

بررسی مقاومت سطح بالا به جنتامایسین و ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزید در *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسسیوم* جداشده از عفونت زخم سوخته

محسن محمدی^۱، محسن جعفری^۲، مرتضی حیدری^۳، حمید اسحاقی^۴، اباذر پورنجف^۵، رامین کفشگری^۶، مهرداد
غلامی^۷، کتایون برهانی^۴، محمود خداپنده^{۴*}

۱- مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیر کودکان، موسسه پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲- دپارتمان بیماری های عفونی کودکان، بیمارستان کودکان بهرامی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دپارتمان نورولوژی کودکان، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دپارتمان بیماری های عفونی کودکان، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- دپارتمان میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۶- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۷- دپارتمان میکروپزشکی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین و ژن های کدکننده آنزیم های
تغییردهنده آمینوگلیکوزید در *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسسیوم* جداشده از عفونت زخم سوختگی بود.

مواد و روش ها: پس از شناسایی سویه های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسسیوم*، آزمون حساسیت
آنتی بیوتیکی انجام شد. به منظور شناسایی سویه های HLGR از دیسک های جنتامایسین استفاده شد. آزمون PCR به منظور
شناسایی ژن های کدکننده AMEs انجام گردید.

یافته ها: از مجموع ۱۱۴ جدایه *انتروکوکوس*، تعداد ۵۶/۱٪ سویه HLGR بودند. تمامی سویه های HLGR واجد ژن
aac(6')-Ie-aph(2'')-Id بودند. ۱/۹٪ از سویه های HLGR *انتروکوکوس فیسسیوم* حامل ژن *aph(2'')-Id* بودند.

نتیجه گیری: داده های ما نشان داد که مقاومت به جنتامایسین در عفونت زخم سوخته در بیمارستان ما شیوع بالایی
دارد. مسئول اصلی بروز مقاومت به جنتامایسین در مطالعه حاضر، ژن *Ia-aph(2'')-Ie-aac(6')* است.

واژه های کلیدی: جنتامایسین، آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزید، *انتروکوکوس فکالیس*،
انتروکوکوس فیسسیوم، زخم سوختگی.

مقدمه

انتروکوکوس ها^۱ کوکسی های گرم مثبتی هستند که فلور
طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات هستند (۲۷).
این ارگانیسم ها قادر به ایجاد عفونت های ادراری،
اندوکاردیت، مننژیت، عفونت های خون، عفونت های داخل
شکمی و لگنی و عفونت های نوزادان هستند (۲۹). این
میکروارگانیسم دومین عامل ایجادکننده عفونت ادراری و

نویسنده مسئول:

دپارتمان بیماری های عفونی اطفال، مرکز طبی اطفال،
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

پست الکترونیک: khodabandeh@farabi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۹

¹ Enterococcus

در سال های اخیر، به دلیل افزایش مصرف خودسرانه آنتی بیوتیک ها، سویه های مقاوم به غلظت های بالای جنتامایسین (HLGR)^{۱۴} با $MIC > 500 \mu g/ml$ گزارش شده است (۶). سویه های HLGR توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی (AMEs)^{۱۵} دارند (۱۲). AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره را از بین می برد. ژن $aac(6')-aph(2')$ که کدکننده یک آنزیم دوکاره ۶-آمینوگلیکوزیل استیل-ترانسفراز و ۲-آمینوگلیکوزیل فسفوترانسفراز است در اغلب انتروکوکوس ها دیده می شود (۲۱). هم چنین ژن های $aph(3')-ant(4')-Ia$ ، $aph(2')-Ib$ ، $aph(2')-Ia$ و $IIIa$ در جمعیت های انتروکوکوسی و در ارتباط با مقاومت به آمینوگلیکوزیدها یافت شده است (۱۴). Samadi و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژن های $aac(3')-Ia$ ، $aac(3')-IIa$ و $acc(6')-Ib$ را در ۱۴۰ سویه انتروکوکوک مطالعه شده به ترتیب برابر ۷۲/۰۴٪، ۶۶/۷٪ و ۳۶/۶٪ اعلام نمودند. این محققین نتیجه گرفتند که ژن استیله کننده نقش مهمی در مقاومت به آمینوگلیکوزید در ایزوله های انتروکوکوک دارد. از این رو، هدف از مطالعه حاضر، تعیین شیوع بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین و ژن های AMEs در سویه های انتروکوکوکوس فکالیس و انتروکوکوکوس فسیوم جدا شده از عفونت زخم سوخته و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها است.

مواد و روش کار

نمونه گیری و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی^{۱۶} که در یک بازه زمانی ۹ ماهه از ابتدای دی ۱۳۹۵ لغایت انتهای شهریور ۱۳۹۶ انجام شد، تعداد ۱۸۲ نمونه غیرتکراری از زخم سوختگی ۸۴ (۴۶/۲٪) بیمار زن و ۹۸ (۵۳/۸٪) بیمار مرد بستری در مرکز درمانی شهید مطهری تهران جمع آوری گردید. میانگین سنی بیماران مطالعه شده ۲۳/۵ سال و با دامنه بین ۱۶ تا ۶۸ سال بود. هم زمان اطلاعات هر بیمار شامل

سومین عامل رایج باکتری می در عفونت های بیمارستانی^۲ هستند (۳). از میان تمامی ۲۰ گونه مختلف جنس انتروکوکوکوس، گونه های انتروکوکوکوس فکالیس^۳ و انتروکوکوکوس فسیوم^۴ شایع ترین علل ایجاد عفونت در افراد بستری در بیمارستان هستند (۱۷). تخمین زده شده که ۸۵-۹۰ درصد از تمامی عفونت های ناشی از انتروکوکوکوس توسط انتروکوکوکوس فکالیس و ۱۵-۱۰ درصد آن ها توسط انتروکوکوکوس فسیوم در انسان رخ می دهد (۱۸). به تازگی انجمن بیماری های عفونی آمریکا (IDSA)^۵ فهرستی از میکروارگانیسم های با مقاومت بالا را که در عفونت های بیمارستانی شرکت می کنند و سبب شکست درمانی می شوند منتشر کرده که به اختصار ESKAPE pathogens (E؛ انتروکوکوکوس فسیوم، S؛ استافیلوکوکوس اورئوس^۶، K؛ کلبسیلا پنومونیه^۷، A؛ اسینتوباکتر بومانی^۸، P؛ پseudوموناس آئروژینوزا^۹ و E؛ گونه های انتروباکتر^{۱۰}) نامیده می شوند (۲۸، ۱۹). از دلایل موفقیت انتروکوکوکوس ها می توان به مقاومت ذاتی، موتاسیون و یا کسب فاکتورهای مقاومتی از طریق مکانیسم های انتقال افقی ژن (HGT)^{۱۱} نام برد (۲۰). مشخص شده است که به دلیل نفوذ اندک آمینوگلیکوزیدها از خلال غشای سلولی گونه های انتروکوکوکوس، این سویه ها به خصوص انتروکوکوکوس فکالیس و انتروکوکوکوس فسیوم دارای مقاومت ذاتی به غلظت های پایین جنتامایسین هستند، به طوری که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^{۱۲} در این باکتری ها ۴ تا ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر است (۹). از طرفی ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام و یا ونکومایسین ایجاد حالت سینرژیستی^{۱۳} نموده که می تواند در درمان عفونت ها مؤثر باشد (۲۵).

² Hospital-acquired infection (HAI) or nosocomial infection

³ *Enterococcus faecalis*

⁴ *Enterococcus faecium*

⁵ Infectious Diseases Society of America

⁶ *Staphylococcus aureus*

⁷ *Klebsiella pneumoniae*

⁸ *Acinetobacter baumannii*

⁹ *Pseudomonas aeruginosa*

¹⁰ Enterobacter species

¹¹ Horizontal gene transfer

¹² Minimum inhibitory concentration

¹³ Synergistic effect

¹⁴ High Level Gentamicin Resistant

¹⁵ Aminoglycosides Modifying Enzymes

¹⁶ Cross-sectional study

جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن ثبت گردید. هم-چنین رضایتنامه اخلاقی از تمامی بیماران و یا همراهان آنها به دست آمد. نمونه ها با استفاده از سوآپ استریل و زیر نظر پزشک متخصص عفونی جمع آوری گردید. به منظور جداسازی انتروکوک ها، بعد از کشت اولیه روی محیط های آگار خون دار (Merck, Germany)، کوکسی-های گرم مثبت کاتالاز منفی جدا و آزمایش های تکمیلی جهت تشخیص انتروکوکوس ها در شرایط دمای ۴۵-۱۰ درجه سلسیوس، تحمل دمای ۶۰ درجه سلسیوس، هیدرولیز بایل اسکولین و رشد در حضور نمک ۶/۵٪ انجام گرفت. برای شناسایی گونه از تست تخمیر قند و جهت تولید اسید، از آرایینوز استفاده شد. برای تأیید روش های تشخیص *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *انتروکوکوس فیسیوم* ATCC 51559 به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. تمام جدایه ها در محیط لوریا-برتانی برات (Merck, Frankfurt, Germany) حاوی ۲۰٪ گلیسرول (v/v) در دمای ۸۰- سلسیوس برای استفاده بیش تر نگهداری شدند.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی

آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک با استفاده از روش انتشار از دیسک (DAD)^{۱۷} و مطابق با استانداردهای مؤسسه بالینی و آزمایشگاهی (CLSI, M100-S28) (۷)، بر روی محیط مولر-هینتون آگار (Merck Co., Germany) برای کلرامفنیکل (CHL؛ ۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (AMP؛ ۱۰ میکروگرم)، اریترومايسين (ERY؛ ۱۵ میکروگرم)، لینزولاید (LNZ؛ ۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (NIT؛ ۳۰۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (LEV؛ ۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CIP؛ ۵ میکروگرم)، ونکومايسين (VAN؛ ۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (TET؛ ۳۰ میکروگرم) و تریموتریم-سولفامتوکسازول (SXT؛ ۵ میکروگرم) (MAST UK, Merseyside, Diagnostics) انجام شد.

آزمون فنوتیپی سویه های HLGR

از دیسک های جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرمی برای تعیین سویه های HLGR بر روی محیط مولر هینتون آگار

استفاده شد. به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی جنتامایسین (MIC) از روش ماکروبراث-دایلوژن^{۱۸} و مطابق با استاندارد CLSI استفاده شد (۷). بدین منظور رقت های متوالی از پودر جنتامایسین (Sigma, St. Louis, MO) در محیط مولر هینتون برات (مرک، آلمان) تهیه شد. رقت ها شامل ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ بود. به طور خلاصه و برای این منظور به ده لوله آزمایش استریل مقدار ۱ میلی لیتر محیط مولر هینتون برات استریل افزوده شد و به لوله اول ۱ میلی لیتر محلول جنتامایسین اضافه گردید. محتویات لوله مذکور به خوبی مخلوط گردید تا غلظت نهایی عصاره در آن برابر ۵۰ mg/ml شود. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول در شرایط آسپتیک به لوله دوم منتقل و به خوبی مخلوط شد تا غلظت دارو نصف لوله اول و برابر mg/ml ۲۵ گردد. غلظت های سوم تا دهم دارو به همین ترتیب در لوله های بعدی تهیه شد. سپس به هر غلظت ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هینتون برات که کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (سوسپانسیون باکتریایی حاوی 1×10^8 CFU/ml) داشت، اضافه شد. در نهایت لوله ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند و با مقایسه کدورت ایجاد شده در لوله های آزمون با کدورت کنترل منفی، کم ترین غلظتی که رشد باکتری در آن مهار شده بود به عنوان MIC انتخاب گردید. در این آزمون لوله حاوی پودر جنتامایسین و *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *انتروکوکوس فیسیوم* ATCC 51559 به عنوان کنترل مثبت و لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

تکثیر ژن های AMEs با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام گرفت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) در OD=260/280=1.8-2nm آنالیز شد. پس از ثبت و سفارش توالی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران)، صحت آنها در سایت NCBI و با استفاده از

¹⁸ Macrobroth dilution

¹⁷ Disk agar diffusion

نتایج آزمایش های حساسیت ضد میکروبی بر روی ۱۱۴ جدایه انتروکوکوس در جدول ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه لینزولاید^{۲۳} (از خانواده اگرازولیدینون^{۲۴}) دارای بهترین اثر ضد میکروبی بر روی سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم بود. هم چنین به ترتیب ۹ سویه (۲۱/۹٪) و ۴ سویه (۲/۷٪) از انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس به ونکومايسين مقاوم بودند. بیش ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های انتروکوکوس فسیوم (۹۲/۷٪) و سویه های انتروکوکوس فکالیس (۹۰/۴٪) مربوط به تتراسیکلین بود (p value < 0.03).

تعیین فراوانی سویه های HLGR

از مجموع ۱۱۴ سویه انتروکوکوس، تعداد ۶۴ (۵۶/۱٪) سویه HLGR بودند. نتایج تعیین گونه در میان ۶۴ سویه HLGR نشان داد که ۳۶ (۵۶/۳٪) سویه انتروکوکوس فکالیس و ۲۸ (۴۳/۷٪) تا انتروکوکوس فسیوم هستند. نتایج ماکروبراث دایلوژن در تعیین MIC نشان داد که تمام سویه های مقاوم به جنتامایسین دارای MIC ≥ 500 μg/m هستند. مابقی سویه ها یا به مقادیر پایین جنتامایسین (فنوتیپ LLGR^{۲۵}؛ MIC ≤ 64, n=42) مقاوم بودند و یا مقادیر حد واسط (MIC < 500, n=8) مقاوم بودند (جدول ۳).

تکثیر ژن های AMEs در واکنش PCR

سویه هایی که دارای سطوح مختلفی از مقاومت نسبت به جنتامایسین بودند (HLGR و LLGR) برای بررسی ژن های AMEs استفاده شدند. فراوانی ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های انتروکوکوس در جدول ۴ آمده است. نتایج آزمون مولکولی نشان داد که تمامی سویه های HLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* می باشند. هم چنین ۳۷ سویه (۸۸/۱٪) از تمامی سویه های LLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* بودند. تمامی سویه های انتروکوکوس فکالیس با فنوتایپ HLGR و LLGR فاقد ژن *aph(2'')-Id* بودند. در مجموع از ۱۰۶ سویه با فنوتایپ

نرم افزار BLAST مورد تأیید قرار گرفتند (جدول ۱) (۱۲،۲۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/μl)، (3 mM) MgCl₂ و (0.4 mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (R و F) به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۳/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادینانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با دناتوراسیون^{۲۰} اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای ۳۲ سیکل شامل؛ دناتوراسیون در ۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها^{۲۱} در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، بسط^{۲۲} در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase) انجام شد.

آزمون آماری

داده ها در برنامه نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) و با استفاده از آزمون آماری کای اسکور تجزیه و تحلیل شدند. در این مطالعه سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

جداسازی سویه های باکتریایی

در این مطالعه، از مجموع ۱۸۲ نمونه سوآپ اخذ شده از زخم های سوخته عفونی بیماران مراجعه کننده به مرکز سوانح سوختگی شهید مطهری، تعداد ۱۱۴ (۶۲/۶٪) سویه انتروکوکوس شامل ۷۳ (۶۴/۱٪) انتروکوکوس فکالیس و ۴۱ (۳۵/۹٪) انتروکوکوس فسیوم به دست آمد.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی

²³ Linezolid

²⁴ Oxazolidinones

²⁵ Low-level gentamicin-resistant

¹⁹ Forward and reverse primers

²⁰ Denaturation

²¹ Annealing step

²² Extension step

LLGR و HLGR، تنها ۲ سویه (۱/۹٪) حامل ژن *aph(2'')-Id* بودند. تمامی سویه های LLGR از نظر وجود ژن های *aph(2'')-Ic* و *aph(2'')-Ib* و *aph(2'')-Id* منفی بودند.

بحث

لینزولاید دارای بهترین اثر ضد میکروبی بر روی سویه های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* بود. هم چنین به ترتیب ۲۱/۹٪ و ۲/۷٪ از *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* به ونکومايسين مقاوم بودند. این نتایج با مطالعه Samadi و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد (۲۴). Dadfarma و همکاران (۱۳۸۹) (۸) اظهار کردند که وجود *انتروکوکوس* های مقاوم به ونکومايسين نشان دهنده اهمیت نقش این گونه *انتروکوک* در انتشار مقاومت به ونکومايسين از طریق کلونیزه شدن آن ها در محل عفونت بیماران بستری در بیمارستان ها و هم چنین از طریق فاضلاب های بیمارستانی و شهری است که با نتایج پیش رو هم خوانی دارد. Abamecha و همکاران (۲۰۱۵) (۱) نشان دادند که از ۱۱۴ ایزوله *انتروکوکوس*، ۳۶٪ به آمپی سیلین، ۵۰٪ به سیپروفلوکساسین، ۴۹/۱٪ به نورفلوکساسین، ۶۳/۲٪ به اریترومايسين، ۶۴/۹٪ به تتراسیکلین، ۳۴/۲٪ به کلرامفنیکل و ۳۲/۴٪ به نیتروفورانتوئین مقاوم هستند. Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) مقاومت به تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین، اریترومايسين، کلرامفنیکل، آمپی سیلین را در *انتروکوکوس فسیوم* به ترتیب برابر ۹۳/۱٪، ۵۵/۱٪، ۸۹/۶٪، ۳/۱٪، ۶۵/۵٪ و ۱۳/۸٪ گزارش کرده اند در حالی که در مورد *انتروکوکوس فکالیس* برابر ۹۳/۳٪، ۲۲/۲٪، ۹۵/۵٪، ۲۸/۹٪ و ۰٪ بود. این نتایج نشان می دهد مقاومت در سویه های *انتروکوکوس فسیوم* بیش تر از *انتروکوکوس فکالیس* است که با نتایج ما کامل مطابقت دارد. هم چنین مطالعه Simonsen و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که تمامی سویه های *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی به آمپی سیلین حساس هستند در حالی که ۴۸/۸٪ از ایزوله های *انتروکوکوس فسیوم* مقاوم بودند (۲۶). در این مطالعه ها علت برخی از تفاوت ها در الگوی مقاومت دارویی می تواند ناشی از پراکندگی ژن های مقاومتی، منشأ نمونه ها، شیوع متفاوت عفونت های بیمارستانی در مراکز

درمانی مختلف، رعایت زنجیره بهداشتی در مراکز درمانی و مانیتورینگ محیط بیمارستان از نظر کنترل کیفی میکروبی باشد.

در این مطالعه از مجموع ۱۱۴ سویه *انتروکوکوس*، تعداد ۵۶/۱٪ سویه HLGR بودند که از میان آن ها ۵۶/۳٪ *انتروکوکوس فکالیس* و ۴۳/۷٪ *انتروکوکوس فسیوم* بودند. هم چنین تعداد ۴۲ ایزوله با $MIC \leq 64$ (LLGR) وجود داشت که ۶۱/۹٪ و ۳۸/۱٪ به ترتیب متعلق به *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* بودند. از سوی دیگر ۶۲/۵٪ از *انتروکوکوس فکالیس* و ۳۷/۵٪ از *انتروکوکوس فسیوم* دارای مقاومت به مقادیر حد واسط $(500 < MIC < 64)$ جنتامایسین بودند. Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) از ۵۰۰ نمونه مدفوع، تعداد ۱۵ سویه (۱۵/۲٪) HLGR جداسازی نمودند. هم چنین در مطالعه Dadfarma و همکاران (۱۳۸۹) (۱۸) از ۱۴۲ سویه جدا شده از بیماران، ۶۲ سویه (۴۳/۷٪) HLGR بودند. Amini و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۷ و Padmasini و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۴ فراوانی سویه های HLGR را با استفاده از روش MIC برابر ۴۲/۲٪ و ۴۲/۷٪ گزارش نمودند که با نتایج فعلی هم خوانی دارد. Simonsen و همکاران (۲۶) اظهار کردند که فراوانی سویه های HLGR در آزمایشگاه های بالینی مختلف متفاوت است (۲۷/۶٪-۱/۱٪). در مطالعه Feizabadi و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۰۶ از مجموع ۷۹ *انتروکوکوس فکالیس* و ۳۵ *انتروکوکوس فسیوم*، ۵۱ سویه دارای فنوتایپ HLGR، ۳۸ تا LLGR و ۱۷ تا دارای مقاومت به مقادیر حد واسط جنتامایسین بودند. Jabalameli و همکاران (۱۱) فراوانی سویه های HLGR را ۵۲٪ اعلام کردند. در سال ۲۰۱۸، Chotinantakul و همکاران (۵) نشان دادند که از ۱۱۸ *انتروکوکوس* جمع آوری شده از گوشت خوک تخمیر شده تایلندی، ۷/۶٪ دارای فنوتایپ HLGR هستند. Osuka و همکاران (۲۰۱۵) (۱۵) علت این تناقض ها را در نتیجه تفاوت در مکان و زمان انجام مطالعه، منبع نمونه گیری و مواد و روش هایی می دانند که ارگانیس م ها با آن ها مورد ارزیابی قرار می گیرند. در مورد ژن های مختلف ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین نشان داده شده که ۷۹٪ مقاومت های HLGR توسط ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')*

قابل انتقال Tn5281 امکان انتقال این ترانسپوزون را در بین ایزوله های انتروکوکوس فراهم می کند.

نتیجه گیری

توزیع ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک یک انتشار خاص جغرافیایی و منطقه ای دارد به طوری که در هر منطقه الگوی خاصی وجود دارد که این می تواند به عملکرد کمیته های نظارت بر مصرف دارو، سطح آگاهی مردم منطقه در عواقب استفاده خودسرانه از آنتی بیوتیک و تنوع ژنتیکی سویه ها وابسته باشد. داده های ما نشان داد که مقاومت به جنتامایسین در عفونت زخم سوخته شیوع بالایی دارد. علت اصلی بروز مقاومت به جنتامایسین در سویه های جداسده از بیماران سوخته تحت مطالعه، ژن *aac (6') -Ie -aph (2'') -Ia* است.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان بخش میکروپزشناسی بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری (تهران) به علت جمع آوری نمونه تشکر و قدردانی می نمایند.

Ia ۵٪ توسط ژن *aph(2'')-Ib* ۱۶٪ توسط ژن *aph(2'')-Ic* ۱۴٪ توسط ژن *aph(2'')-Id* کد می شوند. مطابق با مطالعه Feizabadi و همکاران (۲۰۰۶) (۱۰) و Noohi و همکاران (۲۰۰۹) (۱۳) تمامی سویه های HLGR حاوی ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* بودند. این نتایج نشان داد که این ژن، ژن غالب در ایجاد مقاومت سطح بالا به جنتامایسین است. در این مطالعه ژن *aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia* در تمامی سویه های HLGR و ۸۸/۱٪ از تمامی سویه های LLGR وجود داشت که اهمیت ویژه این ژن در ایجاد و انتقال مقاومت به جنتامایسین در سویه های انتروکوکوس موجود در زخم های سوختگی را نشان می دهد. Padmasini و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۴ فراوانی ژن های کدکننده AMEs را ۳۸/۲٪ و ۴۰/۴٪ به ترتیب برای ژن های *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* و *aph(3')-IIIa* گزارش نمودند. این محققین نیز ژن های *aph(2'')-Ib*، *aph(2'')-Ic* و *aph(2'')-Id* را در میان ایزوله های خود مشاهده نمودند. هم چنین Amini و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۷ در کرمانشاه فراوانی ژن های *aac(6')-Ie-aph(2'')-I* و *ant(6')-Ia* و *ant(3'')-III* را به ترتیب ۴۲/۶٪، ۲۰/۴٪ و ۱۵/۷٪ گزارش نمودند. در مطالعه پیش رو تمامی سویه های انتروکوکوس فکالیز فاقد ژن *aph(2'')-Id* بودند، در حالی که ۱/۹٪ از سویه های HLGR انتروکوکوس فیسیوم حامل این ژن بودند. Rosvoll و همکاران (۲۰۱۲) (۲۲) در مطالعه خود شیوع ژن *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia* را در ایزوله های HLGR ۹۸٪ اعلام کردند. Behnood و همکاران (۲۰۱۳) (۴) اعلام کردند که شیوع ژن *aac (6') Ie-aph (2'')Ia* در ایزوله های مقاوم به جنتامایسین بسیار بالا است. این محققین اظهار کردند که حمل ژن *aac (6') Ie-aph (2'')Ia* در عنصر

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

اندازه محصول PCR (bp)	توالی الیگونوکلوئیدی پرایمر (۵'→۳')	ژن هدف
۳۶۹	F= 5'-CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG-3' R= 5'-CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC-3'	<i>aac(6')-Ie -aph(2'')-Ia</i>
۵۲۳	F= 5'-GGCTAAAATGAGAATATCACCGG-3' R= 5'-CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG-3'	<i>aph(3')-IIIa</i>
۲۹۶	F= 5'-CAAACGTCTAAATCGGTAGAAGCC-3' R= 5'-GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT-3'	<i>ant(4')-Ia</i>
۶۴۱	F= 5'- GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC -3' R= 5- CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC -3'	<i>aph(2'')-Id</i>
۸۶۷	F= 5'- CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC -3' R= 5- GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCCTT -3'	<i>aph(2'')-Ib</i>
۴۴۴	F= 5'- CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC -3' R= 5- CCACAGTTCGGATAGCAAGAG -3'	<i>aph(2'')-Ic</i>

جدول ۲: پروفایل حساسیتی سویه‌های تحت مطالعه

عامل ضد میکروبی	انتروکوکوس فکالیس			انتروکوکوس فیسیوم		
	S	I	R	S	I	R
کلرامفنیکل	۳۲ (٪ ۴۳/۸)	۰ (٪ ۰)	۴۱ (٪ ۵۶/۲)	۱۹ (٪ ۴۶/۳)	۲ (٪ ۴/۸)	۲۰ (٪ ۴۸/۸)
امپی‌سیلین	۷۳ (٪ ۱۰۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۱۷ (٪ ۴۱/۵)	۱ (٪ ۲/۴)	۲۳ (٪ ۵۶/۱)
اریترومایسین	۲۴ (٪ ۳۲/۸)	۰ (٪ ۰)	۴۹ (٪ ۶۷/۱)	۹ (٪ ۲۱/۹)	۰ (٪ ۰)	۳۲ (٪ ۷۸)
تری‌موت‌ریم-سولفا‌متوکسازول	۳۰ (٪ ۴۱/۱)	۱ (٪ ۱/۴)	۴۲ (٪ ۵۷/۵)	۱۰ (٪ ۲۴/۴)	۱ (٪ ۲/۴)	۳۰ (٪ ۷۳/۳)
سیپروفلوکساسین	۳۳ (٪ ۴۵/۲)	۰ (٪ ۰)	۴۰ (٪ ۵۴/۷)	۲۳ (٪ ۵۶/۱)	۰ (٪ ۰)	۱۸ (٪ ۴۳/۹)
تتراسیکلین	۷ (٪ ۹/۵)	۰ (٪ ۰)	۶۶ (٪ ۹۰/۴)	۳ (٪ ۷/۳)	۰ (٪ ۰)	۳۸ (٪ ۹۲/۷)
نیترو‌فوران‌توئین	۴۴ (٪ ۶۰/۳)	۱ (٪ ۱/۴)	۲۸ (٪ ۳۸/۴)	۲۲ (٪ ۵۳/۶)	۰ (٪ ۰)	۱۹ (٪ ۴۶/۳)
لووفلوکساسین	۶۳ (٪ ۸۶/۳)	۰ (٪ ۰)	۱۰ (٪ ۱۳/۷)	۲۹ (٪ ۷۰/۷)	۰ (٪ ۰)	۱۲ (٪ ۲۹/۳)
ونکوما‌سین	۶۹ (٪ ۹۴/۵)	۰ (٪ ۰)	۴ (٪ ۲/۷)	۳۲ (٪ ۷۸)	۰ (٪ ۰)	۹ (٪ ۲۱/۹)
لینزولاید	۷۳ (٪ ۱۰۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۴۱ (٪ ۱۰۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)

Abbreviations : R, resistant; S, susceptible, I, intermediate.

جدول ۳: نتایج ماکروبراث دایلو‌شن در تعیین MIC جنتامایسین در سویه‌های تحت مطالعه

سویه‌های تحت مطالعه	MIC ≥ ۵۰۰ µg/mL	MIC ≤ ۶۴ µg/mL	۶۴ < MIC < ۵۰۰
انتروکوکوس فکالیس	۳۶ (٪ ۵۶/۳)	۲۶ (٪ ۶۱/۹)	۵ (٪ ۶/۲/۵)
انتروکوکوس فیسیوم	۲۸ (٪ ۴۳/۷)	۱۶ (٪ ۳۸/۱)	۳ (٪ ۳/۷/۵)

جدول ۴: فراوانی ژن‌های کدکننده AMEs

سویه‌های تحت مطالعه	فنوتایپ‌های مقاومتی	ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینو‌گلیکوزیدی					
		<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	<i>Aph (3')-IIIa</i>	<i>ant(4')-Ia</i>	<i>aph(2'')-Id</i>	<i>aph(2'')-Ib</i>	<i>aph(2'')-Ic</i>
انتروکوکوس فکالیس	HLGR (N=36)	۳۶ (٪ ۱۰۰)	۱۲ (٪ ۳۳/۳)	۸ (٪ ۲۲/۲)	۰ (٪ ۰)	۴ (٪ ۱۱/۱)	۱ (٪ ۲/۷)
	LLGR (N= 26)	۳۳ (٪ ۸۸/۵)	۲ (٪ ۷/۷)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)
انتروکوکوس فیسیوم	HLGR (N=28)	۲۸ (٪ ۱۰۰)	۱۸ (٪ ۶۴/۳)	۱۱ (٪ ۳۹/۳)	۲ (٪ ۷/۱)	۰ (٪ ۰)	۳ (٪ ۱۰/۷)
	LLGR (N=16)	۱۴ (٪ ۸۷/۵)	۴ (٪ ۲۵)	۱ (٪ ۶/۳)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)
جمع کل	HLGR (N=64)	۶۴ (٪ ۱۰۰)	۳۰ (٪ ۴۶/۹)	۱۹ (٪ ۲۹/۷)	۰ (٪ ۰)	۴ (٪ ۶/۳)	۴ (٪ ۶/۶)
	LLGR (N=42)	۳۷ (٪ ۸۸/۱)	۶ (٪ ۱۴/۳)	۱ (٪ ۲/۴)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)
	Total (N= 106)	۱۰۱ (٪ ۹۵/۳)	۳۶ (٪ ۳۳/۹)	۲۰ (٪ ۱۸/۹)	۲ (٪ ۱/۹)	۴ (٪ ۳/۷)	۴ (٪ ۳/۷)

منابع

1. 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(1):213.
2. Amini F, Krimpour HA, Ghaderi M, Vaziri S, Ferdowsi S, Azizi M, et al. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* strains in Kermanshah, Iran. Iran J Med Sci. 2018; 43(5):487.
3. Anderson AC, Andisha H, Hellwig E, Jonas D, Vach K, Al-Ahmad A. Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic Susceptibility of Oral *Enterococcus faecalis* Isolates Compared to Isolates from Hospitalized Patients and Food. Adv Exp Med Biol. 2018; 1057:47-62.
4. Behnood A, Farajnia S, Moaddab SR, Ahdi-Khosroshahi S, Katayounzadeh A. Prevalence of aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia resistance gene and its linkage to Tn5281 in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from Tabriz hospitals. Iran J Microbiol. 2013; 5(3):203.
5. Chotinantakul K, Chansiw N, Okada S. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand. J Glob Antimicrob Resist. 2018; 12:143-8.
6. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2):403-34.
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
8. Dadfarma N, Oskoei M, Imani Fouladi A, Farokh P. Study of aac(6')Ie-aph(2'')Ia Gene in Clinical Strain of Enterococci and Identification of High-Level Gentamicin Resistant Enterococci. Avicenna J Clin Med. 2010; 17(3):25-32.
9. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. J Prev Med Hyg. 2016; 57(4):E200.
10. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. Microb Drug Resist. 2006; 12(4):265-8.
11. Jabalameli F, Emaneini M, Shahsavan S, Sedaghat H, Abdolmaliki Z, Aligholi M. Evaluation of antimicrobial susceptibility patterns of Enterococci isolated from patients in Tehran University of Medical Sciences Teaching Hospitals. Acta Med Iran. 2009; 47(4):325-8.
12. Jahansepar A, Aghazadeh M, Rezaee MA, Hasani A, Sharifi Y, Aghazadeh T, et al. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Various Clinical Infections: Detection of Their Drug Resistance and Virulence Determinants. Microb Drug Resist. 2018; 24(1):76-82.
13. Noohi N, Talebi M, Ebrahimipour G, Pourshafie M. The study of high level gentamicin resistance in *Enterococcus* species isolated from healthy human in Tehran, 2007-8. Iran J Med Microbiol. 2009; 2(3):47-52.
14. Niu H, Yu H, Hu T, Tian G, Zhang L, Guo X, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. Braz J Microbiol. 2016; 47(3):691-6.

15. Osuka H, Nakajima J, Oishi T, Funayama Y, Ebihara T, Ishikawa H, et al. High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. *J Infect Chemother*. 2016; 22(1):61-3.
16. Padmasini E, Padmaraj R, Ramesh SS. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *Scientific World journal*. 2014:329157.
17. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11(3):297-308.
18. Phoon HY, Hussin H, Hussain BM, Lim SY, Woon JJ, Er YX, et al. Distribution, genetic diversity and antibiotic resistance of clinically important bacteria from the environment of a tertiary hospital. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 11:35-42.
19. Pourcel G, Sparo M, Corso A, Delpech G, Galletti P. Molecular Genetic Profiling of Clinical and Foodborne Strains of *Enterococci* with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin. *Clin Microbiol*. 2017; 6(272):2.
20. Qu T-T, Chen Y-G, Yu Y-S, Wei Z-Q, Zhou Z-H, Li L-J. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. *J Infect*. 2006; 52(2):124-30.
21. Ranieri MR, Whitchurch CB, Burrows LL. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 45:164-169.
22. Rosvoll TC, Lindstad BL, Lunde TM, Hegstad K, Aasnæs B, Hammerum AM, et al. Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac* (6') *Ie-aph* (2 ") *Ia*-encoding transferable megaplasms hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 66(2):166-76.
23. Samadi N, Pakzad I, Sefidan AM, Hosainzadegan H, Tanomand A. Study of aminoglycoside resistance genes in *enterococcus* and *salmonella* strains isolated from ilam and milad hospitals, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015; 8(4): e18102.
24. Samadi H, Pirhajati Mahabadi R, Pournajaf A, Omid S, Moghimyan S, Alyasin N. An Investigation of the *vanA* and *vanB* Genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains isolated from the Hospitalized Patients in Shariati Hospital and Evaluation of Their Antibiotic Susceptibility. *Qom Univ Med Sci J*. 2015; 9(3): 32-38.
25. Shete V, Grover N, Kumar M. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among *Enterococcal* Isolates. *J Pathog*. 2017; 2017:3256952.
26. Simonsen G, Småbrekke L, Monnet D, Sørensen T, Møller J, Kristinsson K, et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51(2):323-31.
27. Stein-Thoeringer C, Peled JU, Lazrak A, Slingerland AE, Shono Y, Staffas A, et al. Domination of the Gut Microbiota with *Enterococcus* Species Early after Allogeneic Bone Marrow Transplantation is an Important Contributor to the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease (GHVD) in Mouse and Man. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018; 24(3):S40-S1.

28. Tyson GH, Nyirabahizi E, Crarey E, Kabera C, Lam C, Rice-Trujillo C, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. *Appl Environ. Microbiol.* 2018; 84(1):e01902-17.
29. Wei Y, Kypraios T, O'Neill PD, Huang SS, Rifas-Shiman SL, Cooper BS. Evaluating hospital infection control measures for antimicrobial-resistant pathogens using stochastic transmission models: application to vancomycin-resistant enterococci in intensive care units. *Stat Methods Med Res.* 2018; 27(1):269-85.