مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم، شماره اول (پیاپی ۱۴) بهار ۱۳۹۲
صفحات ۳۳-۲۳

Original Article

بررسی فراوانی ژن های *vanA* و *vanB* در *انتروکوک* های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از نمونه های کلینیکی بیمارستان شهید محمدی بندرعباس

زینب قلندرزاده دریایی[۱]، صدیقه جواد پور*[۲]، محمد کارگر[۳]

[۱] کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، [۳] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوک ها* به صورت فلور نرمال در دستگاه گوارش انسان و بسیاری از پستانداران وجود دارند. امروزه افزایش شیوع *انتروکوک های* مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان های سراسر جهان یک مشکل مهم به شمار می آید. این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع سویه های *انتروکوک*، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و نیز تعیین مهم ترین ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین (*vanA* و *vanB*) در نمونه های بالینی انجام شده است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۵۴ نمونه *انتروکوک* جمع آوری شده از نمونه های بالینی (ادرار، زخم، خون و مایع آسیت) بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس انجام پذیرفت. به منظور شناسایی گونه های مختلف *انتروکوک* از کیت RapID STR System استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی به کمک روش دیسک دیفیوژن کربی-بائر و معیار CLSI مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری MIC ونکومایسین از روش E-Test و به منظور شناسایی ژن های *vanA* و *vanB* از تکنیک PCR چندگانه استفاده گردید.

یافته ها: از ۵۴ جدایه *انتروکوک* ۳۸ سویه (۷۰/۴۰٪) به گونه *فیکالیس*، ۱۰ سویه (۱۸/۵۰٪) به گونه *فیسیوم*، ۳ سویه (۵/۵۵٪) به گونه *هیرا* و یک سویه (۱/۸۵٪) به هر کدام از گونه های *موندتی*، *دورانس* و *آوییوم* تعلق داشتند. بیشترین مقاومت سویه های *انتروکوک* نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و سفالکسین و کمترین مقاومت را نسبت به لاینزولید نشان دادند. در مجموع ۲۴/۱۰٪ (۱۳ مورد) از سویه ها به ونکومایسین مقاوم بودند. ۶۹/۲۳٪ از سویه های مقاوم، دارای ژن *vanA*، ۱۵/۳۸٪ حاوی ژن *vanB* و ۱۵/۳۸٪ نیز هر دو ژن را داشتند.

نتیجه گیری: با توجه به فراوانی بالای سویه های *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین، ضرورت کاربرد اقدامات کنترلی و پیشگیرانه وجود دارد. همچنین به منظور تجویز مناسب آنتی بیوتیک، انجام آزمون آنتی بیوگرام برای هر بیمار قبل از درمان پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: *انتروکوک های* مقاوم به ونکومایسین، ژن *vanA*، ژن *vanB*، E-test.

دریافت مقاله: آذر ماه ۱۳۹۱ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۹۱

مقدمه

انتروکوک ها (*Enterococcus*) باکتری های گرم مثبت تخمیری هستند که به صورت کوکسی های زنجیره ای و یا منفرد مشاهده می شوند. این باکتری ها فلور طبیعی روده پرندگان، انسان و حیوانات هستند. همچنین می توانند در حفره دهان، روده و واژن انسان ها و محیط نیز زندگی کنند (۱). مطالعات نشان داده است که حدود ۹۰٪ از عفونت های انتروکوکی در انسان توسط *انتروکوکوس فیکالیس*

* آدرس برای مکاتبه: بندرعباس، بلوار امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۷۶۱-۶۶۸۹۶۲۴ پست الکترونیک: sedigheh.javadpour@yahoo.com

(*Enterococcus faecalis*) و ۱۰٪ باقی مانده به وسیله *انتروکوکوس فیسیوم* (*Enterococcus faecium*) ایجاد می گردند (۲). این دو گونه انتروکوکی بیشتر در مواد غذایی مانند پنیر، ماهی، سوسیس و گوشت چرخ کرده گاو دیده می شوند (۳). بیماری زایی *انتروکوک ها* برای اولین بار در اواخر قرن ۱۹ توسط مکالوم (Maccallum) و هستینگ (Hasting) عنوان گردید (۴). در سال های اخیر گونه های *انتروکوک* به عنوان مهم ترین پاتوژن های بیمارستانی مطرح شده اند. بر اساس اطلاعات سیستم های مراقبتی عفونت های بیمارستانی در آمریکا، *انتروکوک* ها چهارمین عامل عفونت های بیمارستانی، سومین عامل عفونت های باکتریمی و دومین عامل عفونت های ادراری می باشند (۵). *انتروکوک ها* به دلیل فقدان توکسین های قوی و عوامل بیماری زای قابل توجه، پتانسیل کمی در ایجاد بیماری دارند. با این وجود می توانند موجب بروز باکتریمی، عفونت زخم های جراحی، عفونت دستگاه ادراری و اندوکاردیت شوند (۶ و ۷). افزایش روز افزون مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سراسر دنیا یک مشکل عمده بهداشتی محسوب می گردد. از طرفی عفونت های ایجاد شده به وسیله *انتروکوک* های مقاوم به آنتی بیوتیک نیز جامعه پزشکی را با مشکل مواجه کرده است. مقاومت *انتروکوک* به عوامل ضد میکروبی به صورت ذاتی (مقاومت در سطح پایین به پنی سیلین، سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها) و یا اکتسابی (نسبت به گلیکوپپتیدها و غلظت های بالای آمینوگلیکوزیدها) می باشد (۵). آنتی بیوتیک ونکومایسین برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ به منظور درمان عفونت های *استافیلوکوکی* (*Staphylococcus*) ساخته شد. اما تا اواخر دهه ۱۹۷۰ که *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) مقاوم به متی سیلین شیوع یافت، مصرف عمده ای پیدا نکرد (۸). برای درمان عفونت های انتروکوکی، ونکومایسین برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ در موارد بالینی مورد استفاده قرار گرفت (۳). *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین ابتدا در سال ۱۹۸۶ در اروپا، در سال ۱۹۸۷ در آمریکا و سپس در سراسر دنیا مشاهده شد و اکنون نیز در حال افزایش است (۹). ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین شامل *vanA*، *vanB*، *vanC*، *vanD*، *vanG* و *vanE* می باشند (۱۰). اگرچه هر شش نوع مقاومت، به دلیل تغییر در ژن کد کننده عملکرد آنزیمی ایجاد می گردد، اما محل ژن و حالت های تنظیم بیان ژن در آنها متفاوت است (۱۱). اولین گزارش *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین مربوط به فنوتایپ VanA بوده است (۱۰ و ۱۲). از میان ژن های مقاومت به گلیکوپپتید در *انتروکوک* ها، ژن *vanA* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. این ژنوتایپ که باعث مقاومت به سطح بالای ونکومایسین و تیکوپلانین می شود، اغلب بر روی پلاسمید قرار داشته و از طریق ترانسپوزون Tn*1546* منتقل می گردد. ژنوتایپ *vanB* نیز عملکردی مشابه با *vanA* دارد. تنها تفاوت مربوط به نحوه تنظیم در آنها می باشد. اپرون *vanB* می تواند بر روی کروموزوم و یا پلاسمید قرار گیرد (۱ و ۱۰). مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهد که به جز ژن های *vanA* و *vanB* سایر ژن های ایجاد کننده مقاومت، فراوانی بسیار پایینی در ایران دارند (۱۵-۱۳). *انتروکوک ها* می توانند ژن مقاومت خود را به دیگر باکتری های بیماری زا نیز منتقل نمایند (۱۶ و ۱۷). هدف از این پژوهش ارزیابی شیوع سویه های *انتروکوک*، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و نیز تعیین مهم ترین ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین (*vanA* و *vanB*) در نمونه های بالینی بیمارستان شهید محمدی بندرعباس بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۵۴ نمونه *انتروکوک* به دست آمده از نمونه های بالینی (ادرار، زخم، خون و مایع آسیت) بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس از مهر ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ماه ۱۳۹۱ پس از کسب موافقت کمیته اخلاق پزشکی انجام پذیرفت. در این پژوهش محدودیتی در مورد سن، جنس و علت بستری برای ورود به طرح وجود نداشت.

ب) شناسایی باکتری: در ابتدا تمامی نمونه ها بر روی محیط

نوترینت آگار (Merck) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. کلنی ها با رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، بایل اسکولین آگار (Merck)، محیط TSB حاوی ۶/۵٪ نمک (Merck) و رشد در ۴۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی گونه های مختلف *انتروکوک* از کیت تشخیصی RapID STR System (Remel) استفاده گردید.

ج) *آزمون حساسیت آنتی بیوتیک:* با استفاده از دیسک های ونکومایسین ۳۰ mg، آمپی سیلین ۱۰ mg، لاین زولید ۳۰ mg، ایمی پنم ۱۰ mg، تیکوپلانین ۳۰ mg تهیه شده از شرکت Mast و تری متوپریم (۱/۲۵) + سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵)، سفتی زوکسیم ۳۰ mg، جنتامایسین ۱۰ mg و سفالکسین ۳۰ mg تهیه شده از شرکت Himedia، روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار (Mast) انجام شد. فنوتایپ مقاومت بر اساس دستوالعمل CLSI تعیین گردید. به منظور تعیین MIC ونکومایسین از نوار E-Test (Liofilchem) استفاده شد. پس از ۱۸ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، حداقل غلظت مهاری قرائت گردید. حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر مقاوم، حداقل غلظت مهاری ۱۲-۶ میکروگرم در میلی لیتر حد واسط و حداقل غلظت مهاری کمتر از ۴ میکروگرم در میلی لیتر حساس تفسیر شد. در این مطالعه از سویه استاندارد *انتروکوکوس فیکالیس* (ATCC 29212) به عنوان کنترل استفاده گردید.

د) *انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR):* پس از جداسازی نمونه های مقاوم به ونکومایسین، استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت DIAtom DAN Prep 100 (ژن فناوران) انجام گرفت. به منظور شناسایی ژن های *vanA* و *vanB* از PCR چندگانه (Multiplex PCR) و پرایمرهای اختصاصی آنها استفاده گردید (جدول ۱) (۱۸).

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱۸/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (SensoQuest) با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردید. از *انتروکوکوس فیسیوم* (BM4147) حاوی ژن *vanA* و از *انتروکوکوس فیکالیس* (V583) حاوی ژن *vanB* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همچنین از سویه *انتروکوکوس فیکالیس* (ATCC 29212) حساس به ونکومایسین به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آزمون مجذور کای استفاده شد. مرز معنی داری روی $p < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای واکنش زنجیره پلی مراز

نام پرایمر	توالی ′3→5′	اندازه
Van A (F)	AATACTGTTTGGGGGTTGCTC	۷۳۴
Van A (R)	CTTTTTCCGGCTCGACTTCCT	
Van B (F)	GCG GGG AGG ATG GTG CGA	۴۲۰
Van B (R)	GGA AGATACCGTGGCTCAAAC	

یافته ها

در مجموع نمونه های بالینی مورد بررسی در این مطالعه شامل ۷۷/۸۰٪ ادرار (۴۲ نمونه)، ۳/۷۰٪ مایع آسیت (۲ نمونه)، ۱/۸۵٪ از هر نمونه تراشه، زخم و خون (۱ نمونه) بودند. بخش داخلی با ۱۹ نمونه (۳۵/۱۸٪) به عنوان بیشترین بخش دارای نمونه *انتروکوک* شناسایی گردید و پس از آن به ترتیب بخش سرپایی با ۱۲ نمونه (۲۲/۲۲٪)، بخش نفرولوژی با ۷ نمونه (۱۳٪) و بخش سوختگی با ۵ نمونه (۹/۲۵٪) قرار داشتند. سایر بخش ها شامل مراقبت های ویژه با ۴ نمونه (۷/۴۰٪)، اورژانس

با ۳ نمونه (۵/۵۵٪)، نورولوژی با ۲ نمونه (۳/۷۰٪) و بخش جراحی و مراقبت های قلبی با یک نمونه (۱/۸۵٪) بودند. میانگین سنی بیماران ۳/۱۱۹ ± ۵۲/۲۷ با میانه ۵۷ سال از حداقل ۹ ماه تا حداکثر ۹۶ سال متغیر بود. ۲۵ مورد (۴۶/۳۰٪) از بیماران زن و ۲۹ مورد (۵۳/۷۰٪) مرد بودند. همچنین میانگین روزهای بستری در بیمارستان ۸ روز، با حداکثر ۵۹ و حداقل ۱ روز گزارش گردید. در جدول ۲ گونه های مختلف *انتروکوک* جداسازی شده از نمونه های بالینی بیماران نشان داده شده است.

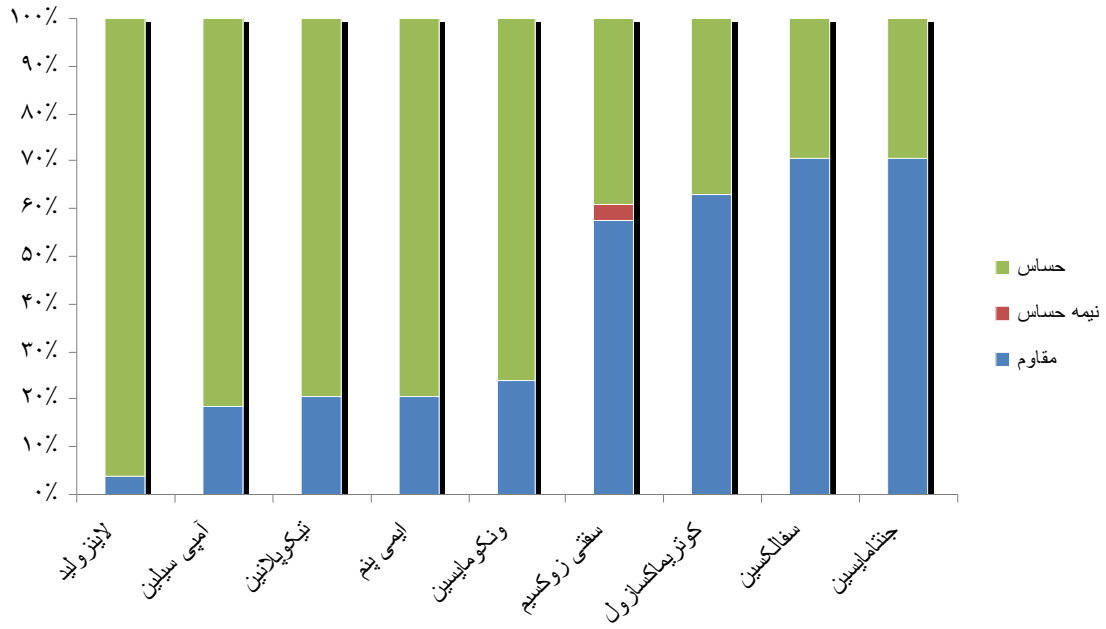
بر اساس تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، گونه های *انتروکوک* بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین و جنتامایسین و کمترین میزان را به لاینزولید نشان دادند (نمودار ۱).

تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که ۱۳ سویه به ونکومایسین مقاوم می باشند. سویه ای با مقاومت بینابینی مشاهده نگردید. از میان سویه های مقاوم، یک سویه دارای حداقل غلظت مهاری ۴۸ میکروگرم در میلی لیتر و یک سویه دارای حداقل غلظت مهاری ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر بود. بقیه سویه های مقاوم، مقدار MIC بیش از ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر داشتند. سویه های مقاوم از نمونه های ادرار با فراوانی ۷۶/۹۳٪ (۱۰ مورد) و پس از آن از نمونه های زخم، آسیت و تراشه با فراوانی ۷/۶۹٪ (۱ مورد) جداسازی شدند.

جدول ۲: سویه های جداسازی شده از نمونه های بالینی

گونه باکتری	تعداد	فراوانی
انتروکوکوس فیکالیس	۳۸	٪۷۰/۴۰
انتروکوکوس فیسیوم	۱۰	٪۱۸/۵۰
انتروکوکوس هیرا	۳	٪۵/۵۵
انتروکوکوس دورانس	۱	٪۱/۸۵
انتروکوکوس آویوم	۱	٪۱/۸۵
انتروکوکوس موندتی	۱	٪۱/۸۵

در این مطالعه ۶ سویه مقاوم به ونکومایسین از بخش داخلی (۴۶/۱۵٪)، ۵ سویه از بخش سرپایی (۳۸/۴۷٪)، یک سویه از بخش سوختگی (۷/۶۹٪) و یک سویه نیز از بخش مراقبت های ویژه (۷/۶۹٪) جداسازی گردید. سویه های مقاوم به ونکومایسین شامل ۶ سویه *انتروکوکوس فیکالیس* (۴۶/۱۵٪)، ۴ سویه *انتروکوکوس فیسوم* (۳۰/۷۸٪)، یک سویه *انتروکوکوس آویوم* (*Enterococcus avium*) (۷/۶۹٪)، یک سویه *انتروکوکوس دورانس* (*Enterococcus durans*)



نمودار ۱: توزیع فراوانی درصد حساسیت و مقاومت سویه های *انتروکوک* به تفکیک نوع آنتی بیوتیک

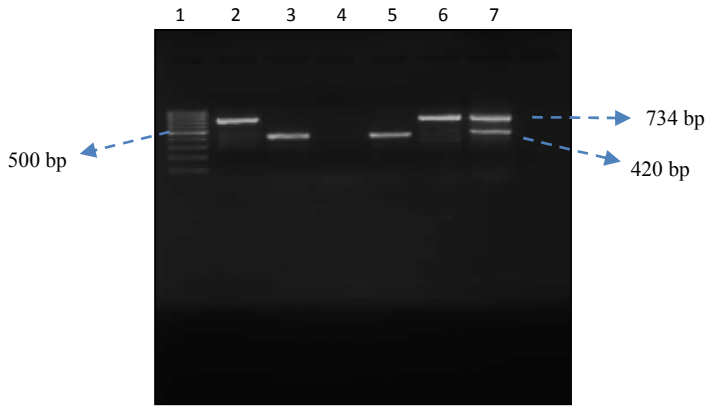
(٪۷/۶۹) و یک سویه *انتروکوکوس هیرا* (*Enterococcus hirea*) (٪۷/۶۹) بودند. در جدول ۳ اطلاعات دموگرافیگ و بالینی بیماران مورد بررسی نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین وجود بیماری زمینه ای در فرد و شیوع سویه *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین ارتباط معنی داری وجود دارد ($p = ۰/۰۳$).

نتایج PCR چندگانه نشان داد که ۹ سویه (٪۶۹/۲۳) ژنوتایپ *vanA* و ۲ سویه (٪۱۵/۳۸) ژنوتایپ *vanB*را دارند. ۲ سویه (٪۱۵/۳۸) نیز هر دو ژن *vanA* و *vanB* را داشتند (شکل ۱).

٪۵۰ از سویه های مقاوم *انتروکوکوس فیکالیس*، حاوی ژن *vanA*، ٪۱۶/۷ حاوی *vanB* و ٪۳۳ دارای هر دو ژن بودند. ٪۷۵ از سویه های *انتروکوکوس فیسیوم* دارای ژن *vanA* و ٪۲۵ *vanB* بودند. سویه های مقاوم *انتروکوکوس آویوم*، *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس هیرا* حاوی ژن *vanA* بودند. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص گردید که ارتباط

جدول ۳: عوامل خطر ساز عفونت با انتروکوک مقاوم به ونکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی (n ۳۲).

خصوصیات بیماران		فراوانی	*p* value
سن	کمتر از ۴۰ سال مساوی یا بیشتر از ۴۰ سال	٪۲۷/۷۷ ٪۷۲/۲۳	۰/۵۵۱
جنسیت	زن مرد	٪۴۶/۳۰ ٪۵۳/۷۰	۰/۵۳۱
مدت بستری در بیمارستان	کمتر از یک هفته مساوی یا بیشتر از یک هفته	٪۴۰/۶۲۵ ٪۵۹/۳۷۵	۰/۱۰۸
کاتتر ادراری	داشته نداشته	٪۵۹/۳۷۵ ٪۴۰/۶۲۵	۰/۱۰۸
مصرف قبلی آنتی بیوتیک	داشته نداشته	٪۷۸/۱۲۵ ٪۲۱/۸۷۵	۰/۵۸۳
بیماری زمینه ای	داشته نداشته	٪۶۵/۶۲۵ ٪۳۴/۳۷۵	۰/۰۳
مصرف قبلی ونکومایسین	داشته نداشته	٪۳۱/۲۵ ٪۶۸/۷۵	۰/۲۷۲
سابقه بستری	داشته نداشته	٪۴۶/۸۷۵ ٪۵۳/۱۲۵	۰/۲۷۲
عاقبت بالینی	بهبودی زنده و بیمار فوت	٪۵۶/۲۵ ٪۳۴/۳۷۵ ٪۹/۳۷۵	۰/۷۰۳



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن های انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین با روش multiplex PCR. ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی. ۲) *انتروکوکوس فیسیوم* BM4147 حاوی ژن *vanA* (کنترل مثبت). ۳) *انتروکوکوس فیکالیس* V583 حاوی ژن *vanB* (کنترل مثبت). ۴) *انتروکوکوس فیکالیس* ATCC 29212 حساس به ونکومایسین (کنترل منفی). ۵) نمونه حاوی *vanB*. ۶) نمونه حاوی *vanA*. ۷) نمونه حاوی هر دو ژن *vanB* و *vanB*.

معناداری بین گونه های *انتروکوک* و ژن مقاومت وجود ندارد (*p* ۰/۸۷۵). در پژوهش حاضر، ۷۷/۷۸٪ از ژن *vanA* (۷ سویه) در نمونه ادرار، ۱۱/۱۱٪ (۱ سویه) در تراشه و ۱۱/۱۱٪ (۱ سویه) در زخم مشاهده شدند. ۱۰۰٪ ژن *vanB* (۲ سویه) در نمونه ادرار جداسازی گردید. از طرفی ۵۰٪ (۱ سویه) از سویه های حامل هر دو ژن *vanA* و *vanB* در آسیت و ۵۰٪ باقیمانده (۱سویه) در ادرار بودند. ۴۴/۴۵٪ از ژن *vanA* (۴ سویه) در بخش سرپایی، ۳۳/۳۳٪ (۳ سویه) در بخش داخلی، ۱۱/۱۱٪ (۱ سویه) در بخش سوختگی و ۱۱/۱۱٪ (۱ سویه) در بخش مراقبت های ویژه بودند. ۵۰٪ ژن *vanB* (۱ سویه) در بخش داخلی و ۵۰٪ دیگر (۱ سویه) در بخش سرپایی وجود داشتند. ۱۰۰٪ سویه های حامل هر دو ژن *vanA* و *vanB* (۲ سویه) در بخش داخلی بودند.

بحث

از دو دهه گذشته تاکنون افزایش شیوع عفونت های انتروکوکی، در کنار افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی مشکلات زیادی را در سیستم بهداشت و درمان کشورها ایجاد نموده است (۱۹). در مطالعه حاضر مانند پژوهش فیض آبادی (Feizabadi) و همکاران بیشتر سویه های انتروکوکی از نمونه های ادرار جداسازی گردید. این مساله اهمیت استقرار *انتروکوک ها* را در مجاری ادراری نشان می دهد. *انتروکوک ها* اولین عامل عفونت در میان کوکسی های گرم مثبت عفونت زا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری ادراری زنان در ایران پس از *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* می باشند (۲۰).

فتح الله زاده (Fatholazadeh) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ۳ بیمارستان تهران، در افرادی با عفونت ادراری، میزان شیوع گونه های *انتروکوک* را به صورت ۵۷٪ *انتروکوس فکالیس*، ۳۰٪ *انتروکوس فسیوم* و ۱۳٪ باقی مانده شامل ۶٪ *انتروکوس موندتی* (*Enterococcus mundtii*)، ۳٪ *انتروکوس آویوم*، ۱٪ *انتروکوس دورانس*، ۲٪ *انتروکوس هیرا* و ۱٪ *انتروکوس رافینوزوز* (*Enterococcus raffinosus*)گزارش نمودند (۲۱). در مطالعه اسکاتن (Schouten) و همکاران در ۲۷ کشور اروپایی، شیوع سویه های *انتروکوک* تنوع بیشتری را داشت. این سویه ها شامل *انتروکوکوس فیکالیس* ۸۳٪، *انتروکوکوس فیسیوم* ۱۳/۶٪، *انتروکوکوس گالیناروم* (*Enterococcus gallinarium*) ۱/۲۰٪، *انتروکوکوس دورانس* ۰/۷۱٪، *انتروکوکوس کسلی فلاووس* (*Enterococcus casseliflavus*) ۰/۵۳٪، *انتروکوکوس آویوم* ۰/۴۶٪، *انتروکوکوس هیرآ* ۰/۱۲٪، *انتروکوکوس موندتی* ۰/۰۵٪ و *انتروکوکوس رافینوزوز* ۰/۰۲٪ بودند (۲۲). همان گونه که مشخص است سویه های *انتروکوکوس فیکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* به ترتیب بیشترین درصد عفونت را در بیماران به خود اختصاص می دهند. زیرا این سویه ها مدفوعی هستند و در فلور دستگاه گوارش، واژن، دهان و پوست وجود دارند. اما سویه های دیگر در محیط یافت می شوند. از طرفی با وجود تفاوت نسبی درصد شیوع، اما سویه های مشابهی در بیمارستان وجود دارند. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه فتح الله زاده (Fatholazadeh) و همکاران و نیز اسکاتن (Schouten) و همکاران، وجود تنوع سویه ها را می توان به میزان نمونه های مورد بررسی و گستردگی زمان نمونه گیری نسبت داد.

در پژوهش حاضر فراوانی سویه های *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین ۲۴/۱۰٪ گزارش گردید. عوامل متعددی می توانند در ظهور این سویه های مقاوم نقش داشته باشند. به ویژه می توان به افزایش چشمگیر استفاده از سفالوسپورین ها و کینولون ها اشاره نمود که احتمالاً راه را برای ظهور سویه های *انتروکوک* به عنوان پاتوژن بیمارستانی باز می نمایند. در مطالعه فرناندز (Fernandes) و همکاران و همچنین هریس (Harris) و همکاران میزان شیوع سویه های *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین به ترتیب ۸/۶٪ و ۱۰٪ گزارش شده است (۲۳ و ۲۴). اما در مطالعه صلاح (Salah) و همکاران و همچنین در بررسی انجام شده توسط گینی و یوری وین (Guiney & Uriwin) هیچ گونه از *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین مشاهده نگردید (۲۵ و ۲۶). مطالعات انجام شده در ایران نشان

می دهد که فراوانی سویه های *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین بین ۷ تا ۸/۳٪ بوده است (۲۱ و ۲۷).

در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین و جنتامایسین و بیشترین حساسیت نسبت به لاینزولید و ایمی پنم گزارش گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه قاسمی (Ghasemi) و همکاران نشان داد که مقاومت سویه های *انتروکوکوس فیکالیس* جدا شده از نمونه های بالینی به آنتی بیوتیک های جنتامایسین ۳۸/۷٪، آمپی سیلین ۱۱/۳٪، ایمی پنم ۱۰/۴٪ و ونکومایسین ۴/۷٪ بوده است. از طرفی فنوتایپ مقاوم به چند دارو نیز در ۳۷/۷٪ سویه ها مشاهده شده بود (۲۸). در بیشتر مطالعات انجام شده مشابه با پژوهش حاضر آنتی بیوتیک لاینزولید کمترین مقاومت را داشته است. در مطالعه شفی یابی (Shafiyabi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جنوب هند مقاومت به آنتی بیوتیک های سفالکسین، جنتامایسین، کوتریماکسازول، ونکومایسن و لاینزولید به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۰٪، ۸۵٪، ۵٪ و ۰٪ گزارش گردید (۲۹). یافته های ما نشان می دهد که ژنوتایپ *vanA* با ۶۹/۲۳٪ بیشترین فراوانی را در میان ژنوتایپ های مقاومت داشته است. غالب بودن ژن *vanA* با اکثر پژوهش های داخل و خارج از ایران هم خوانی دارد (۲۱ و ۳۰). دلیل این امر را می توان به قابلیت بالای این ژن در انتقال به کمک ترانسپوزون مربوطه نسبت داد.

در مطالعه طالبی (Talebi) و پوراکبری (Pourakbari) تمامی *انتروکوک* های مقاوم به ونکومایسین حاوی ژن *vanA* بودند (۱۴ و ۱۵). اما در مطالعه پدیگلیون (Padiglione) در استرالیا تمامی سویه های مقاوم دارای ژنوتایپ *vanB* بودند (۳۱). یافته های تیرفلدر (Thierfelder) و همکاران در سوئیس نشان داد که از میان ۱۷ سویه *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین، ۱۶ سویه حاوی ژن *vanB* و یک سویه حامل *vanA* بوده است (۳۲). وجود هر دو ژن *vanA* و *vanB* در مطالعه تیمور نژاد (Teymourrnejad) و همکاران و نیز در تحقیق لی (Lee) و همکاران گزارش شده است (۱۳ و ۳۳).

به نظر می رسد جدایه هایی که هر دو ژن *vanA* و *vanB* را دارند سویه های حد واسطی هستند که از ابتدا یکی از ژن های مقاومت را داشته اند. اما پلاسمید حاوی ژن دیگر را از سایر سویه ها دریافت نموده اند و به مرور زمان پلاسمید اولیه خود را از دست داده اند (۳۴).

نتیجه گیری

با توجه به شیوع بالای *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین در بیماران بستری شده، ارزیابی بیشتر در رابطه با چگونگی فراوانی این سویه ها در محیط بیمارستان و کارکنان نیز احساس می گردد. از آنجایی که *انتروکوک* ها به صورت ذاتی و اکتسابی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند، انجام تست آنتی بیوگرام قبل از تجویز ضروری می باشد. همچنین مصرف صحیح آنتی بیوتیک ها علاوه بر استفاده بالینی، در صنعت کشاورزی و دامپروری نقش بسیار مهمی در کاهش مقاومت باکتریایی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس و مرکز پزشکی مولکولی بندرعباس به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Bjorkeng E. 2010. On mobile genetic elements in *Enterococci*; adding more facets to the complexity. A thesis submitted according to the requirements for the degree of Philosophiae Doctor. University of Tromse.

2. Gordon S, Swenson J, Hill B, Pigott N, Facklam R, Cooksey RC, Thornsberry C, Jarvis WR, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of *enterococci* causing infections in the United States. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2373-2378.

3. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiol. 2009; 155: 1749-1757.

4. Morrison D, Woodford N, Cookson B. *Enterococci* as emerging pathogens of humans. J Appl Microbiol Symp, Suppl. 1997; 83: 89-99.

5. Ghaffarpasand I, Moniri R, Kheradi I. The prevalence of fecal carriage of antibiotic resistant *enterococci* among hospitalized patients in Shahid Beheshti hospital, Kashan, Iran at 2007. Feyz. 2010; 14: 70-75 [In Persian].

6. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multi-drug-resistant *Enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis. 1998; 4: 239-249.

7. Cetinkaya Y, Fallk P, Mayhall C. Vancomycin-resistant *Enterococci*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 686-707.

8. Afkhamzadeh A, Askarian M, Barari M, Hadinia M, Jokar M. Comparison of the rate of enteric colonization with vancomycin-resistant *enterococci* in medical wards with surgical wards of Namazi Hospital in Shiraz. J Kurdistan Uni Med Sci. 2008; 13:7-14 [In Persian].

9. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* Spp. AAC. 2000; 44: 967-971.

10. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. CID. 2006; 42: 25-34.

11. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. CM R. 2007; 20: 79-114.

12. French GL. *Enterococci* and vancomycin resistance. CID. 1998; 27: S75-83.

13. Teymourrnejad O, Mohabati MA, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in *Enterococcus* spp. isolated from clinical samples. JFUMS. 2011; 2: 1-6 [In Persian].

14. Talebi M, Eshraghi SS, Pourshafie MR, Pourmand MR, Eshraghian MR. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Iranian J Publ Health. 2007; 36: 20-25.

15. Pourakbari B, Aghdam MK, Mahmoudi Sh, Ashtiani MTH, Sabouni F, Movahedi Z, Alyari AE, Sadeghi RH, Mamishi S. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in an Iranian referral children medical hospital. Maedica J Clin Med. 2012; 7: 201-204.

16. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine. 2004; 22: 822-830.

17. Hayakawa K, Marchaim D, Palla M, Mahesh GU, Pulluru H, Bathina P. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case-case-control study. AAC. 2013; 57: 49-55.

18. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistant gene markers by PCR. Mol Cell Probes. 2005; 19: 27-34.

19. Mundy L, Sahm D, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 513-522.

20. Feizabadi MM, Asadi S, Khatibi S, Etemadi G, Parvin M, Oskoui M. Assesment of drug resistant pattern species about *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of Labbafinejad hospitals and Shahid Chamran hospitals during the years 2000-2003. Pejouhandeh. 2004; 9: 333-339 [In Persian].

21. Fatholazadeh B, Hashemi BF, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani AF, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) isolated from urinary tract (UTI) in Tehran, Iran. DARU. 2006; 14: 141-145.

22. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A and the European VRE study group. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19: 816-822.

23. Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance and virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. Indian J Med Res. 2013; 137: 981-985.

24. Harris AD, Nemoy L, Johnson JA, Martin-Carnahan A, Smith LD, Standiford H, Perencevich EN. Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patients: implications for an active surveillance program. ICHE. 2004; 25: 105-108.

25. Salah R, Dar-odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factor and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. BMC Oral Health. 2008; 1: 8-17.

26. Guiney M, Urwin G. Frequency and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1993; 12: 362-366.

27. Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N, Ghafoorian S, Maleki A, Davoodian E, Rahbar M, Mohammadzadeh M. Evaluation of drug resistance frequency among *Entrococci faecium* and *E. faecalis* strains and detection of *VanA/B* genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. Sci J Ilam Uni Med Sci. 2010; 19:1-8 [In Persian].

28. Ghasemi A, Moniri R, Khorshidi A, Gholam Abbas Musavi GH. The survey of virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolated from urine samples, Iran. J Med Microbiol, 2008; 3&4: 53-58 [In Persian].

29. Shafiyabi S, Mariraj J, Sumathi S, Krishna S. Emergence of vancomycin resistant *Enterococci* in a tertiary care hospital in South India. Int J Pharm Biomed Res 2013; 4: 111-113.

30. Ahmadi A, Soltan Dallal MM, Pourshafie MR. Molecular study of *Van* genes in vancomycin resistant *Enterococci* isolated from wastewater in Tehran, Iran. J Ilam Uni Med Sci. 2006*;* 14*:* 1-7 [In Persian].

31. Padiglione A, Grabsch E, Wolfe R, Gibson K, Grayson ML. The prevalence of fecal colonization with VRE among residents of long-term-care facilities in Melbourne, Australia.

Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22: 576-578.

32. Thierfelder C, Keller PM, Kocher C, Gaudenz R, Hombach M, Bloemberg GV, Ruef C. A multiple-strain out break of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. Eur J Basic Med Sci. 2012; 142: 1-6.

33. Lee W, Kim M, Huh J, Kim Y, Hyun B. The conversion pattern of epidemiology among vancomycin resistant *Enterococci*: a transitional strain of *enterococcus faecium* containing both *vanA* and *vanB* genes. Abstr Intersci Conf. AAC. 2001; C2-511.

34. Oskoui M, Farrokh P. Evaluation phenotypic and genotypic characteristics of the strains of vancomycin-resistant *Enterococci* isolated from clinical specimens**.** Iran J Med Microbiol. 2008; 1: 15-22 [In Persian].

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 1, April 2013

Original Article

Frequency of *vanA* & *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical specimens at Shahid Mohammadi hospitals Bandar Abbass

Zeinab Ghalandarzadeh Daryaei[1], Sedigheh Javadpour[2], Mohammad Kargar[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Research Center for Molecular Medicine , Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbass, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Enterococci are normal flora of alimentary tract of humans and many other mammals. Recently vancomycin resistant enterococci (VRE) have emerged as an increasingly important cause of nosocomial infections all around the world. The aims of this study were to determine frequency and antibiogram patterns of enterococci to vancomycin and also to detect the corresponding genes (*vanA* and *vanB*) in clinical isolates.

Materials and Methods: This cross–sectional study was carried out on 54 enterococci strains isolated from clinical specimens (urine, wound, blood, …) obtained from the patients hospitalized in Shahid Mohammadi hospital, Bandar Abbass. RapID STR System Kit was used to identify species of isolated enterococci. Antibiogram pattern was examined by Kirby-Bauer disk diffusion method and CLSI criteria. MIC of vancomycin was determined by E-Test. Multiplex PCR and specific primers was used to detect *vanA* and *vanB* genes.

Results: 38 out of 54 isolates (70.4%) of enterococci belonged to *E. faecalis* while *E, feacium* and and *E. hirea* consist only and 10 (18.5%) and 3 (5.55%) of the isolates, respectively. Furthermore, one (1.85%) of each *E.mundtii*, *E.durans* and *E.avium* were isolated from these samples. These strains were mostly resistant to gentamicin and cephalexin while showed lowest antibiotic resistance to linezolid. 13 (24.10%) of the isolates were resistant to vancomycin. *Van A* and *Van B* genes were found in 69.23% and 15.38% of VRE strains, respectively. Two strains (16.38%) harbored both genes.

Conclusion: According to the extensive frequency of vancomycin resistant enterococci, application of precautionary and management procedures are highly required. Furthermore, it is recommended to carry out the antibiogram assay for each patient, before the treatment process, in order to prescribe an appropriate antibiotic.

Keywords: Vancomycin resistant enterococci, *vanA* gene, *vanB* gene, E-test.

Correspondance to: Sedigheh Javadpour

Tel: +987616689624

E-mail: sedigheh.javadpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(1): 23-33.