Archive of SID

تعیین حساسیت ضد میکروبی و تشخیص ژنهـای مقاومت به ونکومایسیـن در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از فاضلاب

علی احمدی[1]، محمد مهدی سلطان دلال[1]، محمدرضا پورشفیع[2]*

1) بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

2) بخش میکروبشناسی، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۸۵/۷/۱۰

چکیده

مقدمه: افزایش شیوع انتروکوک‌های مقاوم به ونکومـایسین (VRE) در محیط های بهداشتی و غیر بهداشتی از جمله فاضلاب های شهری به یکی از مسائل مهم در حوزه بهداشت و درمان تبدیل شده است. در این مطالعه پس از جداسـازی انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب و تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی، با استفاده از روش PCR وجود ژنهای *vanA*، *vanB*، *vanC1* و *vanC2/3* در سویه‌ها بررسی شد.

مواد و روش ها: پس از نمونه برداری از فاضلاب و فیلتراسیون نمونه ها، ممبران های حاصله بر روی محیط های اختصاصی و حاوی آنتی بیوتیک قـرار گـرفته و انتـروکوک هـای مقاوم به ونکومایسین خالص سازی گردید. سپس تست‌های بیوشیمیایی، آنتی بیوگرام و MIC سویه ها در مورد ونکومایسین و چندین آنتی بیوتیک دیگر انجام شد. در نهایت PCR جهت تشخیص ژنهای *vanA*، *vanB*، *vanC1* و *vanC2/3* انجام گرفت.

یافته های پژوهش: طبق نتایج، از بین سویه های VRE جدا شده، ۵۳ کلنی بطور تصادفی خالص سازی گردید. با انجام تستهای بیوشیمیایی تمام ایزوله ها بعنوان انتروکوک فسیوم شناسایی شدند. نتایج حساسیت ضد میکروبی حاکی از وجود مقاومت چندگانه در سویه هـا بود و ۹۸ درصد سویه ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین بودند. طبق نتایج PCR ، بالاترین فرکانس، مربوط به ژن *van*A (۹۶درصد) بود و ژن *van*B نیز در ۱۵ درصد سویه ها وجود داشت. هیچیک از ژنهای *van*C1 و *van*C2/3 در سویه های مورد نظر یافت نشد.

نتیجه گیری نهایی: به سبب اینکه ژنهای مقاومت به ونکومایسین قابل انتقال بین باکتریها و نیز بین باکتریها و محیط بوده و مخازن محیطی می توانند در انتشار انتروکوک های با مقاومت آنتی بیوتیکی نقش داشته باشند از اینرو باید نسبت به نظارت دقیق‌تر بر سیستم دفع و تصفیه فاضلاب های شهری و حذف ارگانیسم های مقاوم از آن توجه بیشتری مبذول داشت. گفتنی است وضع قوانین بهداشتی در مورد استفاده محدودتر از ونکومایسین در حوزه های مختلف بهداشتی، درمانی و صنایع غذایی تاثیر بسزایی در کنترل شیوع مقاومت به این ارگانیسم خواهد داشت.

واژه های کلیدی: انتروکوک، مقاومت به ونکومایسین، فاضلاب

* **نویسنده مسوول:** بخش میکروبشناسی، انستیتو پاستور ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انتروکوک ها، کوکسی های گرم مثبت تخمیری و فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوان می باشند. این باکتریها که در گذشته از لحاظ بالینی کم اهمیت تلقی می شدند بدلیل کسب مقاومت اکتسابی به چندین آنتی بیوتیک مهم بالینی مانند ونکومایسین (با شیوع ۱۲ درصد) از اوایل ۱۹۷۰ بعنوان دومین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی از جمله اندوکاردیت، عفونتهای مانند انتروکوک، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و کلستریدیوم دیفیسیل در نظر گرفته می‌شوند. مصرف بی‌رویه ونکومایسین در ۲ دهه گذشته منجر به ظهور سویه های مقاوم انتروکوک به گلیکوپپتیدها شده است (۳ و ۵). مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک ها شامل *van*A، *van*B، vanC1 و *van*C2/C3 می‌باشند. ژنهای *van*A و *van*B بعنوان مهمترین ژنهای مسئول مقاومت، بترتیب بر روی ترانسپوزون‌های *Tn1546* و *Tn1547* قرار دارند که می‌توانند روی پلاسمید یا کروموزوم یافت شود. ژنهای *van*C1 و *van*C2/C3 کروموزومی هستند. فنوتیپ *van*A از طریق مقاومت اکتسابی سطح بالا هم به ونکومایسین و هم تیکوپلانین مشخص می‌شود. فنوتیپ *van*B از طریق مقاومت اکتسابی سطح متوسط به ونکومایسین (و نه تیکوپلانین) مشخص می‌شود. فنوتیپ *van*C از طریق مقاومت داخلی سطح پایین به ونکومایسین و حساسیت به تیکوپلانین مشخص می‌شود (۶، ۷ و ۸). انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از تصفیه خانه‌های شهری، اولین بار در سال ۱۹۹۳ در انگلستان و سپس در شهر کوچکی در آلمان در نمونه های مدفوع خوک و طیور مزرعه دیده شد (۹).

مطالعات فراوانی قابلیت انتشار این سویه ها بهمراه انتقال ژنهای مقاومت را در بین محیط های مختلف تایید کرد (۱۰ و ۱۷). به سبب اینکه ژنهای مقاومت به ونکومایسین قابل انتقال بین باکتریها می‌باشند، بنابراین مخازن محیطی می تواند در انتشار انتروکوک های مقاوم حتی به محیط های درمانی و باکتری های مهم از لحاظ پزشکی نقش داشته باشد، چنانکه انتقال ژنهای مقاومت در بین انتروکوک ها در تصفیه خانه های شهری نیز گزارش شده است (۹، ۱۸ و ۱۹). ترانسپوزونهای کنژوگاتیو انتروکوک فسیوم می‌توانند مقاومت به ونکومایسین را به استافیلوکوک اورئوس منتقل نمایند (۹). چنانکه سویه های استاف اورئوس مقاوم به ونکومایسین با ژنوتیپ *van*A در ادراری، سپتی سمی و غیره شناخته شدند (۱و۲). از بین انتروکوک ها دو گونه انتروکوک فکالیس و انتروکوک فسیوم با شیوع بترتیب ۸۵ و ۱۰ درصد، شایع‌ترین عوامل مسبب را تشکیل می دهند (۳ و۴). آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدیونکومایسین و تیکوپلانین آخرین راه درمان عفونتهای جدی ناشی از کوکسی‌های گرم مثبت امریکا گزارش شده است (۲۰، ۲۱ و ۲۲). بنابراین بروز این نوع مقاومت در انتروکوک ها مشکلات عمده ای در بروز عفونتهای بیمارستانی ناشی از این ارگانیسم ها و نیز تشخیص و درمان آنها را سبب گردیده است.

روش PCR جهت شناسایی ژنهای مقاومت به ونکومایسین و تعیین پراکندگی این دسته از ژنها در انتروکوک های مقاوم کاربرد فراوانی داشته است (۱۲،۱۱ و ۱۳). در این مطالعه پس از جداسازی انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب و تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی، با استفاده از روش PCR وجود مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومایسین در این سویه ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری:

نمونه برداری در ماههای آذر و بهمن سال ۱۳۸۳ انجام شد. جهت انجام نمونه گیری از تصفیه خانه شهرک اکباتان استفاده شد. منابع نمونه برداری در هر تصفیه خانه شامل ورودی حوضچه هوادهی، لجن و خروجی حوضچه هوادهی بود. پس از نمونه گیری، نمونه های فاضلاب به سرعت به آزمایشگاه میکروبشناسی انستیتو پاستور ایران منتقل شد.

جداسازی باکتری:

ابتدا رقت های ۱/۱۰ از نمونه های مورد نظر تهیه شد و سپس با استفاده از ممبران‌های میلی پور 0.45µm(Millipore Cooperation) فیلتر شدند. سپس فیلتر را برداشته و به آرامی بر روی پلیت محیط کشت Brain Heart Infusion (DIFCO, USA) آگار منتقل نموده و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس مجدداً فیلترها برروی محیط M Enterococcus agar (DIFCO,USA) (ME agar) حاوی ۸ µg/ml

www.SID.ir

Archive of SID

ونکومایسین قرار گرفتند و بمدت ۴۸ ساعت در ۴۲°C گرماگذاری شدند. سپس فیلترها بر روی پلیت‌های بایل اسکولین آگار (DIFCO,USA)بمدت ۲ ساعت در ۴۵ °C گرماگذاری شدند. پس از این مدت از روی فیلترها، کلنی های سیاه، بر روی بلاد آگار خالص سازی شدند (۲).

تعیین هویت بیوشیمیایی:

پس از خالص سازی کلنی ها، تعیین هویت سویه‌ها از طریق تست‌های بیوشیمیایی مانند رشد در حضور نمک amide pyrrolidonyl-B-naphty، ۶/۵ درصد(PYR)، رشد در ۴۵ °C و غیره انجام گرفت (۱۴).

تعیین حساسیت ضد میکروبی:

تعیین حساسیت ضد میکروبی سویه ها انتشار دیسک با آنتی بیوتیک‌های

Vancomycin (30 µg), Streptomycin (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Gentamicin (120 µg), Amikacin (30 µg), Ampicillin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Tetracycline (30 µg), Erythromycin (15 µg) (BBL,Sensi Disc, USA) و نیز MIC به روش Macrodilution و نیز E-test (AB Bio Disk, Sweden) در مورد ونکومایسین و تیکوپلانین بر طبق استانداردهای CLSI انجام شد (۱۵).

استخراج DNA:

برای استخراج محتوای کل DNA از روش استخراج موتانولیزین استفاده شد. بطور خلاصه، ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI براث به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به رسوب حاصله ۱ میلی‌لیتر از بافر لیز با فرمول زیر اضافه شد:

(1mM NaCl, 10 mM Tris HCL, 5mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)

سپس به محلول حاصله، بترتیب لیزوزیم (۱۰mg/ml)، موتانولیزین ۵۰ واحد ، پروتئیناز K (۲۰mg/ml) و سارکوزیل (۲۰٪)، و سپس SDS (۲۵٪) افزوده و در هر مرحله یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در نهایت محلول حاصل ابتدا با فنل و کلروفرم- ایزوپروپانول و سپس تنها با کلروفرم شستشو شده و پس از سانتریفوژ مایع رویی برداشته شد (۱۶).

PCR:

در نهایت با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، وجود ژنهای مقاومت به ونکومایسین شامل *van*A، *van*B، *van*C1، و*van*C2/3 در سویه‌ها بررسی شد. سویه های استاندارد و کنترل مثبت شامل انتروکوک فکالیس ATCC 51299 برای *van*A، انتروکوک فسیوم ATCC V583 برای *van*B و انتروکوک گالیناروم ATCC BM4174 برای *van*C بودند. سکانس پرایمرهای مورد استفاده (۱۲) در مورد ژنهای مقاومت به ونکومایسین بترتیب عبارتند از: ژن *van*A شامل Forward - CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A و Reverse- CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA در مورد *van*B شامل Forward-GTC ACA AAC CGG AGG CGA و Reverse- CCG CCA TCC TCC TGC GGA AAA AAA و در مورد *van*C1 شامل Forward -GGTATCAAGGAAACCTC- و Reverse- CTTCCGCCATCATAGCT و در مورد *van*C2/C3 شامل Forward- CGCAGGGACGGTGATTTT و Reverse-CGGGGAAGATGGCAGTAT می‌باشد. در مورد هر پرایمر واکنش PCR مربوطه بصورت جداگانه انجام گرفت. سپس الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در هر PCR با استفاده از ژل آگارز ۱% انجام شده و پس از رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از نمونه برداری:

در این مطالعه از تصفیه خانه شهرک اکباتان در تهران در مجموع سه بار نمونه برداری شد. با انجام فیلتراسیون نمونه های فاضلاب، از بین تقریباً۳۰۰ کلنی مشاهده شده بر روی محیط های اختصاصی، در نهایت ۵۳ کلنی بطور تصادفی جدا و خالص سازی گردید. پس از انجام تستهای بیوشیمیایی تمام ایزوله‌ها بعنوان انتروکوک فسیوم شناسایی شدند.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت ضد میکروبی:

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج MIC به روش Macrodilution و همچنین E-test نشان داد ۹۸ درصد سویه ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین بودند (MIC≥۴) (۲۵۶ و تنها یک سویه دارای MIC≤۴ بود. نتایج آنتی‌بیوگرام در مورد ۹ آنتی بیوتیک (جدول۱) حاکی از آمار بالای مقاومت چندگانه در سویه های مورد نظر می‌باشد. در واقع بجز در مورد دو آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۲۱٪) و تتراسایکلین (۱۵٪) که مقاومت بطور قابل توجهی پایین تر از بقیه آنتی‌بیوتیک ها بود، ۹۴ درصد از سویه های مورد نظر به تمام آنتی بیوتیک های مورد استفاده مقاومت داشتند.

PCR:

طبق نتایج PCR ، بالاترین فرکانس مربوط به ژن *van*A بوده (تصویر۱) و ژن *van*B نیز در مرتبه دوم قرار داشت (تصویر۲). در مورد دو سویه فاقد *van*A، هر دو دارای *van*B بوده و با انجام E-test در مورد تیکوپلانین هر دو دارای MIC≤۸ بودند که با فنوتیپ *van*B همخوانی داشت. نتایج حاصل از توزیع فرکانس ژنی سویه های مورد آزمایش در جدول شماره ۲ ارائه شده است. در نهایت جدول ۳ نیز پراکندگی ژنهای مقاومت را بر حسب محل نمونه‌برداری نشان می دهد.

جدول۱. نتایج آنتی بیوگرام در سویه های مقاوم

نتایج حاصل از

مواد ضد میکروبی	درصد مقاومت
وانکومایسین	۱۰۰
استرپتومایسین	۱۰۰
اریترومایسین	۹۸
آمیکاسین	۹۸
آمپی سیلین	۹۸
جنتامایسین	۹۴
سیپروفلاکساسین	۹۴
کلرامفنیکل	۲۱
تتراسیکلین	۱۵

جدول ۲. نتایج PCR ژنهای مقاومت به ونکومایسین در سویه‌ها

نتایج	تعداد (درصد مثبت)	تعداد (درصدمنفی)
VanA	۵۱ (۹۶)	۲(۴)
VanB	۸ (۱۵)	۴۵(۸۵)
VanC1	۰ (۰)	۵۳(۱۰۰)
VanC2/3	۰ (۰)	۵۳(۰)

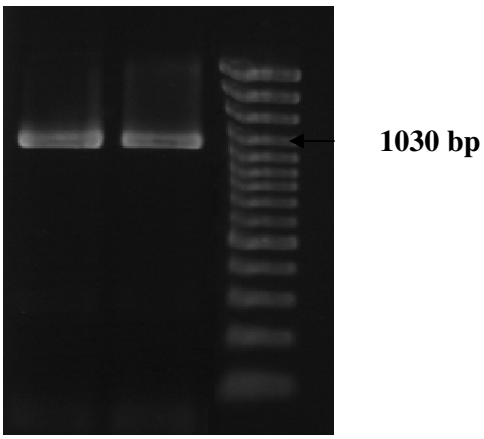
جدول ۳- پراکندگی ژنهای مقاومت بر حسب محل نمونه برداری

تعداد ایزوله‌ها / محل نمونه‌برداری	تعداد ایزوله ها با vanB	تعداد ایزوله ها با vanA
Incoming	۲	۱۳
Sludge	۳	۱۸

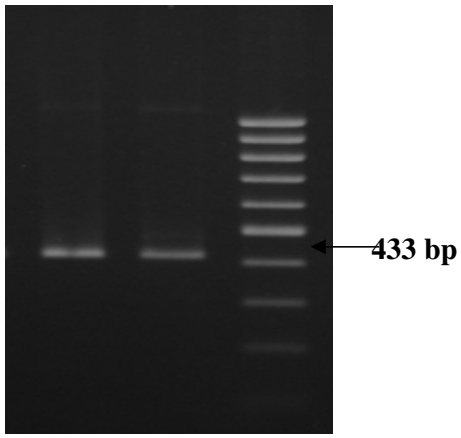
www.SID.ir

Archive of SID

Outgoing	۳	۲۰
Total	۸	۵۱



شکل۱. محصول PCR مربوط به ژن *van*A.



شکل۲. محصول PCR مربوط به ژن *van*B.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه به علت استفاده از روش کاملاً انتخابی به نفع جداسازی انتروکوک های دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین می توان به سرعت و مستقیماً برای جداسازی چنین سویه هایی از سیستم فاضلاب شهری و انجام بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی بر روی آنها اقدام کرد. تمام سویه های جدا شده انتروکوک فسیوم بودند که در چندین مطالعه مشابه نیز آمار انتروکوک فسیوم بر سایر گونه های جدا شده غلبه داشت (۱۰ و ۲۳). از لحاظ مقاومت چند گانه، آمار مقاومت در مورد آنتی بیوتیک های مختلف بالا بود اما مقاومت به دو آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسایکلین پایین تر از آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون آمپی‌سیلین و جنتامایسین است (۲۴ و ۲۵). مهمترین دلیل این امر پایین تر بودن میزان کاربرد بالینی این دو آنتی‌بیوتیک می باشد که این امر باعث می شود پلاسمید های مقاومت مربوط به این دو آنتی بیوتیک در سویه‌های فاضلاب شهری پایینتر از بقیه آنتی بیوتیک‌ها باشد. در این مطالعه دو مورد از سویه‌ها، فاقد *van*A و در عوض دارای ژنوتیپ *van*B بودند. با انجام MIC تیکوپلانین به روش E-test در مورد این دو سویه و حساس بودن هر دو (MIC≤۸)، فنوتیپ *van*B برای دو سویه کاملاً تأیید گردید. چرا که مطابق اطلاعات موجود، دامنه MIC مربوط به ژن *van*B می تواند بین۲۵۶-۴ متغیر باشد. ژن*van*B آمار پایین‌تری نسبت به *van*A داشته و دومین عامل انتشار فنوتیپ مقاومت بشمار می رود (۱۰). از آنجا که تمام سویه های جدا شده انتروکوک فسیوم بوده و

ژنهای*van*C1 و *van*C2/3 نیز عامل مقاومت ذاتی در انتروکوک های گالیناروم و کاسلیفلاووس هستند (۱۰)، یافت نشدن ژنهای فوق در سویه های مورد نظر غیر عادی نیست. مطالعه مشابهی توسط Novais و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کشور پرتغال انجام شد (۲۶). در این مطالعه ۳۱ نمونه فاضلاب شهری بیمارستانی و رودخانه ای جداسازی شد. در بین این ۳۱ سویه، ۲۵ سویه انتروکوک فسیوم بودند. با انجام PCR، در ۲۷ سویه، ژن *van*A، و در ۴ سویه *van*B و در یک سویه *van*C یافت شد.

در مطالعه مشابه دیگری که توسط Iversen در سال ۲۰۰۲ در سوئد انجام شد (۲۷) نمونه های فاضلاب تصفیه‌خانه‌های شهری مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از محیط های اختصاصی M Enterococcus agar حاوی ۸ میکروگرم در میلی لیتر ونکومایسین، انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین جداسازی شد. در نهایت از بین نمونه‌های فاضلاب مورد استفاده، ۳۵ ایزوله VRE جداسازی شد. پس از

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین هویت بیوشیمیایی در این ۳۵ ایزوله، ۲۴ ایزوله (۶۹ درصد) انتروکوک فسیوم بودند و اکثر سویه های مورد نظر دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه بودند. پس از انجام PCR ، ۳۰ ایزوله دارای ژن *van*A و ۵ ایزوله دارای ژن *van*B بودند. مقایسه این مطالعات و سایر پژوهش ها با مطالعه اخیر نشان می دهد استفاده از روش فیلتراسیون غشایی و محیط M Enterococcus agar حاوی ۸ میکروگرم در میلی لیتر ونکومایسین برای جداسازی انتروکوک های دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین از نمونه های فاضلاب، یک روش استاندارد و با راندمان بالا بشمار می رود. از سویی دیگر نشان می دهد که انتروکوک فسیوم همواره مقاومترین گونه انتروکوک به آنتی بیوتیک های مختلف بوده و بروز سویه های با مقاومت های آنتی بیوتیکی، آمار بسیار بالاتری نسبت به بقیه گونه ها دارد. البته بعلت فراوانتر بودن در محیط و نیز دارا بودن فاکتورهای ویرولانس بسیار بیشتر، انتروکوک فکالیس بیشترین شیوع از لحاظ بالینی را بخود اختصاص می‌دهد. در مورد فرکانس ژنهای مقاومت به ونکومایسین، در این دو مطالعه و نیز تمام پژوهش های دیگر، ژن *van*A بالاترین آمار را بخود اختصاص می‌دهد که علت آن قابلیت بالای انتقال ترانسپوزون مربوطه می‌باشد. بدنبال ژن *van*A، ژن *van*B نیز دومین ژن مهم در انتقال مقاومت قلمداد می شود. این مطالعه هر چند اپیدمی دقیق انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب را به دست نمی دهد، اما مسلماً وجود این باکتریهای دارای مقاومت چندگانه را در سیستم فاضلاب های شهری تهران تایید کرده و با در نظر گرفتن امکان انتقال ژنهای مقاومت به سایر باکتریها و محیط ها، توجه مسئولان امر را نسبت به برنامه ریزی و نظارت دقیقتر بر سیستم دفع و تصفیه فاضلاب های شهری، حذف ارگانیسم های مقاوم از طریق جلوگیری از تجویز بی‌رویه در درمان و نیز ممنوعیت از استفاده از این آنتی بیوتیک بعنوان مکمل‌های غذایی و کشاورزی و همچنین جلوگیری از آلودگی تصفیه فاضلاب های شهری با فاضلاب های بیمارستانی در سطح شهر ها جلب می نماید.

REFERENCES

1. Kavindra VS, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 1845–1850.

2. Kennethe GV, Gedris CA, Rodnery KM, et al. Selective isolation of vancomycin-resistant *Enterococci.* J Clin Microbiol 1996, 38: 924–927.

3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin resistance *Enterococci*. Clin Microbiol Rev 2000, 13: 686-707.

4. Harwood VJ. Vancomycin-resistance *enterococci spp*. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. App Env Microbiol. 2001, 67: 4930-4933.

5. Saeed AK, Mohamed SN, Ashraf AK, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus spp.* from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Molecular Cellular Probes 2005, 19: 27–34.

6. Maria DA, Citron DM, Kwok R. Evaluation of the velogene genomic assay for detection of *van*A and *van*B genes in vancomycin-resistant *Enterococcus* Species. J Clin Microbiol 2004, 42: 1751–1752.

7. Mendez-Alvarez S, Perez-Hernandez X, Claverie-Martin F. Glycopeptide resistance in *Enterococci.* Microbiol 2000, 7252: 71-80.

8. Murray B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. New Eng J Med 2000, 32:557-567.

9. Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and Antibiotic resistance. Acta Vet Brno 2003, 72: 315-323.

10. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium.* Int J Food Microbiol, 2003, 88: 269-290.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P et al. Detection of the *van*A alphabet and identification of *enterococci* and *staphylococci* at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004, 28: 5857-5860.

12. Kariyama R, Mitsuhta R, Chow JW, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant E*nterococci*. J Clin Microbiol 2000, 38: 3092-3095.

13. Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. Multiplex PCR detection for *van*A, *van*B, *van*C1 and *van*C2/3 genes in enterococci. J Clin Microbiol 1997, 36:703-707.

14. Facklam RR, Collins MD. Identification of *enterococcus* species isolated from human infection by a conventional test scheme. J Clin Microbial 1989, 27: 731-734

15. CLSI guidelines, 2006.

16. Regnault B. Universal ribotyping methods using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. Res Microbiol 1997, 148: 649-659.

17. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, et al. Prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in fecal samples from hospitalized patients and non hospitalized controls in a cattle-rearing area of france. J Clin Microbiol 2000, 38: 620–624.

18. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant *Enterococci* in nosocomial surveillance specimens by PCR. J. Clin. Microbiol., 1999, 37: 2090–2092.

19. Noble WC, Virani A, Cree R, et al. Cotransfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992 195-198.

20. Klopp S. Resistance to vancomycin in US chicken feed. Lancet 1999, 353:1190-1195.

21. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, et al. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococci* from animal feed in USA. Lancet 1999, 353: 722-728.

22. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48: 275-280.

23. Huycke MM, Sham DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerge Infect Dis 2002, 4: 239-249.

24. Hayes, English LL, Carter PJ, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus species isolates from retail meats. Appl Env Microbiol 2003, 7153-7160.

25. Panesso D, Ospina S, Robledo J, et al. First characterization of a cluster of vanA-type glycopeptide-resistant *enterococcus faecium*. Colombia Emerge Infect Dis 2002; 8: 961-965

26. Novais C, Coque T, Ferreira H, et al. Environmental contamination with vancomycin-resistant *enterococc*i from hospital sewage in portugal. App Env Microbiol 2005, 71:3364-3368.

27. Versen A, Kuhn I, Franklin A, et al. High prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in Swedish sewage. Appl Env Microbiol 2002, 68: 2838-2842 .

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular Study of Van Genes in Vancomycin Resistant Enterococci Isolated from Wastewater in Tehran, Iran

Ahmadi A[2], Soltan Dallal MM[1], Pourshafie MR[2]*.

1) Division of Microbiology, Dept of Pathobiology, Institute of Public Health, Tehran University of Medical Sciences.
2) Division of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran.

Abstract

Introduction: Vancomycin resistance in *Enterococci* has become of great concern in public health, since the increase of prevalence of these organisms inside and outside the health care settings including urban sewage treatment plants have been documented.

Materials & Methods: In this study, we isolated vancomycin resistant *Enterococci* strains from wastewaters. After identification and susceptibility testing of the isolates, PCR assays were used for detection of *van*A, *van*B, *van*C1 and *van*C2/3 resistant genes.

Results: As a result, 53 VRE strains were isolated and identified as vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrobial susceptibility revealed that all the isolates were multidrug resistant and 98% of them had high level of vancomycin resistance**.** Molecular analyses revealed that all proved the presence of *van*A gene, while *van*B was detected only in 15%. But non of them had *van*C1 and *van*C2/3.

Conclusion: Due to the possibility of resistance prevalence of *van* genes, more care should be taken to control the sewage systems and elimination of resistant organisms especially multi drug resistant VRE and prevent the transmission of their resistant genes to other *Enterococci.*

***

Keywords: *Enterococci*, Vancomycin resistance, Wastewater, Tehran.

* **Corresponding Author:** Division of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran

www.SID.ir