مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره سوم، خرداد ۹۴
صفحه ۳۲ الی ۳۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی وجود ژن‌های *vanA* و *vanB* در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی و ارزیابی حساسیت دارویی آنها

حامد صمدی[۱]، رحیم پیرحاجاتی مهابادی[۲*]، اباذر پورنجف[۳]، سجاد امیدی[۴]، سمیه مقیمیان[۵]، ندا آل‌یاسین[۶]

[۱]کارشناس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران.

[۲]مربی میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[۳]دانشجوی دکتری تخصصی میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[۴]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[۵]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

[۶]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
رحیم پیرحاجاتی مهابادی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
rmpirhajati@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: یکی از نگرانی‌های عمومی، پیدایش انتروکوک‌های مقاوم در برابر ونکوماسین است. ژن‌های *vanA* و *vanB* مسئول پیدایش مقاومت به غلظت بالایی از ونکومایسین هستند. در این مطالعه، وجود ژن‌های مقاوم به *vanA* و *vanB* در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی و تعیین حساسیت دارویی آنها بررسی شد.

روش بررسی: تعداد ۲۲۸ نمونه شامل ادرار، خون، زخم و مدفوع از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی به دست آمد. کلنی‌های مشکوک به انتروکوک با استفاده از تست‌های استاندارد شناسایی شدند، سپس حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک و برطبق استانداردهای مؤسسه آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) به دست آمد. برای تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی سویه‌های مقاوم به ونکومایسین، E.Test انجام شد. توزیع ژن‌های *vanA* و *vanB* با استفاده از روش PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۱۱۳ انتروکوکوس به دست آمده، بیشترین و کمترین تعداد (درصد) مربوط به *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۰۳ سویه (۹۱/۱٪) بود و کمترین تعداد به *انتروکوکوس فاسیوم*، ۱۰ سویه (۸/۹٪) تعلق داشت. در روش انتشار از دیسک، تعداد ۱۱ سویه (۹/۷٪)، مقاومت به ونکومایسین از خود نشان دادند. تمامی ایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین حاوی ژن *vanA* بوده و هیچ موردی از ژن *vanB* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: افزایش سویه‌های مقاوم به ونکومایسین، یک تهدید جدی در دنیا و کشور محسوب می‌شود. به‌علاوه، افزایش این سویه‌ها، موجب محدودیت در گزینه‌های درمانی برای بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوکی، افزایش هزینه و انتشار ژن‌های مقاومتی به سایر باکتری‌ها شده است.

کلید واژه‌ها: مقاومت دارویی؛ *انتروکوک فکالیس*؛ *انتروکوک فاسیوم*؛ ژن *vanA* و *vanB*؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Samadi H, Pirhajati Mahabadi R, Pournajaf A, Omidi S, Moghimyan S, Aleyasin 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. [Full Text in Persian]

مقدمه

انتروکوک‌ها *(Enterococcus)* کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده که فلور طبیعی بدن انسان و حیوانات می‌باشند. آنها قادر به رشد در حضور نمک ۶/۵٪ و ۴۰٪ املاح صفراوی هستند (۱). در سالهای اخیر، انتروکوک‌ها به‌عنوان دومین عامل عمده عفونت‌های بیمارستانی مطرح شده‌اند و این به دلیل کسب مقاومت اکتسابی به چندین آنتی‌بیوتیک مهم از جمله بتالاکتام‌ها، سفالوسپورین‌ها، تریمتوپریم - سولفامتوکسازول و گلیکوپپتیدها می‌باشد. از مهم‌ترین عفونت‌های ایجادشده توسط انتروکوک‌ها می‌توان به عفونت‌های مجرای ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت اشاره نمود. برخی از انتروکوک‌ها به‌طور ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و کاربانم) و آمینوگلیکوزیدها مقاوم هستند.

از میان تمامی انتروکوک‌ها، *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک فاسیوم*، مسئول اکثر عفونت‌ها در جامعه و بیمارستان هستند. *انتروکوک فاسیوم* که عامل ۱۰٪ عفونت‌های انتروکوکی است، در مقایسه با *انتروکوک فکالیس* از مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار است (۲). اولین بار انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در سال ۱۹۸۶ از لندن و توسط Leclercq گزارش شد (۳). ژن‌های vanA، *vanB*، $vanC_1$، $vanC_2/_3$، *vanG*، van L وvan X مسئول کد کردن مقاومت نسبت به تیکوپلانین، آووپارسین و ونکومایسین می‌باشند. مقاومت نوع *vanA* و *vanB*، غالب‌ترین نوع مقاومت بوده که به ترتیب بر روی ترانسپوزون Tn_{1546} و Tn_{5382} یا Tn_{1547} قرار دارد که می‌تواند روی پلاسمید و یا کروموزوم نیز قرار گیرد (۵،۴). فنوتیپ‌های دارای *vanA* در برابر مقدار بالایی از ونکومایسین و تیکوپلانین مقاوم هستند، اما فنوتیپ *vanB* نسبت به ونکومایسین مقاوم و به تیکوپلانین حساس است. انتروکوک‌های حاوی *ژن vanB* قادرند فاکتور مقاومت به انتروکوک‌های حساس را از طریق کونژوگاسیون منتقل کنند (۶). در سال ۱۹۸۸ اولین گزارش VRE (Vancomycin Resistance Enterococcus) از آمریکا منتشر شد که میزان شیوع آن ۰/۴-۰/۳٪ بود و در مدت کمتر از ۷ سال میزان شیوع این میکروارگانیسم به ۲۰ برابر افزایش یافت (۸،۷).

VRE با داشتن حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) بالاتر یا مساوی با چهار (MIC≥64) نسبت به ونکومایسین و مقاومت چندگانه به پنی‌سیلین، آمینوگلیکوزید و سفالوسپورین‌ها در نظر گرفته می‌شود (۹).

مطالعات اپیدمیولوژیکی در ایالات متحده و اروپا، نگرانی‌هایی را در نتیجه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش انتروکوک‌های مقاوم در برابر ونکومایسین نشان داده است و تلاش‌هایی نیز جهت پیشگیری و کنترل مقاومت ونکومایسین در استافیلوکوکوس‌ها و انتروکوک‌ها صورت گرفته است (۶). درمان عفونت‌های ناشی از VRE مشکل و هزینه‌بر بوده و انتقال ژن مقاومت به ونکوماسین از انتروکوک به سایر گونه‌های حساس به ونکومایسین از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد توجه می‌باشد (۹،۳). برای درمان سویه‌های مقاوم به ونکومایسین از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کوئینوپریستین/دالفوپریستین (سینرسید) یا تیگسیکلین استفاده می‌شود (۱۰). با توجه به اهمیت عفونت‌های VRE، در این مطالعه وجود ژن‌های *vanA* و *vanB* در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی و ارزیابی حساسیت دارویی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه به روش توصیفی - مقطعی انجام شد. تعداد ۲۲۸ نمونه شامل ادرار، خون، زخم و مدفوع همراه با اطلاعات بیماران (شامل سن، جنس و بستری یا سرپایی‌بودن) مراجعه‌کننده به بیمارستان دکتر شریعتی، طی سالهای ۱۳۹۲-۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. به‌منظور جداسازی انتروکوک‌ها، بعد از کشت اولیه روی محیط‌های آگار خوندار، کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی جدا و آزمایشهای تکمیلی جهت تشخیص انتروکوک‌ها در شرایط دمای ۴۵-۱۰ درجه سانتیگراد، تحمل دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، هیدرولیز بایلاسکولین و رشد در حضور نمک ۶/۵٪ انجام گرفت. برای شناسایی گونه از تست تخمیر قند و جهت تولید اسید، از آرابینوز استفاده شد. برای تأیید روش‌های تشخیص *E. faecalis* $ATCC_{29212}$ و *E. faecium* $ATCC_{51559}$ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

حساسیت دارویی سویه‌های به دست آمده پس از تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند و مطابق مؤسسه استاندار آزمایشگاه و بالین (۱۱)، با استفاده از روش استاندارد Kirby–baur، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۲۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تریمتوپریم (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و تیکوپلانین (۳۰ میکروگرمی) ساخت مرک آلمان ارزیابی شد. در روش انتشار از دیسک، سویه‌های دارای هاله عدم رشد بیشتر یا مساوی از ۱۴ میلی‌متر نسبت به ونکومایسین مقاومت نشان دادند. برای تعیین MIC این سویه‌ها از روش E-test (Epsilon Test) همراه با نوار پلاستیکی حاوی آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (Liofilchem) استفاده شد که نتایج برطبق مؤسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI)، به‌صورت مقاوم (MIC≥32µg)، حدواسط (MIC=6-12µg) و حساس (MIC≤4µg) ثبت گردید.

برای استخراج DNA ژنومی باکتری از کشت ۲۴ ساعته نمونه‌ها در محیط LB براث (ساخت مرک آلمان) کشت داده شد، سپس DNA ژنومی باکتری از رسوب نمونه‌ها و با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation (ساخت Roche آلمان) انجام شد. برای انجام PCR، از پرایمر اختصاصی از قبل شناخته‌شده برای تکثیر ژن‌های، *vanA* و *vanB* استفاده گردید (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمر استفاده‌شده برای تکثیر ژن *vanA* و *vanB*

رفرنس	نام ژن مورد مطالعه	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر یافته (جفت باز)
۱۲	***vanA***	5'-TCTGCAATAGAGATAGCCGC-3' :ترادف جلویی 5'-GGAGTAGCTATCCCAGCATT-3':ترادف برگشتی	۴۵۰
۱۳	***vanB***	5' -GGGGGGGAGGATGGTGGGATAGAG-3' :ترادف جلویی 5'- GGAAGATACCGTGGCTCAAAC -3' :ترادف برگشتی	۴۲۰

واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از: PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی ۰/۰۸ مول بر میکرولیتر پلیمراز Taq DNA، ۳ میکرومولار $MgCl_2$ و ۰/۴ میکرومولار dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندروف آلمان) برای ۳۰ سیکل به‌صورت زیر انجام شد:

مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیومبروماید (۰/۵ میکروگرم/میلی‌متر) الکتروفورز گردید و با استفاده از دستگاه Gel Doc ثبت شد. در این مطالعه *S. pneumonia* $ATCC_{49619}$ و *E. coli* $ATCC_{25922}$ به‌عنوان کنترل منفی و *E. faecalis* $ATCC_{51559}$ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

جدول شماره ۲: نمونه‌های استفاده‌شده جهت جداسازی انتروکوکوس‌ها

نوع نمونه	تعداد نمونه	*انتروکوکوس فکالیس* جداشده	*انتروکوکوس فاسیوم* جداشده	تعداد کل انتروکوکوس‌های به‌دست آمده
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
ادرار	(۴۱/۲)۹۴	(۷۷/۶)۷۳	(۴/۲)۴	(۸۱/۸)۷۷
خون	(۲۵/۴)۵۸	(۲۲/۴)۱۳	(۳/۴)۲	(۲۵/۸)۱۵
زخم	(۱۸/۴)۴۲	(۳۵/۷)۱۵	(۹/۵)۴	(۴۵/۲)۱۹
مدفوع	(۱۵) ۳۴	(۵/۹)۲	(۰)۰	(۵/۹)۲
تعداد کل	(۱۰۰)۲۲۸	(۴۵/۲)۱۰۳	(۴/۳)۱۰	(۴۹/۵)۱۱۳

یافته‌ها

در این مطالعه از ۱۱۳ (۴۹/۵٪) انتروکوک جداشده، بیشترین تعداد، ۱۰۳ سویه (۹۱/۱٪) مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و کمترین تعداد، ۱۰ سویه (۸/۹٪) به *انتروکوکوس فاسیوم* تعلق داشت. ۹۴ نمونه (۴۱/۲٪) از ادرار به دست آمد که ۷۳ سویه (۷۷/۶٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۴ سویه (۴/۲٪) *انتروکوکوس فاسیوم* بود. ۳۴ نمونه (۱۵٪) از مدفوع به دست آمد که از این میان ۲ سویه (۵/۹٪) *انتروکوکوس فکالیس* بود (جدول شماره ۲). در این مطالعه، هیچ موردی (۰٪) از *انتروکوکوس فاسیوم* از مدفوع جدا نشد.

در مطالعه حاضر از کل انتروکوک‌های به دست آمده، تعداد ۱۱ مورد (۹/۷٪)، با روش انتشار از دیسک، مقاومت به ونکومایسین را از خود نشان دادند. همچنین روش انتشار از دیسک، مقاومت انتروکوک‌های تحت مطالعه را نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد. بیشترین (۶۱/۲٪) و کمترین (۳/۹٪) میزان مقاومت در *انتروکوکوس فکالیس* مربوط به اریترومایسین و ونکومایسین بود. در این بررسی، *انتروکوکوس فاسیوم* بیشترین (۷۰٪) مقاومت را به ونکومایسین و اریترومایسین از خود نشان داد، اما کمترین (۳۰٪) میزان مقاومت مربوط به جنتامایسین بود. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری کای‌مربع تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۳: الگوی آنتی‌بیوگرام در روش انتشار از دیسک

نوع باکتری	باکتری ایزوله‌شده	سویه‌های مقاوم به دیسک								
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)								
		Va	Te	Gm	E	Cl	Am	Tmp	Cip	TEC
انتروکوکوس فکالیس	(۹۱/۱) ۱۰۳	(۳/۹) ۴	(۵۱/۵) ۵۳	(۴۱/۷) ۴۳	(۶۱/۲) ۶۳	(۵۵/۳) ۵۷	(۵۹/۲) ۶۱	(۵۳/۴) ۵۵	(۴۶/۶) ۴۸	(۴۲/۷) ۴۴
انتروکوکوس فاسیوم	(۸/۹) ۱۰	(۷۰) ۷	(۵۰)۵	(۳۰)۳	(۷۰) ۷	(۵۰) ۵	(۴۰) ۴	(۶۰) ۶	(۴۰) ۴	(۷۰) ۷

ونکومایسین (Va)، تتراسیکلین (Te)، جنتامایسین (Gm)، اریترومایسین (E)، کلرامفنیکل (Cl)، آمپی‌سیلین (Am)، تریمتوپریم (Tmp)، سیپروفلوکساسین (Cip) و تیکوپلانین (Tec)

حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. همچنین از کل انتروکوک‌های جداشده، تعداد ۳ انتروکوکوس (۲/۶٪) مقاومت چندگانه (MDR) داشتند که هر دو متعلق به گونه *انتروکوک فاسیوم* بود. همچنین طبق نتایج E-test، فقط یک سویه (۱۲/۵٪) دارای مقاومت بالا به ونکومایسین (MIC≥256) بود.

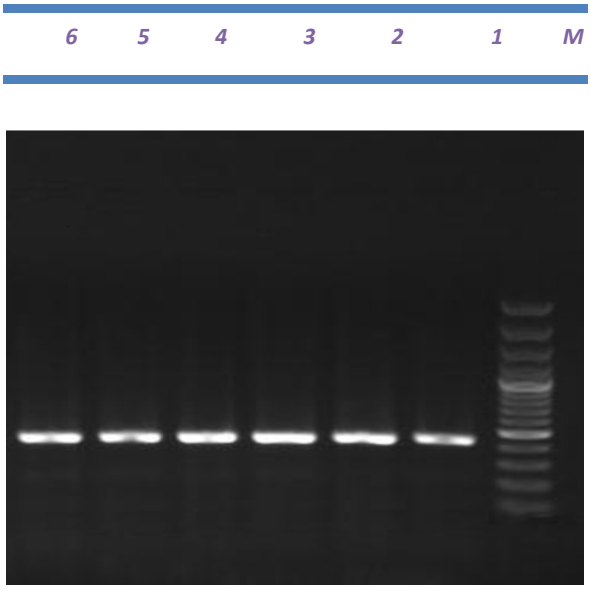
سویه دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین متعلق به گونه *انتروکوک فاسیوم* بود که از ادرار ایزوله گردید. پس از استخراج DNA، PCR با پرایمرهای اختصاصی *vanA* و *vanB* انجام گرفت و از ۱۱ سویه (۹/۷٪) انتروکوک که در روش انتشار از دیسک از خود مقاومت نشان دادند همگی (۱۰۰٪) دارای ژن *vanA* بوده و هیچ موردی (۰٪) از ژن *vanB* یافت نشد.

از بین تمامی سویه‌های دارای ژن *vanA* در PCR، تعداد ۴ سویه (۳۶/۵٪) *انتروکوک فکالیس* و ۷ سویه (۶۳/۵٪) نیز *انتروکوک فاسیوم* بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ٤: پراکندگی ژن *VanA* و *VanB* در انتروکوکوس‌های جداشده

نام ژن	حضور ژن	نوع نمونه			
	تعداد (درصد)	ادرار	خون تعداد (درصد)	زخم	مدفوع
vanA	۱۱ (۱۰۰)	۶ (۵۴/۶)	۴ (۳۶/۴)	۱ (۹)	۰ (۰)
vanB	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)

بیشترین سویه‌های مقاوم {۶ سویه (۵۴٪) و کمترین صفر سویه (۰٪)} به ونکومایسین به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های ادرار و مدفوع بود. همچنین از ۵ سویه باقیمانده، ۴ سویه (۳۶/۴٪) از خون و یک سویه (۹٪) نیز از زخم جدا شد که ژن *vanA* را حمل می‌کرد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، برای ژن *vanA* در شکل نشان داده شده است.



شکل: محصول PCR برای ژن *vanA* در ۵ سویه انتخابی از انتروکوکوس

چاهک شماره ۱: *انتروکوکوس فکالیس* $ATCC_{51559}$؛ چاهک شماره۲: *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از ادرار؛ چاهک شماره۳: *انتروکوکوس فاسیوم* جداشده از زخم؛ چاهک شماره ٤: *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از ادرار؛ چاهک شماره ٥: *انتروکوکوس فکالیس* جداشده از خون؛ M: DNA مارکر (100 bp).

بحث

انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین، اولین بار در انگلستان در سال ۱۹۸۶ شناسایی شدند، اما همچنان میزان شیوع این سویه‌ها در کشورهای اروپایی کمتر از میزان شیوع آنها در کشورهای آمریکایی می‌باشد. یکی از دلایل این تفاوت، ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی (مانند آووپارسین در دام‌ها)، در کشورهای اروپایی است (۶،۵). به‌طورکلی انتروکوک‌ها پاتوژن‌هایی با ویرولانس پیچیده نیستند، اما به‌علت وجود انواع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

عفونت‌های اکتسابی مقاوم به غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی و آمینوگلیکوزیدی این مشکل را حادتر کرده است. عوامل اصلی همچون حضور بلندمدت در بیمارستان، استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از آووپارسین در غذای حیوانات، پیوند کبد و کلیه، دیابت، بدخیمی‌های خونی، ضعف سیستم ایمنی به‌عنوان عوامل مستعدکننده کلونیزاسیون و ایجاد عفونت در این بیماران مطرح می‌باشند (۷). طبق آزمون آماری کای‌مربع، اختلاف معنی‌داری بین یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج مطالعه محمدی (۱۲) و شکوهی (۱۳) وجود نداشت.

در پژوهش Perez-hernandez و همکاران، تنها ۳ نمونه VRE از میان ۴۳۷ نمونه انتروکوک به دست آمد. آنها تنها یک نمونه *انتروکوک فکالیس* حاوی فنوتیپ *vanA* را شناسایی کردند (۱۴). همچنین Yanq و همکاران نشان دادند مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در بین نمونه‌ها در حال افزایش است که از میان ۴ نمونه *انتروکوک فاسیوم* مقاوم به دست‌آمده در این مطالعه، همگی دارای ژن *vanA* و فاقد ژن *vanB* بودند (۱۵).

محققی به‌نام Jung در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش PCR به شناسایی ایزوله‌های VRE پرداخت. وی حساسیت دارویی ایزوله‌های انتروکوک جداشده از حیوانات را نسبت به داروهای مختلف نظیر پنی‌سیلین، تیکوپلانین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، جنتامایسین، ونکومایسین و تتراسایکلین ارزیابی کرد. از ۲۴۳ ایزوله انتروکوک جداشده از حیوانات، ۵۱ ایزوله مربوط به گونه *انتروکوک فاسیوم* با فنوتیپ *vanA* و ۱۴۴ ایزوله متعلق به گونه *انتروکوک گالیناروم* با فنوتیپ *vanC1* بود (۱۶). در مطالعه حاضر، از ۲۲۸ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۱۰۳ سویه (۹۱/۱٪)، *انتروکوک فکالیس* و ۱۰ سویه (۸/۹٪) *انتروکوک فاسیوم* شناسایی شد. بیشترین تعداد، ۸۴ سویه (۳۶/۸٪) انتروکوکوس‌های به دست‌آمده شامل ۶۹ سویه (۹۴/۵٪) *انتروکوک فکالیس* و ۴ سویه (۵/۵٪) *انتروکوک فاسیوم*، از نمونه ادرار بود. کمترین تعداد، ۳۴ نمونه (۳۰٪) از مدفوع جدا شد که هیچ (۰٪) موردی از *انتروکوک فاسیوم* مشاهده نگردید.

در این مطالعه، از ۱۱ سویه انتروکوک که در روش انتشار از دیسک نسبت به ونکومایسین از خود مقاومت نشان دادند همگی (۱۰۰٪) دارای ژن *vanA* بوده و هیچ موردی (۰٪) از وجود ژن *vanB* مشاهده نشد که این یافته‌ها با مطالعه محمدی (۱۱) مطابقت داشت. نتایج حاصل از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای *انتروکوک فکالیس* نشان داد بیشترین و کمترین تعداد (درصد) مقاومت سویه‌ها مرتبط با اریترومایسین و ونکومایسین بوده که به ترتیب برابر ۶۳ (۶۱/۲٪) و ۴ (۳/۹٪) می‌باشد. همچنین این نتایج برای *انتروکوک فاسیوم* نیز به دست آمد که در آنها نیز بیشترین و کمترین تعداد (درصد) مرتبط با اریترومایسین، ونکومایسین و جنتامایسین بود که به ترتیب برابر ۷ (۷۰٪) و ۳ (۳۰٪) به دست آمد. یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد هرچند تعداد ایزوله‌های *انتروکوک فکالیس* به دست‌آمده از نمونه‌های تحت مطالعه بیشتر است، اما پراکندگی ژن‌های مقاوم در ایزوله‌های *انتروکوک فاسیوم* به مراتب بسیار بیشتر می‌باشد که این نتایج با مطالعه محمدی (۱۲) و شکوهی (۱۳) همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری

گسترش مقاومت به گلیکوپپتیدها مانند ونکومایسین و تیکوپلانین، گزینش‌های دارویی و درمانی را محدود کرده است که در نتیجه خطر مضاعف انتقال ژن‌های مقاومتی به سایر باکتری‌ها مانند استافیلوکوک وجود دارد. برای محدود کردن شیوع VRE، باید استفاده از دارو چه در زمینه حیوانی و چه انسانی با احتیاط انجام گیرد، همچنین کنترل دائمی در مورد شیوع گونه‌های انتروکوک مقاوم به گلیکوپپتیدها نیز ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران در اجرای این طرح (به شماره ۱۰۶۷)، همچنین از همکاری کارشناسان بخش میکروب‌شناسی بیمارستان دکتر شریعتی تهران به‌علت جمع‌آوری نمونه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Weinstein RA, Hayden MK. Insights into the epidemiology and control infection with vancomycin-resistance enterococci. Clin Infect Dis 2000;31(4):1058-65.

2. Frye JG1, Jackson CR. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in Salmonell aenterica, Escherichia coli, and Enteroccocus spp. Isolated from U.S. food animals. Front Microbiol 2013;4:135.

3. Cetikaya Y, Falk P, Myhall CG. Vancomycin-resistance enterococcus. Clin Microbial Rev 2000;13(4):686-707.

4. Ballard SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PDR, Grayson ML. Molecular characterization of vanB Elements in naturally occurring gut anaerobes. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(5):1688-94.

5. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive Cocci. Clin Infect Dis 2006;42(Suppl 1):S25-34.

6. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. New Eng J Med 2000;342(10):710-21.

7. Karki S, Houston L, Land G, Bass P, Kehoe R, Borrell S, et al. Prevalence and risk factors for VRE colonisation in a tertiary hospital in Melbourne, Australia: A cross sectional study. Antimicrob Resist Infect Control 2012;1(1):31.

8. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. American society microbiology. J Clin Microbiol 2000;38(2):620-4.

9. Appleman MD, Citron DM, Kwok R. Evaluation of the velogene genomic assay for detection of vanA and vanB gene invancomycin resistant enterococcus species. J Clin Microbial 2004;42(4):1751-2.

10. Kauffman CA. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother 2003;51(Suppl 3):23-30.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2010.

12. Mohammadi F, Tabarai B, Davoodian A, Maleki A, Maleknia SH, Sadeghifard N, et al. Assessment of antimicrobial profile in enterococcus fecalis and E. feacium isolates and detection of VanA/B gene in vancomycin resistance strain with PCR methods in Illam and Kermanshah hospitals. Iran J Med Micro 2012;5(1,2):14-18. [Full Text in Persian]

13. Shokoohizadeh L, Mohabati Mobarez A, Zali MR, Ranjbar R, Albouyeh M. Survey of frequency to vancomycin among Enterococcus feasium strain isolated from urinary infections in Tehran hospitals. Zanjan Univ Med Sci 2014;22(91):121-30. [Full Text in Persian]

14. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Delgado T, Moreno A, Reyes-Darias A, Sierra López A, et al. Low prevalence of vancomycin resistant enterococci in clinical samples from hospitalized patients of the Canary Islands, Spain. Int Microbiol 2002;5(3):117-20.

15. Yanq J, Lee D, Kim Y, Kang B, Kim K, Ha N. Occurrence of the van genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from Clinical Isolates in Korea. Arch Pharm Res 2007;30(3):329-36.

16. Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, et al. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. Int J Food Microbiol 2007;113(1):102-7.

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

Hamed Samadi[1]; Rahim Pirhajati Mahabadi[2*]; Abazar Pournajaf[3]; Sajad Omidi[4]; Somayeh Moghimyan[5]; Neda Alyasin[6]

[1]Bachelor of Sciences in Cellular & Molecular Biology, Babol Branch, Azad Islamic University, Mazandaran, Iran.

[2]Instructor of Microbiology, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

[3]PhD Student of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4]MSc Student of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[5]Master of Sciences in Microbiology, Tonekabon Branch, Azad Islamic University, Tonekabon, Iran.

[6]MSc Student of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:** **Rahim Pirhajati Mahabadi,** Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Email: rmpirhajati@gmail.com

Received: 8 Sep, 2014

Accepted: 19 Oct, 2014

Abstract

Background and Objectives: One of the public concerns is emergence of Vancomycin-resistant Enterococci. *VanA* and *vanB* genes is responsible for resistance to high concentrations of Vancomycin. The purpose of this study is detection of the *vanA* and *vanB* genes in the *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from hospitalized patients in Shariati hospital and their antibiotic susceptibility profile.

Methods: A total of 228 samples, including urine, blood, wound and stool were collected from patients referred to the Shariati hospital. Suspected grown colonies were identified by standard methods and then antibiotic susceptibility testing by disk diffusion assay performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). E. test was used to determination of MIC levels on the samples with resistance to Vancomycin. Distribution of *vanA* and *vanB* genes was determined by using of PCR method.

Results: In this study, out of 113 achieved Enterococcus, the highest and lowest prevalence of *E. faecalis* and *E. faecium* were 103 (91.1%) and 10 (8.9%), respectively. In the disk diffusion method, 11 (7/9%) strains were resistant to Vancomycin. All Vancomycin resistance isolates revealed *vanA*, but not *vanB*.

Conclusion: The increase of Vancomycin resistance strains is a serious threat in the world and our country. Furthermore, the limited treatment options for patients with Enterococcus infections caused increasing cost and transfer resistance genes to other bacteria.

Keywords: Drug Resistance*; Enterococcus faecalis*; *vanA* & *VanB* Protein; *Enterococcus faecium*; Polymerase Chain Reaction.