



## بررسی فراوانی ژن های *vanA* و *vanB* در انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين جدا شده از نمونه های کلينيكي بیمارستان شهيد محمدی بندرعباس

زينب قلندرزاده دريایی<sup>۱</sup>، صديقه جواد پور<sup>۲\*</sup>، محمد کارگر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروپ شناسی، <sup>۲</sup> دانشيار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، <sup>۳</sup> دانشيار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروپ شناسی

### چکیده

**سابقه و هدف:** انتروکوک ها به صورت فلور نرمال در دستگاه گوارش انسان و بسیاری از پستانداران وجود دارند. امروزه افزایش شیوع انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين در بیمارستان های سراسر جهان یک مشکل مهم به شمار می آید. این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع سويه های انتروکوک، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و نیز تعیین مهم ترین ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومايسين (*vanA* و *vanB*) در نمونه های بالینی انجام شده است.

**مواد و روش ها:** این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۵۴ نمونه انتروکوک جمع آوری شده از نمونه های بالینی (ادرار، زخم، خون و مایع آسیت) بیماران بستری در بیمارستان شهيد محمدی بندرعباس انجام پذیرفت. به منظور شناسایی گونه های مختلف انتروکوک از کیت RapID STR System استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی به کمک روش دیسک دیفیوژن کربی-باثر و معیار CLSI مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری MIC ونکومايسين از روش E-Test و به منظور شناسایی ژن های *vanA* و *vanB* از تکنیک PCR چندگانه استفاده گردید.

**یافته ها:** از ۵۴ جدایه انتروکوک ۳۸ سويه (۷۰/۴۰٪) به گونه فیکالیس، ۱۰ سويه (۱۸/۵۰٪) به گونه فیسوم، ۳ سويه (۵/۵۵٪) به گونه هیرا و یک سويه (۱/۸۵٪) به هر کدام از گونه های موندتی، دورانس و آویوم تعلق داشتند. بیشترین مقاومت سويه های انتروکوک نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و سفالکسین و کمترین مقاومت را نسبت به لاینزولید نشان دادند. در مجموع ۲۴/۱۰٪ (۱۳ مورد) از سويه ها به ونکومايسين مقاوم بودند. ۶۹/۲۳٪ از سويه های مقاوم، دارای ژن *vanA*، ۱۵/۳۸٪ حاوی ژن *vanB* و ۱۵/۳۸٪ نیز هر دو ژن را داشتند.

**نتیجه گیری:** با توجه به فراوانی بالای سويه های انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، ضرورت کاربرد اقدامات کنترلی و پیشگیرانه وجود دارد. همچنین به منظور تجویز مناسب آنتی بیوتیک، انجام آزمون آنتی بیوگرام برای هر بیمار قبل از درمان پیشنهاد می گردد.

**واژگان کلیدی:** انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين، ژن *vanA*، ژن *vanB* E-test.

پذیرش: بهمن ماه ۱۳۹۱

دریافت مقاله: آذر ماه ۱۳۹۱

### مقدمه

منفرد مشاهده می شوند. این باکتری ها فلور طبیعی روده پرندگان، انسان و حیوانات هستند. همچنین می توانند در حفره دهان، روده و واژن انسان ها و محیط نیز زندگی کنند (۱). مطالعات نشان داده است که حدود ۹۰٪ از عفونت های انتروکوکسی در انسان توسط انتروکوکوس فیکالیس

انتروکوک ها (*Enterococcus*) باکتری های گرم مثبت تخمیری هستند که به صورت کوکسی های زنجیره ای و یا

(\* آدرس برای مکاتبه: بندرعباس، بلوار امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، گروه میکروپ شناسی  
تلفن: ۰۷۶۱-۶۶۸۹۶۲۴ پست الکترونیک: sedigheh.javadpour@yahoo.com

(۹). ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین شامل *vanA*، *vanB*، *vanC*، *vanD*، *vanE* و *vanG* می باشند (۱۰). اگرچه هر شش نوع مقاومت، به دلیل تغییر در ژن کد کننده عملکرد آنزیمی ایجاد می گردد، اما محل ژن و حالت های تنظیم بیان ژن در آنها متفاوت است (۱۱). اولین گزارش اتروکوک مقاوم به ونکومایسین مربوط به فنوتایپ VanA بوده است (۱۰ و ۱۲). از میان ژن های مقاومت به گلیکوپپتید در اتروکوک ها، ژن *vanA* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. این فنوتایپ که باعث مقاومت به سطح بالای ونکومایسین و تیکوپلانتین می شود، اغلب بر روی پلاسمید قرار داشته و از طریق ترانسپوزون Tn1546 منتقل می گردد. فنوتایپ *vanB* نیز عملکردی مشابه با *vanA* دارد. تنها تفاوت مربوط به نحوه تنظیم در آنها می باشد. اپرون *vanB* می تواند بر روی کروموزوم و یا پلاسمید قرار گیرد (۱ و ۱۰). مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهد که به جز ژن های *vanA* و *vanB* سایر ژن های ایجاد کننده مقاومت، فراوانی بسیار پایینی در ایران دارند (۱۳-۱۵). اتروکوک ها می توانند ژن مقاومت خود را به دیگر باکتری های بیماری زا نیز منتقل نمایند (۱۶ و ۱۷). هدف از این پژوهش ارزیابی شیوع سویه های اتروکوک، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و نیز تعیین مهم ترین ژن های ایجاد کننده مقاومت به ونکومایسین (*vanA* و *vanB*) در نمونه های بالینی بیمارستان شهید محمدی بندرعباس بود.

### مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها: این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۵۴ نمونه اتروکوک به دست آمده از نمونه های بالینی (ادرار، زخم، خون و مایع آسیت) بیماران بستری در بیمارستان شهید محمدی بندرعباس از مهر ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ماه ۱۳۹۱ پس از کسب موافقت کمیته اخلاق پزشکی انجام پذیرفت. در این پژوهش محدودیتی در مورد سن، جنس و علت بستری برای ورود به طرح وجود نداشت.

ب) شناسایی باکتری: در ابتدا تمامی نمونه ها بر روی محیط

(*Enterococcus faecalis*) و ۱۰٪ باقی مانده به وسیله اتروکوکوس فیسیوم (*Enterococcus faecium*) ایجاد می گردند (۲). این دو گونه اتروکوکی بیشتر در مواد غذایی مانند پنیر، ماهی، سوسیس و گوشت چرخ کرده گاو دیده می شوند (۳). بیماری زایی اتروکوک ها برای اولین بار در اواخر قرن ۱۹ توسط مکالموم (Maccallum) و هستینگ (Hasting) عنوان گردید (۴). در سال های اخیر گونه های اتروکوک به عنوان مهم ترین پاتوژن های بیمارستانی مطرح شده اند. بر اساس اطلاعات سیستم های مراقبتی عفونت های بیمارستانی در آمریکا، اتروکوک ها چهارمین عامل عفونت های بیمارستانی، سومین عامل عفونت های باکتری می و دومین عامل عفونت های ادراری می باشند (۵). اتروکوک ها به دلیل فقدان توکسین های قوی و عوامل بیماری زای قابل توجه، پتانسیل کمی در ایجاد بیماری دارند. با این وجود می توانند موجب بروز باکتری می، عفونت زخم های جراحی، عفونت دستگاه ادراری و اندوکاردیت شوند (۶ و ۷). افزایش روز افزون مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سراسر دنیا یک مشکل عمده بهداشتی محسوب می گردد. از طرفی عفونت های ایجاد شده به وسیله اتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک نیز جامعه پزشکی را با مشکل مواجه کرده است. مقاومت اتروکوک به عوامل ضد میکروبی به صورت ذاتی (مقاومت در سطح پایین به پنی سیلین، سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها) و یا اکتسابی (نسبت به گلیکوپپتیدها و غلظت های بالای آمینوگلیکوزیدها) می باشد (۵). آنتی بیوتیک ونکومایسین برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ به منظور درمان عفونت های استافیلوکوکی (*Staphylococcus*) ساخته شد. اما تا اواخر دهه ۱۹۷۰ که استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) مقاوم به متی سیلین شیوع یافت، مصرف عمده ای پیدا نکرد (۸). برای درمان عفونت های اتروکوکی، ونکومایسین برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ در موارد بالینی مورد استفاده قرار گرفت (۳). اتروکوک مقاوم به ونکومایسین ابتدا در سال ۱۹۸۶ در اروپا، در سال ۱۹۸۷ در آمریکا و سپس در سراسر دنیا مشاهده شد و اکنون نیز در حال افزایش است

۱۸/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (SensoQuest) با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردید. از انتروکوکوس فیسوم (BM4147) حاوی ژن *vanA* و از انتروکوکوس فیکالیس (V583) حاوی ژن *vanB* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همچنین از سویه انتروکوکوس فیکالیس (ATCC 29212) حساس به ونکومايسين به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آزمون مجذور کای استفاده شد. مرز معنی داری روی  $p < 0/05$  قرار داده شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای واکنش زنجیره پلی مرز

اندازه	توالی 5'→3'	نام پرایمر
۷۳۴	AATACTGTTTGGGGGTTGCTC	<i>Van A</i> (F)
	CTTTTCCGGCTCGACTTCCT	<i>Van A</i> (R)
۴۲۰	GCG GGG AGG ATG GTG CGA	<i>Van B</i> (F)
	GGA AGATACCGTGGCTCAAAC	<i>Van B</i> (R)

#### یافته ها

در مجموع نمونه های بالینی مورد بررسی در این مطالعه شامل ۷۷/۸۰٪ ارادار (۴۲ نمونه)، ۳/۷۰٪ مایع آسیت (۲ نمونه)، ۱/۸۵٪ از هر نمونه تراشه، زخم و خون (۱ نمونه) بودند. بخش داخلی با ۱۹ نمونه (۳۵/۱۸٪) به عنوان بیشترین بخش دارای نمونه انتروکوک شناسایی گردید و پس از آن به ترتیب بخش سرپایی با ۱۲ نمونه (۲۲/۲۲٪)، بخش نفرولوزی با ۷ نمونه (۱۳٪) و بخش سوختگی با ۵ نمونه (۹/۲۵٪) قرار داشتند. سایر بخش ها شامل مراقبت های ویژه با ۴ نمونه (۷/۴۰٪)، اورژانس

نوترینت آگار (Merck) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. کلنی ها با رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، بایل اسکولین آگار (Merck)، محیط TSB حاوی ۶/۵٪ نمک (Merck) و رشد در ۴۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی گونه های مختلف انتروکوک از کیت تشخیصی System (Remel) Rapid STR استفاده گردید.

ج) آزمون حساسیت آنتی بیوتیک: با استفاده از دیسک های ونکومايسين ۳۰ mg، آمپی سیلین ۱۰ mg، لاین زولید ۳۰ mg، ایمی پنم ۱۰ mg، تیکوپلانین ۳۰ mg تهیه شده از شرکت Mast و تری متوپریم (۱/۲۵) + سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵)، سفتری زوکسیم ۳۰ mg، جنتامایسین ۱۰ mg و سفالکسین ۳۰ mg تهیه شده از شرکت Himedia، روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هیتتون آگار (Mast) انجام شد. فنوتایپ مقاومت بر اساس دستوالعمل CLSI تعیین گردید. به منظور تعیین MIC ونکومايسين از نوار E-Test (Liofilchem) استفاده شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، حداقل غلظت مهاري قرائت گردید. حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر مقاوم، حداقل غلظت مهاري ۱۲-۶ میکروگرم در میلی لیتر حد واسط و حداقل غلظت مهاري کمتر از ۴ میکروگرم در میلی لیتر حساس تفسیر شد. در این مطالعه از سویه استاندارد انتروکوکوس فیکالیس (ATCC 29212) به عنوان کنترل استفاده گردید.

د) انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR): پس از جداسازی نمونه های مقاوم به ونکومايسين، استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت DIAtom DAN Prep 100 (ژن فناوری) انجام گرفت. به منظور شناسایی ژن های *vanA* و *vanB* از PCR چندگانه (Multiplex PCR) و پرایمرهای اختصاصی آنها استفاده گردید (جدول ۱) (۱۸).

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR،

میلی لیتر داشتند. سویه های مقاوم از نمونه های ادرار با فراوانی ۷۶/۹۳٪ (۱۰ مورد) و پس از آن از نمونه های زخم، آسیت و تراشه با فراوانی ۷/۶۹٪ (۱ مورد) جداسازی شدند.

جدول ۲: سویه های جداسازی شده از نمونه های بالینی

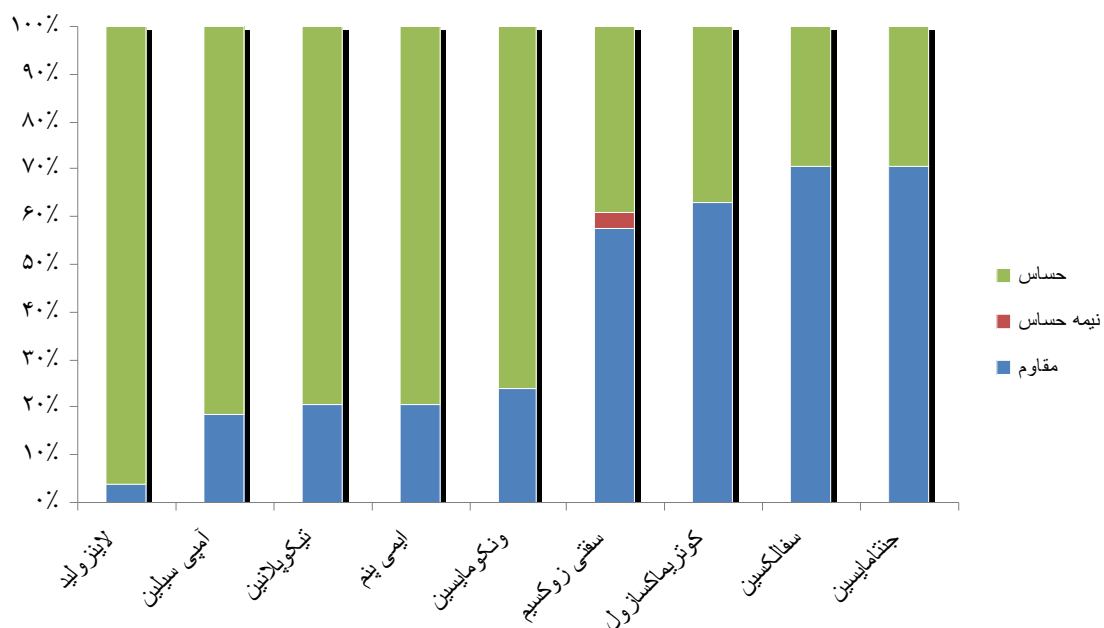
گونه باکتری	تعداد	فراوانی
انتروکوکوس فیکالیس	۳۸	۷۰/۴۰٪
انتروکوکوس فیسوم	۱۰	۱۸/۵۰٪
انتروکوکوس هیرا	۳	۵/۵۵٪
انتروکوکوس دورانس	۱	۱/۸۵٪
انتروکوکوس آویوم	۱	۱/۸۵٪
انتروکوکوس موندتی	۱	۱/۸۵٪

در این مطالعه ۶ سویه مقاوم به ونکومايسين از بخش داخلی (۴۶/۱۵٪)، ۵ سویه از بخش سرپایی (۳۸/۴۷٪)، یک سویه از بخش سوختگی (۷/۶۹٪) و یک سویه نیز از بخش مراقبت های ویژه (۷/۶۹٪) جداسازی گردید. سویه های مقاوم به ونکومايسين شامل ۶ سویه انتروکوکوس فیکالیس (۴۶/۱۵٪)، ۴ سویه انتروکوکوس فیسوم (۳۰/۷۸٪)، یک سویه انتروکوکوس آویوم (*Enterococcus avium*) (۷/۶۹٪)، یک سویه انتروکوکوس دورانس (*Enterococcus durans*)

با ۳ نمونه (۵/۵۵٪)، نورولوژی با ۲ نمونه (۳/۷۰٪) و بخش جراحی و مراقبت های قلبی با یک نمونه (۱/۸۵٪) بودند. میانگین سنی بیماران ۳/۱۱۹ ± ۵۲/۲۷ با میانگین ۵۷ سال از حداقل ۹ ماه تا حداکثر ۹۶ سال متغیر بود. ۲۵ مورد (۴۶/۳۰٪) از بیماران زن و ۲۹ مورد (۵۳/۷۰٪) مرد بودند. همچنین میانگین روزهای بستری در بیمارستان ۸ روز، با حداکثر ۵۹ و حداقل ۱ روز گزارش گردید. در جدول ۲ گونه های مختلف انتروکوک جداسازی شده از نمونه های بالینی بیماران نشان داده شده است.

بر اساس تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، گونه های انتروکوک بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین و جنتامایسین و کمترین میزان را به لاینزولید نشان دادند (نمودار ۱).

تعیین حداقل غلظت مهاري نشان داد که ۱۳ سویه به ونکومايسين مقاوم می باشند. سویه ای با مقاومت بینابینی مشاهده نگردید. از میان سویه های مقاوم، یک سویه دارای حداقل غلظت مهاري ۴۸ میکروگرم در میلی لیتر و یک سویه دارای حداقل غلظت مهاري ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر بود. بقیه سویه های مقاوم، مقدار MIC بیش از ۲۵۶ میکروگرم در

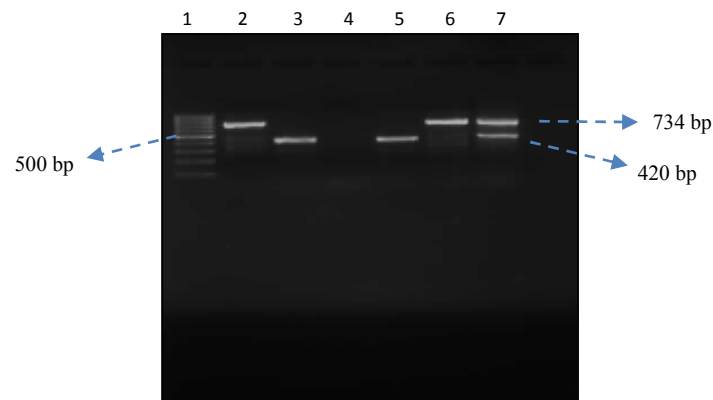


نمودار ۱: توزیع فراوانی درصد حساسیت و مقاومت سویه های انتروکوک به تفکیک نوع آنتی بیوتیک

(۰/۷/۶۹) و یک سویه انتروکوکوس هیرا (*Enterococcus hirae*) (۰/۷/۶۹) بودند. در جدول ۳ اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران مورد بررسی نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین وجود بیماری زمینه ای در فرد و شیوع سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین ارتباط معنی داری وجود دارد ( $p = ۰/۰۳$ ). نتایج PCR چندگانه نشان داد که ۹ سویه (۰/۶۹/۲۳) ژنوتایپ *vanA* و ۲ سویه (۰/۱۵/۳۸) ژنوتایپ *vanB* را دارند. ۲ سویه (۰/۱۵/۳۸) نیز هر دو ژن *vanA* و *vanB* را داشتند (شکل ۱). ۵۰٪ از سویه های مقاوم انتروکوکوس فیکالیس، حاوی ژن *vanA*، ۱۶/۷٪ حاوی *vanB* و ۳۳٪ دارای هر دو ژن بودند. ۷۵٪ از سویه های انتروکوکوس فیسوم دارای ژن *vanA* و ۲۵٪ *vanB* بودند. سویه های مقاوم انتروکوکوس آویوم، انتروکوکوس دورانس و انتروکوکوس هیرا حاوی ژن *vanA* بودند. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص گردید که ارتباط

جدول ۳: عوامل خطر ساز عفونت با انتروکوک مقاوم به ونکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی (۳۲ n).

<i>p value</i>	فراوانی	خصوصیات بیماران
۰/۵۵۱	٪۲۷/۷۷ ٪۷۲/۲۳	سن کمتر از ۴۰ سال مساوی یا بیشتر از ۴۰ سال
۰/۵۳۱	٪۴۶/۳۰ ٪۵۳/۷۰	جنسیت زن مرد
۰/۱۰۸	٪۴۰/۶۲۵ ٪۵۹/۳۷۵	مدت بستری در بیمارستان کمتر از یک هفته مساوی یا بیشتر از یک هفته
۰/۱۰۸	٪۵۹/۳۷۵ ٪۴۰/۶۲۵	کاتتر ادراری داشته نداشته
۰/۵۸۳	٪۷۸/۱۲۵ ٪۲۱/۸۷۵	مصرف قبلی آنتی بیوتیک داشته نداشته
۰/۰۳	٪۶۵/۶۲۵ ٪۳۴/۳۷۵	بیماری زمینه ای داشته نداشته
۰/۲۷۲	٪۳۱/۲۵ ٪۶۸/۷۵	مصرف قبلی ونکومایسین داشته نداشته
۰/۲۷۲	٪۴۶/۸۷۵ ٪۵۳/۱۲۵	سابقه بستری داشته نداشته
۰/۷۰۳	٪۵۶/۲۵ ٪۳۴/۳۷۵ ٪۹/۳۷۵	عاقبت بالینی بهبودی زنده و بیمار فوت



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن های انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین با روش multiplex PCR (۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی. (۲) انتروکوکوس فیسوم BM4147 حاوی ژن *vanA* (کنترل مثبت). (۳) انتروکوکوس فیکالیس V583 حاوی ژن *vanB* (کنترل مثبت). (۴) انتروکوکوس فیکالیس ATCC 29212 حساس به ونکومایسین (کنترل منفی). (۵) نمونه حاوی *vanB*. (۶) نمونه حاوی *vanA*. (۷) نمونه حاوی هر دو ژن *vanA* و *vanB*.

*Enterococcus raffinosus*) گزارش نمودند (۲۱). در مطالعه اسکاتن (Schouten) و همکاران در ۲۷ کشور اروپایی، شیوع سویه های انتروکوک تنوع بیشتری را داشت. این سویه ها شامل انتروکوکوس فیکالیس ۸۳٪، انتروکوکوس فسیوم ۱۳/۶٪، انتروکوکوس گالیناروم (*Enterococcus gallinarum*) ۱/۲۰٪، انتروکوکوس دورانس ۰/۷۱٪، انتروکوکوس کسلی فلاووس (*Enterococcus casseliflavus*) ۰/۵۳٪، انتروکوکوس آویوم ۰/۴۶٪، انتروکوکوس هیرا ۰/۱۲٪، انتروکوکوس موندتی ۰/۰۵٪ و انتروکوکوس رافینوز ۰/۰۲٪ بودند (۲۲). همان گونه که مشخص است سویه های انتروکوکوس فیکالیس و انتروکوکوس فسیوم به ترتیب بیشترین درصد عفونت را در بیماران به خود اختصاص می دهند. زیرا این سویه ها مدفوعی هستند و در فلور دستگاه گوارش، واژن، دهان و پوست وجود دارند. اما سویه های دیگر در محیط یافت می شوند. از طرفی با وجود تفاوت نسبی درصد شیوع، اما سویه های مشابهی در بیمارستان وجود دارند. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه فتح الله زاده (Fatholazadeh) و همکاران و نیز اسکاتن (Schouten) و همکاران، وجود تنوع سویه ها را می توان به میزان نمونه های مورد بررسی و گستردگی زمان نمونه گیری نسبت داد.

در پژوهش حاضر فراوانی سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومايسين ۲۴/۱۰٪ گزارش گردید. عوامل متعددی می توانند در ظهور این سویه های مقاوم نقش داشته باشند. به ویژه می توان به افزایش چشمگیر استفاده از سفالوسپورین ها و کینولون ها اشاره نمود که احتمالاً راه را برای ظهور سویه های انتروکوک به عنوان پاتوژن بیمارستانی باز می نمایند. در مطالعه فرناندز (Fernandes) و همکاران و همچنین هریس (Harris) و همکاران میزان شیوع سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومايسين به ترتیب ۸/۶٪ و ۱۰٪ گزارش شده است (۲۳ و ۲۴). اما در مطالعه صلاح (Salah) و همکاران و همچنین در بررسی انجام شده توسط گینی و یوری وین (Guiney & Uriwin) هیچ گونه از انتروکوک مقاوم به ونکومايسين مشاهده نگردید (۲۵ و ۲۶). مطالعات انجام شده در ایران نشان

معناداری بین گونه های انتروکوک و ژن مقاومت وجود ندارد (p ۰/۸۷۵). در پژوهش حاضر، ۷۷/۷۸٪ از ژن *vanA* (سویه ۷) در نمونه ادرار، ۱۱/۱۱٪ (سویه ۱) در تراشه و ۱۱/۱۱٪ (سویه ۱) در زخم مشاهده شدند. ۱۰۰٪ ژن *vanB* (سویه ۲) در نمونه ادرار جداسازی گردید. از طرفی ۵۰٪ (سویه ۱) از سویه های حامل هر دو ژن *vanA* و *vanB* در آسیت و ۵۰٪ باقیمانده (سویه ۱) در ادرار بودند. ۴۴/۴۵٪ از ژن *vanA* (سویه ۴) در بخش سرپایی، ۳۳/۳۳٪ (سویه ۳) در بخش داخلی، ۱۱/۱۱٪ (سویه ۱) در بخش سوختگی و ۱۱/۱۱٪ (سویه ۱) در بخش مراقبت های ویژه بودند. ۵۰٪ ژن *vanB* (سویه ۱) در بخش داخلی و ۵۰٪ دیگر (سویه ۱) در بخش سرپایی وجود داشتند. ۱۰۰٪ سویه های حامل هر دو ژن *vanA* و *vanB* (سویه ۲) در بخش داخلی بودند.

## بحث

از دو دهه گذشته تاکنون افزایش شیوع عفونت های انتروکوک، در کنار افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی مشکلات زیادی را در سیستم بهداشت و درمان کشورها ایجاد نموده است (۱۹). در مطالعه حاضر مانند پژوهش فیض آبادی (Feizabadi) و همکاران بیشتر سویه های انتروکوک از نمونه های ادرار جداسازی گردید. این مساله اهمیت استقرار انتروکوک ها را در مجاری ادراری نشان می دهد. انتروکوک ها اولین عامل عفونت در میان کوکسی های گرم مثبت عفونت زا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری ادراری زنان در ایران پس از اشریشیا کلی و کلبسیلا نمونیه می باشند (۲۰).

فتح الله زاده (Fatholazadeh) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ۳ بیمارستان تهران، در افرادی با عفونت ادراری، میزان شیوع گونه های انتروکوک را به صورت ۵۷٪ انتروکوکوس فیکالیس، ۳۰٪ انتروکوکوس فسیوم و ۱۳٪ باقی مانده شامل ۶٪ انتروکوکوس موندتی (*Enterococcus mundtii*)، ۳٪ انتروکوکوس آویوم، ۱٪ انتروکوکوس دورانس، ۲٪ انتروکوکوس هیرا و ۱٪ انتروکوکوس رافینوزوز

دارند سويه های حد واسطی هستند که از ابتدا یکی از ژن های مقاومت را داشته اند. اما پلاسمید حاوی ژن دیگر را از سایر سويه ها دریافت نموده اند و به مرور زمان پلاسمید اولیه خود را از دست داده اند (۳۴).

### نتیجه گیری

با توجه به شیوع بالای *انتروکوک* مقاوم به ونکومايسين در بیماران بستری شده، ارزیابی بیشتر در رابطه با چگونگی فراوانی این سويه ها در محیط بیمارستان و کارکنان نیز احساس می گردد. از آنجایی که *انتروکوک* ها به صورت ذاتی و اکتسابی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند، انجام تست آنتی بیوگرام قبل از تجویز ضروری می باشد. همچنین مصرف صحیح آنتی بیوتیک ها علاوه بر استفاده بالینی، در صنعت کشاورزی و دامپروری نقش بسیار مهمی در کاهش مقاومت باکتریایی دارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس و مرکز پزشکی مولکولی بندرعباس به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

می دهد که فراوانی سويه های *انتروکوک* مقاوم به ونکومايسين بین ۷ تا ۸/۳٪ بوده است (۲۱ و ۲۷).

در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین و جنتامایسین و بیشترین حساسیت نسبت به لاینزولید و ایمپی پنم گزارش گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه قاسمی (Ghasemi) و همکاران نشان داد که مقاومت سويه های *انتروکوکوس فیکالیس* جدا شده از نمونه های بالینی به آنتی بیوتیک های جنتامایسین ۳۸/۷٪، آمپی سیلین ۱۱/۳٪، ایمپی پنم ۱۰/۴٪ و ونکومايسين ۴/۷٪ بوده است. از طرفی فنوتایپ مقاوم به چند دارو نیز در ۳۷/۷٪ سويه ها مشاهده شده بود (۲۸). در بیشتر مطالعات انجام شده مشابه با پژوهش حاضر آنتی بیوتیک لاینزولید کمترین مقاومت را داشته است. در مطالعه شفییابی (Shafiyabi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جنوب هند مقاومت به آنتی بیوتیک های سفالکسین، جنتامایسین، کوتریماکسازول، ونکومايسين و لاینزولید به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۰٪، ۸۵٪، ۵٪ و ۰٪ گزارش گردید (۲۹). یافته های ما نشان می دهد که ژنوتایپ *vanA* با ۶۹/۲۳٪ بیشترین فراوانی را در میان ژنوتایپ های مقاومت داشته است. غالب بودن ژن *vanA* با اکثر پژوهش های داخل و خارج از ایران هم خوانی دارد (۲۱ و ۳۰). دلیل این امر را می توان به قابلیت بالای این ژن در انتقال به کمک ترانسپوزون مربوطه نسبت داد.

در مطالعه طالبی (Talebi) و پوراکبری (Pourakbari) تمامی *انتروکوک* های مقاوم به ونکومايسين حاوی ژن *vanA* بودند (۱۴ و ۱۵). اما در مطالعه پدیگلیون (Padiglione) در استرالیا تمامی سويه های مقاوم دارای ژنوتایپ *vanB* بودند (۳۱). یافته های تیرفلدر (Thierfelder) و همکاران در سوئیس نشان داد که از میان ۱۷ سويه *انتروکوک* مقاوم به ونکومايسين، ۱۶ سويه حاوی ژن *vanB* و یک سويه حامل *vanA* بوده است (۳۲). وجود هر دو ژن *vanA* و *vanB* در مطالعه تیمور نژاد (Teymournejad) و همکاران و نیز در تحقیق لی (Lee) و همکاران گزارش شده است (۱۳ و ۳۳).

به نظر می رسد جدایه هایی که هر دو ژن *vanA* و *vanB* را

## References

1. Bjorkeng E. 2010. On mobile genetic elements in *Enterococci*; adding more facets to the complexity. A thesis submitted according to the requirements for the degree of Philosophiae Doctor. University of Tromse.
2. Gordon S, Swenson J, Hill B, Pigott N, Facklam R, Cooksey RC, Thornsberry C, Jarvis WR, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of *enterococci* causing infections in the United States. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2373-2378.
3. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.* 2009; 155: 1749-1757.
4. Morrison D, Woodford N, Cookson B. *Enterococci* as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symp, Suppl.* 1997; 83: 89-99.
5. Ghaffarpassand I, Moniri R, Kheradi I. The prevalence of fecal carriage of antibiotic resistant *enterococci* among hospitalized patients in Shahid Beheshti hospital, Kashan, Iran at 2007. *Feyz.* 2010; 14: 70-75 [In Persian].
6. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multi-drug-resistant *Enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 239-249.
7. Cetinkaya Y, Fallk P, Mayhall C. Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 686-707.
8. Afkhamzadeh A, Askarian M, Barari M, Hadinia M, Jokar M. Comparison of the rate of enteric colonization with vancomycin-resistant *enterococci* in medical wards with surgical wards of Namazi Hospital in Shiraz. *J Kurdistan Uni Med Sci.* 2008; 13:7-14 [In Persian].
9. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* Spp. *AAC.* 2000; 44: 967-971.
10. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *CID.* 2006; 42: 25-34.
11. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *CM R.* 2007; 20: 79-114.
12. French GL. *Enterococci* and vancomycin resistance. *CID.* 1998; 27: S75-83.
13. Teymournejad O, Mohabati MA, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in *Enterococcus* spp. isolated from clinical samples. *JFUMS.* 2011; 2: 1-6 [In Persian].
14. Talebi M, Eshraghi SS, Pourshafie MR, Pourmand MR, Eshraghian MR. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Iranian J Publ Health.* 2007; 36: 20-25.
15. Pourakbari B, Aghdam MK, Mahmoudi Sh, Ashtiani MTH, Sabouni F, Movahedi Z, Alyari AE, Sadeghi RH, Mamishi S. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in an Iranian referral children medical hospital. *Maedica J Clin Med.* 2012; 7: 201-204.
16. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine.* 2004; 22: 822-830.
17. Hayakawa K, Marchaim D, Palla M, Mahesh GU, Pulluru H, Bathina P. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case-case-control study. *AAC.* 2013; 57: 49-55.



18. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistant gene markers by PCR. *Mol Cell Probes*. 2005; 19: 27-34.
19. Mundy L, Sahn D, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13: 513-522.
20. Feizabadi MM, Asadi S, Khatibi S, Etemadi G, Parvin M, Oskoui M. Assesment of drug resistant pattern species about *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of Labbafinejad hospitals and Shahid Chamran hospitals during the years 2000-2003. *Pejouhandeh*. 2004; 9: 333-339 [In Persian].
21. Fatholazadeh B, Hashemi BF, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani AF, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) isolated from urinary tract (UTI) in Tehran, Iran. *DARU*. 2006; 14: 141-145.
22. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A and the European VRE study group. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 816-822.
23. Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance and virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Med Res*. 2013; 137: 981-985.
24. Harris AD, Nemoy L, Johnson JA, Martin-Carnahan A, Smith LD, Standiford H, Perencevich EN. Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patients: implications for an active surveillance program. *ICHE*. 2004; 25: 105-108.
25. Salah R, Dar-odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factor and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. *BMC Oral Health*. 2008; 1: 8-17.
26. Guiney M, Urwin G. Frequency and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; 12: 362-366.
27. Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N, Ghafoorian S, Maleki A, Davoodian E, Rahbar M, Mohammadzadeh M. Evaluation of drug resistance frequency among *Entrococci faecium* and *E. faecalis* strains and detection of *VanA/B* genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. *Sci J Ilam Uni Med Sci*. 2010; 19:1-8 [In Persian].
28. Ghasemi A, Moniri R, Khorshidi A, Gholam Abbas Musavi GH. The survey of virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolated from urine samples, Iran. *J Med Microbiol*, 2008; 3&4: 53-58 [In Persian].
29. Shafiyabi S, Mariraj J, Sumathi S, Krishna S. Emergence of vancomycin resistant *Enterococci* in a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Res* 2013; 4: 111-113.
30. 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: 1-7 [In Persian].
31. Padiglione A, Grabsch E, Wolfe R, Gibson K, Grayson ML. The prevalence of fecal colonization with VRE among residents of long-term-care facilities in Melbourne, Australia.

Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22: 576-578.

32. Thierfelder C, Keller PM, Kocher C, Gaudenz R, Hombach M, Bloemberg GV, Ruef C. A multiple-strain out break of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. Eur J Basic Med Sci. 2012; 142: 1-6.
33. Lee W, Kim M, Huh J, Kim Y, Hyun B. The conversion pattern of epidemiology among vancomycin resistant *Enterococci*: a transitional strain of *enterococcus faecium* containing both *vanA* and *vanB* genes. Abstr Intersci Conf. AAC. 2001; C2-511.
34. Oskoui M, Farrokh P. Evaluation phenotypic and genotypic characteristics of the strains of vancomycin-resistant *Enterococci* isolated from clinical specimens. Iran J Med Microbiol. 2008; 1: 15-22 [In Persian].



## Frequency of *vanA* & *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical specimens at Shahid Mohammadi hospitals Bandar Abbass

Zeinab Ghalandarzadeh Daryaei<sup>1</sup>, Sedigheh Javadpour<sup>2</sup>, Mohammad Kargar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Microbiology, Research Center for Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbass, Iran.

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

### Abstract

**Background and Objectives:** Enterococci are normal flora of alimentary tract of humans and many other mammals. Recently vancomycin resistant enterococci (VRE) have emerged as an increasingly important cause of nosocomial infections all around the world. The aims of this study were to determine frequency and antibiogram patterns of enterococci to vancomycin and also to detect the corresponding genes (*vanA* and *vanB*) in clinical isolates.

**Materials and Methods:** This cross-sectional study was carried out on 54 enterococci strains isolated from clinical specimens (urine, wound, blood, ...) obtained from the patients hospitalized in Shahid Mohammadi hospital, Bandar Abbass. RapID STR System Kit was used to identify species of isolated enterococci. Antibiogram pattern was examined by Kirby-Bauer disk diffusion method and CLSI criteria. MIC of vancomycin was determined by E-Test. Multiplex PCR and specific primers was used to detect *vanA* and *vanB* genes.

**Results:** 38 out of 54 isolates (70.4%) of enterococci belonged to *E. faecalis* while *E. faecium* and *E. hirae* consist only 10 (18.5%) and 3 (5.55%) of the isolates, respectively. Furthermore, one (1.85%) of each *E. mundtii*, *E. durans* and *E. avium* were isolated from these samples. These strains were mostly resistant to gentamicin and cephalixin while showed lowest antibiotic resistance to linezolid. 13 (24.10%) of the isolates were resistant to vancomycin. *Van A* and *Van B* genes were found in 69.23% and 15.38% of VRE strains, respectively. Two strains (16.38%) harbored both genes.

**Conclusion:** According to the extensive frequency of vancomycin resistant enterococci, application of precautionary and management procedures are highly required. Furthermore, it is recommended to carry out the antibiogram assay for each patient, before the treatment process, in order to prescribe an appropriate antibiotic.

**Keywords:** Vancomycin resistant enterococci, *vanA* gene, *vanB* gene, E-test.

---

Correspondance to: Sedigheh Javadpour

Tel: +987616689624

E-mail: [sedigheh.javadpour@yahoo.com](mailto:sedigheh.javadpour@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2013, 6(1): 23-33.