مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۳/ ۶۹-۶۱

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن های VanA و VanB در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان الزهرا (س) اصفهان در سال ۱۳۹۰

مهرداد نیکوئی[۱،۲]، محسن میدانی[۲*]، فرزین خوروش[۳]، مهرداد کریمی[۴]، پویا پارسائی[۵]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۴] دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۵]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: **انتروکوک ها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان می باشند، ولی تحت شرایطی می توانند باعث عفونت شوند و نقش مهمی در پخش ژن های مقاومت و ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک دارند. با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ونکومایسین، انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین (VRE) یکی از پاتوژن های شایع بیمارستانی در سراسر دنیا هستند. این مطالعه با هدف بررسی شیوع و فراوانی ژن های مقاومت در سطح فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین انجام شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی مقطعی، پس از جداسازی و تشخیص ۱٦۵ سویه انتروکوک از نمونه های بالینی بخش های مختلف بیمارستان الزهرا (س) اصفهان در سال ۱۳۹۰ و انجام تست های تأییدی، انتروکوک‌ها از نظر مقاومت به وانکومایسین با روش انتشار دیسک و همچنین آزمون E-test مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین با استفاده از روش Real Time-PCR از لحاظ وجود ژن های مقاوم به وانکومایسین VanA و VanB مورد مطالعه قرار گرفت.**

یافته ها: **نتایج نشان داد از میان ۱٦۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده از نمونه های بالینی ۷۹(٤۸٪) انتروکوک با روش انتشار دیسک به ونکومایسین مقاوم بودند، اما با روش E-test فقط ٤۰(۲۵٪) انتروکوک دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین بودند. با روش Real time-PCR از ٤۰ نمونه مورد نظر ۳۷ مورد (۹۲/۵٪) حاوی ژن Van A و ۳ مورد (۷/۵٪) حاوی ژن Van B بودند.**

نتیجه گیری: **براساس نتایج به دست آمده، تعداد سویه های جدا شده دارای ژن VanA بیشتر از سویه های جدا شده دارای ژن VanB در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان می باشد. روش ژنوتیپی Real time-PCR دارای اختصاصیت بالا نسبت به روش های فنوتیپی انتشار دیسک و E-TEST را می باشد.**

واژه های کلیدی: **انتروکوک، عفونت های بیمارستانی، وانکومایسین، مقاومت، *Van A*، *Van B*.**

مقدمه:

انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین (Vancomycin Resistance Entrococcus=VRE) یکی از پاتوژن های شایع بیمارستانی در سراسر دنیا هستند (۱). VRE نخستین بار در دهه ۱۹۸۰ و سال ۱۹۸۶ در اروپا و سپس در ایالات متحده آمریکا مشاهده گردید (۲). در ایالات متحده پس از مشاهده VRE در سال ۱۹۹۸ شیوع آن افزایش چشمگیری پیدا کرده است و میزان عفونت های بیمارستانی ناشی از آن در بین سال های ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۸، ۲۰ برابر شده است (۲،۱). کلونیزه شدن بیماران با VRE می تواند منجر به بیماری های جدی مانند عفونت های دستگاه ادراری باکتریمی، آندوکاردیت و غیره گردد که در بسیاری از موارد مثل عفونت خون ناشی از VRE می توانند منجر به مرگ شوند. مطالعات گوناگون نشانگر این مسأله

*نویسنده مسئول: اصفهان-دانشگاه علوم پزشکی اصفهان-مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری-تلفن: ۰۹۱۳۳۷٤۹۱٦۵، E-mail::Meidani@med.mui.ac.ir

www.SID.ir

است که تجویز ابتدایی وانکومایسین به ویژه در بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی می تـــواند باعث شیوع VRE شود و به آسانی از بیماری به بیمار دیگر منتقل شـــود. VRE به مدت طولانی بر روی دست ها، دستکش ها و سطوح باقی می ماند و سطوح باید به عنوان یک منبع بالقوه VRE در بیمارستان در نظر گرفته شوند. بروز مقاومت در انتروکوک ها نسبت به وانکومایسین که باعث بروز عفونت های خطرناک بالینی می شود اهمیت ویژه ای دارد زیرا وانکومایسین به طور گسترده ای به عنوان داروی جانشین برای درمان عفونت با میکروارگانیسم های گرم مثبت مقاوم به آنتی بیوتیک به کار می رود (۳).

اگرچه ۱۲ گونه از جنس *Enterococcus* شناخته شده ولی بیشتر گونه های آن *E. faecalis* و *E. faecium* می باشد. *E. faecium* به طور غالب مقاومت بیشتری نسبت به *E.faecalis* دارد و پیدایش مقاومت به وانکومایسین سبب افزایش این گونه می شود (۴). استفاده بیش از اندازه از آنتی بیوتیک ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوکوس برای کسب و انتشار عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی و انتقال ژن های مقاومت بین این میکروارگانیسم ها و یا سایر گونه ها، درمان بیماری های ناشی از آن را به مشکلی جدی تبدیل نموده است (۵). در انتروکوک ها مقاومت به گلیکوپپتیدها به وسیله خوشه ژنی شامل ژن های VanA، VanB، VanC، VanD، VanE یا VanG می باشد که ژنوتایپ VanA از بقیه مهمتر است (۹-۶). ژنوتایپ VanA نوع غالبی از ژنوتایپ مقاومت در اروپا گزارش شده است. سویه های با ژنوتایپ VanA نسبت به آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تیکوپلانین مقاومند و این ژن ها را از طریق پلاسمیدهای کانژوگیتیو به دیگر سویه های پاتوژن مانند methicillin-resistant Staphylococcus aureus انتقال می دهد (۱۱،۱۰).

روش PCR روش سریع و حساس است اما دارای محدودیت نیز می باشد. مانند چرخه های حرارتی زیاد، استفاده از دستگاه ترموسایکلر گران قیمت و روش های آشکارسازی و تشخیص محصول و به همین دلیل امکان استفاده در آزمایشگاه های سیار ندارد.

روش جدید تکثیر DNA به وسیله Real time PCR روش ساده با کارایی بالا است که فاقد این محدودیت ها است و دارای مزایای زیر می باشد: فرآیند به نحوی است که امکان آلودگی بسیار کمتر است، تحت تأثیر تکثیرهای غیر اختصاصی قرار نمی گیرد، خیلی سریع بوده و از ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت نتایج قابل ارائه می باشد، محدوده وسیعی از توالی هدف را می تواند تشخیص دهد (از یک کپی تا ۱۰ کپی)، در مقایسه با PCR معمولی احتیاج به ۱۰۰ برابر DNA کمتر برای واکنش دارد تقریباً معادل ۳ پیکوگرم که معادل یک ژنوم است، تأیید تکثیرهای اختصاص به وسیله آنالیز Melting curve، Real time PCR تکثیر هدف (target) را در فاز لگاریتمی تشخیص می دهد ولی PCR معمولی تکثیر target را در فاز Plateau یا مسطح بعد از پایان PCR نمایش می دهد (۱۲).

گلیکوپپتید وانکومایسین داروی مهمی است که به جای پنی سیلین همراه با آمینوگلیکوزیدها در درمان عفونت های انتروکوکی تجویز می شود. در ایالات متحده انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین در حال افزایش هستند. اینگونه انتروکوک ها به وانکومایسین همراه با آمینوگلیکوزید حساس نمی باشند. مقاومت انتروکوک فاسیوم به وانکومایسین شایع ترین آن ها می باشد و مقاومت به وانکومایسین همچنین در برخی از نژادهای انتروکوک فکالیس مشاهده می شود (۱۴،۱۳). به دلیل عدم وجود درمان های مؤثر آنتی بیوتیکی دیگر برای عفونت های ناشی از VRE کاستن از عفونت با این ارگانیسم جزء مهمی در کنترل مورتالیتی و موربیدیتی ناشی از VRE است (۱۳). با افزایش شیوع VRE در جوامع مختلف و عدم بررسی میزان شیوع آن در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان و نیز اهمیت شیوع VRE به عنوان یک شاخص بهداشتی برای بررسی کنترل عفونت در بیمارستـــان بر آن شـدیم طی مطالعـــه حاضر میزان

Archive of SID
www.SID.ir

فراوانی نسبی انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین را بررسی کنیم.

روش بررسی:

در این مطالعه که از نوع توصیفی- مقطعی می باشد در طول مدت یک سال (در سال ۱۳۹۰) نمونه های بالینی بیمارستان الزهرا (س) اصفهان شامل خون، ادرار، خلط و زخم همراه با اطلاعات بیمار شامل جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن جمع آوری شد.

در این بررسی ۴۰(۲۵٪) سویه انتروکوکی مقاوم به وانکومایسین از بین ۱۶۵ سویه انتروکوک جدا شده از بیمارستان الزهرا (س) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه های مثبت با رنگ آمیزی گرم، با انجام تست های کاتالاز، حساسیت به باسیتراسین، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵٪، تست هیدرولیز ال- پیرولیدونیل- بتا- نفتیل آمید (PYR)، تست هیدرولیز بایل اسکولین آگار تعیین هویت شدند.

برای تعیین گونه انتروکوکوس ها از توانایی گونه های مختلف در مصرف آرابینوز و سوربیتول در محیط نیمه جامد OF و همچنین تولید رنگدانه (pigment) در محیط BHI آگار (Brain Heart Infusion agar) استفاده شد (۱۵). برای غربالگری اولیه با روش انتشار دیسک، مقاومت انتروکوک ها نسبت به دیسک های ۳۰ میکروگرمی ونکومایسین (که از شرکت Mast، UK تهیه شده بود) بررسی شد. در مرحله بعد انتروکوک هائی که برای آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تیکوپلانین دارای قطر هاله ۱۶≤ میلی متر بودند، برای آنتی بیوتیک وانکومایسین، تعیین حداقل غلظت مهار کننده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) به روش E-Test بر اساس کمیته استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گرفت و نتایج بر اساس دستورالعمل استانداردهای CLSI حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک وانکومایسین بیشتر از۳۲ میکروگرم در میلی لیتر مقاوم، حداقل غلظت مهاری ۱۲-۶ میکروگرم در میلی لیتر حد واسط، حداقل غلظت مهاری کمتر از۴ میکروگرم در میلی لیتر حساس تفسیر گردید (۱۶).

تمامی سویه هایی که کمترین میزان غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک وانکومایسین برای آن ها MIC≥۳۲ µg/ml بود، برای انجام آزمون PCR در نظر گرفته شدند.

جهت استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده گردید. به منظور استخراج DNA از کلنی باکتری در روش جوشاندن مقداری از کلنی ها به آرامی از سطح محیط کشت ۲۴ ساعته بلاد آگاربه درون لوله‌های اپندورف منتقل گردید. با توجه به اینکه محیط کشت بلاد آگارحاوی خون و هسته پورفیرین می‌باشد و این مواد در مراحل استخراج DNA و انجام PCR می‌توانند به عنوان بازدارنده عمل کنند، از این رو قبل از استخراج DNA ابتدا شستشوی کلنی ها با فسفات بافر سالین انجام شد. سپس آب دو بار تقطیر به آن ها اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. آنگاه تمام نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به لوله های اپندورف استریل منتقل شد. این محلول که حاوی قطعات DNA می‌باشد تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷).

برای انجام Real time PCR از دستگاه Rotor gene Q استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲µl آب مقطر دوبار تقطیر، ۲µl (10X) PCR Buffer، ۴µl $MgCl_2$، ۲µl dNTP (10mm)، ۲µl از هر کدام از پرایمرها وپروب ها (۱۸) (جدول شماره ۱) و ۲µl (5unit) TaqDNA polymerase و ۵µl از DNA استخراج شده بود. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در ۵۰ چرخه با برنامه دمایی شامل ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. برنامه دمایی PCR برای هر دو ژن یکسان انتخاب شد. سویه های انتروکوکی استاندارد شامل، E. faecalis

Archive of SID

www.SID.ir

PTCC 1394 و E. faecalis PTCC 1237 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای ژن های VanA و VanB مورد استفاده قرار گرفتند(تهیه شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران). سویه های استاندارد به شکل لیوفلیزه ارائه می شود که عملیات احیای آن ها با کشت جداگانه هر یک در محیط نوترینت براث (Nutrient broth) و گرماگذاری آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید (۱۸).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و پروب های ژن VanA و VanB مورد استفاده (۱۸)

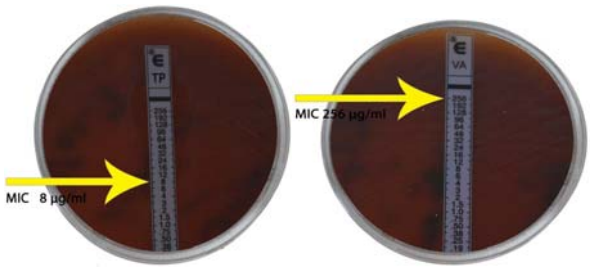
ژن	توالی پروب (′3-′5)	توالی پرایمر (′3-′5)		طول قطعه هدف (bp)
Van A	6-FAM-TGCACTTCCCGAACTG-BHQ1	TATGATGGCCGCTGCAGGTA	Forward	۱۶۳
		CGGTGAAATTATCCCAAGTGGC	Reverse	
Van B	6-FAM-TGAGCCACGGTATCTTC-BHQ1	GCCATGCAAAACCGGGAAAG	Forward	۹۲
		CAAGCGATTTCGGGCTGTGA	Reverse	

Van A: ژن وانکومایسین A؛ Van B: ژن وانکومایسین B

یافته ها:

از میان ۱۶۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده، بیشترین ایزوله به ترتیب از ادرار (۶۵٪)، مایع مغزی نخاعی (۱۵٪)، خون (۱۲/۵۰٪) و برونش (۷/۵٪) بودند. از میان ۱۶۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده از نمونه های بالینی ۴۸٪ (۷۹ نمونه) انتروکوک ها با روش انتشار دیسک به ونکومایسین مقاوم بودند، اما با روش E-test فقط ۲۵٪ (۴۰ نمونه) انتروکوک ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین بودند. از ۴۰ سویه انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین، از بخش عفونی و اطفال هر بخش ۷ نمونه، جراحی و دیالیز هر بخش ۶ نمونه، نفرولوژی، سرپایی، پیوند کلیه و مراقبت ویژه به ترتیب ۳،۵،۴ و ۲ نمونه بودند که تعداد ۳۴ عدد انتروکوکوس فاسیوم (۸۵٪)، ۴ عدد انتروکوکوس فکالیس (۱۰٪) و ۲ عدد انتروکوکوس گالیناروم (۵٪) بودند.

از بین ۴۰ انتروکوک دارای مقاومت بالا به وانکومایسین تعداد ۳۴ سویه (۸۵٪) با داشتن MIC وانکومایسین (۳۲≥µg/ml) و MIC تیکوپلانین (۱۶-۵۱۲µg/ml) دارای فنوتایپ VanA و تعداد ۶ سویه (۱۵٪) با داشتن MIC وانکومایسین (۴-۵۱۲µg/ml) و MIC تیکوپلانین(۸≥µg/ml) دارای فنوتیپ VanB می باشند (تصویر شماره ۱).



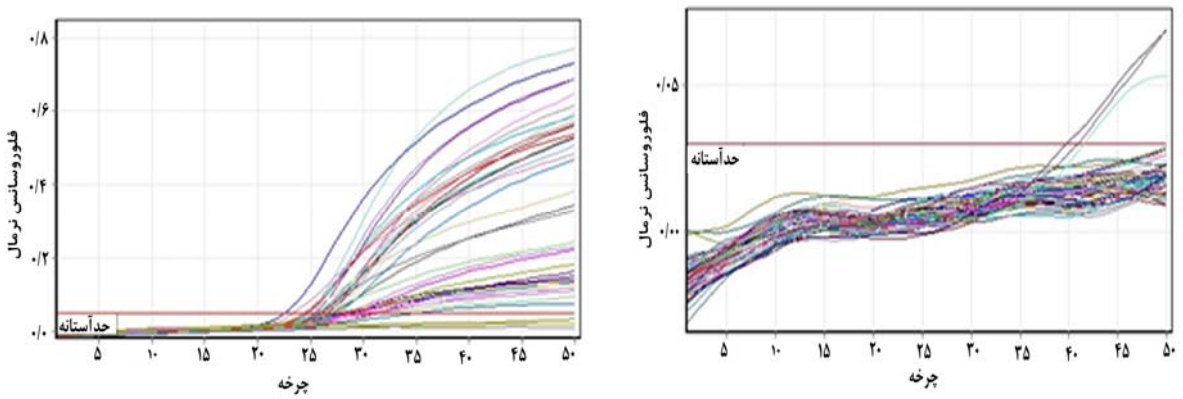
تصویر شماره ۱: تشخیص فنوتیپ سویه های انتروکوکی با روش E-Test

نتایج Real time PCR نشان داد از ۴۰ نمونه مورد نظر ۳۷ مورد (۹۲/۵٪) حاوی ژن Van A و ۳ مورد (۷/۵٪) حاوی ژن Van B بودند (تصویر شماره ۲) و در روش E-test از ۴۰ نمونه ۳۴ مورد (۸۵٪) حاوی ژن

Archive of SID

www.SID.ir

Van A و ۶ مورد (۱۵٪) حاوی ژن Van B بودند، یعنی حساسیت E-test در تشخیص Van A (۹۱/۹٪) می باشد.



تصویر شماره ۲: تشخیص ژنوتیپ سویه های انتروکوکی با روش Real time-PCR

الف: ژن Van A، (کنترل مثبت، کنترل منفی) ب: ژن Van B،(کنترل مثبت، کنترل منفی). منحنی هایی که از حد آستانه (۰/۰۵) بالاتر آمده اند مربوط به نمونه هایی که نتیجه Real time-PCR برای آن ها مثبت محسوب می شود.

بحث:

انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا هستند که می توانند منجر به بیماری های جدی مانند عفونت های ادراری، اندوکاردیت، باکتریمی و ... شوند و میزان بروز عفونت های ناشی از VRE در تمام دنیا در حال افزایش است، به عنوان سومین باکتری که موجب شیوع عفونت بیمارستانی در جهان می شود شناخته می شوند (۱۰). VRE بیشتر در بیمارانی که باکتری انتروکوک در دستگاه گوارش آن ها کلنیزه شده اتفاق می افتد (۱۹). شیوع VRE در دو مطالعه در سال های ۸۵ و ۹۱ در بیمارستان های تهران انجام شده که بر طبق این مطالعات میزان شیوع در بیمارستان های تهران به ترتیب ۷٪ و ۱۶/۹٪ گزارش شده است (۲۰،۲۱). در مطالعه ای که سال ۸۷ در بیمارستان های آموزشی اصفهان انجام شد، میزان شیوع VRE ۲۹/۳٪ گزارش شده است (۲۲). این نشان دهنده افزایش شیوع VRE می باشد.

بر اساس نتایج این مطالعه مهمترین سویه ها شامل انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می باشد، بسیاری از این ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین، آمپی سیلین گلیکوپپتیدها و آمینوگلیکوزیدها از خود مقاومت نشان داده اند که این باعث محدودیت در استفاده از آنتی بیوتیک به عنوان درمان در این ایزوله ها شده است. بروز و پخش سویه های انتروکوکی با سطح بالایی از مقاومت به گلیکوپپتیدها به ویژه ونکومایسین در سراسر جهان گزارش شده است (۲۳). بنابراین با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارشاتی مبنی بر ناهمگونی های فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین (۲۴)، ما به بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی ۴۰ سویه انتروکوکی مقاوم به ونکومایسین که از بیماران بیمارستان الزهرا (س) اصفهان جدا شده اند، پرداختیم.

در این مطالعه از میان سویه های انتروکوک جدا شده از ۲۶۵ نمونه بیمارستانی ۴۰ (۲۵٪) سویه آن VRE بوده اند که از این تعداد سویه ۲۶ مورد از نمونه ادرار، ۶ مورد از نمونه مغز نخاعی، ۵ مورد از نمونه خون و دو مورد از نمونه برونش جدا شدند که از ۴۰ سویه تعداد، ۳۴ عدد انتروکوکوس فاسیوم (۸۵٪)، ۴ عدد انتروکوکوس فکالیس (۱۰٪)، ۲ عدد انتروکوکوس گالیناروم (۵٪) هر دو فنوتایپ به طور مجزا ژن های Van A و Van B را

Archive of SID

www.SID.ir

داشتند. تمام انتروکوک های با مقاومت سطح بالا انتروکوک فاسیوم بودند. در این مطالعه مانند مطالعه جوادی و همکاران و مطالعه پور اکبری و همکاران هیچ ارتباطی میان جنسیت و سن با ابتلا به عفونت VRE وجود ندارد (۲۲،۲۵).

در مطالعه تیمورنژاد و همکاران از ۴۱۱ انتروکوک مورد مطالعه ۲۳(۵/۶٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که تمامی ۲۳ انتروکوک مقاوم به ونکومایسین انتروکوک فاسیوم بودند؛ که از این تعداد، ۱۳ سویه (۵۶/۵٪) انتروکوک از ادرار، ۸(۳۴/۸٪) انتروکوک از خون و ۲ (۸/۷٪) انتروکوک از زخم جدا شده اند که سویه ها هر دو فنوتایپ Van A و Van B را داشتند (۲۶). همچنین در مطالعه دیگری در مورد شیوع VRE توسط شریفی و همکاران از ۲۲۰ انتروکوک مورد مطالعه ۴۳(۱۳/۲٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که ۳۵ انتروکوک مقاوم به ونکومایسین، انتروکوک فاسیوم و ۸ مورد انتروکوک فکالیس هستند که این تعداد سویه ۸۵/۵٪ از ادرار، ۷/۷٪ از خون و ۴/۱ ٪ از مایعات بدن بودند که سویه ها هردو فنوتایپ Van A و Van B را داشتند (۲۷). در مطالعه صادقی و همکاران از ۴۱۴ انتروکوک مورد مطالعه ۱۹(۴/۶٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که تمامی ۱۹ VRE انتروکوک فاسیوم بوده اند؛ که این تعداد سویه ۱۷(۸۹٪) انتروکوک از ادرار، ۱(۱۱٪) انتروکوک از خون و از دستگاه تنفسی جدا که همه سویه ها فنوتایپ Van A را داشته اند (۲۸).

مقایسه میزان شیوع VRE در بیشتر مطالعات مختلفی که ذکر گردید به خوبی نشان می دهد که شیوع VRE و نوع فنوتایپ آن در تمام این مطالعات با هم متفاوت بوده است. در تمام مطالعات عفونت های ادراری در مقایسه با دیگر عفونت ها بیشترین مقدار عفونت های انتروکوکی مقاوم به وانکومایسین را شامل می شوند. تفاوت در میزان شیوع VRE در مطالعات ذکر شده می توانند به دلیل حجم نمونه، سن و جنس بیماران و همچنین روش تشخیص VRE در این مطالعات باشند.

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش از ۳۷ موردی که با روش Real Time-PCR، Van A تشخیص داد شد، ۳۴ مورد (۹۱/۹٪) آن ها توسط E-test نیز Van A تشخیص داده شد یعنی حساسیت E-test در تشخیص Van A (۹۱/۹٪) می باشد. از ۳ موردی که Real Time PCR آن ها را Van A تشخیص داده بود E-test نیز هر ۳ مورد (۱۰۰٪) را نیز Van A تشخیص داده است؛ یعنی ویژگی (اختصاصیت) E-test برابر (۱۰۰٪) به دست آمد. در مورد تشخیص Van B بر عکس Van A حساسیت E-test برابر ۱۰۰٪ و ویژگی آن برابر (۹۱/۹٪) آن به دست آمد. در مطالعه تیمورنژاد و همکاران ویژگی (اختصاصیت) E-test در مورد تشخیص Van A (۱۰۰٪) و در مورد تشخیص Van B حساسیت E-test برابر ۱۰۰٪ و ویژگی آن برابر (۸۳٪) ذکر شده است (۲۶). این تفاوت به دلیل اختلاف روش شناسایی این دو روش است. به طوری که روش مولکولی در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین یک روش سریع و دقیق است که تشخیص براساس توالی موجود در ژنوم باکتری که توسط پرایمرها و پروب های اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد برخلاف مطالعاتی که تاکنون انجام شده در تمامی جدایه ها با فنوتیپ های Van A و Van B ژن های مورد پیش بینی احتمال دارد وجود نداشته باشد و هماهنگی فنوتیپی و ژنوتیپی بین سویه ها موجود وجود نداشته باشد. نکته مهمی که در این مطالعه مشخص گردید، آسان تر، دقیق بودن و اختصاصیت بالا روش Realtime-PCR نسبت به سایر روش های فنوتیپی از جمله انتشار دیسک و E-test می باشد. انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین به دلیل پخش سریع، همراه بودن

Archive of SID
www.SID.ir

با عفونت ها و میزان مرگ و میر بالا، محدودیت داشتن برای درمان و امکان انتقال ژن های مقاومت به وانکومایسین به دیگر پاتوژن های بیماری زا و شایع تر مانند استافیلوکوک اورئوس، به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل شده است. از آنجایی که این مقاومت در بین سویه های باکتری روند افزایشی دارد احتیاط در استفاده از آنتی بیوتیک بسیار مهم بوده و انجام تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیک در مـــورد این عفونت ها ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمامی پرسنل مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خصوصاً آقای دکتر داریوش شکری، خانم دکتر پریسا شعاعی و خانم بهاره وکیلی برای همکاری صمیمانه آن ها کمال تشکر را داریم.

منابع:

1. Paul A, Tambyah M, Jhon A, Dennis G. Nosocomial infection with vancomycin-dependent Entrococci. Emerg Infect Dis. 2004; 10(7): 1277-81.
2. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. J Hosp Infect. 2008; 70(Suppl 2): 3-10.
3. Freitas MC, Pacheco-Silva A, Barbosa D, Silbert S, Sader H, Sesso R, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococcus fecal colonization among kidney transplant patients. BMC Infect Dis. 2006; 22(6): 133.
4. Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis. 2001; 7(2): 183-7.
5. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram positive bacteria. Am J Med. 2006; 119(6): S11-S9.
6. Armeanu E, Bonten MJ. Control of vancomycin-resistant enterococci: one size fits all? Clin Infect Dis. 2005; 41(2): 210-6.
7. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. Trends Microbiol. 1996; 4(10): 401-7.
8. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from Enterococcus faecium BM4339. J Bacteriol. 1999; 181(12): 3644-8.
9. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(11): 3224-8.
10. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348(14): 1342-7.
11. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B, et al. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the absence of vancomycin exposure. Clin Infect Dis. 2004; 38(8): 1049-55.
12. Honarm H, Falah Ghavidel M, Nikokar I, Rahbar Taromsari M. Evaluation of a PCR assay to detect enterococcusfaecalis in blood and determine glycopeptides resistance genes: van a and van B. Iran J Med Sci. 2012; 37(3): 194-9.
13. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008; 128(2): 111-21.
14. Hayakawa K, Marchaim D, Vidaillac C, Lephart P, Pogue JM, Sunkara B, et al. Growing prevalence of vancomycin-resistant enterococcus faecalis in the region with the highest prevalence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011; 32(9): 922-4.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J. 2007; 11(3): 161-7.
16. Modi GB, Soni ST, Patel KJ, Goswami HM, Vegad MM. Prevalence of vancomycin resistant enterococci in tertiary care hospital, western, India. Int J Microbiol Res. 2012; 4(2): 182-85.
17. Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(2): 293-6.
18. Arbour N, Weirich A, Cornejo-Palma D, Prevost S, Ramotar K, Harder CJ. Real-time PCR detection of VRE. Spartan Bio sci. 2008; 1(3): 203-15.
19. Kalocheretis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, et al. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among hemodialysis patients in Athens. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(6): 1031-4.
20. Fatholahzadeh B, Hashemi F, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani F, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant Enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. Daru. 2006; 14(3): 141-5.
21. Rafiei Tabatabaei S, Karimi A, Navidinia M, Fallah F, Tavakkoly Fard A, Rahbar M. A study on prevalence of vancomycin-resistant enterococci carriers admitted in a children hospital in Iran. Ann Biol Res, 2012; 3(12): 5441-45.
22. Javadi A, Ataei B, Khorvash F, Toghyani S, Mobasherzadeh S, Soghrati M. Prevalence of vancomycin resistant Enterococci colonization in gastrointestinal tract of hospitalized patients. Iran J Clin Infect Dis. 2008; 3(3): 137-41.
23. Sreeja S, Babu PRS, Prathab AG. The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. J Clin Diagn Res. 2012; 6(9): 1486-8.
24. Ghoshal U, Garg A, Tiwari DP, Ayyagiri A. Emerging vancomycin resistance in Enterococci in India. Indian J Pathol Microbiol. 2006; 49(4): 620-2.
25. Pourakbari B, Aghdam MK, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sabouni F, Movahedi Z, et al. High frequency of vancomycin-resistant enterococcus faecalis in an Iranian referral children medical hospital. Maedica (Buchar). 2012; 7(3): 201-4.
26. Teymournejad O, Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in enterococcus spp. isolated from clinical samples. J Fasa Univ Med Sci. 2011; 2(1): 1-6.
27. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Soroush MH, et al. Vancomycin-resistant enterococci among clinical isolates from north-west Iran: identification of therapeutic surrogates. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 4): 600-2.
28. Sedaghat M, Rahimi F, Pourshafie MR, Talebi M. Studies of vancomycin resistant enterococcus faecium isolated from clinical samples in Tehran, Iran. Curr Res Bacteriol. 2012; 5(2): 53-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Jul, Aug; 16(3): 61-69

Original article

Evaluation of the frequency of phenotype and genotype of Van A and Van B genes in vancomycine resistant enterococcus isolated from clinical sample of Alzahra Hospitals in Isfahan

Nikooei M[1, 2], Meidani M[2*], Khorvash F[3], Karimi M[4], Parsaei P[5]

[1]Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. Iran; [2]Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [3]Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [4]Department of Surgery, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; [5]Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran

Received: 30/June/2013 Accepted: 3/June/2014

Background and aims: Enterococcis are a part of the normal flora of the human gastrointestinal tract, and play an important role in the spread of resistance genes and produce antibiotic-resistant strains. With increasing the use of vancomycin antibiotics, Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are one of the major nosocomial pathogens in worldwide. The aim of this study was to investigate the frequency of phenotype and genotype of van genes in vancomycine resistant Enterococci.

Methods: In this cross-sectional descriptive study, after isolating and identifying 165 strains of enterococci from clinical specimens in different wards of Alzahra hospital, the enterococcus isolates were identified by biochemical confirmation tests. Resistance of each isolate to vancomycin determined by disk diffusion and E-Test method and was tested for the presence of the Van A and Van B genes by Real time PCR.

Results: The results of the 165 isolates of enterococci collected from clinical specimens showed 79 (48%) enterococcus was resistant by disk diffusion method to vancomycin, but using E-test, only 40 (25%) enterococci was resistant in high level to vancomycin. Real-time-PCR assay of 40 samples showed 37 patients (92/5%) included Van A gene and 3 (7/5%) with Van B gene.

Conclusion: Based on the results of the present study, the rate of isolation of Van A-containing strains was higher than that of Van B-containing of Alzahra Hospital in Isfahan. Real Time-PCR has a high specificity compared to other phenotypic methods E-Test and disk diffusion method.

Keywords: **Enterococci, Nosocomial infections, Vancomycin, Resistance, Van A, Van B.**

Cite this article as: Nikooei M, Meidani M, Khorvash F, Karimi M, Parsaei P. Evaluation of the frequency of phenotype and genotype of Van A and Van B genes in vancomycine resistant enterococcus isolated from clinical sample of Alzahra Hospitals in Isfahan. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(3): 61-69.

[*]**Corresponding author:**

Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran. Tel:00989132749165, E-mail: meidani@med.mui.ac.ir

www.SID.ir