مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۶/ بهمن و اسفند۱۳۹۴/ ۵۲-۴۵

مقاله پژوهشی

کاهش مقاومت وانکومایسین در سویه های انتروکوک مقاوم به وانکومایسین حاوی ژن های Van A و Van B در حضور پروتئین لاکتوفرین

فرزین خوروش[۱]، مهرداد نیکویی[۲]، محسن میدانی[۳*]، داریوش شکری[۴]، محمدرضا ذوالفقاری[۲]

[۱]مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۲]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۴]دانشجو، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۶

چکیده:

زمینه و هدف: **پروتئین لاکتوفرین (Lactoferrin= LF) دارای اثرات ضد میکروبی اثبات شده ای است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر لاکتوفرین روی حداقل غلظت مهاری (Minimum Inhibitory Concentration= MIC) وانکومایسین در سویه های انتروکوک مقاوم به وانکومایسین دارای ژن های مقاومت Van A و Van B بود.**

روش بررسی: **در این مطالعه مقطعی، پس از جداسازی و تشخیص ۲۶۵ سویه انتروکوک از نمونه های بالینی، MIC وانکومایسین و تیکوپلانین سویه ها با روش تست اپسیلومتر (Epsilometer test= Etest) به دست آمد. نمونه های انتروکوک مقاوم به وانکومایسین (Vancomycin Resistant Enterococcus= VRE)، با روش real time PCR از لحاظ وجود ژن های مقاوم به وانکومایسین Van A و Van B بررسی شد و سپس تأثیر لاکتوفرین را بر روی MIC آنتی بیوتیک وانکومایسین سویه های VRE مورد بررسی و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون با سطح معنی داری P<۰/۰۵ آنالیز گردید.**

یافته ها: **نمونه Van A در غلظت (۲۰۴۸ µg/ml) پروتئین لاکتوفرین MIC وانکومایسین را ۸۵ و ۸۰ برابر به ترتیب در روش تغییر یافته Etest و میکروتیتر کاهش داده و در نمونه Van B در غلظت (۵۱۲ µg/ml) پروتئین لاکتوفرین MIC وانکومایسین را ۱۰و ۱۰/۳ برابر به ترتیب در روش تغییر یافته Etest و میکروتیتر کاهش داده است. شاخص لاکتوفرین ارتباط همبستگی مثبت معنی داری را با کاهش MIC وانکومایسین نشان داد (P<۰/۰۰۱ و r=۰/۱۸۳).**

نتیجه گیری: **غلظت های متفاوت پروتئین لاکتوفرین در شرایط آزمایشگاهی باعث کاهش مقاومت در سویه های VRE دارای ژن Van A و Van B می شود، پیشنهاد پتانسیل استفاده از این پروتئین به عنوان یک عامل کمکی به وانکومایسین وجود دارد.**

واژه های کلیدی: **انتروکوک مقاوم به وانکومایسین، حداقل غلظت مهاری، پروتئین لاکتوفرین، ژن های مقاومت وانکومایسین.**

مقدمه:

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. عفونت های بیمارستانی مربوط به این باکتری ها که به چندین آنتی بیوتیک مقاوم اند. با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ونکومایسین، سویه های انتروکوک مقاوم به وانکومایسین، یک عامل مهم عفونت های بیمارستانی

نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری- تلفن: ۰۹۱۳۲۷۴۹۱۶۵، E-mail: meidani@med.mui.ac.ir

www.SID.ir

در جهان هستند (۴-۱). پروتئین لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون که افینیتی بالایی به آهن نشان می دهد ساختار مولکولی و سکانس های آمینواسیدی پروتئین لاکتوفرین در سال ۱۹۸۴ کشف شد. این پروتئین یک پروتئین دفاعی غشایی است و به عنوان کاتیون لاکتوفرین به آنیونی در اسید تیکوئیک متصل می شود. فعالیت ضد میکروبی پروتئین لاکتوفرین وابسته به آهن نیست و این اثرات ضد باکتریایی از طریق های دیگر خودش را نشان می دهد (۵). خصوصیات بیولوژیکی پروتئین لاکتوفرین به وسیله اتصال به گیرنده مناسب خودش را نشان می دهد. این پروتئین دارای گیرنده های روی ماکروفاژ، منوسیت، لکوسیت، پلی مورفو نوکلوئید و بعضی باکتری ها مانند استافیلوکوکوس ارئوس و سودوموناس هیدروفیلا دارای گیرنده ویژه برای پروتئین لاکتوفرین می باشند. پروتئین لاکتوفرین بر روی پخش و توزیع آهن در میکروارگانیسم ها تأثیر بسزایی دارد. پروتئین لاکتوفرین یک نقش مهمی را در انتقال آهن بازی می کند. رسپتورهای N ترمینال پروتئین لاکتوفرین روی سطح بعضی میکروارگانیسم ها کشف شدند. اتصال پروتئین لاکتوفرین به این رسپتورها موجب مرگ سلول ها شده و در باکتری های گرم مثبت و منفی هم اثر بسزایی دارد (۸-۶). لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر لاکتوفرین روی MIC وانکومایسین در سویه های انتروکوک مقاوم دارای ژن های مقاوم به وانکومایسین Van A و Van B از نمونه های بالینی جدا شده از بیمارستان الزهرا (س)، به جهت کنترل شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و درمان مناسب افراد بستری در بخش های مختلف بیمارستان است.

روش بررسی:

در این مطالعه در طول مدت یک سال 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 به روش مقطعی به مطالعه ۴۰ (۱۵٪) سویه انتروکوکی مقاوم به وانکومایسین از بین ۲۶۵ سویه انتروکوک جدا شده از بیمارستان الزهرا (س) در سال ۱۳۹۰ پرداخته شد. نمونه های VRE با استفاده از روش real time PCR از لحاظ وجود ژن های مقاوم به وانکومایسین Van A و Van B مورد مطالعه قرار گرفت (۷)؛ سپس به وسیله دو روش میکروتایترپلیت و تست اپسیلومتر، MIC آنتی بیوتیک وانکومایسین برای سویه های VRE تعیین گردید. دیالیز پروتئین لاکتوفرین از مخلوط کردن ۱cc HCl با PH= ۸ و ۲۰۰ µl EDTA ۰/۵ مولار در یک بشر بزرگ و حجم آن را با آب مقطر به ۱۰۰cc رساندیم. غشاء دیالیز (نفوذ پذیری ۸ میکرون) را که اندازه و سایز مناسبی از آن را بریده ایم به مدت ۱۵ دقیقه گذاریم تا در محلول جوش بیاید. دیالیز پروتئین لاکتوفرین در سه نوبت در مقابل EDTA با PH برابر ۶ و بافر فسفات (Na_2HPO_4 ۰/۱ M، PH ۴/۶) به ترتیب به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ دیالیز پروتئین لاکتوفرین در سه نوبت در مقابل آب مقطر انجام گرفت (۹). در تعیین MIC وانکومایسین به روش MIC ماکرودیلوشن، غلظت (۲۵۶ µg/ml) از آنتی بیوتیک وانکومایسین، تهیه غلظت لاکتوفرین (۲۰۴۸ µg/ml) در ۲ میلی لیتر بافر و سپس دیالیز کرده و با فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون آن را فیلتر می کنیم و تهیه باکتری را که روز قبل در محیط تریپتیکاز سویا براث (Trypticase Soy Broth= TSB) کشت داده ایم ۳ بار در بافر فسفات PH برابر۶ شسته و سانتریفوز کرده و میزان جذب نور آن را به ۰/۱ در ۶۶۰ نانومتر رساندیم. ۲۰۰ لاندا از غلظت آنتی بیوتیک تهیه شده (۲۵۶ µg/ml) را به چاهک های شماره ۱ هر سری اضافه کردیم. به همهٔ چاهک های دیگر ۱۰۰ لاندا محیط کشت مولر هینتون براث استریل اضافه کردیم. تهیه سری رقت آنتی بیوتیک از چاهک اول هر سری تا چاهک شماره ۸، ۱۰۰ لاندا لاکتوفرین (۲۰۴۸ µg/ml) را به همه چاهک های ۱ تا ۸ در سری اول اضافه می کنیم. ۱۰۰ لاندا لاکتوفرین (۱۰۲۴ µg/ml) را به همه چاهک های ۱ تا ۸ در سری

Archive of SID
www.SID.ir

دوم اضافه کردیم. ۱۰۰ لاندا لاکتوفرین (۵۱۲ µg/ml) را به همه چاهک های ۱ تا ۸ در سری سوم اضافه کردیم. ۱۰۰ لاندا لاکتوفرین (۲۵۶ µg/ml) را به همه چاهک های ۱ تا ۸ در سری چهارم اضافه کردیم. به سری پنجم دست نزندیم (لاکتوفرین اضافه نکردیم). اضافه کردن ۲۰ لاندا باکتری با میزان جذب نور ۰/۱ به همه چاهک ها سری ۱ تا ۹ به جزء چاهک شماره ۱۰ هر سری اضافه کردیم (چاهک شماره ۹، MIC باکتری را نشان داد. چاهک شماره ۱۰، هیچ چیز ندارد آلودگی را نشان می دهد). انکوباسیون در انکوباتور شیکردار ۳۷ °C، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و سپس بررسی آن و خواندن MIC آن رسید (۱۰). تعیین MIC وانکومایسین به روش تغییر یافته تست اپسیلومتر با برداشت کلنی یکسان از نظر شکل از محیط کشت ۲۴ ساعت محیط کشت بلادآگار (Blood Agar) و در داخل cc ۸، محیط TSB حل کردیم و داخل انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه کردیم. سه بار شستشو و سانتریوفوژ در بافر فسفات PH برابر ۶ (۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm) و میزان جذب نور آن را به ۶۶۰ نانومتر رساندیم. تهیه استوک با مقدار ۲/۰۴۸ میلی گرم پروتئین لاکتوفرین در یک میلی لیتر بافر فسفات PH برابر۶، سپس cc ۰/۵ از استوک را برداشته و درون میکروتیوب تمیز و استریل ریخته cc ۰/۲۵ از میکروتوب ۱ برداشته و در میکروتیوب ۲ ریخته و cc ۰/۲۵ بافر فسفات PH برابر ۶ به آن اضافه کرده و این عمل را تا میکروتیوب ۴ تکرار کردیم و از استوک اولیه سری رقت های به ترتیب (۲۰۴۸ µg/ml)، (۱۰۲۴ µg/ml)، (۵۱۲ µg/ml) و (۲۵۶ µg/ml) تهیه گردید. به نسبت ۰/۱ باکتری را به لوله های سری رقت پروتئین لاکتوفرین اضافه کردیم؛ سپس به مدت ۱۰ ساعت در ۳۷ °C در انکوباتور شیکردار قرار دادیم. بعد از آن به روش کشت چمنی با سوآپ بر روی محیط بلادآگار کشت دادیم. بعد از ۱۵ دقیقه بر روی هر بلادآگار از سری رقت (۲۰۴۸ µg/ml)، تا صفر یک نوار Etest وانکومایسین قرار دادیم و در داخل انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار دادیم و سپس نتایج را خواندیم (۱۲،۱۱). پس از به دست آمدن نتایج اولیه و اطلاعات حاصل از شاخص های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری رگرسیون خطی و همبستگی پیرسون با سطح معنی داری P<۰/۰۵ آنالیز گردید.

یافته‌ها:

در مجموع از میان ۴۰ ایزوله VRE، ۲ ایزوله به نام های V_1 و V_{40} برای بررسی اثر لاکتوفرین بر روی MIC وانکومایسین انتخاب شدند. سویه V_1 دارای فنوتیپ Van B در حضور غلظت پروتئین لاکتوفرین (۵۱۲ µg/ml) (P<۰/۰۰۱) ۱۱ برابر کاهش در MIC وانکومایسین (۳ µg/ml) در مقایسه با زمانی که وانکومایسین تنهاست (۳۲ µg/ml) می شود. سویه V_{40} دارای فنوتایپ VanA در حضور غلظت پروتئین لاکتوفرین (۲۰۴۸ µg/ml) (P<۰/۰۰۱) ۸۵ برابر کاهش در MIC وانکومایسین (۳ µg/ml) در مقایسه با زمانی که وانکومایسین تنهاست (۲۵۶ µg/ml) می شود. برای تعیین MIC از دو روش میکروتیتر پلیت و روش تغییر یافته Etest استفاده شد. (این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و میانگین نتایج در ۳ بار در جدول ذکر گردید).

جدول شماره ۱: میانگین MIC ژن Van A در غلظت های مختلف پروتئین لاکتوفرین

LF	E.test	Microtiter
µg/ml	Mean (SD)	Mean (SD)
۰	۲۵۶ ± ۰	۲۵۶ ± ۰
۲۵۶	۲۰ ± ۳/۴	۲۵۶ ± ۰
۵۱۲	۱۶/۷ ± ۱/۲	۸۵/۳ ± ۳۷
۱۰۲۴	۹/۳ ± ۲/۳	۲۶/۷ ± ۹/۲
۲۰۴۸	۲/۶ ± ۰/۵۸	۱/۲ ± ۰/۶۷

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲: میانگین MIC ژن در Van B در غلظت های مختلف پروتئین لاکتوفرین

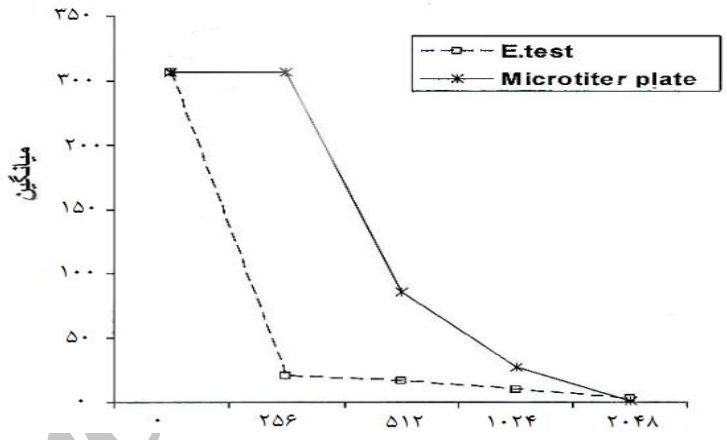
LF µg/ml	E.test Mean (SD)	Microtiter Mean (SD)
۰	۳۲ ± ۰	۶۴ ± ۰
۲۵۶	۱۴/۷ ± ۲/۳	۵۳/۳ ± ۱۸/۵
۵۱۲	۴/۳ ± ۱/۵	۵/۳ ± ۲/۳
۱۰۲۴	۹/۳ ± ۲/۳	۴۲/۷ ± ۱۸/۵
۲۰۴۸	۷/۳ ± ۱/۲	۱۳/۳ ± ۴/۶

بحث:

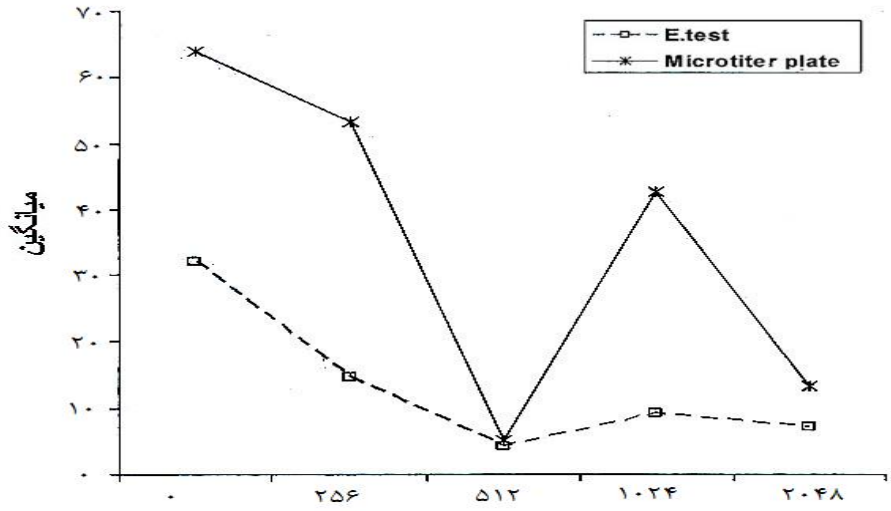
پروتئین لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن است که به عنوان دفاع اولیه سیستم ایمنی بدن در مقابل باکتری، ویروس و انگل به حساب می آید (۷). ما در این مطالعه فعالیت باکتریوسیدال پروتئین لاکتوفرین و تأثیر گذاشتن بر روی مقاومت سویه های VRE را نشان دادیم، در این مطالعه توانایی باکتریوسیدال پروتئین لاکتوفرین از طریق کاهش MIC وانکومایسین سویه های VRE جدا شده بیمارستانی گزارش شده است. ما در این مطالعه برای تعیین MIC قبل و بعد از تأثیر پروتئین لاکتوفرین محدود به آهن مانند پژوهش انجام شده در استرالیا که از روش میکروتیترپلیت استفاده کردیم (۱۱)؛ ولی به دلیل وقت گیر بودن و دقت پایین آن از روش اصلاح شده با وسیله نوارهای تست اپسیلومتر استفاده کردیم. طبق جدول MIC محاسبه شده به وسیله این دو روش متفاوت است (جدول شماره ۱ و ۲). روش میکروتیترپلیت جزء اولین روش های تعیین MIC، باکتری بوده است. این روش خسته کننده، آماده سازی سری رقت از آنتی بیوتیک ها و آماده سازی محلول های آنتی بیوتیکی امکان خطا را به وجود می آورد که این خطا به دلیل آماده سازی دستی سری رقت از آنتی بیوتیک ها است. در روش تست اپسیلومتر که روش حساس و دقیق به ویژه در نمونه های مقاوم به دیسک آنتی بیوتیک می باشد. روش تست اپسیلومتر یک روش جدید برای تعیین حساسیت ضد میکروبی که به طور بالقوه برای تعداد زیادی آنتی بیوتیک ها و میکروارگانیسم وجود دارد. تست اپسیلومتر روش خوبی برای مطالعه باکتری های سخت رشد می باشد و باکتری های بی هوازی را مورد آزمایش قرار می دهد (۱۳،۱۰). MIC تعیین شده توسط تست اپسیلومتر پایین تر از MIC تعیین شده به وسیله روش میکروتیترپلیت می باشد که بیشتر به دلیل محیط است که آنتی بیوتیک در آن قرار می گیرد نوار تست اپسیلومتر روی محیط آگار ولی محیط میکروتیترپلیت روی محیط براث می باشد. در این مطالعه حاضر توانایی پروتئین لاکتوفرین تا حد زیادی به کاهش MIC وانکومایسین سویه های VRE جدا شده از بیمارستان گزارش شده است به طوری که در غلظت (۲۰۴۸ µg/ml) از پروتئین لاکتوفرین محدود به آهن بالاترین تأثیر بر روی MIC وانکومایسین (در مورد سویه $V_{۴۰}$ دارای ژن Van A داشته است، پروتئین لاکتوفرین باعث کاهش ۸۵ برابر MIC نمونه $V_{۴۰}$ شده است؛ اما در مورد سویه $V_{۱}$ دارای ژن Van B در غلظت (۵۱۲ µg/ml) از پروتئین لاکتوفرین محدود به آهن بالاترین تأثیر بر روی MIC وانکومایسین داشته است، پروتئین لاکتوفرین باعث کاهش ۱۱ برابری MIC نمونه $V_{۱}$ شده است که این نتایج با نتایج پژوهش در استرالیا سال ۲۰۰۰ میلادی متفاوت است. گزارش شد که در غلظت (۲۰۴۸ µg/ml) از پروتئین لاکتوفرین محدود به آهن بالاترین تأثیر بر روی MIC وانکومایسین (Van B) نشان داده و باعث کاهش ۸ تا ۱۵ برابر MIC نمونه سویه های VRE استاندارد انتروکوکوس فکالیس (Enterococcus faecalis) و انتروکوکوس فاسیوم (Enterococcus faecium) به ترتیب می شود (۱۲). در پژوهش انجام شده دیگر که در حضور پروتئین لاکتوفرین حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها افزایش می یابد، به طوری

Archive of SID
www.SID.ir

که MIC آنتی بیوتیک های ریفامپین برای باکتری بولخوردریا سپاسیا (burkholderia cepacia) و MIC آنتی بیوتیک داکسی سیکلین برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) در حضور پروتئین لاکتوفرین ۶۴-۳۲ برابر کاهش یافت (۱۳). در پژوهش دیگر مربوط به افزایش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها در حضور پروتئین لاکتوفرین است. به طوری که MIC آنتی بیوتیک های ریفامپین و کلرامفینکل در حضور پروتئین لاکتوفرین ۶۷-۳ برابر کاهش یافت (۱۴). تأثیر پروتئین لاکتوفرین بر روی کاهش MIC آنتی بیوتیک های داکسی سیکلین وریفامپین (۱۳) و آنتی بیوتیک های ریفامپین و کلرامفینکل (۱۴) مانند تأثیر پروتئین لاکتوفرین بر روی کاهش MIC آنتی بیوتیک وانکومایسین در این مطالعه می باشد. مقایسه میزان تأثیر پروتئین لاکتوفرین بر روی MIC وانکومایسین در این مطالعه و مطالعات ذکر شده به خوبی نشان می دهد که رابطه معنی داری میان افزایش غلظت پروتئین لاکتوفرین و کاهش میزان MIC وانکومایسین وجود دارد. مکانیسم تأثیر پروتئین لاکتوفرین بر روی MIC وانکومایسین به این صورت است که لاکتوفرین به دلیل خاصیت کاتیونیک خود به قسمت آنیونیک روی تیکوئیک اسیدهای انتروکوک ها متصل می شود، جایی که اتولیزین ها و D- آلانین ها به طور معمول برای متصل شدن به این جایگاه با یکدیگر رقابت می کنند.



تصویر شماره ۱: نمودار میانگین MIC ژن Van A در غلظت های مختلف پروتئین لاکتوفرین با دو روش



تصویر شماره ۲: میانگین MIC ژن Van B در غلظت های مختلف پروتئین لاکتوفرین با دو روش

www.SID.ir

نتیجه گیری:

سویه های VRE به دلیل پخش سریع آن، همراه بودن 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 بیماریزا تر و شایع تر مانند استافیلوکوک اورئوس آن به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل شده است (۳-۱). مطالعه حاضر با تمرکز بر روی سویه های VRE و با تأثیر پروتئین لاکتوفرین بر روی سویه های VRE دارای ژن های Van A و Van B باعث کاهش MIC وانکومایسین و از بین بردن مقاومت شده و راهکاری برای این مشکل ارائه داده است. غلظت های متفاوت پروتئین لاکتوفرین در شرایط آزمایشگاهی باعث کاهش مقاومت در سویه های VRE دارای ژن Van A و Van B می شود، پیشنهاد پتانسیل استفاده از این پروتئین به عنوان یک عامل کمکی به وانکومایسین وجود دارد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی با کد تصویبی ۲۹۰۲۶۱ در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۸ در مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و همچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می باشد؛ لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل پشتیبانی مالی و نیز جناب آقای دکتر پویا پارسایی که ما را در این پژوهش یاری کرده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع:

1. Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. Emerg Infect Dis. 2004; 10(7): 1277-81.
2. Lee SC, Wu MS, Shih HJ, Huang SH, Chiou MJ, See LC, et al. Identification of vancomycin-resistant enterococci clones and inter-hospital spread during an outbreak in Taiwan. BMC Infect Dis. 2013; 13: 163.
3. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Naghili B, Aghazadeh M, Milani M, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. Adv Pharm Bull. 2013; 3(1): 197-201.
4. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. Curr Opin Microbiol. 2013; 16(1): 10-6.
5. Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator. Curr Pharm Des. 2009; 15(17): 1956-73.
6. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. Infect Immun. 1980; 28(3): 893-8.
7. 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): 61-9.
8. Leitch EC, Willcox MD. Synergistic antistaphylococcal properties oflactoferrin and lysozyme. J Med Microbiol. 1998; 47(9): 837-42.
9. Wikler MA, Matthew A. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. 2003.
10. Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin-induced reduction of vanB vancomycin resistance in enterococci. Int J Antimicrob Agents. 2001; 18(4): 399-402.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Gold HS. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. Clin Infect Dis. 2001; 33(2): 210-9.
12. Jorgensen JH, Crawford SA, Kelly CC, Patterson JE. In vitro activity of daptomycin against vancomycin-resistant enterococci of various Van types and comparison of susceptibility testing methods. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(12): 3760-3.
13. Alkawash M, Head M, Alshami I, Soothill JS. The effect of human lactoferrin on the MICs of doxycycline and rifampicin for Burkholderia cepacia and Pseudomonas aeruginosa strains. J Antimicrob Chemother. 1999; 44(3): 385-7.
14. Fowler CE, Soothill JS, Oakes L. MICs of rifampicin and chloramphenicol for mucoid Pseudomonas aeruginosa strains are lower when human lactoferrin is present. J Antimicrob Chemother. 1997; 40(6): 877-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016 Feb, Mar; 17(6): 45-52. ***Original article***

Reduction of vancomycin resistant in Van A and Van B containing Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) isolates in presence of Lactoferrin protein

Khorvash F[1], Nikooei M[2], Meidani M[3*] Shokri D[4], Zolfaghari M[2]
[1]Nosocomial Infection Research Center., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [2]Microbiology Dept., Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. Iran; [3]Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [4]Student, Nosocomial Infection Research Center., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan I.R. Iran.
Received: 1/Feb/2015 Accepted: 17/Aug/2015

Background and aims: The protein Lactoferrin (LF) has the confirmed antimicrobic effects. The aim of this research was to investigate the effect of LF on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of vancomycin for van A and van B resistant isolates of enterococcus.
Methods: In this cross sectional study, after isolating and identifying 265 strains of enterococci from clinical specimens, The MIC test by using E-test method was performed for the vancomycin resistance enterococci specimens with the vancomycin and teicoplanin antibiotics**.** To study the presence of van A and van B genes in vancomycin resistant Enterococcus was used Real time PCR method. Then, the effect of Lactoferrin on the MIC of VRE isolates was assessed and analyzed using SPSS software and linear regression and Pearson correlation test with significance level $P<0.05$.
Results: Van A isolate at (2048 µg/ml) concentration of LF showed 85 and 80 fold reduced the MIC of vancomycin in modified E-test and Microtiter methods respectively and in van B isolate at the concentration of (512 µg/ml) of LF 10 and 10.3 fold reduced the MIC of vancomycin in modified E-test and broth Microtiter methods, respectively. Lactoferrin index showed a significant positive correlation with reduced vancomycin MIC ($P<0.001$ and $r= 0.183$).
Conclusion: Different concentrations of Lactoferrin protein induced reduction in VRE isolates contained van A and van B genes in vivo concentrations suggest a potential use for this protein as an adjunctive agent to vancomycin.

Keywords: **Vancomycin resistant enterococcus, Minimum inhibitory concentration, Lactoferrin protein, Vancomycin resistant genes.**

Cite this article as: Khorvash F, Nikooei M, Meidani M, Shokri D, Zolfaghari M. Reduction of vancomycin resistant in Van A and Van B containing Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) isolates in presence of Lactoferrin protein. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(6): 45-52.

[*]**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