تحقیقی

ارزیابی مولکولی ژن‌های *van A* و *van B* در جدایه‌های انتروکوکی بیمارستانی مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین

دکتر شهرام شهرکی[۱]، سیدمرتضی ربیع نژاد موسوی*[۲]، بهرام دهمرده[۳]، محمد آتشگه[٤]

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

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

۳- کارشناس میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. ٤- کارشناس زیست شناسی، گروه میکروب‌شناسی، 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 A و van B در جدایه‌های انتروکوکی بیمارستانی مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین 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 A و van B با استفاده از روش PCR انجام شد.*

یافته ها : *جدایه‌ها از نمونه های ادراری، کشت خون و ترشحات ریوی به ترتیب با مقادیر ۹۲ درصد، ٦/۲ درصد و ۱/۸ درصد به دست آمدند. این مطالعه نشان داد گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم بیشترین مقاومت را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و تیکوپلانین داشته و ژن van A در تمامی این نمونه‌ها جدا شد و ژن vanB 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 ، ونکومایسین ، تیکوپلانین ، 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 میکروب‌شناسی، تلفن و نمابر ۳۳۲۲۹۷۹۲-۰٥٤

وصول مقاله : ۱۳۹٤/۱۲/۲ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٥/۳/۱۷ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٥/۳/۲۹

مقدمه

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 ونکومایسین در سرتاسر دنیا گزارش شده است (۱و۲). در بین جدایه‌های انتروکوکی، عمدتاً انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم به عنوان ارگانیسم‌های 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).

عفونت‌های حاصله به واسطه انتروکوک‌ها را می توان مرتبط با مجاری ادراری در نظر گرفت که به سیستیت، اپیدمیدیت، پریتونیت و همچنین به سایر بیماری‌ها از جمله باکتریمی و اندوکاردیت اشاره کرد (۴). انتروکوک‌ها واجد مقاومت ذاتی به مواد ضدمیکروبی متعددی هستند و همچنین با داشتن عوامل متحرک ژنتیکی، توانایی کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی را پیدا می کنند که این موضوع باعث اهمیت بیشتر آنها می‌شود (۵). انتروکوکوس فکالیس نیز بسیار شایع؛ اما انتروکوکوس فاسیوم بیشتر، مقاومت ونکومایسین 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 ونکومایسین در مجموعه ژن‌های *van* کد می‌شود و

می‌تواند به انواع ژنوتیپ مختلف *vanA*، *vanB1*، *vanB2*، *vanB3*، *vanC1* و *vanC2/C3* تقسیم شوند (۸). ژنوتیپ‌های مقاوم به ونکومایسین در انتروکوک‌ها شامل *vanA* و *vanB* است که دارای بالاترین اهمیت پزشکی هستند. سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین ژنوتیپ *vanA* را نشان می‌دهند. در حالی که سویه های حساس به تیکوپلانین و مقاوم به ونکومایسین ژنوتیپ *vanB* را نیز نشان می‌دهند. ترانسپوزون Tn1546 از جمله عوامل ژنتیکی متحرکی است که ژن مقاومتی *van A* را حمل می‌کند. در حالی که ترانسپوزون‌های Tn1547-Tn1549 ژن مقاومتی *vanB* را حمل می‌کنند که هر کدام ممکن است بر روی پلاسمید و 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 انتروکوکی یافت شده‌اندکه می‌توان به انتروکوکوس گالیناروم اشاره کرد و تسهیل در شناسایی آنها می‌گردد (۹). *vanD* واجد شاخصه‌هایی با مقاومت در سطح متوسطی به ونکومایسین و سطح پایینی به تیکوپلانین 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 بر خلاف 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 ونکومایسین و تیکوپلانین در جدایه‌های انتروکوکی، این مطالعه به منظور ارزیابی مولکولی PCR ژن‌های *vanA* و *vanB* در جدایه‌های انتروکوکی بیمارستانی مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین 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 بودن می‌شود؛ انجام گردید. رشد بر روی براث 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 انتروکوکی 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 ۰/۰۴ 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 ونکومایسین، تیکوپلانین، نیتروفورانتوئین، کوئین دالفوپریستین، لاینزولید، فسفومایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین با دوز بالا (۱۲۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، استرپتومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، ایمیپنم و پیپراسیلین 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، سواپ استریل را در سوسپانسیون مربوطه آغشته کرده و بر روی محیط مولر هینتون 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 شرکتLiofilchem ایتالیا)، آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و تیکوپلانین استفاده شد. بر مبنای دستورالعمل CLSI، MIC ≥ ۳۲ µg/ml به عنوان مقاوم، ۱۶-۸ µg/ml به‌عنوان نیمه‌حساس و ≤ ۴ µg/ml به‌عنوان حساس درنظر گرفته شد.

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

جدول ۱ : توالی پرایمرهای اختصاصی

نام ژن	Oligonucleotide sequence (5' ا 3')	محصول PCR	دمای Annealing (سانتی‌گراد)	منبع
VanA	5-GGG-AAA-ACG-ACA-ATT-GC-3 5-GTA-CAA-TGC-GGC-CGT-TA-3	۷۳۲	٥٤	۱۳و۱٤
VanB	5-ATG-GGA-AGC-CGA-TAG-TC-3 5-GAT-TTC-GTT-CTT-CGA-CC-3	٦۳٥	٥٤	۱۳و۱٤

محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای 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 facalis ATCC 29212 در جهت تشخیص فنوتیپی، آنتی‌بیوگرام و بررسی MIC نیز استفاده شد. استخراج DNA طبق پروتکل کیت Qiagen (mericon DNA Bacteria Plus Kit) انجام شد. سپس نمونه‌های استخراج شده مورد بررسی اسپکتروفتومتری قرار گرفت. سپس نسبت OD260به OD280 را ارزیابی کرده و در صورت میزان جذب نوری بین ۱/۶ تا ۱/۸، نشانه کیفیت مطلوب از استخراج DNA بود.

PCR (polymerase chain reaction) و الکتروفورزیز: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول یک) انجام شد. پس از آن ژل یک درصد ی 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 فناوران) استفاده شد. برای کنترل کیفی از سویه استاندارد Enterococcus faecium ATCC 51559 استفاده گردید.

یافته‌ها

جدایه‌ها از نمونه‌های 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. فراوان‌ترین گونه مختص به انتروکوکوس فکالیس (۷۴ درصد) و در مراتب پایین‌تر 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 نمونه‌گیری به‌عمل آمده است.

نمونه‌گیری از بیماران در بخش‌های 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 گونه‌های انتروکوکی، نخست آزمون آنتی‌بیوگرام در مجموع چهار گونه‌ای که به روش‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند؛ انجام شد. جدول ۲ نیز درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، آنتی بیوتیک های مختلف در مجموع چهار گونه شناسایی شده را مشخص می کند.

جدول ۲ : الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف انتروکوک‌های جداشده

دارو	درصد
ونکومایسین	۱۸/۶
تیکوپلانین	۱۷/۷
ایمیپنم	۳۷/۲
لینزولید	۱۱/۵
کوئین-دالفوپریستین	۸
نیتروفورانتوئین	۱۵
پیپراسیلین	۱۶/۸
جنتامایسین ۱۰ میکروگرم	۴۳/۴
جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم	۲۰/۴
سیپروفلوکساسین	۳۱/۹
فسفومایسین	۶/۲
اریترومایسین	۷۷
تتراسایکلین	۷۱/۷
استرپتومایسین	۷۷/۹
کلرامفنیکل	۱۵/۹

در مجموع ۱۱۳ ایزوله جدا شده ۱۸/۶ درصد (۲۱ ایزوله) به ونکومایسین مقاوم بودند و ۲۸/۳ درصد (۳۲ ایزوله) حساسیت حدوسط داشتند. مقاومت نسبت به تیکوپلانین ۱۷/۷ درصد (۲۰ ایزوله) بود. سایر آنتی بیوتیک ها با صرف نظر از تنوع گونه‌های حاصله، فراوانی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی شامل نیتروفورانتوئین (۱۵ درصد)، پیپراسیلین (۱۶/۸درصد)، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (۴۳/۴ درصد)، جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم (۲۰/۴ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۱/۹ درصد)، فسفئومایسین (۶/۲درصد)، تتراسایکلین (۷۱/۷ درصد)، اریترومایسین (۷۷ درصد)، استرپتومایسین (۷۷/۹ درصد) و کلرامفنیکل (۱۵/۹ درصد) ایجاد کردند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بررسی شده بیانگر حضور مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین تنها در دو گونه انتروکوکوس فکالیس (ونکومایسین: ۶ ایزوله و تیکوپلانین: ۱۵ایزوله) و انتروکوکوس فاسیوم (ونکومایسین: ۱۵ ایزوله و تیکوپلانین: ۱۵ ایزوله) از مجموع چهار گونه را نمایان می‌سازد.

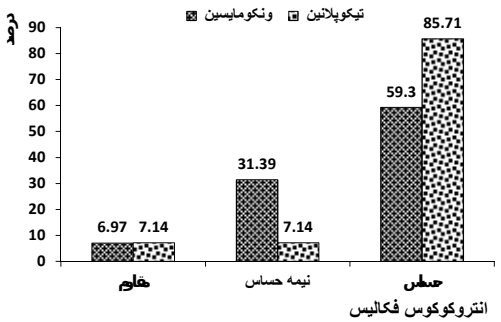
گونه‌هایی که مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در آنها به طریق انتشار دیسک مسجل گردید؛ میزان MIC در آنها بررسی شد. به عبارتی دیگر ۲۰ ایزوله هم به ونکومایسین و هم به تیکوپلانین

جدول ۳ : ارزیابی حداقل غلظت بازدارندگی رشد ونکومایسین و تیکوپلانین سویه‌های مقاوم

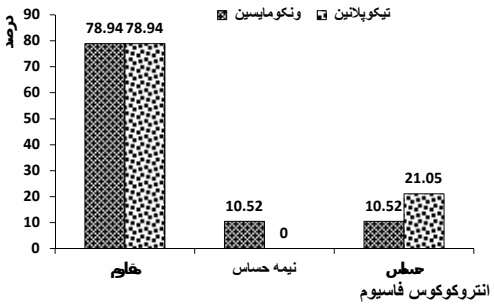
		حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)															
		۱/۵	۲	٤	٦	۸	۱۲	۱٦	۲٤	۳۲	٤۸	٦٤	۹٦	۱۲۸	۱۹۲	۲٥٦	ñ ۲٥٦
ونکومایسین	انتروکوکوس فکالیس	۲۳	۸	۱٦	۳	۱۲	٤	۱۱	–	–	–	–	–	–	–	–	٦
(«g/ml)	انتروکوکوس فاسیوم	۱	–	۱	–	–	۲	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱٥
تیکوپلانین	انتروکوکوس فکالیس	۲۳	۸	۱٦	۲٥	۱	٥	–	–	–	–	–	–	۱	–	–	٤
(«g/ml)	انتروکوکوس فاسیوم	٤	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱٥

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

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 ۱و۲ آمده است.



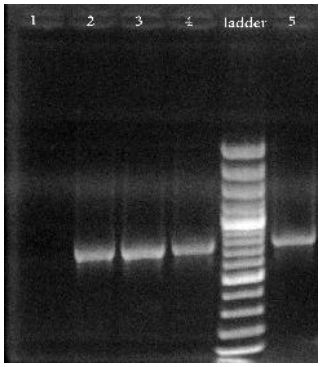
نمودار ۱ : نسبت فراوانی مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در گونه انتروکوکوس فکالیس



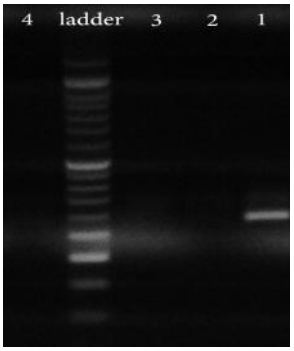
نمودار ۲ : نسبت فراوانی مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در گونه انتروکوکوس فاسیوم

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 تیکوپلانین 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 به‌دست آمد.



شکل ۱ : ستون ۱) Enterococcus faecalis ATCC29212 (کنترل منفی)؛ ستون ۲) Enterococcus faecium ATCC51559 (کنترل مثبت)؛ ستون‌های ۳ و ٤ و٥) 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 ۲و۳و٤) نمونه منفی از لحاظ حضور van B

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر بیشتر جدایه‌ها از نمونه‌های ادراری به‌دست آمد. ۱۸/۶ درصد به ونکومایسین و ۱۷/۷ درصد به تیکوپلانین 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 انتروکوک‌ها 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 باکتریمی 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 انتروکوکی علی‌الخصوص گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم مشاهده شد (۱۳و۱۴). در مطالعه کوهورت یونان پس از جداسازی دو گونه با اهمیت بیمارستانی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی و

۲۱۲۳ جدایه انتروکوکی ردیابی شد. ۷۰/۶ درصد (۱۴۹۸ نمونه) انتروکوکوس فکالیس و ۲۹/۴ درصد (۶۲۵ نمونه) انتروکوکوس فاسیوم جدا گردید. میزان شیوع ابتلا بیماران درگونه 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 (*vanA*، *vanB* و *vanC1/C2*) بررسی شد و به ترتیب ونکومایسین ۹/۶-۰/۵ درصد و تیکوپلانین ۸/۲-۰/۱ درصد بود (۱۵)؛ در حالی که نتیجه آن با مطالعه حاضر متفاوت بود. به‌طوری که مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین به میزان بالاتری ارزیابی شد.

انتروکوکوک‌ها علاوه بر گلیکوپپتیدها نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت وسیعی نشان می‌دهند. از جمله این موارد می‌توان به بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها اشاره کرد. در مطالعه کوهورت تایوان مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سطح بالا آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین و استرپتومایسین) ارزیابی شد (۱۶). آمینوگلیکوزیدها به علت خصوصیت سینژیسمی که در اثر ترکیب شدن آنها با یک عامل مهار کننده دیواره سلولی همچون بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها دارند؛ در مواردی که عفونت تهدید کننده‌ای از گونه‌های انتروکوکی سبب شود؛ برای مقابله با پیشرفت عفونت برای بیمار عرضه می‌گردد (۱۷). در مطالعه حاضر حضور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر به‌خصوص آمینوگلیکوزیدها بیانگر افزایش شیوع سویه‌های مقاوم چنددارویی و پیدایش آن در گونه‌های مختلف انتروکوک‌ها است. در مطالعه انجام شده در هندوستان به ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت گلیکوپپتیدی (ونکومایسین و تیکوپلانین) پرداخته شد و از ۳۶۷ جدایه بالینی ۸/۷ درصد آنها به ونکومایسین مقاوم بودند (۴) و همانند مطالعه حاضر در سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم تنها ژن *vanA* یافت شد. اگرچه حضور *vanA* در تمامی نمونه‌ها همسو با مطالعه حاضر است؛ اما ارقام آماری متفاوتی را به میزان پایین‌تری نشان داد (۴).

در مطالعه حسینی‌زاده و همکاران در بیمارستان‌های آموزشی اراک از بین ۱۵۰ نمونه جدا شده ۱۴/۶ درصد سویه‌های انتروکوکی به ونکومایسین و ۵/۳ درصد به تیکوپلانین مقاوم بودند (۱۸). نسبت اختلاف مقاومت به ونکومایسین در مطالعه حاضر با مطالعه فوق (۱۸) افزایش ۳ درصدی بود. در مطالعه شکوهی‌زاده و همکاران در چهار بیمارستان (بخش مراقبت‌های ویژه) تهران، تنها سویه‌های مقاوم انتروکوکوس فسیوم جدا شدند و در تمامی موارد ژن *vanA* حضور داشت (۱۹). حضور این ژن از این نظر با مطالعه حاضر مشابه بود. در مطالعه نقی‌پور و همکاران در بیمارستان‌های شهر گنبد و گرگان از بین ۱۲۸ نمونه مشکوک انتروکوکی جمع‌آوری شده تنها یک نمونه مقاوم به ونکومایسین به روش انتشار دیسک جدا گردید (۲۰) که برخلاف نتایج مطالعه حاضر است. در مطالعات مذکور شاهد افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شیوع گونه‌های با اهمیت بیمارستانی انتروکوک‌ها بودیم و در مطالعه حاضر (۱۸/۶ درصد مقاومت به ونکومایسین و ۱۷/۷ درصد مقاومت به تیکوپلانین 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 پیش‌بینی می‌کند و هشداری برای افزایش این روند در سال‌های متمادی است. در نهایت شکست درمان را در هنگام روبرو شدن با عفونت‌های مرتبط از جمله عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش های مراقبت‌های ویژه را ایجاد می نماید (۲۱). لازم به ذکر است حضور ژن *vanA* در نمونه‌های مقاوم یافت شده و غیبت ژن *vanB* دلالت بر افزایش شیوع *vanA* در این منطقه است که با سایر مطالعات (۴و۱۹) همسو بود؛ در حالی که میزان فراوانی مقاومت بالاتر بود. در این مطالعه سویه‌های مقاوم اغلب انتروکوکوس فاسیوم و میزان پراکندگی و حساسیت به ونکومایسین وتیکوپلانین در انتروکوکوس فکالیس نیز بالاتر بوده است. فقر بهداشتی، مصرف بیش از حد مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها 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 می‌گردد که متعاقباً نیازمند یک استراتژی مناسب و ضروری در راستای درمان برای بیماران مختلف بستری در بیمارستان است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی انتروکوکوس فکالیس به مراتب بالاتر از گونه‌های دیگر است؛ اما مقاومت گلیکوپپتیدی در انتروکوکوس فاسیوم سهم بیشتری را در برداشت. تجویز و یا مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیکی می‌تواند در شکست درمان و پیامد آن عدم بهبود بیماران نقش داشته باشد. انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب بسیار حائز اهمیت است و ایجاد یک برنامه درمانی برای بیماران در برابر جلوگیری از روند افزایشی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌های بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه (شماره ک/۱۰۷) آقای سیدمرتضی ربیع‌نژاد موسوی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروب‌شناسی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان بود. بدین‌وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان علی‌بن ابی‌طالب (ع) به خاطر همکاری در نمونه‌گیری از بیماران سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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.

5. 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

6. 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.

7. 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.

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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

12. Forbes BA SD, Weissfeld A. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Virginia: Elsevier Health Sciences. 11st ed. 2002; pp: 236-40.

13. 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.

14. 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.

15. 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

16. 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

17. 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.

18. 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]

19. 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]

20. Naghipoor E, Raefi A, NasrollahiOmran 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.

21. 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]

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

Cite this article as: Shahraki Sh, Rabi Nezhad Mousavi M, Dahmarde B, Atashgah M. [Molecular evaluation of *vanA* and *vanB* genes of enterococci isolates resistant to Vancomycin and Teicoplanin]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2017; 19(2): 84-90. [Article in Persian]