

بررسی فراوانی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن های VanA و VanB در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان الزهرا (س) اصفهان در سال ۱۳۹۰

مهرداد نیکوئی^{۱،۲}، محسن میدانی^{۳*}، فرزین خوروش^۳، مهرداد کریمی^۴، پویا پارسائی^۵

^۱دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۴دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۵باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: انتروکوک ها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان می باشند، ولی تحت شرایطی می توانند باعث عفونت شوند و نقش مهمی در پخش ژن های مقاومت و ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک دارند. با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک وانکومایسین، انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین (VRE) یکی از پاتوژن های شایع بیمارستانی در سراسر دنیا هستند. این مطالعه با هدف بررسی شیوع و فراوانی ژن های مقاومت در سطح فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، پس از جداسازی و تشخیص ۱۶۵ سویه انتروکوک از نمونه های بالینی بخش های مختلف بیمارستان الزهرا (س) اصفهان در سال ۱۳۹۰ و انجام تست های تأییدی، انتروکوک ها از نظر مقاومت به وانکومایسین با روش انتشار دیسک و همچنین آزمون E-test مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین با استفاده از روش Real Time-PCR از لحاظ وجود ژن های مقاوم به وانکومایسین VanA و VanB مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد از میان ۱۶۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده از نمونه های بالینی (۷۹/۴۸٪) انتروکوک با روش انتشار دیسک به وانکومایسین مقاوم بودند، اما با روش E-test فقط ۴۰ (۲۵٪) انتروکوک دارای مقاومت سطح بالا به وانکومایسین بودند. با روش Real time-PCR از ۴۰ نمونه مورد نظر ۳۷ مورد (۹۲/۵٪) حاوی ژن Van A و ۳ مورد (۷/۵٪) حاوی ژن Van B بودند.

نتیجه گیری: براساس نتایج به دست آمده، تعداد سویه های جدا شده دارای ژن VanA بیشتر از سویه های جدا شده دارای ژن VanB در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان می باشد. روش ژنوتیپی Real time-PCR دارای اختصاصیت بالا نسبت به روش های فنوتیپی انتشار دیسک و E-TEST را می باشد.

واژه های کلیدی: انتروکوک، عفونت های بیمارستانی، وانکومایسین، مقاومت، Van A، Van B.

مقدمه:

و میزان عفونت های بیمارستانی ناشی از آن در بین سال های ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۸، ۲۰ برابر شده است (۲،۱). کلونیزه شدن بیماران با VRE می تواند منجر به بیماری های جدی مانند عفونت های دستگاه ادراری باکتری، آندوکاردیت و غیره گردد که در بسیاری از موارد مثل عفونت خون ناشی از VRE می تواند منجر به مرگ شوند. مطالعات گوناگون نشانگر این مسأله

انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین (Vancomycin Resistance Enterococcus=VRE) یکی از پاتوژن های شایع بیمارستانی در سراسر دنیا هستند (۱). VRE نخستین بار در دهه ۱۹۸۰ و سال ۱۹۸۶ در اروپا و سپس در ایالات متحده آمریکا مشاهده گردید (۲). در ایالات متحده پس از مشاهده VRE در سال ۱۹۹۸ شیوع آن افزایش چشمگیری پیدا کرده است

زیاد، استفاده از دستگاه ترموسایکلر گران قیمت و روش های آشکارسازی و تشخیص محصول و به همین دلیل امکان استفاده در آزمایشگاه های سیار ندارد.

روش جدید تکثیر DNA به وسیله Real time PCR روش ساده با کارایی بالا است که فاقد این محدودیت ها است و دارای مزایای زیر می باشد: فرآیند به نحوی است که امکان آلودگی بسیار کمتر است، تحت تأثیر تکثیرهای غیر اختصاصی قرار نمی گیرد، خیلی سریع بوده و از ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت نتایج قابل ارائه می باشد، محدوده وسیعی از توالی هدف را می تواند تشخیص دهد (از یک کپی تا ۱۰ کپی)، در مقایسه با PCR معمولی احتیاج به ۱۰۰ برابر DNA کمتر برای واکنش دارد تقریباً معادل ۳ پیکوگرم که معادل یک ژنوم است، تأیید تکثیرهای اختصاص به وسیله آنالیز Real time PCR، Melting curve تکثیر هدف (target) را در فاز لگاریتمی تشخیص می دهد ولی PCR معمولی تکثیر target را در فاز Plateau یا مسطح بعد از پایان PCR نمایش می دهد (۱۲).

گلیکوپتید وانکومایسین داروی مهمی است که به جای پنی سیلین همراه با آمینوگلیکوزیدها در درمان عفونت های انتروکوکوی تجویز می شود. در ایالات متحده انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین در حال افزایش هستند. اینگونه انتروکوک ها به وانکومایسین همراه با آمینوگلیکوزید حساس نمی باشند. مقاومت انتروکوک فاسیوم به وانکومایسین شایع ترین آن ها می باشد و مقاومت به وانکومایسین همچنین در برخی از نژادهای انتروکوک فکالیس مشاهده می شود (۱۳، ۱۴). به دلیل عدم وجود درمان های مؤثر آنتی بیوتیکی دیگر برای عفونت های ناشی از VRE کاستن از عفونت با این ارگانسیم جزء مهمی در کنترل مورتالیتی و موربیدیتی ناشی از VRE است (۱۳). با افزایش شیوع VRE در جوامع مختلف و عدم بررسی میزان شیوع آن در بیمارستان الزهرا^(س) اصفهان و نیز اهمیت شیوع VRE به عنوان یک شاخص بهداشتی برای بررسی کنترل عفونت در بیمارستان بر آن شدیم طی مطالعه حاضر میزان

است که تجویز ابتدایی وانکومایسین به ویژه در بیماران مبتلا به عفونت بیمارستانی می تواند باعث شیوع VRE شود و به آسانی از بیماری به بیمار دیگر منتقل شود. VRE به مدت طولانی بر روی دست ها، دستکش ها و سطوح باقی می ماند و سطوح باید به عنوان یک منبع بالقوه VRE در بیمارستان در نظر گرفته شوند. بروز مقاومت در انتروکوک ها نسبت به وانکومایسین که باعث بروز عفونت های خطرناک بالینی می شود اهمیت ویژه ای دارد زیرا وانکومایسین به طور گسترده ای به عنوان داروی جانسین برای درمان عفونت با میکروارگانسیم های گرم مثبت مقاوم به آنتی بیوتیک به کار می رود (۳).

اگرچه ۱۲ گونه از جنس *Enterococcus* شناخته شده ولی بیشتر گونه های آن *E. faecalis* و *E. faecium* می باشد. *E. faecium* به طور غالب مقاومت بیشتری نسبت به *E. faecalis* دارد و پیدایش مقاومت به وانکومایسین سبب افزایش این گونه می شود (۴). استفاده بیش از اندازه از آنتی بیوتیک ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوکوس برای کسب و انتشار عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی و انتقال ژن های مقاومت بین این میکروارگانسیم ها و یا سایر گونه ها، درمان بیماری های ناشی از آن را به مشکلی جدی تبدیل نموده است (۵). در انتروکوک ها مقاومت به گلیکوپتیدها به وسیله خوشه ژنی شامل ژن های VanA، VanB، VanC، VanD، VanE، یا VanG می باشد که ژنوتایپ VanA از بقیه مهمتر است (۶-۹). ژنوتایپ VanA نوع غالبی از ژنوتایپ مقاومت در اروپا گزارش شده است. سویه های با ژنوتایپ VanA نسبت به آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تیکوپلانتین مقاومند و این ژن ها را از طریق پلاسمیدهای کانژوگتیو به دیگر سویه های پاتوژن مانند methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* انتقال می دهد (۱۰، ۱۱).

روش PCR روش سریع و حساس است اما دارای محدودیت نیز می باشد. مانند چرخه های حرارتی

فراوانی نسبی انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین را بررسی کنیم.

روش بررسی:

در این مطالعه که از نوع توصیفی - مقطعی می باشد در طول مدت یک سال (در سال ۱۳۹۰) نمونه های بالینی بیمارستان الزهرا^(س) اصفهان شامل خون، ادرار، خلط و زخم همراه با اطلاعات بیمار شامل جنس، سن و بستری یا سرپایی بودن جمع آوری شد.

در این بررسی ۴۰ (۲۵٪) سویه انتروکوک مقاوم به وانکومایسین از بین ۱۶۵ سویه انتروکوک جدا شده از بیمارستان الزهرا^(س) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه های مثبت با رنگ آمیزی گرم، با انجام تست های کاتالاز، حساسیت به باسیتراسین، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵٪، تست هیدرولیز ال- پیرولیدونیل- بتا- نفتیل آمید (PYR)، تست هیدرولیز بایل اسکولین آگار تعیین هویت شدند.

برای تعیین گونه انتروکوکوس ها از توانایی گونه های مختلف در مصرف آراینوز و سوریتول در محیط نیمه جامد OF و همچنین تولید رنگدانه (pigment) در محیط BHI آگار (Brain Heart Infusion agar) استفاده شد (۱۵). برای غربالگری اولیه با روش انتشار دیسک، مقاومت انتروکوک ها نسبت به دیسک های ۳۰ میکروگرمی وانکومایسین (که از شرکت Mast، UK تهیه شده بود) بررسی شد. در مرحله بعد انتروکوک هائی که برای آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تیکوپلانین دارای قطر هاله ≤ 16 میلی متر بودند، برای آنتی بیوتیک وانکومایسین، تعیین حداقل غلظت مهار کننده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) به روش E-Test بر اساس کمیته استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گرفت و نتایج بر اساس دستورالعمل استانداردهای CLSI حداقل غلظت مهارتی آنتی بیوتیک وانکومایسین بیشتر از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر مقاوم، حداقل غلظت مهارتی ۱۲-۶ میکروگرم در میلی لیتر حد واسط، حداقل

غلظت مهارتی کمتر از ۴ میکروگرم در میلی لیتر حساس تفسیر گردید (۱۶).

تمامی سویه هایی که کمترین میزان غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک وانکومایسین برای آن ها $MIC \geq 32 \mu g/ml$ بود، برای انجام آزمون PCR در نظر گرفته شدند.

جهت استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده گردید. به منظور استخراج DNA از کلنی باکتری در روش جوشاندن مقداری از کلنی ها به آرامی از سطح محیط کشت ۲۴ ساعته بلاد آگار به درون لوله های اپندورف منتقل گردید. با توجه به اینکه محیط کشت بلاد آگار حاوی خون و هسته پورفیرین می باشد و این مواد در مراحل استخراج DNA و انجام PCR می توانند به عنوان بازدارنده عمل کنند، از این رو قبل از استخراج DNA ابتدا شستشوی کلنی ها با فسفات بافر سالین انجام شد. سپس آب دو بار تقطیر به آن ها اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. آنگاه تمام نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به لوله های اپندورف استریل منتقل شد. این محلول که حاوی قطعات DNA می باشد تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷).

برای انجام Real time PCR از دستگاه Rotor gene Q استفاده شد. مخلوط واکنش شامل $2 \mu l$ آب مقطر دوبار تقطیر، $2 \mu l$ PCR Buffer (10X)، $4 \mu l$ MgCl₂، $2 \mu l$ dNTP (10mm)، $2 \mu l$ از هر کدام از پرایمرها و پروب ها (۱۸) (جدول شماره ۱) و $2 \mu l$ TaqDNA polymerase (5unit) و $5 \mu l$ از DNA استخراج شده بود. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در ۵۰ چرخه با برنامه دمایی شامل ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. برنامه دمایی PCR برای هر دو ژن یکسان انتخاب شد. سویه های انتروکوککی استاندارد شامل، E. faecalis

می شود که عملیات احیای آن ها با کشت جداگانه هر یک در محیط نوترینت براث (Nutrient broth) و گرماگذاری آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید (۱۸).

PTCC 1394 و E. faecalis PTCC 1237 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای ژن های VanA و VanB مورد استفاده قرار گرفتند (تهیه شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران). سویه های استاندارد به شکل لیوفلیزه ارائه

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و پروپ های ژن VanA و VanB مورد استفاده (۱۸)

ژن	توالی پروپ (5'-3')	توالی پرایمر (5'-3')	طول	قطعه هدف (bp)
Van A	6-FAM-TGCACTTCCCGAACTG-BHQ1	Forward	TATGATGGCCGCTGCAGGTA	۱۶۳
		Reverse	CGGTGAAATTATCCCAAGTGGC	
Van B	6-FAM-TGAGCCACGGTATCTTC-BHQ1	Forward	GCCATGCAAAACCGGAAAG	۹۲
		Reverse	CAAGCGATTTCTGGGCTGTGA	

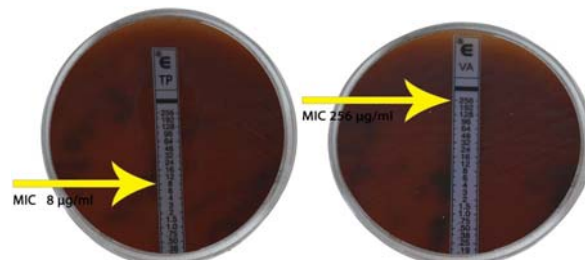
Van A: ژن وانکومایسین A؛ Van B: ژن وانکومایسین B

یافته ها:

ترتیب ۳،۵،۴ و ۲ نمونه بودند که تعداد ۳۴ عدد انتروکوکوس فاسیوم (۸۵٪)، ۴ عدد انتروکوکوس فکالیس (۱۰٪) و ۲ عدد انتروکوکوس گالیناروم (۵٪) بودند.

از بین ۴۰ انتروکوک دارای مقاومت بالا به وانکومایسین تعداد ۳۴ سویه (۸۵٪) با داشتن MIC وانکومایسین ($\geq 32 \mu\text{g/ml}$) و MIC تیکوپلانتین ($16-512 \mu\text{g/ml}$) دارای فنوتایپ VanA و تعداد ۶ سویه (۱۵٪) با داشتن MIC وانکومایسین ($4-512 \mu\text{g/ml}$) و MIC تیکوپلانتین ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) دارای فنوتیپ VanB می باشند (تصویر شماره ۱).

از میان ۱۶۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده، بیشترین ایزوله به ترتیب از ادرار (۶۵٪)، مایع مغزی نخاعی (۱۵٪)، خون (۱۲/۵۰٪) و برونش (۷/۵٪) بودند. از میان ۱۶۵ ایزوله انتروکوک جمع آوری شده از نمونه های بالینی ۴۸٪ (۷۹ نمونه) انتروکوک ها با روش انتشار دیسک به وانکومایسین مقاوم بودند، اما با روش E-test فقط ۲۵٪ (۴۰ نمونه) انتروکوک ها دارای مقاومت سطح بالا به وانکومایسین بودند. از ۴۰ سویه انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین، از بخش عفونی و اطفال هر بخش ۷ نمونه، جراحی و دیالیز هر بخش ۶ نمونه، نفرولوژی، سرپایی، پیوند کلیه و مراقبت ویژه به



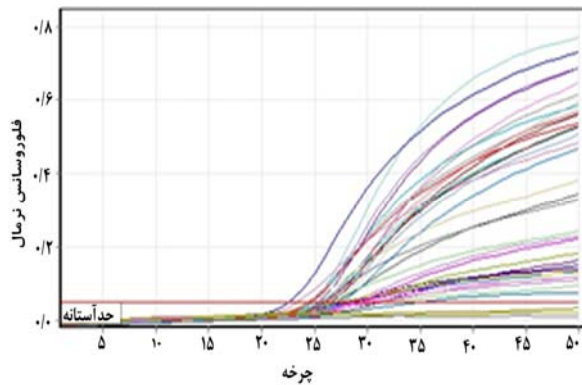
تصویر شماره ۱: تشخیص فنوتیپ سویه های انتروکوک با روش E-Test

(۷/۵٪) حاوی ژن Van B بودند (تصویر شماره ۲) و در روش E-test از ۴۰ نمونه ۳۴ مورد (۸۵٪) حاوی ژن

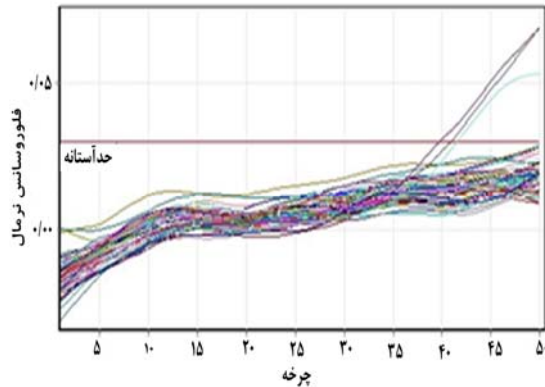
نتایج Real time PCR نشان داد از ۴۰ نمونه مورد نظر ۳۷ مورد (۹۲/۵٪) حاوی ژن Van A و ۳ مورد

Van A و ۶ مورد (۱۵٪) حاوی ژن Van B بودند، یعنی

حساسیت E-test در تشخیص Van A (۹۱/۹٪) می باشد.



ب



الف

تصویر شماره ۲: تشخیص ژنوتیپ سویه های انتروکوک با روش Real time-PCR

الف: ژن Van A، (■ کنترل مثبت، ■ کنترل منفی) ب: ژن Van B، (■ کنترل مثبت، ■ کنترل منفی). منحنی هایی که از حد آستانه (۰/۰۵) بالاتر آمده اند مربوط به نمونه هایی که نتیجه Real time-PCR برای آن ها مثبت محسوب می شود.

بحث:

پنی سیلین، آمپی سیلین گلیکوپتیدها و آمینوگلیکوزیدها از خود مقاومت نشان داده اند که این باعث محدودیت در استفاده از آنتی بیوتیک به عنوان درمان در این ایزوله ها شده است. بروز و پخش سویه های انتروکوک با سطح بالایی از مقاومت به گلیکوپتیدها به ویژه ونکومایسین در سراسر جهان گزارش شده است (۲۳). بنابراین با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارشی مبنی بر ناهمگونی های فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین (۲۴)، ما به بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی ۴۰ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین که از بیماران بیمارستان الزهرا^(س) اصفهان جدا شده اند، پرداختیم.

در این مطالعه از میان سویه های انتروکوک جدا شده از ۲۶۵ نمونه بیمارستانی ۴۰ (۱۵٪) سویه آن VRE بوده اند که از این تعداد سویه ۲۶ مورد از نمونه ادرار، ۶ مورد از نمونه مغز نخاعی، ۵ مورد از نمونه خون و دو مورد از نمونه برونش جدا شدند که از ۴۰ سویه تعداد، ۳۴ عدد انتروکوکوس فاسیوم (۸۵٪)، ۴ عدد انتروکوکوس فکالیس (۱۰٪)، ۲ عدد انتروکوکوس گالیناروم (۵٪) هر دو فوتایپ به طور مجزا ژن های Van A و Van B را

انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا هستند که می توانند منجر به بیماری های جدی مانند عفونت های ادراری، اندوکاردیت، باکتری می و ... شوند و میزان بروز عفونت های ناشی از VRE در تمام دنیا در حال افزایش است، به عنوان سومین باکتری که موجب شیوع عفونت بیمارستانی در جهان می شود شناخته می شوند (۱۰). VRE بیشتر در بیمارانی که باکتری انتروکوک در دستگاه گوارش آن ها کلنیزه شده اتفاق می افتد (۱۹). شیوع VRE در دو مطالعه در سال های ۸۵ و ۹۱ در بیمارستان های تهران انجام شده که بر طبق این مطالعات میزان شیوع در بیمارستان های تهران به ترتیب ۷٪ و ۱۶/۹٪ گزارش شده است (۲۰، ۲۱). در مطالعه ای که سال ۸۷ در بیمارستان های آموزشی اصفهان انجام شد، میزان شیوع VRE ۲۹/۳٪ گزارش شده است (۲۲). این نشان دهنده افزایش شیوع VRE می باشد.

بر اساس نتایج این مطالعه مهمترین سویه ها شامل انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می باشد، بسیاری از این ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک هایی مانند

ذکر شده می توانند به دلیل حجم نمونه، سن و جنس بیماران و همچنین روش تشخیص VRE در این مطالعات باشند.

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش از ۳۷ موردی که با روش Van A Real Time-PCR تشخیص داد شد، ۳۴ مورد (۹۱/۹٪) آن ها توسط E-test نیز Van A تشخیص داده شد یعنی حساسیت E-test در تشخیص Van A (۹۱/۹٪) می باشد. از ۳ موردی که Real Time PCR آن ها را Van A تشخیص داده بود E-test نیز هر ۳ مورد (۱۰۰٪) را نیز Van A تشخیص داده است؛ یعنی ویژگی (اختصاصیت) E-test برابر (۱۰۰٪) به دست آمد. در مورد تشخیص Van B بر عکس Van A حساسیت E-test برابر ۱۰۰٪ و ویژگی آن برابر (۹۱/۹٪) آن به دست آمد. در مطالعه تیمورنژاد و همکاران ویژگی (اختصاصیت) E-test در مورد تشخیص Van A (۱۰۰٪) و در مورد تشخیص Van B حساسیت E-test برابر ۱۰۰٪ و ویژگی آن برابر (۸۳٪) ذکر شده است (۲۶). این تفاوت به دلیل اختلاف روش شناسایی این دو روش است. به طوری که روش مولکولی در انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین یک روش سریع و دقیق است که تشخیص براساس توالی موجود در ژنوم باکتری که توسط پرایمرها و پروب های اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد برخلاف مطالعاتی که تاکنون انجام شده در تمامی جدایه ها با فنوتیپ های Van A و Van B ژن های مورد پیش بینی احتمال دارد وجود نداشته باشد و هماهنگی فنوتیپی و ژنوتیپی بین سویه ها موجود وجود نداشته باشد. نکته مهمی که در این مطالعه مشخص گردید، آسان تر، دقیق بودن و اختصاصیت بالا روش Realtime-PCR نسبت به سایر روش های فنوتیپی از جمله انتشار دیسک و E-test می باشد. انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین به دلیل پخش سریع، همراه بودن

داشتند. تمام انتروکوک های با مقاومت سطح بالا انتروکوک فاسیوم بودند. در این مطالعه مانند مطالعه جوادی و همکاران و مطالعه پور اکبری و همکاران هیچ ارتباطی میان جنسیت و سن با ابتلا به عفونت VRE وجود ندارد (۲۲،۲۵).

در مطالعه تیمورنژاد و همکاران از ۴۱۱ انتروکوک مورد مطالعه ۲۳ (۵/۶٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که تمامی ۲۳ انتروکوک مقاوم به وانکومایسین انتروکوک فاسیوم بودند؛ که از این تعداد، ۱۳ سویه (۵۶/۵٪) انتروکوک از ادار، ۸ (۳۴/۸٪) انتروکوک از خون و ۲ (۸/۷٪) انتروکوک از زخم جدا شده اند که سویه ها هر دو فنوتایپ Van A و Van B را داشتند (۲۶). همچنین در مطالعه دیگری در مورد شیوع VRE توسط شریفی و همکاران از ۲۲۰ انتروکوک مورد مطالعه ۴۳ (۱۳/۲٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که ۳۵ انتروکوک مقاوم به وانکومایسین، انتروکوک فاسیوم و ۸ مورد انتروکوک فکالین هستند که این تعداد سویه ۵ (۸۵/۵٪) از ادار، ۷ (۷/۷٪) از خون و ۱ (۴/۱٪) از مایعات بدن بودند که سویه ها هر دو فنوتایپ Van A و Van B را داشتند (۲۷). در مطالعه صادقی و همکاران از ۴۱۴ انتروکوک مورد مطالعه ۱۹ (۴/۶٪) انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین بودند و با تعیین گونه مشخص شد که تمامی ۱۹ VRE انتروکوک فاسیوم بوده اند؛ که این تعداد سویه ۱۷ (۸۹٪) انتروکوک از ادار، ۱ (۱۱٪) انتروکوک از خون و از دستگاه تنفسی جدا که همه سویه ها فنوتایپ Van A را داشته اند (۲۸).

مقایسه میزان شیوع VRE در بیشتر مطالعات مختلفی که ذکر گردید به خوبی نشان می دهد که شیوع VRE و نوع فنوتایپ آن در تمام این مطالعات با هم متفاوت بوده است. در تمام مطالعات عفونت های اداری در مقایسه با دیگر عفونت ها بیشترین مقدار عفونت های انتروکوک های مقاوم به وانکومایسین را شامل می شوند. تفاوت در میزان شیوع VRE در مطالعات

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمامی پرسنل مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خصوصاً آقای دکتر داریوش شگری، خانم دکتر پریسا شعاعی و خانم بهاره و کیلی برای همکاری صمیمانه آن ها کمال تشکر را داریم.

با عفونت ها و میزان مرگ و میر بالا، محدودیت داشتن برای درمان و امکان انتقال ژن های مقاومت به وانکومایسین به دیگر پاتوژن های بیماری زا و شایع تر مانند استافیلوکوک اورئوس، به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل شده است. از آنجایی که این مقاومت در بین سویه های باکتری روند افزایشی دارد احتیاط در استفاده از آنتی بیوتیک بسیار مهم بوده و انجام تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیک در مورد این عفونت ها ضروری به نظر می رسد.

منابع:

1. Paul A, Tambyah M, Jhon A, Dennis G. Nosocomial infection with vancomycin-dependent Enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(7): 1277-81.
2. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect.* 2008; 70(Suppl 2): 3-10.
3. Freitas MC, Pacheco-Silva A, Barbosa D, Silbert S, Sader H, Sesso R, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococcus fecal colonization among kidney transplant patients. *BMC Infect Dis.* 2006; 22(6): 133.
4. Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2): 183-7.
5. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram positive bacteria. *Am J Med.* 2006; 119(6): S11-S9.
6. Armeanu E, Bonten MJ. Control of vancomycin-resistant enterococci: one size fits all? *Clin Infect Dis.* 2005; 41(2): 210-6.
7. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* 1996; 4(10): 401-7.
8. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol.* 1999; 181(12): 3644-8.
9. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(11): 3224-8.
10. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.* 2003; 348(14): 1342-7.
11. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(8): 1049-55.
12. Honarm H, Falah Ghavidel M, Nikokar I, Rahbar Taromsari M. Evaluation of a PCR assay to detect enterococcus faecalis in blood and determine glycopeptides resistance genes: van a and van B. *Iran J Med Sci.* 2012; 37(3): 194-9.
13. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.* 2008; 128(2): 111-21.
14. Hayakawa K, Marchaim D, Vidailac C, Lephart P, Pogue JM, Sunkara B, et al. Growing prevalence of vancomycin-resistant enterococcus faecalis in the region with the highest prevalence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011; 32(9): 922-4.

15. 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): 161-7.
16. Modi GB, Soni ST, Patel KJ, Goswami HM, Vegad MM. Prevalence of vancomycin resistant enterococci in tertiary care hospital, western, India. *Int J Microbiol Res.* 2012; 4(2): 182-85.
17. Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(2): 293-6.
18. Arbour N, Weirich A, Cornejo-Palma D, Prevost S, Ramotar K, Harder CJ. Real-time PCR detection of VRE. *Spartan Bio sci.* 2008; 1(3): 203-15.
19. Kalocheritis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, et al. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among hemodialysis patients in Athens. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(6): 1031-4.
20. Fatholahzadeh B, Hashemi F, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani F, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant Enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. *Daru.* 2006; 14(3): 141-5.
21. Rafiei Tabatabaei S, Karimi A, Navidinia M, Fallah F, Tavakkoly Fard A, Rahbar M. A study on prevalence of vancomycin-resistant enterococci carriers admitted in a children hospital in Iran. *Ann Biol Res,* 2012; 3(12): 5441-45.
22. Javadi A, Ataei B, Khorvash F, Toghyani S, Mobasherzadeh S, Soghrati M. Prevalence of vancomycin resistant Enterococci colonization in gastrointestinal tract of hospitalized patients. *Iran J Clin Infect Dis.* 2008; 3(3): 137-41.
23. Sreeja S, Babu PRS, Prathab AG. The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res.* 2012; 6(9): 1486-8.
24. Ghoshal U, Garg A, Tiwari DP, Ayyagiri A. Emerging vancomycin resistance in Enterococci in India. *Indian J Pathol Microbiol.* 2006; 49(4): 620-2.
25. 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): 201-4.
26. Teymournejad O, Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in enterococcus spp. isolated from clinical samples. *J Fasa Univ Med Sci.* 2011; 2(1): 1-6.
27. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Soroush MH, et al. Vancomycin-resistant enterococci among clinical isolates from north-west Iran: identification of therapeutic surrogates. *J Med Microbiol.* 2012; 61(Pt 4): 600-2.
28. Sedaghat M, Rahimi F, Pourshafie MR, Talebi M. Studies of vancomycin resistant enterococcus faecium isolated from clinical samples in Tehran, Iran. *Curr Res Bacteriol.* 2012; 5(2): 53-8.

Evaluation of the frequency of phenotype and genotype of Van A and Van B genes in vancomycin resistant enterococcus isolated from clinical sample of Alzahra Hospitals in Isfahan

Nikooei M^{1,2}, Meidani M^{2*}, Khorvash F³, Karimi M⁴, Parsaei P⁵

¹Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. Iran; ²Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ³Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ⁴Department of Surgery, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; ⁵Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran

Received: 30/June/2013 Accepted: 3/June/2014

Background and aims: Enterococci are a part of the normal flora of the human gastrointestinal tract, and play an important role in the spread of resistance genes and produce antibiotic-resistant strains. With increasing the use of vancomycin antibiotics, Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are one of the major nosocomial pathogens in worldwide. The aim of this study was to investigate the frequency of phenotype and genotype of van genes in vancomycin resistant Enterococci.

Methods: In this cross-sectional descriptive study, after isolating and identifying 165 strains of enterococci from clinical specimens in different wards of Alzahra hospital, the enterococcus isolates were identified by biochemical confirmation tests. Resistance of each isolate to vancomycin determined by disk diffusion and E-Test method and was tested for the presence of the Van A and Van B genes by Real time PCR.

Results: The results of the 165 isolates of enterococci collected from clinical specimens showed 79 (48%) enterococcus was resistant by disk diffusion method to vancomycin, but using E-test, only 40 (25%) enterococci was resistant in high level to vancomycin. Real-time-PCR assay of 40 samples showed 37 patients (92/5%) included Van A gene and 3 (7/5%) with Van B gene.

Conclusion: Based on the results of the present study, the rate of isolation of Van A-containing strains was higher than that of Van B-containing of Alzahra Hospital in Isfahan. Real Time-PCR has a high specificity compared to other phenotypic methods E-Test and disk diffusion method.

Keywords: Enterococci, Nosocomial infections, Vancomycin, Resistance, Van A, Van B.

Cite this article as: Nikooei M, Meidani M, Khorvash F, Karimi M, Parsaei P. Evaluation of the frequency of phenotype and genotype of Van A and Van B genes in vancomycin resistant enterococcus isolated from clinical sample of Alzahra Hospitals in Isfahan. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(3): 61-69.

*Corresponding author:

Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran. Tel:00989132749165, E-mail: meidani@med.mui.ac.ir