

## **Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of vancomycin resistant enterococci isolated from clinical sample of educational hospitals in Arak**

Hosseinizadeh A(M.Sc)<sup>1</sup>, Abtahi H(Ph.D)<sup>\*2</sup>, ShojaPour M(M.Sc)<sup>2</sup>, Akbari M(M.Sc)<sup>2</sup>, Nazari R(Ph.D)<sup>3</sup>, Sofian M(M.D)<sup>4</sup>

1- Department of microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

2- Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology and Immunology , Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

4- Department of infectious disease, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 22 Oct 2011, Accepted: 27 Dec 2011

### **Abstract**

**Background:** Enterococcus is known as an important pathogen in Iran like all around the world. The increasing use of vancomycin makes vancomycin-resistant enterococci (VRE) an important nosocomial pathogen. Vancomycin in combination with an aminoglycoside can provide effective treatment for severe enterococcus infections, while resistance to vancomycin antibiotic is increasing in enterococci. In this study, the pattern of antibiotic resistance and prevalence of vancomycin resistance enterococci have been explored.

**Materials and Methods:** In this experimental study, after isolating and identifying 150 strains of enterococci from clinical specimens, the antibiotic resistance pattern of these strains to erythromycin, teicoplanin, vancomycin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, co-trimoxazole and linezolid was examined. The MIC test by using micro dilution broth method was performed for the vancomycin resistance enterococci specimens with the vancomycin and teicoplanin antibiotics.

**Results:** Antibiotic susceptibility test showed 14% and 5.3% of the samples were resistant to vancomycin and teicoplanin respectively. Resistant to erythromycin, co-trimoxazole, ciprofloxacin, tetracycline, linezolid and gentamicin were 64, 40, 38.6, 6.6, 0, 38.76 percent respectively. Fourteen samples had high resistance to vancomycin which MIC were  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ .

**Conclusion:** Based on the results of present study, there are vancomycin-resistant enterococci in Arak as well as other parts of the world. The percentage of vancomycin resistance enterococci is high in Arak and appropriate treatment of infections caused by enterococcus is essential.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Enterococcus, MIC, Vancomycin

\*Corresponding author:

Address: Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

## بررسی فراوانی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های آموزشی اراک

عادله حسینی زاده<sup>1</sup>، حمید ابطحي<sup>2\*</sup>، مانا شجاع پور<sup>3</sup>، مجید اکبری<sup>2</sup>، راضیه نظری<sup>4</sup>، معصومه صوفیان<sup>5</sup>

- 1- کارشناس ارشد میکروبی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
- 2- دانشیار، دکترای باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- کارشناس ارشد میکروبی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 4- استادیار، دکترای تخصصی میکروبی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
- 5- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/8/1 تاریخ پذیرش: 90/10/7

### چکیده

**زمینه و هدف:** انتروکوکوس در ایران همانند سراسر جهان به عنوان یک پاتوژن مهم مطرح شده است. با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک ونکومايسين، انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، یک عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی شده است. ونکومايسين قادر است همراه با یک آمینوگلیکوزید درمان موثری را برای عفونت‌های انتروکوک‌ها فراهم کند. در عین حال مقاومت انتروکوک به آنتی‌بیوتیک ونکومايسين در حال افزایش است. در این مطالعه به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين پرداخته شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پس از جداسازی و تشخیص 150 سویه انتروکوک از نمونه‌های بالینی، الگوی مقاومت این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين، تیکوپلانین، ونکومايسين، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، جنتامیسین، کوتریموکسازول و لینوزولید مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین آزمون MIC در مورد نمونه‌های مقاوم به ونکومايسين با آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و تیکوپلانین به روش Micro dilution broth انجام شد.

**یافته‌ها:** آزمون تعیین حساسیت باکتری‌ها نشان داد که 14/6 درصد از نمونه‌ها به ونکومايسين و 5/3 درصد نیز به تیکوپلانین مقاوم بودند. به ترتیب 64، 40، 38/6، 6/6، 0 و 38/7 درصد از نمونه‌ها به اریترومايسين، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، لینوزولید و جنتامیسین مقاوم بودند. 14 نمونه دارای مقاومت بالا به ونکومايسين بودند و همگی این 14 نمونه، MIC بزرگ‌تر مساوی 256 میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج به دست آمده، مقاومت به ونکومايسين در سویه‌های انتروکوک در اراک نیز مانند تمامی نقاط دنیا وجود دارد. درصد انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين در اراک بالا است و انتخاب درمان مناسب جهت عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروکوک ضروری می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** مقاومت آنتی‌بیوتیکی، انتروکوک، MIC، ونکومايسين

\* نویسنده مسئول: اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

## مقدمه

ادرار، خلط و زخم جمع آوری شد. هم‌زمان اطلاعات هر بیمار شامل جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن ثبت گردید.

## جداسازی و شناسایی سویه‌ها

نمونه‌های به دست آمده از لحاظ مرفولوژی کلونی، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تایید انتروکوک از تست‌های بیوشیمیایی از جمله بایل اسکولین آگار، رشد در 6/5 درصد نمک و تست PYR استفاده شد. سویه‌های انتروکوک به دست آمده در دمای منهای 70 درجه سانتی گراد فریز گردید (11-13).

## آنتی بیوگرام

آنتی بیوگرام سویه‌های به دست آمده با روش Disk Diffusion Agar مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور سوسپانسیون میکروبی از سویه‌های به دست آمده در محیط مولر برات تهیه کرده و غلظت آن به نیم مک فارلند رسانده شد. با استفاده از سوپ استریل روی محیط مولر هیتون آگار کشت متراکم داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل ونکومايسين، اريترومايسين، جنتامایسین، لینوزولید، سیپروفلوکساسین، تیکوپلانتین و کوتریموکسازول را با فاصله مناسب روی محیط قرار داده و به مدت 24 ساعت گرماگذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بعد از خارج کردن از انکوباتور اندازه‌گیری شد (14).

## بررسی مقاومت به روش MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

تست MIC به روش Micro dilution broth و طبق استاندارد NCCLS با دو آنتی‌بیوتیک ونکومايسين و تیکوپلانتین انجام گرفت. رقت‌هایی برابر 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 و 256 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر خالص دو آنتی‌بیوتیک ونکومايسين و تیکوپلانتین (خریداری شده از شرکت Mast) تهیه شد.

محیط کشت مورد استفاده معمولاً مولر هیتون برات (لیوفیلیکوم ایتالیا) است که به صورت 2X تهیه گردید و به ازای هر 1000 میلی‌لیتر از آن، 1/25 میلی‌لیتر از محلول

انتروکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبت هستند که قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری، اندوکاردیت، مننژیت، عفونت‌های خون، عفونت‌های داخل شکمی و لگنی و عفونت‌های نوزادان می‌باشند (1-3). انتروکوک فکالیس، عامل اصلی انتروکوک، یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان می‌باشد (4-6). استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها طی 50 سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوکوس برای کسب و انتشار عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال ژن‌های مقاومت بین این میکروارگانیسم‌ها و یا سایر گونه‌ها، درمان بیماری‌های ناشی از آن را به مشکلی جدی تبدیل نموده است (7). یکی از دلایل مهم که این ارگانیسم در محیط بیمارستان زنده می‌ماند مقاومت ذاتی آن به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده بوده و همچنین توانایی کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را از طریق جهش یا دریافت عوامل ژنتیکی خارجی مثل پلاسمید یا ترانسپوزون را دارد (8، 9).

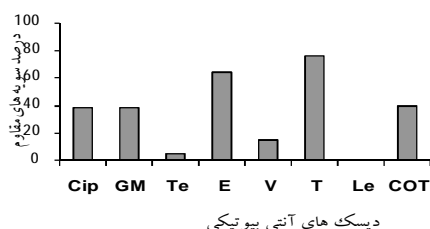
انتروکوک یک ارگانیسم مشکل‌زا در زمینه درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. اکثر انتروکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و گلیکوپپتید مقاوم‌اند به همین دلیل استفاده هم‌زمان آنها با یک آمینوگلیکوزید برای درمان جدی‌ترین عفونت‌های انتروکوک‌ها مثل اندوکاردیت و مننژیت لازم است (10). ونکومايسين در اکثر اوقات به عنوان آخرین راه حل برای درمان عفونت‌های باکتری‌های گرم مثبت به خصوص انتروکوک می‌باشد (5).

لذا هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فراوانی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های اراک می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی در طول مدت یک سال نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های آموزشی اراک شامل خون،

MIC کمتر از 4 میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان حساس، بین 4 تا 24 میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان حد وسط، بالاتر یا برابر 32 میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان مقاوم و MIC بالاتر و یا برابر 256 میکروگرم بر میلی لیتر بسیار مقاوم به ونکومايسين در نظر گرفته شد (16). نتایج تست MIC در جدول 1 آمده است.



نمودار 1. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در 150 نمونه انتروکوک  
 Cip = سیپروفلوکساسین، GM = جنتامایسین، Te = تیکوپلانیلین،  
 E = اریترومايسين، V = ونکومايسين، T = تتراسایکلین، Le =  
 لینوزولید، Cot = کوتریموکسازول

کلرید کلسیم (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) و 2/5 میلی لیتر از محلول کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) اضافه شد. سوسپانسیون از باکتری با غلظت CFU/ml  $1 \times 10^6$  نیز تهیه شد و به مقدار یکسان به هر خانه میکروپلیت (حاوی محیط کشت و آنتی بیوتیک) اضافه گردید و سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه شدند. کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد باکتری شده و در آن کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC گزارش شد (15). داده ها در برنامه نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری کای اسکور تجزیه و تحلیل گردید.

#### یافته ها

در روش آنتی بیوگرام از بین 150 سویه انتروکوک جدا شده از نمونه های بالینی 22 سویه (14/66 درصد) مقاوم به ونکومايسين و 45 سویه حد وسط یافت شد که تست آنتی بیوگرام برای این 67 نمونه انجام شد. نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام در نمودار 1 آمده است.

#### حداقل غلظت مهاری

تست MIC نیز در مورد 67 نمونه دارای قطر هاله کمتر از 17 در برابر آنتی بیوتیک ونکومايسين انجام شد.

#### جدول 1. نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهاری

نوع آنتی بیوتیک	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
MIC (میکرو گرم بر لیتر)	0	0	0	0	5	17	17	15	13
ونکومايسين (تعداد)	0	0	8	11	16	9	6	12	5
تیکوپلانیلین (تعداد)									

#### بحث

طبق نتایج به دست آمده از 150 نمونه بالینی آلوده به انتروکوک، 22 نمونه (14/66 درصد) مقاوم به ونکومايسين بودند و از 67 نمونه انتروکوک جدا شده از نمونه های بالینی که دارای قطر هاله کمتر از 17 در تست آنتی بیوگرام برای ونکومايسين بودند، 28 نمونه دارای مقاومت بالا به ونکومايسين بودند و همگی این 28 نمونه، MIC بزرگ تر و یا مساوی 256 میکروگرم بر میلی لیتر

داشتند. هم چنین هیچ سویه مقاوم به لینوزولید یافت نشد که مطالعه ای در اسپانیا نیز چنین نتیجه ای را نشان می دهد (17). با مقایسه نتایج به دست آمده در این مطالعه و سایر بررسی ها میزان مقاومت مشابهی دیده می شود.

ایمانی و همکاران در تهران نشان دادند که شیوع سویه انتروکوکوس مقاوم به ونکومايسين در بیمارستان های تهران 12 درصد بوده است (18). در مطالعه صادری و همکاران در بیمارستان شهید مصطفی خمینی، انتروکوک ها

این صورت درمان این عفونت‌ها را با مشکل مواجه می‌نماید. بعلاوه این که سویه‌های مقاوم به ونکومايسين اغلب به سایر آنتی بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌باشند، احتیاط در استفاده از آنتی بیوتیک بسیار مهم بوده و انجام تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیک در مورد این عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک و هم‌چنین قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی خانم عادله حسینی زاده دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد. لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکاری‌ها که ما را در این پژوهش همکاری کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

### منابع

1. Sood S, Malhotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.* 2008; 128(2): 111-21.
2. Zirakzadeh A, Patel R, editors. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Moyo Clin* 2006(81): 529-36.
3. Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(7): 1277-81.
4. Axon RN, Engemann JJ, Butcher J, Lockamy K, Kaye KS. Control of nosocomial acquisition of vancomycin-resistant *Enterococcus* through active surveillance of hemodialysis patients. *Infection control and hospital epidemiology.* 2004; 25(5): 436-8.
5. Woodford N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology and Infection.* 2005; 11: 2-21.
6. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among

با 10/5 درصد موارد مثبت بعد از اشیرشیاکولی در مقام دوم قرار داشتند (19). در مطالعه دیگری که توسط امین و همکاران در بیمارستان امام خمینی اهواز انجام شد انتروکوک‌ها بعد از اشیرشیاکولی، کلبسیلا، استافیلوکوک‌ها، انتروباکترو پسودوموناس در مرتبه ششم قرار داشتند (20).

درمان عفونت‌ها در سراسر جهان با ظهور باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف دچار مشکل شده است (21). افزایش انتروکوک مقاوم به ونکومايسين مشکل جدی در درمان عفونت‌های انتروکوک‌ها ایجاد کرده است. از سوی دیگر خطر افزایش انتقال عامل این مقاومت به بقیه گونه‌های حساس به ونکومايسين وجود دارد (10).

انتروکوک دومین عامل عفونت ادراری و سومین عامل باکتری می‌باشد (9). هم‌چنین در دو دهه اخیر انتروکوک سومین عامل عفونت بیمارستانی بعد از اشیرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس معرفی شده است. انتروکوکوس‌ها مسئول 10-20 درصد تمام عفونت‌های بیمارستانی، 10-12 درصد عفونت‌های دستگاه ادراری ایجاد شده در بیمارستان و 5-10 درصد عفونت‌های خون در بیمارستان‌ها هستند (22). بر اساس مطالعات صورت گرفته جنس انتروکوکوس فکالیس مسئول اکثر عفونت‌های انتروکوک‌ها است ولی مقاومت به ونکومايسين بیشتر در انتروکوکوس فسیوم مشاهده می‌شود (23، 24).

مواردی همچون اقامت طولانی در بیمارستان، استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌هایی چون نسل سوم سفالوسپورین‌ها و ونکومايسين، پیوند اعضا، مصرف مترونیدازول، اعمال جراحی، دیابت، لوسمی‌ها، ضعف سیستم ایمنی به هر دلیل و نارسایی کلیه به عنوان عوامل مستعد کننده در کلونیزاسیون یا عفونت بیماران با این میکروارگانیسم‌ها مطرح هستند (25).

### نتیجه گیری

مقاومت بالای آنتروکوک‌ها به ونکومايسين در نمونه‌های مورد مطالعه یک زنگ خطر جدی است که در

- bloodstream-infecting isolates in Italy. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(4): 1575-80.
7. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American journal of medicine*. 2006; 119(6): S11-S9.
8. Zheng B, Tomita H, Inoue T, Ike Y. Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(2): 735-47.
9. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009; 155(6): 1749-57.
10. Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current opinion in infectious diseases*. 2007; 20(4): 384-90.
11. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld A. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11 ed: Elsevier Health Sciences 2002. p. 236-40.
12. Fatholahzade B, Hashemi FB, Emanini M, Aligholy M, Nakhjavani FA, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 14(3): 141-5.
13. Anbumani N, Menon T, Kalyani J, Mallika M. Isolation, distribution and prevalence of various species of enterococci isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2005; 48(4): 534-7.
14. Courvalin P, Leclercq R, Rice LB. *Antibiogram: Amer Society for Microbiology*; 2009.p.285-93.
15. Jorgensen JH, Standards TNCfCL. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard: NCCLS document M7-A3: NCCLS*; 1993.
16. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*. 2007; 56(12): 1581-8.
17. Loza E, Morosini MI, Pascual A, Tubau F, Alcalá J, Liñares J, et al. Comparative in vitro activity of daptomycin against gram-positive microorganisms: SENTRY surveillance program, Spain (2002-2006). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2008; 26(8): 489-94.
18. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*. 2008; 57(2): 173-8.
19. Sadari H, Owlia P, Jalali N, Zaer F, Zandieh E. A3-year study of demographic characteristics of patients with urinary tract infection, microbial etiology, and susceptibility testing of isolated bacteria to antibiotics in Shaheed Mostafa Khomeini hospital. *Iran J Pathol*. 2006; 3:99-104.[persian]
20. Mansour A, Manijeh M, Zohreh P. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2009; 2009(3): 118-23.
21. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology: Mosby*; 2002. p.236-9.
22. Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikolaidis P, Skoutelis A, Levidiotou S, et al. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in Greek hospitals. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(11): 5796-9.
23. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007; 128(6): 1037-50.
24. Javadi A, Ataei B, Khorvash F, Toghyani S, Mobasherzadeh S, Soghrati M. Prevalence of vancomycin resistant *Enterococci* colonization in gastrointestinal tract of hospitalized patients. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2008; 3(3): 137-41.[persian]
25. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Germanson TP, Gold HS, Durbin LJ, et al. A hospital epidemic of vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors and control. *Infection control and hospital epidemiology*. 2001; 22(3): 140-7.