و **خدایی** که در این نزدیکی است،

لای این شب بوها،

پای آن کاج بلند...

۱۳۸۶ /۸/ ۲۷

۶۹۹۸۷

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

عنوان:

بررسی خصوصیات ژنتیکی دستجات ژنی VanA, VanB در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران

اساتید راهنما:

دکترغلامحسین ابراهیمی پور

دکتر مهوش اسکویی

دانشجو:

عزت شیبانی

۱۳۸۶/۸/۲۷

شهریور ماه ۱۳۸۶

۷۹۹۸۷

تقدیم:

به تمامی کسانی که دوستشان دارم.

نوشته اي كه ستردن نمي توان از دل نگارنامه عشق است و مشق استاد است

استاد شهریار

با سپاس و تشکر فراوان از زحمات استادان گرانقدر:

جناب آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور که بدون لطف و راهنمایی های ارزنده ایشان انجام این پروژه امکان پذیر نبود.

سرکار خانم دکترمهوش اسکویی به پاس همه خوبی ها و زحماتشان.

تقدیر و تشکر:

-از اساتید گرانقدرم

-از هم اتاقی ها و همکلاسی های عزیزم

-از دوستان خوبم در بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور

-از دوست عزیزم سرکار خانم شیدا اردلانی

- از همسرصبورم به پاس همه خوبی هایش

و خانواده مهربانم که در طول این پروژه مرا یاری نمودند، بسیار متشکرم.

دوستان من کجا هستند، روزهاشان پرتقالی باد.

چکیده

این پژوهش بر روی ۱۱۳ سویه *E. faecalis* و *E. faecium* جدا شده از بیماران در فاصله زمانی شهریور ماه ۱۳۸۵ تا تیرماه ۱۳۸۶ انجام گرفت. پس از استفاده از تست‌های بیوشیمیایی معتبر و شناسایی اولیه، تمامی سویه‌ها از نظر حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، پنی سیلین، آموکسی سیلین، جنتامایسین، کوتریموکسازول و تتراسایکلین با روش انتشار در آگارآزمایش شدند. از ۱۱۳ سویه انتروکوک جدا شده از بیماران، ۹۳ سویه متعلق به گونه *E. faecalis* و ۲۰ سویه متعلق به گونه *E. faecium* بودند. در مورد تمام آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت قابل ملاحظه‌ای دراین سویه ها مشاهده گردید. تمام سویه‌هایی که با روش انتشار در آگار به ونکومایسین مقاوم بودند، از نظر حساسیت به تیکوپلانین با روش یاد شده مورد بررسی قرار گرفتند و MIC ونکومایسین آنها با روش میکرودیلوشن تعیین گردید. سپس سویه هایی که از لحاظ فنوتیپی متعلق به گروه *VanA* (دارای مقاومت بالا به ونکومایسین و تیکوپلانین) و *VanB* (دارای مقاومت به ونکومایسین وحساسیت به تیکوپلانین) بودند، برای تعیین ژنوتیپ توسط روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. از میان این سویه ها ۱۴ سویه دارای ژن *vanA* و ۲ سویه دارای ژن *vanB* بودند که به همراه ۸ سویه دیگر (۷ سویه دارای ژن *vanA* و۱ سویه حاوی ژن *vanB*) که حاصل تلاش گروه ما در همین فاصله زمانی بود، برای تعیین وجود ۳ توالی الحاقی *(Insertion sequences)* شایع IS1216V, IS1542, IS1251، با روش مولکولی PCR و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی این ۲۴ سویه دربردارنده *IS1216V* و *IS1542* بودند، اما *IS1251* تنها در یک سویه مشخص گردید. البته این ۲۴ ایزوله با روش الکتروفورز میدان پالسی (PFGE) برای تعیین منشا سویه ها مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج، نشان دهنده هتروژنیتی قابل ملاحظه ای در بین سویه ها بود، به طوری که می توان این ایزوله ها را در ۲۲ تیپ و کلون مختلف قرار داد.

نتایج این پژوهش حاکی از آنست که توالی های الحاقی (IS) موجود در دستجات ژنی *VanA* و *VanB* سویه های کلینیکی انتروکوک تهران، بیشتر مشابه توالی های الحاقی سویه های انتروکوک کشورهای اروپایی و کره جنوبی می باشد تا سویه های آمریکایی. همچنین اگرچه تلاشی برای تعیین کروموزومی بودن ویا پلاسمیدی بودن ژن vanA صورت نگرفت، با توجه به نتایج این پژوهش و با مشاهده میزان بالای مقاومت در گونه‌های *E. faecalis* و *E. faecium* دارای ژن مقاومت *vanA* و *vanB*، می‌توان انتقال پلاسمیدی این ژن‌ها را در شرایط طبیعی پیشنهاد نمود.

لغات کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ونکومایسین، *vanA*، *vanB*، *Insertion sequence*

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

۱- مقدمه ۲

۱-۱- تعریف جنس ۵

۱-۲- تاریخچه ۵

۱-۳- بیماری زایی انتروکوک ۷

۱-۴- مکانیسم بیماری زایی ۷

۱-۴-۱- کلونیزاسیون ۷

۱-۴-۲- جابجایی ۸

۱-۵- مکانیسم های مقاومت ۱۰

۱-۵-۱- مقاومت به بتالاکتام ها ۱۰

۱-۵-۲- مقاومت به آمنیوگلیکوزیدها ۱۰

۱-۵-۳- مقاومت به گلیکوپپتیدها ۱۱

۱-۵-۳-۱- مقاومت به به ونکوماسین در انترو کوک ها ۱۲

۱-۶- دسته بندی ژنتیکی ۱۴

۱-۶-۱- مقاومت گلیکوپپتیدی VanA ۱۵

۱-۶-۲- مقاومت گلیکوپپتیدی VanB ۱۷

۱-۶-۳- مقاومت گلیکوپپتیدی VanC ۱۸

۱-۶-۴- مقاومت گلیکوپپتیدی VanD ۱۹

۱-۶-۵- مقاومت گلیکوپپتیدی VanE ۲۰

۱-۶-۶- انتقال کانژوگاتیو ژن های مقاومت ۲۲

۱-۶-۷- اپیدمیولوژی سویه های مقاوم به ونکومایسین ۲۲

۱-۷- شاخص های متحرک ژنتیک ۲۳

۱-۷-۱- توالی های الحاقی ۲۳

۱-۷-۲- ترانسپوزون های باکتریایی: یک گروه بسیار متنوع ۲۴

۱-۷-۲-۱- ترانسپوزون های مرکب..... ۲۴
۱-۷-۲-۲- ترانسپوزون های غیر مرکب یا ساده..... ۲۵
۱-۷-۲-۳- ترانسپوزون های دسته سوم: باکتریوفاژهای قابل انتقال..... ۲۵
۱-۷-۲-۴- ترانسپوزون های کونژوگه ای..... ۲۶
۱-۷-۳- مکانیسم ترانسپوزیشن..... ۲۷
۱-۷-۴- نتایج ترانسپوزیشن..... ۲۸
۱-۷-۵- شاخص های قابل انتقال در جنس انتروکوک..... ۳۱
۱-۷-۶- بررسی های ژنتیکی شاخص های متحرک..... ۳۴
۱-۷-۶-۱- اهمیت توالی های الحاقی در شاخص های مشابه Tn1546..... ۳۴
۱-۷-۶-۲- مثال هایی از توالی های الحاقی دستجات ژنی VanB،VanA ۳۶
۱-۷-۷- بررسی مطالعات مولکولی انجام شده بر روی دستجات ژنی VanA،VanB..... ۳۷
۱- ۸- الکتروفورز میدان پالسی PFGE ۴۳
۱- ۸-۱- اصول روش ۴۳
۱- ۸-۲- تهیه نمونه برای PFGE ۴۳
۱- ۸-۳- معیارهای لازم برای تفسیر نتایج PFGE..... ۴۴
۱- ۸-۴- مروری بر مطالعات PFGE انجام شده در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسن..... ۴۵
فصل دوم : مواد و روشها ۴۶
۲-۱- نمونه گیری ۴۷
۲-۲- تهیه کشت خالص از نمونه ها ۴۸
۲-۳- تعیین جنس انتروکوک..... ۴۸
۲-۳-۱- رشد در دمای ۴۵؟C و۱۰؟C..... ۴۸
۲-۳-۲- آزمون کاتالاز..... ۴۹
۲-۳-۳- رشد در نمک ۶,۵ درصد..... ۴۹
۲-۳-۴- تست PYR..... ۵۲
۲-۴- تعیین گونه انتروکوک..... ۵۲
۲-۴-۱- تولید اسید از قند ها..... ۵۳

۲-۴-۲- تست رنگدانه..... ۵۴
۲-۴-۳- تست حرکت..... ۵۴
۲-۵- تعیین حساسیت دارویی..... ۵۴
۲-۵-۱- سنجش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها به روش انتشاردر آگار..... ۵۴
۲-۵-۱-۱- محیط کشت باکتری ۵۵
۲-۵-۱- روش کار..... ۵۵
۲-۵-۲ -MIC:Minimum inhibitory concentration..... ۵۶
۲-۵-۲-۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی..... ۵۷
۲-۵-۲-۲ تهیه لوله استاندارد ۰٫۵مک فارلند..... ۵۷
۲-۵-۲-۳-استاندارد نمودن سوسپانسیون میکروبی..... ۵۷
۲-۶- استخراج DNA ۶۰
۲-۶-۱- مواد و وسایل لازم..... ۶۰
۲-۶-۲- روش کار..... ۶۰
۲-۷- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت..... ۶۲
۲-۷-۱- روش کار..... ۶۲
۲-۸- آزمون PCR..... ۶۳
۲-۸-۱-آزمون PCR جهت تکثیر ژن های vanB،vanA ۶۳
۲-۸-۲- الکتروفورز محصول PCR..... ۶۵
۲-۸-۳- PCR توالی های الحاقی IS1542, IS1251, IS1216V..... ۶۶
۲-۸-۴- الکتروفورز محصول PCR..... ۶۷
۲-۹- الکتروفورز میدان پالسی (PFGE)..... ۶۸
۲-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز..... ۶۸
۲-۹-۲- روش کار..... ۶۹
فصل سوم : نتایج تحقیق..... ۷۱
۳-۱- شناسایی گونه..... ۷۲
۳-۲- آزمون های تعیین حساسیت دارویی..... ۷۳

۳-۲-۱- سنجش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها به روش انتشار در آگار ۷۳
۳-۲-۲- تعیین میزان MIC به روش میکرودیلوشن ۷۷
۳-۳- آزمون PCR ۷۸
۳-۳-۱- PCR جهت شناسایی ژنهای vanA, vanB ۷۸
۳-۳-۲- PCR جهت شناسایی توالی های الحاقی IS1542, IS1251, IS1216V ۸۰
۳-۴- نتایج الکتروفورز میدان پالسی PFGE ۸۴
فصل چهارم : بحث ۸۶
۴-۱- هویت ایزوله ها ۸۷
۴-۲- حساسیت دارویی ایزوله ها ۸۷
۴-۲-۱- آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی ۸۸
۴-۲-۲- مقاومت به کوتریموکسازول ۹۰
۴-۲-۳- مقاومت به کلرامفنیکل ۹۰
۴-۲-۴- مقاومت به اریترومایسین ۹۰
۴-۲-۵- مقاومت به سیپروفلوکساسین ۹۱
۴-۲-۶- مقاومت به تتراسیکلین ۹۱
۴-۲-۷- مقاومت به جنتامایسین ۹۲
۴-۲-۸- مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالا کتامی ۹۲
۴-۲-۹- مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی ۹۳
۴-۳- شناسایی جنس و گونه های انتروکوک ۹۴
۴-۴- ژن های vanB،vanA ۹۴
۴-۵- بحث در مورد توزیع توالی های الحاقی ۹۵
۴-۵-۱- توالی الحاقی IS1216V ۹۶
۴-۵-۲- توالی الحاقی IS1542 ۹۷
۴-۵-۳- توالی الحاقی IS1251 ۹۹
۴-۶- بحث در مورد الکتروفورزمیدان پالسیPFGE ۱۰۰
پیشنهادات ۱۰۲
منابع ۱۰۳

فهرست اشکال و جداول

شکل ۱-۱ : تصویر شماتیک مکانیسم مقاومت به ونکومایسین درانتروکوک ها..... ۱۵

جدول۱-۱ : مشخصات فنوتیپ های مختلف در انتروکوک های

مقاوم به آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی..... ۲۱

شکل ۱-۲ :عوامل ژنتیکی متحرک در پروکاریوت ها..... ۲۶

شکل ۱-۳ : مکانیسم پیشنهادی برای ترانسپوزیشن ساده..... ۲۹

شکل ۱-۴ : مکانیسم پیشنهادی برای ترانسپوزیشن دو پلیکاسیونی..... ۲۹

شکل ۱-۵ : تولید ترانسپوزون جدید..... ۳۱

شکل ۱-۶ : طرح فرضی تکاملی برای Tn1546 های متنوع که از

ترانسپوزون اولیه Tn1546 اشتقاق یافته اند..... ۳۵

شکل ۱-۷ : بکارگیری پرایمر های متنوع برای انجام over lapping PCR..... ۳۶

شکل ۱-۸ : نقشه ژنتیکی دسته ژنی VanB و ورود ۲ توالی الحاقی به درون آن..... ۳۷

شکل ۱-۹ : نقشه ژنتیکی انواع تیپ هایTn1546 ..... ۳۹

شکل ۱-۱۰ : طرح تکاملی فرضی برای مشتقات متنوع Tn1546..... ۴۰

شکل ۱-۱۱ : نقشه ژنتیکی ۲۲ تیپ مختلفTn1546 ..... ۴۲

جدول۲-۱ : فراوانی و درصد سویه های انترو کوک جدا شده از نمونه های مختلف بالینی ۴۷

نمودار ۲-۱ : درصد سویه های انترو کوک جدا شده از نمونه های مختلف بالینی ۴۷

جدول ۲-۲ : استاندارد های تست های بیوشیمیایی برای شناسایی جنس و گونه انتروکوک..... ۵۱

جدول ۲-۳ : سویه هایی که بعنوان شاهد در آزمون تخمیر قندها استفاده شدند..... ۵۳

جدول ۲-۴ : استانداردهای حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیک های استفاده شده..... ۵۶

شکل ۲-۱ : روش آماده سازی رقت های آنتی بیوتیکی ونکومایسین

جهت انجام آزمون MIC برای انتروکوک..... ۵۹

جدول ۲-۵ : توالی نوکلئوتیدی ، وزن محصول و مشخصات پرایمرهای

استفاده شده در PCR ژنهایvanA و vanB ۶۴

جدول ۲-۶ : توالی نوکلوتیدی ، وزن مولکولی محصول و مشخصات پرایمر های
مورد استفاده شده برای PCR توالی های الحاقی *IS1216V* ، *IS1251* ،*IS1542*.....۶۶
جدول ۳-۱ : توزیع فراوانی گونه های جداشده از بیماران.....۷۲
نمودار ۳-۱ : توزیع فراوانی گونه های جداشده از بیماران.....۷۲
جدول ۳-۲ : فراوانی و درصد مقاومت ۱۱۳ سویه انتروکوک به روش انتشار در آگار.....۷۳
نمودار ۳-۲ : درصد سویه های مقاوم ، حساس بینابینی و حساس ، با روش انتشار درآگار.....۷۴
جدول ۳-۳ : تعداد و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در گونه *E. faecium*.....۷۵
جدول ۳-۴ : درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در گونه *E.faecalis*.....۷۶
نمودار ۳-۳ : درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف بر حسب گونه.....۷۶
جدول ۳-۵ : توزیع فراوانی و درصد سویه های جدا شده بر حسب میزان MIC.....۷۷
نمودار۳-۴: توزیع فراوانی سویه های حساس ، مقاوم بینابینی و مقاوم
سطح بالا، باتوجه به MIC آنها نسبت به ونکومایسین.....۷۸
جدول ۳-۶ : توزیع فراوانی (درصد) ژنهای vanB، vanA درمیان سویه های جدا شده.....۷۹
شکل ۳-۱ : تصویرژل آگاروز محصولات PCR توالی های الحاقی IS1542 ، IS1216V.....۸۱
شکل ۳-۲ : تصویر الکترو فورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٫۵٪.....۸۲
جدول۳-۷ : خلاصه یافته های پژوهش.....۸۳
شکل ۴-۱ : نقشه ژنتیکی تیپ های متنوع Tn۱۵۴۶ در
ا یزوله های *E. faecium* بیمارستانهای کره.....۹۸

فصل اول

مقدمه

مقدمه

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی همراه می باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی ، دامپزشکی و در پرورش حیوانات به عنوان افزایش دهنده های رشد به کار می‌روند، که خود منجر به افزایش پیدایش مقاومت در بین باکتریها می‌شود. افزایش و گسترش باکتری‌های بیماریزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان مؤثر بیماری‌های عفونی را تهدید می کند. فاکتورهای مقاومت اغلب با شاخص های ژنتیکی متحرک[1] مانند ترانسپوزون[2] ها یا پلاسمیدهای کانژوگاتیو[3] همراه می‌باشند و بدین وسیله به باکتری‌های دیگر منتقل می شوند (۱۲۷).

مطالعات متعدد نشان داده است که در طی دهه گذشته عفونت های بیمارستانی که به وسیله باکتری های مقاوم ایجاد می شوند بسیار رایج شده است و مرگ و میر در این عفونت ها در حال افزایش است که اغلب با مقاومت دارویی همراه می باشد (۱۳۷). از آنجا که کوکسی های گرم مثبت معمولترین عامل عفونت های اکتسابی در بیمارستان ها می باشند اخیراً توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند (۱۲۷). آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از باکتریهای گرم مثبت حائز اهمیت می باشند و ونکومایسین و تیکوپلانین مهمترین اعضای خانواده گلیکوپپتیدها از نظر پزشکی هستند (۲۲). بدلیل فعالیت برجسته این آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب این داروها به عنوان آخرین خط درمانی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت بیماری زا با مقاومت چند دارویی مورد استفاده قرار گرفته اند (۵۲). اما با پیدایش مقاومت به ونکومایسین، پزشکان در درمان عفونت های حاد ناشی از باکتری های گرم مثبت دچار مشکل شده اند و این مسئله منجر به مطالعه بیشتر در زمینه فهم اساس مولکولی مقاومت به ونکومایسین شده است. مقاومت نسبت به ونکومایسین در انواع کوکسی های گرم مثبت مشاهده شده است (۱۰۴).

انتروکوک ها باکتری‌های غالب مدفوع انسان هستند و جزء معمولترین ارگانیسم هایی هستند که در عفونت‌های بیمارستانی وجود دارند. این ارگانیسم ها به وسیله مواد مدفوعی حیوانی و انسانی وارد محیط می شوند و جزء باکتری‌هایی هستند که در محیط دارای فراوانی بالایی هستند. انتروکوک‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به راحتی کسب می‌کنند و قادر به انتقال ژن‌های مقاومت به سایر گونه‌ها می باشند (۹۷). مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد از جمله ونکومایسین در انتروکوک‌ها، منجر به پیدایش محدودیت های درمانی شده است. در حال حاضر مجموعه های ژنی *vanC,vanD, vanE, vanF, vanG* *vanB,* و *vanA* در انتروکوک ها شناسایی شده است که توالی شش مجموعه از آنها تعیین شده است. دو ژنوتیپ *vanA* و

---

[1] - Mobile genetic elements
[2] - Conjugative transposons
[3] -Conjugative plasmids

vanB ز اهمیت عمده ای برخوردارند (۸۵)، زیرا این ژن های مقاومت ، قابل انتقال هستند و مقاومت سطح بالا نسبت به ونکومایسین را ایجاد می کنند. ژنوتیپ *vanA* مقاومت نسبت به تیکوپلانین را نیز کد می‌کند. دستجات ژنی[1] *vanA* و *vanB* با ترانسپوزون های بزرگ همراه هستند. ترانسپوزون *Tn1546* با اندازه *10,8 kb* حاوی دسته ژنی *vanA* می باشد. دسته ژنی *vanA* معمولاًبر روی پلاسمید و دسته ژنی *vanB* معمولاً بر روی کروموزوم قرار دارند و از طریق ترانسپوزون ها قابل انتقال می باشند (۱۰۳و۱۵۶).

با بررسی های انجام شدهٔ در مورد ژن های عامل مقاومت به ونکومایسین در سایر کوکسی‌های گرم مثبت، ژن *vanB* در یک سویه استرپتوکوکوس بویس جدا شده از یک بیمار مبتلا به ایدز ردیابی شده است و سویه‌های متعدد استرپتوکوکوس گالولیتیکوس دارای ژن های *vanA* از مدفوع گوساله جداشده است (۲۲). ژن *vanA* در استافیلوکوکهای کواگولاز منفی مقاوم به ونکومایسین گزارش نشده است (۱۶۱)، اما در سویه‌هایی از آنها که کاهش حساسیت به ونکومایسین را نشان می دهند، تغییر در دیواره سلولی مشابه انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین مشاهده شده است (۱۱۴). بررسی ژنتیکی اولین و دومین سویه گزارش شده استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین نشان داد که ترانسپوزون *Tn1546* دارنده ژن *vanA*، جزئی از ساختمان پلاسمید کد کننده مقاومت به ونکومایسین می باشد (۲۴و۸۱). همچنین انتقال ژن مقاومت از انتروکوک به استافیلوکوک اورئوس در مطالعات *in-vitro* انجام شده است (۱۷۴).

مقاومت نسبت به ونکومایسین در انتروکوک در بعضی از کشورها بیشتر از طریق زنجیره غذایی منتقل می شود، زیرا در این کشورها از آنتی‌بیوتیک‌های شبه گلیکوپپتیدی مانند آووپارسین به عنوان محرک رشد دامها استفاده می شود. اما در کشورهایی که از آووپارسین، استفاده نمی‌شود گسترش مقاومت بیشتر به دلیل استفاده زیاد از ونکومایسین در درمان عفونت‌ها می باشد (۹۷و۱۴۹) . همچنین ورود انتروکوک‌های مقاوم از منابع انسانی و حیوانی در فاضلاب‌ها و احتمال رسوخ این باکتری‌ها به آبهای سطحی احتمال حضور این انتروکوک‌ها را در زنجیره غذایی مطرح می‌کند (۹۷). عموماً مکانیسم اصلی برای انتشار ژن *van* در انتروکوک ها می تواند انتشار کلونال[2] باشد، اما اخیراً انتقال افقی[3] دسته ژنی مقاومت، به عنوان یک مکانیسم اصلی در نظر گرفته می شود. روش الکتروفوزز میدان پالسی[4] (*PFGE*) به طور گسترده ای برای دستیابی به فهم انتشارکلونال انتروکوک های

---

[1] - Gene Cluster
[2] -Clonal dissemination
[3] -Horizontal transfer
[4] -Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

های مقاوم به ونکومایسین[1] (*VRE*) انجام می شود و اخیراً بررسی های ساختاری دسته ژنی ژن *van* برای دستیابی به فهم انتقال افقی دسته ژنی مقاومت انجام شده است (۸۴). همان طور که ذکر شد، مقاومت اکتسابی به گلیکوپپتیدها اغلب توسط دستجات ژنی *VanA* و *VanB* ایجاد می شود. مقاومت *VanA* توسط *Tn1546* یا شاخص های مشابه دیگری که اغلب حاوی توالی های الحاقی[2] (*IS*) می باشند، کد می شود. مقاومت *VanB* توسط شاخص *bp* ۶۴۳۶ که دارای ۷ ژن می باشد، ایجاد می شود. اعتقاد براین است که این شاخص جزئی از یک ترانسپوزون بزرگتر؛ برای مثال *Tn1547* می باشد (۱۱۰). این مسائل مشخص کننده آنست که انتقال افقی شاخص های مقاومت نقش مهمی را در انتشار *VRE* بازی می کند. بنابراین بررسی تنوع های ژنتیکی میان این شاخص ها برای دستیابی به چگونگی انتشار *VRE* به خصوص در مورد انتقال افقی ژن لازم می باشد. در مورد *Tn1546* اغلب تنوع ها شامل ورود توالی های الحاقی ، موتاسیون های نقطه ای[3] و حذف[4] می باشد (۲۳و۸۴). بررسی این تنوع ها به همراه روش های معتبری همچون *PFGE* و ریبوتایپینگ[5]، در چندین مطالعه اپیدمیولوژیک استفاده شده است (۲۳). برعکس *VanA*، ساختار و سازمان دهی شاخص های مقاومتی *VanB* در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱۰). در این مطالعه ما دستجات ژنی *VanA* و*VanB* را در *VRE*های جدا شده از بیماران برای تعیین وجود توالی های الحاقی احتمالی مورد بررسی قرار دادیم.

---

[1] -Vancomycin Resistant Enterococci (VRE)
[2] -Insertion Sequences (IS)
[3] -Point mutaitions
[4] -Deletion
[5] -Ribotyping

۱-۱- تعریف جنس

انتروکوک‌ها در ابتدا به صورت کوکسی‌های گرم مثبت شناسایی شده و در جنس استرپتوکوکوس دسته بندی شدند (۱۲۰). در دهه ۱۹۳۰ با رواج سیستم تایپینگ سرولوژی که توسط لانسفیلد ارائه شد، انتروکوک‌ها به صورت استرپتوکوک‌های گروه D شناسایی شدند که این گروه توسط تست‌های بیوشیمیایی از استرپتوکوک‌های گروه D غیر انتروکوکی جدا می شدند (۱۲۰و۱۲۷). *Sherman* اولین کسی بود که پیشنهاد اختصاص جنس انتروکوک را برای استرپتوکوک هایی که دارای شرایط رشد در دمای ۱۰°C و ۴۵ °C و pH=9,6 و غلظت نمک ۶,۵ درصد هستند و دمای ۶۰°C را برای مدت ۳۰ دقیقه تحمل می‌کنند، ارائه داد (۶۳و۶۸). این ارگانیسم‌ها همچنین می‌توانند اسکولین را در حضور نمک‌های صفراوی هیدرولیز نمایند. در دهه ۱۹۸۰ براساس بررسی‌های ژنتیکی، انتروکوک‌ها به صورت کامل از جنس استرپتوکوک خارج شدند و به صورت اختصاصی جنس *Enterococcus* نامیده شدند (۱۳۷). به این ترتیب گونه‌های *faecalis, faecium, gallinarum, durans* و غیره به جای *Streptococcus* با پیشوند جنس *Enterococcus* نامیده شدند. اگرچه تعداد گونه‌های شناسایی شده از انتروکوک‌ها بسیار زیاد است اما تنها دو گونه *E. faecalis* و *E. faecium* از نظر عفونت‌های انسانی مهم هستند. تا کنون *E. faecalis* شایع‌ترین گونه انتروکوک بوده که از ۸۰ تا ۹۰ درصد ایزوله‌های کلینیکی به دست آمده است، بعد از آن *E. faecium* با دارا بودن ۵ الی ۱۵ درصد ایزوله‌های کلینیکی در جایگاه دوم قرار دارد (۷۱،۱۰۱،۱۱۶،۱۳۲و۱۴۸).

۱-۲- تاریخچه

انتروکوک‌ها برای یک قرن تمام به عنوان مهمترین عامل اندوکاردیت شناخته می‌شدند. به علاوه از سال ۱۹۷۰ به بعد این ارگانیسم ها به عنوان یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی مطرح شدند و این همزمان با استفاده بیش از حد سفالوسپورین‌های نسل سوم علیه ارگانیسم‌های دیگر بود، که انتروکوک‌ها به طور طبیعی مقاوم به آن هستند (۱۲۰). انتروکوک‌ها که به طور معمول پاتوژن‌های فرصت طلب دستگاه ادراری می باشند، به دومین عامل شایع عفونت‌های ادراری و زخم و سومین عامل شایع باکتریمی در ایالات متحده تبدیل شدند (۱۵۱). یکی از دلایل مهم زنده ماندن و رشد این باکتری‌ها در محیط بیمارستانی مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل آنتی‌باکتریال معمول در بیمارستانها و از آن مهمتر توانایی این ارگانیسم‌ها در کسب مقاومت از سایر باکتری‌ها و قدرت انتقال شاخص های ژنتیکی مانند پلاسمیدها وترانسپوزون‌های حاوی ژن‌های مقاومت می باشد (۳۷). فرایند افزایش مقاومت انتروکوک‌ها از سال ۱۹۵۰ هنگام بی‌اثرشدن درمان با پنی‌سیلین در

مورد بیماران اندوکاردیت انتروکوکی در مقایسه با بیماران اندوکاردیت استرپتوکوکی مشخص شد، به طوری که روند بهبودی بیماران اندوکاردیت انتروکوکی کندتر از روند بهبودی بیماران اندوکاردیت استرپتوکوکی در درمان با پنی‌سیلین بود (۵۶ و۵۷). برای درمان عفونتهای انتروکوکی مانند اندوکاردیت و مننژیت انتروکوکی می‌بایست از سینرژی دارویی یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی با یکی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی یا گلیکوپپتیدی استفاده نمود، زیرا اکثر انتروکوک ها تحمل آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و گلیکوپپتیدی را دارند (۳۱). اثر باکتری کشی در سینرژی و استفاده همزمان آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و یکی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی یا گلیکوپپتیدی، وقتی مقاومت سطح بالا به هر کدام از کلاس‌های دارویی در ارگانیسم وجود داشته باشد، بی‌اثر خواهد شد. مقاومت به غلظت بالای آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی با حضور آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ایجاد می‌شود و این آنزیم در انتروکوک‌ها گسترش زیادی دارد به طوری که بیش از ۵۰ در صد ایزوله‌های جدا شده از برخی مراکز این آنزیم را دارا هستند (۲۲). بسیاری از *E. faecium* های جدا شده نسبت به پنی‌سیلین‌ها هم مقاوم هستند و این مقاومت به دلیل ضعف پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین[1] (PBPs) در آنها می‌باشد (۱۲۵). تا کنون ونکومایسین بهترین دارو برای درمان عفونتهای انتروکوکی ناشی از انتروکوک‌های مقاوم چند دارویی[2] (MDR) بوده است.

ونکومایسین در درمان‌های کلینیکی به مدت ۳۰ سال بدون ایجاد اورژانس‌های مقاومتی استفاده می‌شده است (۲۲). تیکوپلانین هم آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی دیگری است که در اروپا استفاده می‌شود. این داروها به دلیل عملکرد مؤثرشان بر استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین به صورت گسترده‌ای برای درمان عفونت‌های ناشی از این گونه ارگانیسم‌ها استفاده می شدند (۱۲۰). ونکومایسین خوراکی، که به مقدار خیلی کمی جذب می‌شود، برای درمان انتروکولیت ناشی از *Clostridium difficile* استفاده می‌شد.

در سال ۱۹۸۸، *Uttley* و همکارانش برای اولین بار *E. faecalis* و*E. faecium* مقاوم به ونکومایسین را در انگلستان گزارش کردند. زمان کوتاهی پس از اولین گزارش انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (*VRE*)، این ارگانیسم‌ها در فرانسه (۹۹و ۱۶۹) و در بیمارستان های قسمت شرقی ایالات متحده نیز یافت شدند. هم اکنون انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (*VRE*) تقریباً از تمام بیمارستان‌های ایالات متحده جدا می‌شوند (۱۶۹).

---

[1] -Penicilin Binding Proteins
[2] -Multi Drug Resistant (MDR)

۱-۳- بیماری‌زایی انتروکوک‌ها

اولین باربیماری زایی انتروکوک در اواخر قرن ۱۹ توسط *MacCallum and Hastings* مورد توجه قرار گرفت (۳۱). آنها ارگانیسم را از یک مورد اندوکاردیت حاد جدا کرده و براساس خصوصیات تخمیری‌اش، آنرا *Micrococcus zymogenes* نامیدند. ارگانیسم فوق به خشکی، حرارت تا حد $60^{o}C$ و چندین ماده ضدعفونی کننده از جمله اسیدکربولیک و کلروفرم مقاومت نشان می‌داد (۳۴و۵۷). همچنین دریافتند که قادر به تولید اندوکاردیت در سگ می‌باشد (۳۱). یک قرن بعد، انتروکوک‌ها بعد از *E. coli* بعنوان دومین عامل عفونت های بیمارستانی قرار گرفتند و مسئول ۱۲ درصد موارد عفونت بشمار رفتند (۳۸). عفونت های ناشی از جنس انتروکوک (بخصوص *E. faecalis* که مسئول حدود ۸۰ درصد تمام عفونتهاست) شامل عفونت های دستگاه اداری، باکتریمی و عفونتهای داخل شکمی و اندوکاردیت است (۲۰و۳۷). مشکل عفونت های انتروکوکی بیمارستانی با وجود مقاومت آنتی بیوتیکی، چند برابر می‌شود (۲۵).

وجود *VRE* در خون ارتباط مستقیمی با افزایش آمار مرگ و میر بیماران دارد. بیماران مبتلا به باکتریمی انتروکوکی هنگامی که با یک ایزوله مقاوم به ونکوماسین آلوده می‌شوند، احتمال مرگ و میر بیشتری نسبت به سایر بیماران دارند (۱۲). در حالی که مطالعات جدید نشان می‌دهند که ونکومایسین به کرات به عنوان آخرین درمان موجود در مورد انتروکوک‌های مقاوم چند دارویی استفاده می‌شود، افزایش سریع مقاومت به ونکومایسین، بحران در حال افزایش درمان عفونت انتروکوکی را مطرح می‌کند (۲۰).

۱-۴- مکانیسم‌های بیماری زایی

به منظور ایجاد عفونت، انتروکوک‌ها در ابتدا باید کلونیزه شوند، در مرحله اول این ارگانیسم‌ها بر روی سطح مخاطی محل عفونت قرار می‌گیرند. سپس باید از سیستم ایمنی میزبان فرار کنند و سرانجام یا از طریق فعالیت مستقیم سم زایی و یا غیرمستقیم از طریق پاسخ التهابی، در میزبان تغییرات پاتولوژیک بوجود آورند (۲۷).

۱-۴-۱- کلونیزاسیون

انتروکوک‌ها بطور نرمال در دستگاه گوارش انسان کلونیزه می‌شوند و در مدفوع به تعداد بسیار زیاد (۱۰۵-۱۰۷ ارگانیسم در هر گرم) وجود دارند (۴۰). مطالعات بر روی اتصال اختصاصی انتروکوک ها به اپیتلیوم روده‌ای، در حال پیشرفت است. بسیاری از

سویه‌های عفونی انتروکوک از یک کلون خاص شناسایی شدند که این مسئله، نشانگر انتقال بیمارستانی سویه‌های عفونی است. کلونیزه شدن ارگانیسم در بدن بیماران به دنبال بستری شدن در بیمارستان این فرضیه را ثابت کرده است و مشخص شده که کلونیزاسیون با سویه‌های چندمقاومتی یک فاکتور مستعد کننده برای عفونت‌های بعدی به شمار می‌رود (۲۰و۳۹). برای کلونیزه شدن ارگانیسم در بخش پایین شکم، انتروکوک‌ها باید در مسیر حرکت خود، *pH* اسیدی معده را تحمل کنند. *Flahaut* و همکارانش نشان دادند که برخورد *E. faecalis* با *pH* کمتر از حد کشنده (*pH*=4,84) برای ۳۰-۱۵ دقیقه ارگانیسم را از بحران کشنده *pH*=3,2 حفظ می‌کند (۳۱). *Suzuki* و همکارانش نشان داده‌اند که یک موتانت ناقص *E. faecalis* از نظر فعالیت آنزیم F_1-$F_oH^{\pm}ATPase$، نمی‌تواند در *pH* کمتر از ۶ رشد کند. $H^{\pm}ATPase$ برای تنظیم *pH* سیتوپلاسمی *E. faecalis* به واسطه خروج پروتون بکار می‌رود، به نظر می‌رسد این آنزیم در *pH* پایین فعال می‌شود (۵۴). به این ترتیب مشخص می‌شود که انتروکوک‌ها توانایی مقاومت در برابر *pH* اسیدی معدی را دارند و این امر موجب تسهیل کلونیزاسیون این ارگانیسم‌ها می‌شود. این ویژگی می‌تواند در توانایی سویه‌های چند مقاومتی انتروکوک برای کلونیزه شدن در مجرای گوارش و ایجاد اپیدمی‌های بیمارستانی حیاتی باشد. تا کنون مشخص نشده است که آیا سویه‌های عفونی انتروکوک تحمل اسیدی بالاتری نسبت به سایر سویه‌های انتروکوک نشان می‌دهند یا نه. درمان با آنتی بیوتیک‌های دارای فعالیت ضدانتروکوکی پایین، یک فاکتور مستعد کننده کلیدی برای کلونیزاسیون انتروکوک و عفونت‌زایی آن است (۹). مطالعات بر روی موش‌های داری رشد بیش از حد *E. faecalis* روده‌ای در اثر مصرف بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک، ثابت کرده است که ارگانیسم‌ها در این شرایط می‌توانند به سطح اپیتلیومِ ایلئوم، سکوم و کولون این جانوران متصل شوند (۵۸ و۵۹). همین مطالعات نشان داده است که انتروکوک‌ها قادرند از لومن روده به غدد لنفاوی مزانتریک، کبد و طحال نیز مهاجرت کنند. رشد بیش از حد *E. faecalis* در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک نیز به همراه انتقال ارگانیسم به گردش خون، توجیهی برای باکتریمی‌های با اتیولوژی ناشناخته می باشد (۱۶).

۱-۴-۲- جابجایی

مکانیسم‌های مسئول انتقال انتروکوک هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند، یک فرضیه این است که انتروکوک‌ها توسط ماکروفاژهای بافتی یا سلولهای اپی‌تلیال روده‌ای فاگوسیته می‌شوند و از دیواره روده به سیستم لنفاوی زیرین منتقل می‌شوند. به این ترتیب نقص در کشتن ارگانیسم‌های فاگوسیته شده باعث انتشار سیستمیک این باکتری ها می‌شود (۳۱).