ORIGINAL ARTICLE

Genotypic and Phenotypic Characteristics of Vancomycin-resistant Enterococcus Isolated from Clinical Specimens of Patients in Shahrekord

Safieh Abbasi[1],
Behnam Zamanzad[2]

[1] MSc Student in Microbiology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Cellular and Molecular Research Center , Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received November 20, 2014 ; Accepted March 17, 2015)

Abstract

Background and purpose: Enterococci are important agents of endocarditis and urinary tract infections. They acquire resistance against antimicrobial agents which causes difficulty in their treatment. This study aimed to determine the antimicrobial susceptibility of strains resistant to vancomycin and identification of resistance genes vanA and vanB *Enterococcus* strains isolated from teaching hospitals in 2014.

Material and methods: Hundred and fifty isolates of *Enterococcus* were isolated from hospitals and the genus and species composition were identified using different biochemical methods. Antibiogram tests were also conducted. The minimum inhibitory concentration was conducted applying broth micro dilution. Finally the strains containing vanA and VanB genes were identified.

Results: The antibiogram test showed 10 strains with VanA and VanB phenotype. All strains were resistant to ciprofloxacin. VanA and VanB genes were detected in all 10 isolates of vanA phenotype and two strains of vanB phenotype. VanA and VanB genes were proliferated by PCR in two strains of the10 strains that were VanA phenotype.

Conclusion: Among *Enterococcus* species *E. faecium* and *E. faecalis* isolates were detected in teaching hospitals. The highest rate of resistance was to erythromycin and tetracycline and the lowest resistance rate was to vancomycin.

Keywords: vanA, vanB, *Enterococcus*, vancomycin

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 98-106 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۱۰۶-۹۸)

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی بیماران شهرکرد

صفیه عباسی[1]
بهنام زمانزاد[2]

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوک‌ها نقش مهمی در ایجاد اندوکاردیت و عفونت‌های ادراری دارند و به واسطه توانایی که در کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی دارند، درمان آن‌ها را با سختی مواجه می‌سازد. این مطالعه با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و هم‌چنین شناسایی ژن‌های مقاومت vanB و vanA در میان ایزوله‌های انتروکوکوس جدا شده از بیمارستان‌های آموزشی درمانی شهرکرد درسال **۱۳۹۳** به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها: ۱۵۰ ایزوله انتروکوکوس از بیمارستان جداسازی و جنس و گونه آن‌ها با روش‌های مختلف بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. آزمون آنتی بیوگرام برای این سویه‌ها انجام شد. هم‌چنین تعیین حداقل غلظت مهارکننده به روش براث میکرودایلوشن broth micro dilution انجام و نهایتا سویه‌های دارای ژن VanA و VanB در میان این سویه‌ها شناسایی گردید.

یافته‌ها: براساس نتایج آنتی‌بیوگرام ۱۰سویه دارای فنوتیپ VanA و ۲ سویه دارای فنوتیپ VanB بودند. تمامی سویه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. ژن‌های vanA و VanB به ترتیب درتمامی ۱۰ ایزوله ای که فنوتیپ vanA و ۲ سویه‌ای که فنوتیپ vanB راداشتند، شناسایی شدند. در ۲ سویه از ۱۰ سویه‌ای که دارای فنوتیپ VanA بودند، هردو ژن vanA و VanB توسط PCR تکثیر شدند.

استنتاج: تنوع گونه‌های انتروکوک در بیمارستان‌های آموزشی درمانی شهرکرد محدود به گونه‌های *E. faecium* و *E. faecalis* می‌باشد. در این مطالعه، بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و تتراسایکلین و کم‌ترین مقاومت نیز نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین گزارش گردید.

واژه های کلیدی: vanB، vanA، انتروکوک، ونکومایسین

مقدمه

انتروکوک‌ها، کوکوس‌های گرم مثبتی می‌باشند که به عنوان فرصت طلب می‌توانند باعث انواع عفونت‌های مجاری ادراری-تناسلی، اندوکاردیت، منژیت، عفونت‌های خونی و عفونت در نوزادان شوند(۳-۱). این میکروارگانیسم‌ها سومین علت معمول باکتریایی کسب شده در بیمارستان‌ها هستند. از بیست گونه انتروکوکی که

مولف مسئول: صفیه عباسی- شهرکرد: رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E-mail: Safiyeh abbasi@rocketmail.com
۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۹/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۱/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۲/۲۶

تا امروز شرح داده شده‌اند، *Enterococcus faecium* و *Enterococcus faecalis* حدود ۹۰ درصد از سویه‌های بالینی را به خود اختصاص می‌دهند(۴-۱). از یک طرف استفاده بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای ایجادکننده مقاومت انتروکوکوس‌ها برای کسب و انتشار عوامل آنتی‌بیوتیکی، از جمله عواملی هستند که باعث ایجاد مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها شده است و ظهور مقاومت‌های آنتی بیوتیکی ازجمله عوامل فزونی ژن‌های مقاومت بین این میکروارگانیسم ها و یا سایر گونه‌ها می‌باشد(۵). بیش از ۳۰ سال است که ونکومایسین در موارد کلینیکی بدون هیچ گونه مقاومت مشخصی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنتی‌بیوتیک به عنوان آخرین سلاح در درمان عفونت‌های استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین و هم‌چنین انتروکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد(۷). تیکوپلانین نیز یکی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی است که در آمریکا مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌چنین ونکومایسین خوراکی که به میزان بسیار کمی جذب می‌گردد، در درمان انتروکولیت کلستریدیوم دیفیسیل به کار می‌رود(۵). نخستین سویه مقاوم به ونکومایسین در *E. faecalis* و *E. faecium* در سال ۱۹۸۸ در انگلستان گزارش شد. کمی پس از نخستین گزارش، ایزوله‌های VRE[1] توسط محققین در بریتانیا و فرانسه و هم‌چنین سویه‌های مشابهی نیز در بیمارستان‌هایی در غرب ایالات متحده جداسازی و تشخیص داده شدند. به دنبال آن انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین با سرعتی غیر قابل پیش‌بینی گسترش پیدا کردند و در بسیاری از بیمارستان‌ها و مناطق دنیا مواجهه با آن‌ها هم‌چنان وجود دارد(۱۰). مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتروکوک‌ها نسبت به گلیکوپپتیدها یک تهدید جهانی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود. این امر به این دلیل است که آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی مثل ونکومایسین و تیکوپلانین، داروهای انتخابی و اغلب اوقات آخرین گزینه برای درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از باکترهای گرم مثبت با مقاومت چندگانه می‌باشند(۲،۵،۱۰) مطالعات انجام شده در ایران نیز نشان می‌دهد که عفونت‌های انتروکوکی در بیمارستان‌های تهران حالت اندمیک دارد(۱۱). واین عامل خود نقش مهمی در عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود(۱۱،۱۲) با توجه به این موضوع و اهمیت مقاومت انتروکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و امکان انتقال ژن‌های مقاوم به گلیکوپپتید به سایر باکتری‌ها، و نظر به این که اطلاعات کافی در مورد میزان انتروکوک جدا شده از نمونه‌های بالینی موجود در بیمارستان‌های آموزشی درمانی هاجر و کاشانی شهرکرد و خصوصیات ژنوتیپی آن‌ها در این مراکز درمانی در دست نمی‌باشد، لذا در این پژوهش به بررسی فنوتیپی وژنوتیپی مقاومت VanA و VanB و اثبات وجود ژن‌های فوق بااستفاده از تکنیک‌های مولکولی وهم‌چنین بررسی میزان هماهنگی بین خصوصیات فنوتیپی وژنوتیپی در دسته جات ژنی جدا شده از نمونه‌های بالینی که به ونکومایسین مقاوم بودند پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه‌ها

این‌مطالعه بر روی ۱۵۰ سویه‌ی انتروکوک جمع‌آوری شده طی اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ تا شهریور ماه ۱۳۹۳ که از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی درمانی کاشانی و هاجر شهرکرد و کلینیک تخصصی امام علی(ع) تهیه شده بود، انجام گرفت. این نمونه‌ها از لحاظ مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی متداول از جمله هیدرولیز اسکولین در حضور صفر، رشد در حضور ۶/۵ درصد NaCl و فعالیت پیرولیدونیل آریل آمیداز (PYR) تعیین هویت شدند. برای تعیین گونه از آزمون تخمیر قند (آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز و...) در لوله‌های

1. Vancomycin-Resistant *Enterococci*

حاوی محیط پایه قند به نسبت ۱ درصد از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد(۱۳).

انجام آنتی بیوگرام با استفاده از روش انتشار از دیسک

آنتی‌بیوگرام این سویه ها به روش انتشار از دیسک[1] با تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی در محیط کشت مولرهینتون آگارشرکت MERK آلمان در این آزمایش استفاده شد(۱۴). دیسک‌های مورد استفاده شامل تتراسیکلین(۳۰µg)، ونکومایسین(۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، جنتامایسین (۱۰µg) و تیکوپلانین (۳۰µg) بودند که از شرکت MAST انگلستان تهیه گردید.

بررسی مقاومت به روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده[2]

سویه‌هایی که دارای قطر هاله ≤ ۱۴ میلی‌لیتر برای آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و تیکوپلانین بودند، جهت تعیین MIC انتخاب شدند. تعیین MIC به روش براث میکرودایلوشن با استفاده از محیط مولرهینتون براث انجام شد. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت نهایی $۵*۱۰^{۶}$ CFU/ml تهیه،سپس این سوسپانسیون به میزان ۱/۱۰۰با استفاده از محیط مولرهینتون براث رقیق گشت. استوک آنتی‌بیوتیک ونکومایسین باغلظت ۱۰µg/ml تهیه گردید و رقت‌های آنتی‌بیوتیکی با استفاده از پودر خالص ونکومایسین (تهیه شده از شرکت SERVA) انجام شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با رقت ۱/۱۰۰ تهیه شده از استوک به همراه غلظت‌های آنتی‌بیوتیک به میکروپلیت‌ها اضافه شد و بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، MIC سویه‌ها تعیین گردید. کم‌ترین غلظت آنتی‌بیوتیک که در حضور آن رشد صورت نگرفته بود به عنوان MIC مشخص شد(۱۶-۱۴). برای تعیین MIC سویه‌های حساس از *E.faecalis* ATCC=29212 به عنوان کنترل منفی و برای تعیین سویه‌های مقاوم از *E.faecium* BM 4147 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۱۸،۱۷).

استخراج و تخلیص DNA

تمامی سویه‌هایی که کم‌ترین میزان غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک ونکومایسین برای آن‌ها MIC ≥ ۶ µg/ml بود جهت انجام آزمون PCR در نظر گرفته شدند. جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی جنس و هم چنین گونه‌های مختلف انتروکوکوس و ژن‌های مقاومت به ونکومایسین، استخراج DNA به روش Boiling انجام گرفت(۷). بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS استریل ورتکس شده به مدت ۱۵دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به همراه مواد زیر به عنوان Master Mix جهت انجام آزمون PCR استفاده شد: ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰ x)، ۱میکرولیتر $Mgcl_2$، ۰/۵ میکرولیتر Mixed dNTP، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر F ژن VanA، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر F ژن VanB، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر R ژن VanB، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرR ژن VanA،۳ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۱۴/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۰/۱ میکرولیتر DNA Taq واکنش PCR باحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از پرایمرها ی موجود در جدول شماره ۱ (۷) و برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر (germany,Mastercycler Eppendorf, Hamburg) انجام شد(۷). شرایط بهینه PCR برای هر دو ژن vanB و vanA شامل Denaturation اولیه با دمای ۹۵درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، Annealing با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و Extension با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک

1. diffusion Disk
2. Minimum Inhibitory Concentration

دقیقه می‌باشد. مرحله Extension نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به منظور تجزیه تحلیل آماری داده‌ها از نسخه بیستم نرم‌افزار SPSS وآزمون مجذور کای استفاده شد.

جدول شماره ۱: ویژگی پرایمرهای مورداستفاده درواکنش PCR

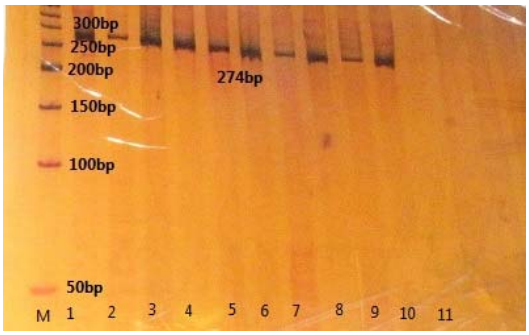
پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول
VanA(F)	GAAAATGTGCGAAAAACCTTG	۲۷۴bp
VanA(R)	CGCAACGATGTATGTCAACG	۲۷۴bp
VanB(F)	GGAGGATGGTGCGATACAG	۲۶۹bp
VanB(R)	CAGCGTTTAGTTCTTCCGTAC	۲۶۹bp

یافته ها

در این بررسی از بین ۱۵۰ انتروکوک، به مطالعه ۱۰ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین جداشده از نمونه‌های بالینی دو بیمارستان هاجر و کاشانی شهرکرد در سال ۱۳۹۳ پرداخته شد. دراین مطالعه ۷۴ درصد سویه‌ها از ادرار، ۱۵ درصد نمونه‌ها از خون و ۱۱ درصد سویه‌ها از نمونه زخم جدا شدند. هم‌چنین از ۱۱۰ سویه انتروکوک، ۱۰ سویه‌ی انتروکوک دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین (VRE) شناسایی شدند، که این نمونه‌ها از بیماران بستری در بخش‌های ICU (۵ مورد)، پیوند کلیه (۱مورد)، عفونی زنان (۱مورد)، عفونی مردان (۲مورد)، دیالیز (۱مورد) جمع‌آوری شده بودند.از ۱۵۰ ایزوله مورد بررسی ۱۰ سویه مقاوم بررسی شدند، که از میان ۱۰ سویه مقاوم مورد بررسی بعد از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد بررسی ۷ مورد *E.faecium* و ۳ مورد *E.faecalis* شناسایی شدند. بیش‌ترین مقاومت در تمامی سویه‌ها به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۰۰ درصد) اریترومایسین (۶۵ درصد)، تتراسایکلین(۷۰ درصد) و جنتامایسین (۶۰ درصد) گزارش گردید. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، از بین ۱۰ سویه (۶/۶ درصد) انتروکوک مقاوم به ونکومایسین، ۷ سویه (۰/۷ درصد) از ایزوله‌های مورد بررسی دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین (MIC > ۳۸۴ µg/ml)بوده‌اند، و به خوبی در اطراف دیسک ونکومایسین ۳۰µg رشد کردند. براساس نتایج آنتی‌بیوگرام و MIC آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و تیکوپلانین، ۸ سویه دارای فنوتیپ VanA (مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانین) و ۲ سویه دارای فنوتیپ VanB (مقاوم به ونکومایسین و حساس به تیکوپلانین) بودند. هم‌چنین دو سویه انتروکوکی که دارای فنوتیپ VanB بودند، دارای قطرهاله ۱۵ میلی‌متر برای دیسک تیکوپلانین ۳۰µg بودند. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص گردید، که ارتباط معنی داری بین گونه‌های انتروکوک و ژن مقاوم وجود ندارد (p>۰/۰۵). ژن VanA با پرایمر اختصاصی و توسط PCR در ۱۰ سویه (۶/۶ درصد) مورد شناسایی قرار گرفتند. اندازه قطعه تکثیر شده با این پرایمرها ۲۷۴ bp بوده که این قطعه معادل قطعه تکثیر شده *E.faecium* BM4147 می‌باشد. در ۲ سویه با خصوصیات فنوتیپی VanB، ژن VanB با پرایمرهای اختصاصی آن با اندازه ۲۶۶ bp شناسایی گردید که با قطعه تکثیرشده از سویه *E.faecalis* V 583 مشابه بوده است. در ۲ سویه از ۱۰ سویه با فنوتیپ VanA، هر دو ژن *vanA* و *vanB* قابل شناسایی بودند.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک ونکومایسین در بین ۱۰ سویه جدا شده مقاوم به این آنتی بیوتیک

گونه باکتری	MIC(میکروگرم بر میلی لیتر)			
	۶-۲۴ mg/ml	۴۸-۳۸۴ mg/ml	۷۶۸-۱۵۳۶ mg/ml	>۱۵۳۶ mg/ml
E.faecium	۰	۰	۱	۱
E.faecalis	۱	۲	۲	۳
تعداد کل	۱	۲	۳	۴

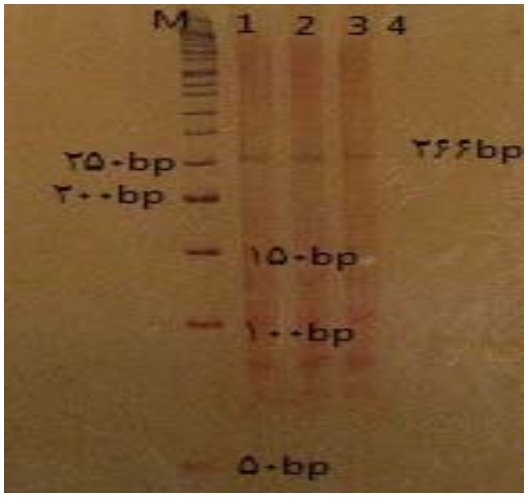


تصویر شماره ۱: محصولات PCR حاصل از ژن VanA ستون M مارکر با وزن ۵۰bp

ستون ۱: کنترل مثبت *E.faecium* BM 4147

ستون ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ و ۹ و ۱۰: سویه‌های دارای ژن VanA

ستون۱۱:کنترل منفی



تصویر شماره ۲: محصولات PCR حاصل از دو ژن VanB
ستون M :مارکر باوزن ۵۰bp
ستون ۱: کنترل مثبت *E.faecalis* V 583
ستون ۲ و ۳:سویه های دارای ژنVanB
ستون ۴:کنترل منفی

سپس محصولات در ژل آگارز ۰/۰۸ الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره ژل پلی اکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه به منظور تایید روش PCR یکی از نمونه‌هایی که محصول PCR آن‌ها در محل موردنظر یعنی در موقعیتی با طول bp ۲۶۹ و bp ۲۷۴ روی ژل قرار گرفته بودند، تعیین توالی شدند. ۵۱µl از محصول PCR نمونه مورد نظر با استفاده از سیستم XL ABI 3731 (Capilary System) تعیین توالی شد. با استفاده از نرم افزار Chromas ۲۳۳ سکانس مورد نظر بررسی گردید، که با توالی VanA در کنترل مثبت (انتروکوک فسیوم) مطابقت داشت.

بحث

از دو دهه گذشته تاکنون افزایش شیوع عفونت‌های انتروکوکی، در کنار افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکلات زیادی را در سیستم بهداشت و درمان کشورها ایجاد نموده است(۱۹). در مطالعه حاضر بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپرو فلوکساسین (۱۰ درصد)، اریترومایسین (۹۶/۸ درصد) و جنتامایسین (۸۷ درصد) گزارش گردید. مقاومت بالای به دست آمده در سویه‌های مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های با نتایج حاصل از مطالعات قبلی مطابقت دارد(۲۰). تنها افزایش قابل توجهی (در حدود ۵۰ درصد) در مقاومت به تتراساکلین در این مطالعه، نسبت به سایر مطالعات گذشته در ایران مشاهده شده است(۲۱،۲۰). در بین نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده، *E. faecalis* از شیوع بسیار بالاتری نسبت به *E. faecium* و سایر گونه‌ها برخوردار است. دلیل این امر دقیقاً مشخص نیست. اما می‌توان این گونه استدلال کرد که غالب بودن *E. faecalis* در فلور نرمال دستگاه گوارش در مقایسه با سایر گونه‌ها و تعداد مجهز بودن آن‌ها به انواع متنوعی از فاکتورهای ویرولانس نسبت به سایر گونه‌های انتروکوک تا حدی توجیه‌کننده شیوع گسترده‌تر آن نسبت به سایر انتروکوک‌ها می‌باشد(۲۰). در مطالعه حاضر مانند مطالعه فیض آبادی و همکاران بیش‌تر سویه‌های انتروکوکی از نمونه‌های ادرار جداسازی گردید. این مساله اهمیت استقرار انتروکوک‌ها را در مجاری ادراری نشان می‌دهد. انتروکوک‌ها اولین عامل عفونت در میان کوکسی‌های گرم مثبت عفونت‌زا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری ادراری زنان در ایران پس از اشریشیا کلی و کلبسیلا نومونیه می‌باشند(۲۱). بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز از ۱۰ سویه مقاوم به ونکومایسین، ۸ ایزوله فنوتیپ vanA و دو ایزوله دارای فنوتیپ vanB بودند. در مطالعه انجام شده روی انتروکوک‌های جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی تهران، ۸۴ درصد سویه‌های مورد بررسی شامل فنوتیپ vanA بوده‌اند(۱۹). هم چنین غالب بودن ژن vanA در داخل و خارج از ایران هم خوانی دارد(۲۲). دلیل این امر را می‌توان به قابلیت بالای این ژن در انتقال به کمک ترانسپوزون مربوطه نسبت داد. در مطالعه طالبی تمامی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین حاوی ژن vanA بوده‌اند(۲۳). اما در مطالعه‌ای انجام گرفته در استرالیا نشان می دهد که تمامی سویه‌های مقاوم دارای ژنوتایپ

vanB بودند(۲۴). از طرفی مطالعات انجام شده در نقاط مختلف، نشان داده که فنو تیپ vanA نسبت به vanB بسیار شایع‌تر می‌باشد(۱۹). هم‌چنین در مطالعه حاضر بررسی حضور ژن‌های مرتبط با vanA و vanB توسط PCR نشان داد که تمام ۱۰ سویه با خصوصیات vanAدارای ژن vanA بودند (۱۰۰ درصد). وجود ژن vanB نیز در دو ایزوله توسط PCR تأیید گردید. هم چنین در چهار سویه از ۱۰سویه‌ی مقاوم به ونکومایسین که دارای خصوصیات فنوتیپی ژن vanA بودند، وجود هر دو ژن vanB و vanA تایید شده است. بنابراین ژن vanB در چهار سویه (دو سویه با فنوتیپ vanB و دو سویه با فنوتیپ vanA) مورد شناسایی قرارگرفت. طبق مطالعات انجام شده درجهان حضور همزمان هر دو ژن vanA و vanB در انتروکوک‌ها، در آمریکا، انگلستان و کره نیز گزارش گردیده است(۲۶،۲۵). در مطالعه انجام شده طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۳ در شیکاگو نشان می‌دهد که ۶۹ درصد از بیماران دارای عفونت با سویه‌های *E.faecium* با ژنوتیپ vanB بوده‌اند. در سال ۱۹۹۳ یک سویه *E.faecium* با Multiplex PCR وجود هر دو ژن vanA و vanB را نشان داده است(۲۵). مطالعات مشابهی در انگلستان(۲۶) و در کره در بین انتروکوک‌های جدا شده از بیماران انجام گرفته است. نتایج به دست آمده از هر یک از این دو تحقیق نشان می‌دهد که اکثر سویه‌های جدا شده به طور همزمان دارای هر دو ژن بوده و تنها یک سویه دارای فنوتیپ vanB بوده است. به نظر می‌رسد، ایزوله‌هایی که هر دو ژن vanB و vanA را دارند، سویه‌های حد واسطی هستند که از ابتدا دارای یکی از ژن‌های مقاومت بوده و پلاسمید حاوی ژن دیگر را از سایر سویه‌ها دریافت کرده و به مرور زمان پلاسمید اولیه خود را از دست داده‌اند(۲۶). در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که از آن‌جایی که انتروکوک‌ها به صورت ذاتی و اکتسابی به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند، انجام تست آنتی‌بیوگرام ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر استفاده بالینی در صنعت، کشاورزی و دامپروری نقش مهمی در کاهش مقاومت باکتریایی دارد. هم‌چنین با توجه به شیوع بالای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در بیماران بستری شده ارزیابی بیش‌تری در رابطه با چگونگی فراوانی این سویه‌ها در محیط بیمارستان و کادر درمانی احساس می‌شود.

References

1. Hayes JR, McIntosh AC, Qaiyumi S, Johnson JA, English LL, Carr LE, et al. High-frequency recovery of quinupristin-dalfopristin-resistant Enterococcus faecium isolates from the poultry production environment. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2298-2299.
2. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13(4): 513-522.
3. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothaki V. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother 2000; 45(3): 277-283.
4. Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE. Vancomycin-resistant Enterococcus spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. Appl Environ Microbiol 2001; 67(10): 4930-4933.
5. Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. Appl Environ Microbiol 2002; 68(6): 2838-2842.
6. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the

environment in different European regions. Appl Environ Microbiol 2005; 71(9): 5383-5390.

7. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J 2007; 11(3): 161-167.
8. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kühn I, Möllby I, Eshraghi S, et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococcal Species in Sewage Treatment Plants in Iran. Water Air Soil Pollut 2007; 185(1-4): 111-119.
9. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Mollby R. Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates. Curr Microbiol 2008; 56(5): 468-473.
10. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13(4): 686-707.
11. Wood AJJ. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. N Eng J Med 2000; 342: 710-721.
12. Flores RM, Ross TW. Vancomycin-Resistant Enterococci: Approach to Treatment and Control. Cancer Control 1996; 3(1): 66-72.
13. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Appl Environ Microbiol 1999; 65(10): 4425-2230.
14. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. Journal of Medical Microbiology 2007; 56(12): 1581-1588.
15. Mendez AS, Hernaadez XP, C MF. Glycopeptide resistance in Enterococci. Int Microbiol 2009; 3: 71-80.
16. Torres Viera C, Tsiodras S, Gold HS, Coakley EP, Wennersten C, Eliopoulos GM, et al. Restoration of vancomycin susceptibility in Enterococcus faecalis by antiresistance determinant gene transfer. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(3): 973-975.
17. Arthur M, Quintiliani R Jr. Regulation of VanA-and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(2): 375-381.
18. Jung WK, Hong SK, Lim JY, Lim SK, Kwon NH, Kim JM, et al. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized humans and from poultry in Korea. FEMS Microbiol Lett 2006; 260(2): 193-200.
19. Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptideresistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. Current Opinion in Infectious Dseases 2007; 20(4): 384-390.
20. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. J Bacteriol 1993; 175(1): 117-127.
21. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from hospitals in Tehran. Polish Journal of Microbiology 2008; 57(2): 173-178.
22. Ahmadi A, Soltan Dallal MM, Pourshafie MR. Molecular study of *Van* genes in vancomycin resistant *Enterococci* isolated from wastewater in Tehran, Iran. J Ilam Uni Med Sci 2006; 14(3):1-7 (Persian).
23. Mansour A, Manijeh M, Zohreh P. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jundishapur Journal of

Microbiology 2009; 2009(3): 118-123.
24. Pourakbari B, Aghdam MK, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sabouni F, Movahedi Z, et al. High frequency of vancomycin-resistant enterococcus faecalis in an Iranian referral children medical hospital. Maedica (Buchar) 2012; 7(3): 201-204.
25. Kim WJ, Weinstein RA, Hayden MK. The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 6-year period. J Infect Dis 1999; 179(1): 163-171.
26. Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, Cookson BD. Strains of glycopeptide-resistant Enterococcus faecium can alter their van genotypes during an outbreak J Clin Microbiol 1997; 35(11): 2966-2968.