

ارزیابی مولکولی ژن‌های *van B* و *van A* در جدایه‌های انتروکوکی بیمارستانی مقاوم به ونکومايسين و تیکوپلانیین

دکتر شهرام شهرکی^۱، سیدمرتضی ربیع نژاد موسوی*^۲، بهرام دهمرده^۳، محمد آتشگه^۴

۱- استادیار، گروه میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲- کارشناسی ارشد میکروپزشناسی، گروه میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۳- کارشناس میکروپزشناسی، گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. ۴- کارشناس زیست شناسی، گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوک‌ها باکتری‌های گرم مثبتی هستند که در دستگاه گوارش انسان یافت می‌شوند. عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سبب افزایش اهمیت انتروکوک‌ها شده است. این مطالعه به منظور ارزیابی مولکولی ژن‌های *van B* و *van A* در جدایه‌های انتروکوکی بیمارستانی مقاوم به ونکومايسين و تیکوپلانیین با استفاده از روش مولکولی PCR انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی ۱۱۳ جدایه از بخش‌های مختلف بیمارستان علی‌بن ابی‌طالب (ع) شهرستان زاهدان به تفکیک جنس و گونه از لحاظ ویژگی‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی بررسی شدند. آزمون آنتی‌بیوگرام برای سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام گردید. بررسی حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimum Inhibitory of Concentration: MIC) به روش E-test انجام شد. سپس بررسی مولکولی ژن‌های *van B* و *van A* با استفاده از روش PCR انجام شد. **یافته‌ها:** جدایه‌ها از نمونه‌های ادراری، کشت خون و ترشحات ریوی به ترتیب با مقادیر ۹۲ درصد، ۶/۲ درصد و ۱/۸ درصد به دست آمدند. این مطالعه نشان داد گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم بیشترین مقاومت را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين و تیکوپلانیین داشته و ژن *van A* در تمامی این نمونه‌ها جدا شد و ژن *van B* در همگی غایب بود. **نتیجه‌گیری:** فراوانی انتروکوکوس فکالیس به مراتب بالاتر از گونه‌های دیگر بود؛ اما مقاومت گلیکوپپتیدی در انتروکوکوس فاسیوم سهم بیشتری داشت.

کلید واژه‌ها: انتروکوک، ونکومايسين، تیکوپلانیین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن *van A*، ژن *van B*

* نویسنده مسؤول: سیدمرتضی ربیع نژاد موسوی، پست الکترونیکی mortzamoosavy7@gmail.com

نشانی: زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروپزشناسی، تلفن و نمابر ۰۵۴-۳۳۲۲۹۷۹۲

وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۳/۱۷، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۹

مقدمه

عفونت‌های حاصله به واسطه انتروکوک‌ها را می‌توان مرتبط با مجاری ادراری در نظر گرفت که به سیستیت، اپیدیمیدیت، پریتونیت و همچنین به سایر بیماری‌ها از جمله باکتری می و اندوکاردیت اشاره کرد (۴). انتروکوک‌ها واجد مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی متعددی هستند و همچنین با داشتن عوامل متحرک ژنتیکی، توانایی کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی را پیدا می‌کنند که این موضوع باعث اهمیت بیشتر آنها می‌شود (۵). انتروکوکوس فکالیس نیز بسیار شایع؛ اما انتروکوکوس فاسیوم بیشتر، مقاومت ونکومايسين را نشان داده و می‌تواند به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه از دستگاه ادراری بیماران جدا گردد که حائز اهمیت است (۸-۶). مقاومت به ونکومايسين در مجموعه ژن‌های *van* کد می‌شود و

انتروکوک‌ها از جمله باکتری‌های گرم مثبت هستند که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و همچنین در آب و خاک یافت می‌شوند. در طول دهه گذشته بیماری‌های گوناگون عفونی ناشی از سویه‌های انتروکوک مقاوم به چند دارو به ویژه ونکومايسين در سرتاسر دنیا گزارش شده است (۱ و ۲). در بین جدایه‌های انتروکوکی، عمدتاً انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم به عنوان ارگانیزم‌های با اهمیت بیمارستانی در سرتاسر دنیا شناسایی شده‌اند. در حال حاضر رایج‌ترین پاتوژن گرم مثبت ایزوله شده از بیماران در ایالات متحده و چندین کشور اروپایی محسوب می‌شود (۳).

بودن می‌شود؛ انجام گردید. رشد بر روی برات حاوی ۶/۵ درصد نمک در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً بررسی هیدرولیز پیرولیدونیل آریل آمیداز (به شکل نوار، شرکت Mast انگلستان) انجام شد. به منظور تفریق و جداسازی گونه‌های مختلف انتروکوک‌ها به بررسی مصرف آمینواسید آرژنین، تخمیر قندهایی همچون مانیتول، سوربیتول، آرابینوز، رافینوز، ساکارز و لاکتوز، بررسی رشد بر روی محیط اسکیم میلک (skim milk) حاوی ۰/۱ درصد متیلن بلو و نیز مشاهده رشد باکتری بر روی محیط حاوی ۰/۴ درصد ماده محدود کننده تلوریت پتاسیم انجام گردید (۱۱).

آنتی بیوگرام: پس از تفکیک و بررسی کامل گونه‌های جدا شده، با توجه به دیسک آنتی‌بیوتیکی به بررسی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی پرداخته شد. دیسک‌ها شامل ونکوماکسین، تیکوپلانتین، نیتروفوران‌توین، کوئین دالفوپریستین، لاینزولید، فسفوماکسین، کلرامفنیکل، سیروفلوکساسین، جنتامایسین با دوز بالا (۱۲۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، استریتوماکسین، تتراسایکلین، اریتروماکسین، کلرامفنیکل، ایمپینم و پیراسیلین بود. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت Mast انگلستان تهیه شد. صول انجام کار بر طبق استاندارد جهانی CLSI و به روش انتشار دیسک در جهت بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود (۱۲).

در این روش (Kirby-baur)، با تهیه سوسپانسیونی از کلنی باکتری در لوله‌های حاوی آب مقطر پس از مقایسه کدورت آن با کدورت محلول نیم مک فارلند، سوپ استریل را در سوسپانسیون مربوطه آغشته کرده و بر روی محیط مولر هیتتون آگار (Merck آلمان) به صورت کشت سفره‌ای کاملاً بر روی محیط پخش کرده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را بر روی آن قرار دادیم. در نهایت پس از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimum Inhibitory of Concentration: MIC) باکتری تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری: برای تعیین MIC از نوارهای E-Test (تهیه شده از شرکت Liofilchem ایتالیا)، آنتی‌بیوتیک ونکوماکسین و تیکوپلانتین استفاده شد. بر مبنای دستورالعمل CLSI، $\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g/ml}$ به عنوان مقاوم، $8-16 \mu\text{g/ml}$ به عنوان نیمه‌حساس و $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ به عنوان حساس در نظر گرفته شد.

بدین ترتیب همانند روش دیسک دیفیوژن سوسپانسیونی تهیه شده و کدورت آن را برابر با نیم مک فارلند قرار داده و بر روی

می‌تواند به انواع ژنوتیپ مختلف *vanA*، *vanB1*، *vanB2*، *vanB3* و *vanC1* و *vanC2/C3* تقسیم شوند (۸). ژنوتیپ‌های مقاوم به ونکوماکسین در انتروکوک‌ها شامل *vanA* و *vanB* است که دارای بالاترین اهمیت پزشکی هستند. سویه‌های مقاوم به ونکوماکسین و تیکوپلانتین ژنوتیپ *vanA* را نشان می‌دهند. در حالی که سویه‌های حساس به تیکوپلانتین و مقاوم به ونکوماکسین ژنوتیپ *vanB* را نیز نشان می‌دهند. ترانسپوزون Tn1546 از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی است که ژن مقاومتی *vanA* را حمل می‌کند. در حالی که ترانسپوزون‌های Tn1547-Tn1549 ژن مقاومتی *vanB* را حمل می‌کنند که هر کدام ممکن است بر روی پلاسمید یا بر روی کروموزوم یافت شوند (۲).

ژن *vanC* در مورد دو سویه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم گزارش نشده است؛ اما در سویه‌های دیگر انتروکوک‌ها یافت شده‌اند که می‌توان به انتروکوکوس گالیناروم اشاره کرد و تسهیل در شناسایی آنها می‌گردد (۹). *vanD* واجد شاخصه‌هایی با مقاومت در سطح متوسطی به ونکوماکسین و سطح پایینی به تیکوپلانتین است. ژن‌های *vanD* بر روی کروموزوم قرار گرفته‌اند و قابل انتقال به دیگر انتروکوک‌ها نیستند. این می‌تواند توضیحی برای سویه‌های *vanD* کمیاب شناسایی شده که برخلاف گسترش شیوع بالای سویه‌های *vanA* و *vanB* باشد (۱۰).

با توجه به شواهد موجود از اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوطه در باکتری‌ها به ویژه مقاومت به ونکوماکسین و تیکوپلانتین در جدایه‌های انتروکوک‌ها، این مطالعه به منظور ارزیابی مولکولی PCR ژن‌های *vanA* و *vanB* در جدایه‌های انتروکوک‌ها بیمارستانی مقاوم به ونکوماکسین و تیکوپلانتین انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی نمونه‌گیری در بیمارستان علی‌بن ابی‌طالب (ع) به مجموع ۱۱۳ جدایه در بخش‌های مختلف مراقبت‌های ویژه، نفرولوژی، پیوند، گوارش، اطفال و اعصاب در شهر زاهدان به فاصله زمانی حدوداً یک سال (مهر ماه سال ۱۳۹۳ لغایت آذر ماه سال ۱۳۹۴) از بیماران عفونی انجام و همه نمونه‌ها به آزمایشگاه بیمارستان منتقل شدند.

تشخیص فنوتیپی: در ابتدا بر روی آگار خون‌دار مورفولوژی کلنی مشابه با کلنی‌های انتروکوک‌ها و همولیز ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. سپس تست کاتالاز، کشت بر روی بایل اسکولین که موجب سیاه یا قهوه‌ای نمودن محیط در هنگام مثبت

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی

نام ژن	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	محصول PCR	دمای Annealing (سانتی‌گراد)	منبع
VanA	5-GGG-AAA-ACG-ACA-ATT-GC-3	۷۳۲	۵۴	۱۴ و ۱۳
	5-GTA-CAA-TGC-GGC-CGT-TA-3			
VanB	5-ATG-GGA-AGC-CGA-TAG-TC-3	۶۳۵	۵۴	۱۴ و ۱۳
	5-GAT-TTC-GTT-CTT-CGA-CC-3			

تشخيص داده شدند؛ انجام شد. جدول ۲ نیز درصد مقاومت آنتی بیوتیکی، آنتی بیوتیک های مختلف در مجموع چهار گونه شناسایی شده را مشخص می کند.

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیک های مختلف انتروکوک های جدا شده

درصد	دارو
۱۸/۶	ونکومايسين
۱۷/۷	تیکوپلانتين
۳۷/۲	ایمپینم
۱۱/۵	لینزولید
۸	کوئین-دالفوپریستین
۱۵	نیتروفورانتوئین
۱۶/۸	پیراسیلین
۴۳/۴	جنتامایسین ۱۰ میکروگرم
۲۰/۴	جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم
۳۱/۹	سیپروفلوکساسین
۶/۲	فسفومايسين
۷۷	اریترومايسين
۷۱/۷	تراسایکلین
۷۷/۹	استریتومايسين
۱۵/۹	کلرامفنیکل

در مجموع ۱۱۳ ایزوله جدا شده ۱۸/۶ درصد (۲۱ ایزوله) به ونکومايسين مقاوم بودند و ۲۸/۳ درصد (۳۲ ایزوله) حساسیت حدودی داشتند. مقاومت نسبت به تیکوپلانتين ۱۷/۷ درصد (۲۰ ایزوله) بود. سایر آنتی بیوتیک ها با صرف نظر از تنوع گونه های حاصله، فراوانی فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی شامل نیتروفورانتوئین (۱۵ درصد)، پیراسیلین (۱۶/۸ درصد)، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (۴۳/۴ درصد)، جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم (۲۰/۴ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۱/۹ درصد)، فسفومايسين (۶/۲ درصد)، تراسایکلین (۷۱/۷ درصد)، اریترومايسين (۷۷ درصد)، استریتومايسين (۷۷/۹ درصد) و کلرامفنیکل (۱۵/۹ درصد) ایجاد کردند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بررسی شده بیانگر حضور مقاومت به ونکومايسين و تیکوپلانتين تنها در دو گونه انتروکوکوس فکالیس (ونکومايسين: ۶ ایزوله و تیکوپلانتين: ۱۵ ایزوله) و انتروکوکوس فاسیوم (ونکومايسين: ۱۵ ایزوله و تیکوپلانتين: ۱۵ ایزوله) از مجموع چهار گونه را نمایان می سازد. گونه هایی که مقاومت به ونکومايسين و تیکوپلانتين در آنها به طریق انتشار دیسک مسجل گردید؛ میزان MIC در آنها بررسی شد. به عبارتی دیگر ۲۰ ایزوله هم به ونکومايسين و هم به تیکوپلانتين

محیط مولر هیتون آگار کشت سفره ای دادیم. پس از آن نوار را بر روی محیط قرار داده و در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگه داشتیم. پس از آن میزان هاله عدم رشد باکتری بررسی شد. سویه استاندارد مناسب Enterococcus faecalis ATCC 29212 در جهت تشخیص فنوتیپی، آنتی بیوگرام و بررسی MIC نیز استفاده شد. استخراج DNA طبق پروتکل کیست Qiagen (mericon DNA Bacteria Plus Kit) انجام شد. سپس نمونه های استخراج شده مورد بررسی اسپکتروفتومتری قرار گرفت. سپس نسبت OD260 به OD280 را ارزیابی کرده و در صورت میزان جذب نوری بین ۱/۶ تا ۱/۸، نشانه کیفیت مطلوب از استخراج DNA بود.

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول یک) انجام شد. پس از آن ژل یک درصدی آگاروز و بافر TBE (تریس بوریک اسید-EDTA) برای الکتروفورز مهیا شد. از مارکر ۱۵۰۰ جفت بازی (SM0321 GeneRuler. 100 bp Plus DNA Ladder fermentas) - شرکت ژن فناوری استفاده شد. برای کنترل کیفی از سویه استاندارد Enterococcus faecium ATCC 51559 استفاده گردید.

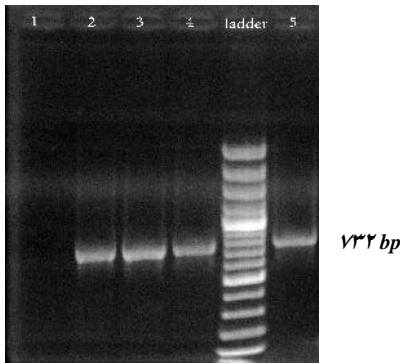
یافته ها

جدایه ها از نمونه های ادراری، کشت خون و ترشحات ریوی به ترتیب با مقادیر ۹۲ درصد (۱۰۴ جدایه)، ۶/۲ درصد (۷ نمونه) و ۱/۸ درصد (۲ نمونه) به دست آمدند. فراوان ترین گونه مختص به انتروکوکوس فکالیس (۷۴ درصد) و در مراتب پایین تر انتروکوکوس فاسیوم (۱۶/۸ درصد)، انتروکوکوس گالیناروم (۸ درصد) و انتروکوکوس رافینوسوس (یک درصد) بود. از لحاظ جنسیت ۳۸/۱ درصد (۴۳ ایزوله) از مردان و ۶۱/۹ درصد (۷۰ ایزوله) از زنان نمونه گیری به عمل آمده است. نمونه گیری از بیماران در بخش های مختلف بیمارستانی شامل بخش های مختلف داخلی (۲۹/۴ درصد)، کودکان (۲۸/۳ درصد)، ICU (۱۵ درصد)، CCU (۴/۴ درصد)، بخش پیوند (۵/۳ درصد)، نفرولوژی (۳/۵ درصد)، بخش جراحی (۲/۷ درصد) و از بیماران سرپایی (۱۳/۳ درصد) بود. پس از یافتن و جداسازی گونه های انتروکوکوی، نخست آزمون آنتی بیوگرام در مجموع چهار گونه ای که به روش های بیوشیمیایی

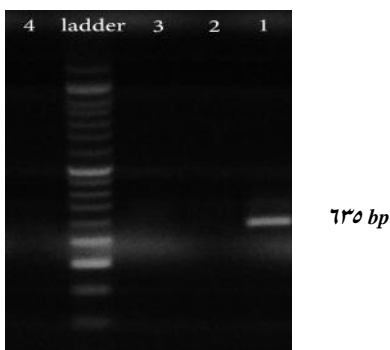
جدول ۳: ارزیابی حداقل غلظت بازدارندگی رشد ونکومايسين و تیکوپلانتين سویه های مقاوم

حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)		۲۵۶	۱۹۲	۱۲۸	۹۶	۶۴	۴۸	۳۲	۲۴	۱۶	۱۲	۸	۶	۴	۲	۱/۵	
ونکومايسين (-g/ml)	انتروکوکوس فکالیس	۶	-	-	-	-	-	-	-	۱۱	۴	۱۲	۳	۱۶	۸	۲۳	
	انتروکوکوس فاسیوم	۱۵	-	-	-	-	-	-	-	۲	-	-	۱	-	۱		
تیکوپلانتين (-g/ml)	انتروکوکوس فکالیس	۴	-	-	۱	-	-	-	-	۵	۱	۲۵	۱۶	۸	۲۳		
	انتروکوکوس فاسیوم	۱۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۴		

دو گونه Enterococcus raffinosus و Enterococcus gallinarum هیچ گونه مقاومتی نشان ندادند.



شکل ۱: ستون ۱) *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (کنترل منفی); ستون ۲) *Enterococcus faecium* ATCC51559 (مثبت); ستون‌های ۳ و ۴ و ۵) نمونه مثبت از لحاظ حضور ژن *vanA* (Ladder) مارکر با فواصل ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۲: ستون ۱) نمونه کنترل مثبت حضور ژن *van B* *Enterococcus faecium* ATCC51559 (Ladder) مارکر با فواصل ۱۰۰ جفت باز ستون‌های ۲ و ۳ و ۴) نمونه منفی از لحاظ حضور *van B*

بحث

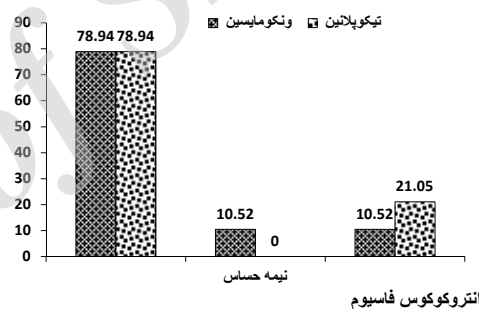
با توجه به نتایج مطالعه حاضر بیشتر جدایه‌ها از نمونه‌های ادراری به دست آمد. ۱۸/۶ درصد به ونکومایسین و ۱۷/۷ درصد به تیکوپلانتین مقاوم بودند و همگی آنها در دو گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* مشاهده شد. در تمامی نمونه‌های مقاوم ژن *vanA* حضور داشت.

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکلی بزرگی در درمان بیماران ایجاد کرده است و در پی آن مقاومت گلیکوپپتیدی *انتروکوکوک‌ها* ویژگی مشخص شده برای آنها است که موجب نگرانی در جهت درمان عفونت‌های مرتبط با آنها می‌گردد. همچنین جزء سومین عامل عفونت بیمارستانی هستند که ایجاد باکتری در بیماران می‌کنند. بر همین اساس طبق گزارشات NNIS (سازمان نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی ایالات متحده) در یک دوره ۵ ساله از بین سال‌های ۱۹۹۸ لغایت ۲۰۰۳ افزایش مقاومت ۱۲ درصدی در گونه‌های *انتروکوک* کی‌علی‌الخصوص گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* مشاهده شد (۱۳ و ۱۴). در مطالعه کوهورت یونان پس از جداسازی دو گونه با اهمیت بیمارستانی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی و

مقاومت داشتند و یک مورد تنها به ونکومایسین مقاومت نشان داد و این نتیجه با آزمون انتشار دیسک کاملاً همخوانی داشت (جدول ۳). تفاوت الگوی مقاومت گلیکوپپتیدی نسبت به دو گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.



نمودار ۱: نسبت فراوانی مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانتین در گونه *انتروکوکوس فکالیس*



نمودار ۲: نسبت فراوانی مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانتین در گونه *انتروکوکوس فاسیوم*

در بررسی ژنوتیپی پس از الکتروفورز در مجموع ۱۱۳ ایزوله جدا شده ۱۷/۶۹ درصد از نمونه جمع‌آوری شده فراوانی ایزوله‌های مقاوم را تشکیل دادند و تمامی سویه‌های مقاوم واجد ژن *vanA* بود و ژن *vanB* در همگی غایب بود. میزان حضور ژن *vanA* در دو گونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* در مجموع ۱۱۳ نمونه به ترتیب ۴/۴۲ درصد و ۱۳/۲۷ درصد بود. با این وجود در تمامی موارد حضور ژن *vanA* در سویه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی (انتشار دیسک و MIC) مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانتین را نشان دادند؛ مثبت بود. فقط یک مورد از گونه *انتروکوکوس فکالیس* که از لحاظ فنوتیپی تنها به ونکومایسین مقاوم بود؛ فاقد ژن‌های *vanA* و *vanB* بود.

شکل‌های ۱ و ۲ نشان‌دهنده شواهد موجود در حضور و عدم حضور ژن‌های *vanA* و *vanB* است که پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد به دست آمد.

۲۱۲۳ جدایه انتروکوکوی ردیابی شد. ۷۰/۶ درصد (۱۴۹۸ نمونه) انتروکوکوس فکالیس و ۲۹/۴ درصد (۶۲۵ نمونه) انتروکوکوس فاسیوم جدا گردید. میزان شیوع ابتلا بیماران در گونه انتروکوکوس فکالیس نیز بیشتر مشاهده شد (۱۵) که از این جهت مشابه با مطالعه حاضر و همسو است. پس از آن مقاومت گلیکوپپتیدی طی شش سال از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی (*vanB*, *vanA* و *vanC1/C2*) بررسی شد و به ترتیب ونکومايسين ۹/۶-۰/۵ درصد و تیکوپلانتين ۸/۲-۰/۱ درصد بود (۱۵)؛ در حالی که نتیجه آن با مطالعه حاضر متفاوت بود. به طوری که مقاومت به ونکومايسين و تیکوپلانتين به میزان بالاتری ارزیابی شد.

انتروکوکوک ها علاوه بر گلیکوپپتیدها نسبت به سایر آنتی بیوتیک های مختلف مقاومت وسیعی نشان می دهند. از جمله این موارد می توان به بتالاکتام ها و آمینوگلیکوزیدها اشاره کرد. در مطالعه کوهورت تایوان مقاومت آنتی بیوتیکی با سطح بالا آمینوگلیکوزیدها (جتنامايسين و استرپتومايسين) ارزیابی شد (۱۶). آمینوگلیکوزیدها به علت خصوصیت سینتزیسمی که در اثر ترکیب شدن آنها با یک عامل مهار کننده دیواره سلولی همچون بتالاکتام ها و گلیکوپپتیدها دارند؛ در مواردی که عفونت تهدید کننده ای از گونه های انتروکوک کی سبب شود؛ برای مقابله با پیشرفت عفونت برای بیمار عرضه می گردد (۱۷). در مطالعه حاضر حضور مقاومت به آنتی بیوتیک های دیگر به خصوص آمینوگلیکوزیدها بیانگر افزایش شیوع سویه های مقاوم چنددارویی و پیدایش آن در گونه های مختلف انتروکوک ها است. در مطالعه انجام شده در هندوستان به ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت گلیکوپپتیدی (ونکومايسين و تیکوپلانتين) پرداخته شد و از ۳۶۷ جدایه بالینی ۸/۷ درصد آنها به ونکومايسين مقاوم بودند (۴) و همانند مطالعه حاضر در سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم تنها ژن *vanA* یافت شد. اگرچه حضور *vanA* در تمامی نمونه ها همسو با مطالعه حاضر است؛ اما ارقام آماری متفاوتی را به میزان پایین تری نشان داد (۴).

در مطالعه حسینی زاده و همکاران در بیمارستان های آموزشی اراک از بین ۱۵۰ نمونه جدا شده ۱۴/۶ درصد سویه های انتروکوکوی به ونکومايسين و ۵/۳ درصد به تیکوپلانتين مقاوم بودند (۱۸). نسبت اختلاف مقاومت به ونکومايسين در مطالعه حاضر با مطالعه فوق (۱۸) افزایش ۳ درصدی بود. در مطالعه شکوهی زاده و همکاران در چهار بیمارستان (بخش مراقبت های ویژه) تهران، تنها سویه های مقاوم انتروکوکوس فاسیوم جدا شدند و در تمامی موارد ژن *vanA* حضور داشت (۱۹). حضور این ژن از این نظر با مطالعه حاضر مشابه بود. در مطالعه نقی پور و همکاران در بیمارستان های شهر گنبد و گرگان از بین ۱۲۸ نمونه مشکوک انتروکوک کی جمع آوری شده تنها

یک نمونه مقاوم به ونکومايسين به روش انتشار دیسک جدا گردید (۲۰) که برخلاف نتایج مطالعه حاضر است. در مطالعات مذکور شاهد افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و شیوع گونه های با اهمیت بیمارستانی انتروکوک ها بودیم و در مطالعه حاضر (۱۸/۶ درصد مقاومت به ونکومايسين و ۱۷/۷ درصد مقاومت به تیکوپلانتين به شکل فنوتیپی) ۱۷/۶۹ درصد به شکل ژنوتیپی مقاومت به گلیکوپپتیدها دیده شد که در مقایسه با فراوانی مطالعات بیان شده (در ایران و سایر کشورها) (۱۷-۱۳)؛ مواجه با یک میزان بسیار بالا است که روندی صعودی را در یک دوره زمانی چندساله پیش بینی می کند و هشدار برای افزایش این روند در سال های متمادی است. در نهایت شکست درمان را در هنگام روبرو شدن با عفونت های مرتبط از جمله عفونت های بیمارستانی به خصوص در بخش های مراقبت های ویژه را ایجاد می نماید (۲۱). لازم به ذکر است حضور ژن *vanA* در نمونه های مقاوم یافت شده و غیبت ژن *vanB* دلالت بر افزایش شیوع *vanA* در این منطقه است که با سایر مطالعات (۱۹ و ۴) همسو بود؛ در حالی که میزان فراوانی مقاومت بالاتر بود. در این مطالعه سویه های مقاوم اغلب انتروکوکوس فاسیوم و میزان پراکندگی و حساسیت به ونکومايسين و تیکوپلانتين در انتروکوکوس فکالیس نیز بالاتر بوده است. فقر بهداشتی، مصرف بیش از حد مجاز آنتی بیوتیک ها در این منطقه عواملی در شیوع این افزایش است. همچنین به عنوان یک هشدار طی چندسال پیشرو در جهت افزایش این روند در این منطقه اعلام می گردد که متعاقباً نیازمند یک استراتژی مناسب و ضروری در راستای درمان برای بیماران مختلف بستری در بیمارستان است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی انتروکوکوس فکالیس به مراتب بالاتر از گونه های دیگر است؛ اما مقاومت گلیکوپپتیدی در انتروکوکوس فاسیوم سهم بیشتری را در برداشت. تجویز و یا مصرف بی رویه آنتی بیوتیکی می تواند در شکست درمان و پیامد آن عدم بهبود بیماران نقش داشته باشد. انتخاب آنتی بیوتیک مناسب بسیار حائز اهمیت است و ایجاد یک برنامه درمانی برای بیماران در برابر جلوگیری از روند افزایشی مقاومت آنتی بیوتیکی در بین جدایه های بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه (شماره ک/ ۱۰۷) آقای سیدمرتضی ربیع نژاد موسوی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان بود. بدین وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان علی بن ابی طالب (ع) به خاطر همکاری در نمونه گیری از بیماران سپاسگزاری می گردد.

References

- Hammad AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Microbiol.* 2014 Apr; 38: 62-6. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.010
- Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Aghazadeh M, et al. Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients of North west of Iran. *Open Microbiol J.* 2012; 6:34-9. doi: 10.2174/1874285801206010034
- Sun H, Wang H, Xu Y, Jones RN, Costello AJ, Liu Y, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Dec; 74(4): 399-403. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.006
- Praharaj I, Sujatha S, Parija SC. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens. *Indian J Med Res.* 2013 Oct; 138(4): 549-56.
- Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* 2012 Jun; 156(3): 222-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.026
- Javadi AB, Ataei B, Khorvash F, Toghyani S, Mobasherzadeh S, Soghrati M. Prevalence of Vancomycin Resistant *Enterococci* colonization in gastrointestinal tract of hospitalized patients. *Iran J of Clin Infect Dis.* 2008; 3(3): 137-41.
- Hasibi M, Rezaei J, Mohajer Iravani B, Moslemi B, Rahimi HM, Taghavi SM, et al. Hospital-Acquired Vancomycin-Resistant *Enterococci*. A Report of 2-year Experience. *Acta Medica Iranica.* 2009; 47(6): 469-72.
- Al-Tonbary YA, Soliman OE, Sarhan MM, Hegazi MA, El-Ashry RA, El-Sharkawy AA, et al. Nosocomial infections and fever of unknown origin in pediatric hematology/oncology unit: a retrospective annual study. *World J Pediatr.* 2011 Feb; 7(1): 60-4. doi: 10.1007/s12519-010-0212-1
- Gurtler V, Grando D, Mayall BC, Wang J, Ghaly-Derias S. A novel method for simultaneous *Enterococcus* species identification/typing and van genotyping by high resolution melt analysis. *J Microbiol Methods.* 2012 Sep; 90(3): 167-81. doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.002
- de Moura TM, Vaz Cassenego AP, Campos FS, Leal Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA, et al. Detection of vanC1 gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Jun; 108(4): 453-56. doi: 10.1590/0074-0276108042013009
- Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov; 54(11): 4643-7. doi: 10.1128/AAC.01710-09
- Forbes BA SD, Weissfeld A. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* Virginia: Elsevier Health Sciences. 11st ed. 2002; pp: 236-40.
- National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004 Dec; 32(8): 470-85.
- Comerlato CB, Resende MC, Caierão J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Aug; 108(5): 590-5.
- Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S, Pitiriga V, Sofianou D, Tsakris A. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect.* 2010 Jul; 75(3): 225-7. doi: 10.1016/j.jhin.2009.12.007
- Wang JT, Chang SC, Wang HY, Chen PC, Shiau YR, Lauderdale TL. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr; 75(4): 406-11. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.004
- Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect.* 2001 Apr; 126(2): 197-204.
- Hoseinizadeh A, Abtahi H, Shojapour M, Akbari M, Nazari R, Sofian M. [Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of vancomycin resistant enterococci isolated from clinical sample of educational hospitals in Arak]. *J Arak Univ Med Sci.* 2012; 15(6): 11-16. [Article in Persian]
- Shokoohi Zade L, Mohabbati Mobarez A, Alebooye M, Ranjbar R, Zali MR. [Antibiotic Resistance Patterns of *E. Faecium* and *E. Faecalis* Strains Isolated from ICUs]. *Medical Laboratory Journal.* 2015; 8(4): 34-41. [Article in Persian]
- Naghipoor E, Raefi A, Nasrollahi Omran A. [Resistance Pattern of *Enterococci* Isolated from Nosocomial Infections in the Hospitals Located in Gonbad and Gorgan Cities]. *Medical Laboratory Journal.* 2015; 8(4): 61-5.
- Biendo M, Adjide C, Castelain S, Belmekki M, Rousseau F, Slama M, et al. Molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitals of the picardy region (France). *Int J Microbiol.* 2010; 2010: 150464. doi: 10.1155/2010/150464

Original Paper

Molecular evaluation of *vanA* and *vanB* genes of enterococci isolates resistant to Vancomycin and Teicoplanin

Shahraki Sh (Ph.D)¹, Rabi Nezhad Mousavi M (M.Sc)^{*2}
Dahmarde B (B.Sc)³, Atashgah M (B.Sc)⁴

¹Assistant Professor, Department of Microbiology, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. ²M.Sc in Microbiology, Department of Microbiology, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. ³B.Sc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran. ⁴B.Sc in Biology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Enterococci is gram positive bacteria which is the inhabitants of gastrointestinal tract. Hospital infections and antibiotic resistance to enterococci is increased. This study was done to determine the molecular evaluation of *vanA* and *vanB* genes of enterococci isolates resistant to Vancomycin and Teicoplanin.

Methods: In this descriptive study, 113 isolates samples were collected and identified according to biochemical test and cultural characteristics in Ali ibn Abi Talib hospital in Zahedan, Iran. Antibiogram test was done to determine antibiotic resistance pattern. E-test strip was used to evaluate the minimum inhibitory of concentration (MIC). PCR was used to detect the *vanA* and *vanB* genotype in Vancomycin and Teicoplanin resistance enterococci.

Results: 92%, 6.2% and 1.8% of isolated samles collected from urine, blood culture and pleura fluid, respectively. According to phenotype, 18.6% and 17.69% were resistance to Vancomycin and Teicoplanin, respectively. Resistance was observed in strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *VanA* genotype was seen in all of the resistance isolated species.

Conclusion: This study showed that strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* have more antibiotic resistance to the Vancomycin and Teicoplanin, moreover *vanA* genotype precence in all of resistance isolated samples.

Keywords: Enterococci, Vancomycin, Teicoplanin, Antibiotic resistance, *VanA* genotype, *VanB* genotype

* Corresponding Author: Rabi Nezhad Moosavy M (M.Sc), E-mail: mortzamoosavy7@gmail.com

Received 21 Feb 2016

Revised 6 Jun 2016

Accepted 18 Jun 2016