
8. Sobhanipoor MH, Ahmadrajabi R, Hosseini Nave H, Saffari F. Reduced susceptibility to biocides among enterococci from clinical and non-clinical sources. Infect Chemother 2021; 53(4): 696-704.
9. Geraldes C, Verdial C, Cunha E, Almeida V, Tavares L, Oliveira M, et al. Evaluation of a Biocide Used in the Biological Isolation and Containment Unit of a Veterinary Teaching Hospital. Antibiotics (Basel) 2021; 10(6): 639.
10. Shokoohizadeh L, Mohabati Mobarez A, Zali MR, Ranjbar R, Alebouyeh M. Frequency of vancomycin-resistant Enterococcus Faecium Strains Isolated from Urinary Tract infections (UTI) in 4 hospitals of tehran [in Persian]. J Adv Med Biomed Res 2014; 22(91): 121-30.
11. Razaz Rahmati N, Mohabati Mobarez A, Khoram Abadi N, Sharifzade peyvasti V, Shokoohizade L. Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus aureus and Enterococcus Spp. Isolated from some Hospitals in Tehran [in Persian]. Medical Laboratory Journal 2015; 9(2): 78-84.
12. Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. BMC Res Notes 2015; 8: 213.
13. Rengaraj R, Mariappan S, Sekar U, Kamalanadhan A. Detection of vancomycin resistance among Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus. J Clin Diagn Res 2016; 10(2): DC04–DC06.
14. Sreeja S, Babu P.R S, Prathab A. The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. J Clin Diagn Res 2012; 6(9): 1486.
15. Namaki Kheljan M, Teymorpour R, Peeri Doghaheh H, Arzanlou M. Antimicrobial Biocides Susceptibility and Tolerance-Associated Genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolates Collected from Human and Environmental Sources. Curr Microbiol 2022; 79(6): 170.
16. Bhardwaj P, Ziegler E, Palmer KL. Chlorhexidine induces VanA-type vancomycin resistance genes in enterococci. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2016;60(4):2209-21.
17. Ignak S, Nakipoglu Y, Gurler B. Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphycocci and enterococci isolates in Turkey. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2017;6(1):1-7.
18. Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Mölle G, Hölzel C. Detection of the Antiseptic Resistance Gene qacA/B in Enterococcus Faecalis.
19. Khazraji NZ, Al Jubouri AS, Al Ma MF. Detection of Antiseptic Resistant Genes and Biofilm Formation in Multidrug Resistant Staphylococcus aureus in Baghdad Hospitals. Iraqi journal of biotechnology. 2020;19(2).

DOI: *10.48305/jims.v40.i700.1044*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 700, 4th Week, February 2023**

Received: 19.11.2022 Accepted: 25.01.2023 Published: 17.02.2023

Resistance to antibiotics and biocides and prevalence of *qacAB*, *smr* and *norA* genes in vancomycin-resistant *Enterococci* isolated from patients of medical education centers in Isfahan, Iran

Nafise Jafari-Kondori[1], Davood Mansury[1]

Original Article

Abstract

Background: Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) are one of the most common hospital pathogens due to antibiotic and biocide resistance, which has become of the major problems in hospitals. This study was conducted in order to determine the pattern of antibiotic resistance, the minimum inhibitory concentration of chlorhexidine and benzalkonium chloride, to investigate the prevalence of biocide resistance genes norA, smr and qacAB and to measure the time-kill assay of biocides in VRE isolates.

Methods: In this study, 50 isolates of VRE were collected from teaching hospitals in Isfahan and confirmed by microbiological testing. Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) of benzalkonium chloride and chlorhexidine was determined by broth microdilution method. Prevalence of biocide resistance genes and determining the killing power of biocides were investigated by PCR and time-kill assay respectively.

Findings: Among 50 clinical isolates, all isolates were resistant to ciprofloxacin and erythromycin and susceptible to linezolid. We reported the MIC range of benzalkonium chloride and chlorhexidine 4-8 µg/ml and 1-8 µg/ml respectively. The frequency of *norA*, *smr* and *qacAB* genes were 84%, 56% and 24%.

Conclusion: The results of the present study showed that in addition to linezolid as the drug of choice for vancomycin-resistant isolates, the biocides chlorhexidine and benzalkonium chloride also had a very good lethal effect on these isolates. But due to the high resistance to other antibiotics, it seems necessary to do an antibiotic sensitivity test.

Keywords: Antibiotic resistance; *Enterococcus*; Vancomycin; Benzalkonium compounds; Chlorhexidine

Citation: Jafari-Kondori N, Davood Mansury. **Resistance to antibiotics and biocides and prevalence of *qacAB*, *smr* and *norA* genes in vancomycin-resistant *Enterococci* isolated from patients of medical education centers in Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(700): 1044-51.

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Davood Mansury, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: mansuryd@med.mui.ac.ir