

بررسی ژن‌های عامل مقاومت به ونکومایسین با روش Multiplex-PCR در گونه‌های انتروکوک ایزوله شده از بیماران بستری و سرپایی

سیدرضا مودب^۱، بهزاد کاظمی حکمی^۲، نادر ابراهیمی آتش خسرو^۳

^۱ دانشیار، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۲ کارشناس بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۳ کارشناس ارشد میکروپ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوک‌ها، پاتوژن‌های مهم و شایع در عفونت‌های بیمارستانی هستند. از میان گونه‌های مختلف انتروکوک‌ها، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم، پاتوژن‌های اصلی محسوب می‌شوند. سویه‌های مقاوم به ونکومایسین (VRE: Vancomycin resistant Enterococci) در بیماران سرپایی و بستری به وفور در سراسر جهان مشاهده می‌شوند. در این مطالعه، خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه‌های ایزوله شده VRE از بیماران بستری و سرپایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: از مجموع ۱۹۳ سویه، ۱۷۸ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم جدا شدند که با روش ماکرودايلوشن براث، در مجموع ۲۲ سویه به عنوان سویه‌های VRE شناسایی گردیدند. تمامی این سویه‌ها ایزوله شده از بیماران بستری بود که تعداد ۶ سویه از نمونه مدفوعی و ۱۶ سویه از نمونه بالینی بود.

یافته‌ها: با روش PCR، ژنوتیپ Vana در ۱۰ سویه انتروکوکوس فسیوم و در ۲ سویه انتروکوکوس فکالیس شناسایی شد. همچنین VanB در ۵ سویه انتروکوکوس فسیوم و در ۵ سویه انتروکوکوس فکالیس تشخیص داده شد. ژنوتیپ VanC در هیچ کدام از سویه‌ها شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به محدود بودن مطالعات در مورد سویه‌های VRE در کشور، امکان مقایسه دقیق بین مطالعه حاضر و تحقیقات دیگر ممکن نیست ولی این مطالعه، مبین وجود سویه‌های VRE در فلور طبیعی و نمونه‌های بالینی بیماران است. همچنین شایع بودن ژنوتیپ Vana را نسبت به VanB در سویه‌های VRE نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: انتروکوک، ونکومایسین، Multiplex PCR، ژن‌های مقاومت.

مقدمه

انتروکوک‌ها شامل بیش از ۲۰ گونه مختلف می‌باشند و به عنوان باکتری‌های گرم مثبت، ساکن طبیعی دستگاه گوارش انسان و بعضی از حیوانات شناخته می‌شوند. علیرغم نداشتن تمایل به بیماری‌زایی، در صورت انتقال به مکان‌هایی غیر از فلور طبیعی، به علت توانمندی حصول مقاومت به اغلب آنتی

بیوتیک‌ها، می‌توانند موجب مشکلات جدی و حتی کشنده به خصوص در بیماران بستری گردند. این باکتری‌ها می‌توانند در خارج از روده مانند خاک، آب‌های سطحی، گیاهان، سبزیجات و مواد غذایی کلونیزه شوند. در بیماران بستری، کلونیزه شدن انتروکوک‌ها در جایگاه طبیعی آنها، به خصوص سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف، شرایطی برای بیمار فراهم می‌سازد که در صورت مداخلات درمانی مانند جراحی، استفاده از کاتترها و شانت‌ها، عفونت‌های فرصت طلب، امکان ایجاد بیماری را خواهند یافت (۱-۶).

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، بهزاد کاظمی حکمی

(email: Behzad_omt@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۴/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۶/۲۳

مواد و روشها

از نمونه‌های کشت داده شده مدفوع، سواب رکتال و همچنین نمونه‌های بالینی بیماران بستری و سرپایی آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بیمارستان‌های امام رضا، سینا، شهید مدنی و آزمایشگاه استان، طی مدت شش ماه (اول اردیبهشت ماه تا پایان مهر ماه ۱۳۸۹)، ایزوله‌های مشکوک به انتروکوک دریافت گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه سل و بیماری‌های ریوی تبریز، ابتدا نمونه‌ها روی محیط کشت آگار خون‌دار کشت مجدد داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس آزمایش‌های تشخیصی بر روی سويه‌ها با رنگ آمیزی گرم انجام شد. با استفاده از تست کاتالاز، کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی جدا شدند. سپس همه نمونه‌ها بر روی محیط اختصاصی انتروکوک آگار (Enterococcus Agar) تلقیح شده، انکوبه گردیدند. سپس سويه‌های انتروکوک با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب شناسی، با تست هیدرولیز بایل اسکولین و رشد در ۶/۵٪ نمک شناسایی شدند. تعیین گونه با استفاده از مصرف قندهای مانیتول، آرابینوز، سوربیتول، سوکروز و رافینوز، همچنین تولید پیگمان در محیط BHI انجام گردید (۷-۱۲).

بر اساس پروتکل‌های CLSI، جهت تعیین حساسیت دارویی آنتی بیوتیکی به ونکومايسين، ابتدا از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. سپس برای تعیین MIC (Minimum Inhibition Concentration) از روش ماکرودایلوشن برات استفاده شد (۹-۱۲).

در سويه‌های VRE، برای شناسایی ژن‌های *VanA*، *VanB*، *VanC* از روش Multiplex PCR استفاده گردید. جداسازی DNA با روش جوشاندن در تریس بافر استریل به مدت ۱۵ دقیقه و سانتیفریژ در ۱۵۰۰g انجام شد و مایع رویی به عنوان نمونه DNA باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در PCR، برای شناسایی ژن‌های عامل مقاومت از ۳ جفت پرایمر استفاده شد (جدول ۱). ترکیب بافر واکنش در PCR مطابق جدول ۱ و برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر واکنش آمپلیکاسیون به ترتیب زیر انجام شد: ۱. دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۲. سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل: - دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، - اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، - تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۳. تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. جهت الکتروفورز از آگاروز ۱٪ در کنار سایزمارکر (1Kb DNA Ladder) در ۱۰۰

انتروکوک‌ها به طور ذاتی مقاومت بیشتری نسبت به پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم مثبت استرپتوکوکی نشان می‌دهند ولی نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاومت کمتری دارند. روند مقاوم شدن انتروکوک‌ها به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. مقاوم شدن این گونه از باکتری‌ها، اغلب با پلاسمیدها اتفاق می‌افتد که می‌توانند به سرعت بین سويه‌های یک گونه و یا گونه‌های دیگر انتقال یابند. ظهور انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين (VRE: Vancomycin Resistant Enterococci)، معضلی است که به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. در ابتدا، VRE مشکل بخش مراقبت‌های ویژه بود، ولی امروزه در اغلب بخش‌های بیمارستانی مشاهده می‌شود و به علت اصل کوه یخی، در ازای هر فرد مبتلا به عفونت VRE، چندین بیمار کلونیزه با آن وجود دارد (۷،۸). انتروکوک‌ها در دستگاه گوارش، پوست، گلو و بینی کلونیزه می‌شوند. همچنین محیط بیمار را آلوده می‌کنند که باعث افزایش خطر عفونت‌های VRE می‌شود. از طرفی، گزارشات نشان می‌دهد ژن‌های مقاومت به ونکومايسين، به استافیلوکوک‌ها انتقال یافته است، بنابراین درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را با مشکلات جدی مواجه می‌سازد. انتروکوک‌ها، گونه‌های مختلفی دارند، ولی شایع‌ترین آنها انتروکوکوس فکالیس (عامل ۹۵-۹۰٪ عفونت‌های انتروکوک‌ی) و انتروکوکوس فسیوم (عامل ۱۰-۵٪ عفونت‌های انتروکوک‌ی) می‌باشد. علت مقاومت به ونکومايسين، وجود ژن‌های *VanA/B/C/D/E/G/L* است (۸-۵، ۱).

به علت اهمیت مقاومت به ونکومايسين در انتروکوک‌ها، شناسایی ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به این دارو برای کنترل شیوع مقاومت از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. این ژن‌ها با شیوع مختلفی در انتروکوک‌ها از بخش‌های متفاوت بیمارستانی جدا می‌شوند. در حال حاضر، یکی از روش‌های کنترل این سويه‌ها، شناسایی کلونیزاسیون در فلور طبیعی بیمار با VRE است که با استفاده از کشت مدفوع و یا سواب رکتال از بیماران بستری و سرپایی انجام می‌شود. به همین علت در این تحقیق بر آن شدیم با گرفتن نمونه از مدفوع، سواب رکتال از بیماران بستری و سرپایی و همچنین از نمونه‌های بالینی، انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين را شناسایی کرده و میزان شیوع ژن‌های *VanA*، *VanB*، *VanC* را تشخیص دهیم (۸-۵).

جدول ۱. پرایمرهای بکار رفته در PCR

Gene	Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	PCR product size (bp)	Sizes (bp) of <i>MspI</i> restriction fragments
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> -FOR	CATGACGTATCGGTAAAATC	885	231, 184, 163, 131/133
	<i>vanAB</i> -REV	ACCGGGCAGRGTTATTGAC		
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> -FOR	CATGATGTGTCGGTAAAATC	885	188/189, 160, 136
	<i>vanAB</i> -REV	ACCGGGCAGRGTTATTGAC		
<i>vanC</i>	<i>vanC123</i> -FOR <i>vanC1</i> -REV	GATGGCWGTATCCAAGGA GTGATCGTGGCGCTG	467	230/237

سویه در محدوده حساس به ونکومایسین قرار دارند ($\mu\text{g/ml}$) ≤ 4 (MIC) که ۸۸٪ از سویه ها را شامل می‌شد. یک سویه در محدوده مقاومت نسبی قرار گرفت ($\text{MIC} = 8 \mu\text{g/ml}$). حداقل غلظت مهار کننده ۲۲ سویه VRE ($\text{MIC} \leq 32 \mu\text{g/ml}$) بود که از این تعداد، ۱۶ سویه از نمونه ادرار و ۶ سویه از نمونه مدفوع و سواب رکتال بیماران بستری ایزوله شده بود. از مجموع ۲۲ سویه VRE، ۷ مورد انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ مورد، انتروکوکوس فسیوم بودند. از بیماران سرپایی مراجعه کننده، سویه VRE ایزوله نشد.

جدول ۳. فراوانی سویه های انتروکوکوک جدا شده از نمونه‌های مختلف در بیماران بستری و سرپایی

منبع	تعداد جدا شده از بیماران بستری	تعداد جدا شده از بیماران از سرپایی
مدفوع و سواب رکتال	۷۰	۴۳
ادرار	۳۰	۳۰
مایع آسیت	۱۰	-
ترشحات زخم	۸	-
خون	۲	-
مجموع	۱۲۰	۷۳

جدول ۴. تعداد سویه‌های ایزوله شده با ژنوتیپ‌های *VanA* و *VanB* در گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم

گونه (تعداد)	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>
انتروکوکوس فکالیس (۷)	۲	۵
انتروکوکوس فسیوم (۱۵)	۱۰	۵

برای شناسایی ژن‌های *VanA*، *VanB*، *VanC* با روش Multiplex PCR، در ژل الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *VanA* و *VanB* در ۲۲ سویه VRE مشاهده شد که از این تعداد، ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم و ۷ سویه انتروکوکوس فکالیس بود ولی در این سویه‌ها، ژن *VanC* دیده نشد (شکل-

ولت به مدت یک ساعت استفاده شد (جدول‌های ۲ و ۱) (۱۴-۱۳).

به منظور کنترل کیفی، جهت تایید صحت تشخیص ژن‌های عامل مقاومت به ونکومایسین، سه نمونه از محصولات PCR ژن *VanA* و دو نمونه از محصولات PCR ژن *VanB* برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان ارسال شد. DNA سویه-ها به عنوان کنترل مثبت در واکنش‌های PCR ژن‌های *VanA* و *VanB* مورد استفاده قرار گرفت. از یک سویه حساس نیز در آزمایش PCR استفاده شد که فاقد ژن عامل مقاومت بود.

جدول ۲. ترکیب بافر واکنش در PCR

10 x PCR buffer	100mM Tris-HCL, PH8/6	Final Concentration
	500mM KCL	1x
	15mM MgCl ₂	
	1% Triton x-100	

Buffer PCR (1x): (۱۰ μl به ۹۰ μl آب مقطر)

یافته‌ها

در این تحقیق، طی مدت ۶ ماه (اول اردیبهشت ماه تا پایان مهر ماه سال ۱۳۸۹)، تعداد ۱۹۳ سویه جمع آوری شد که از این تعداد، ۱۷۸ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم، با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین گونه شدند. ۱۲۰ سویه از بیماران بستری و ۷۳ سویه از بیماران سرپایی ایزوله شده بود. نمونه‌ها در بیماران بستری شامل مدفوع، سواب رکتال و نمونه‌های بالینی شامل ادرار، مایع آسیت، ترشحات زخم و خون بود. در بیماران سرپایی از مجموع ۷۳ سویه، ۴۳ سویه از نمونه مدفوع و ۳۰ سویه از نمونه ادرار بود (جدول‌های ۳ و ۴).

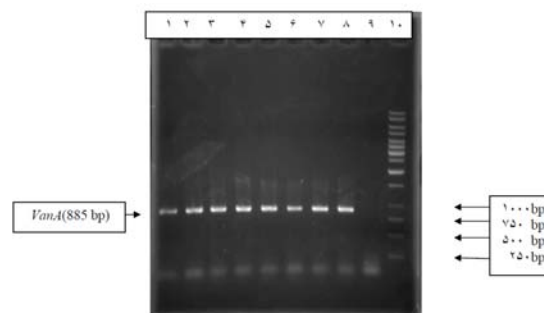
تعداد ۳۵ سویه (۱۸٪) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، مقاوم به ونکومایسین تشخیص داده شد. نتایج حاصل از انجام تعیین MIC در بین ۱۹۳ سویه، نشان داد که تعداد ۱۷۰

بحث

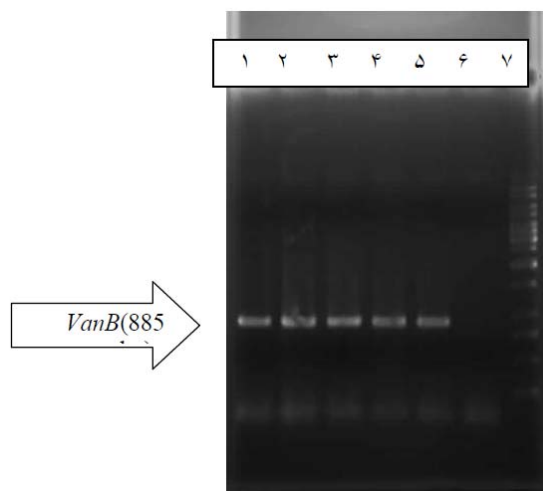
انتروکوکها به عنوان باکتری های فرصت طلب، به خصوص سویه های مقاوم در شرایطی خاص می توانند با کلونیزه شدن به عنوان فلور طبیعی موجب بیماری های مهلک شوند. گزارش های متعددی مبنی بر کلونیزه شدن سویه های مقاوم به دارو به عنوان فلور طبیعی بیماران سرپایی حتی افراد غیربیمار، محیط زیست و محیط های بیمارستانی و همچنین در فلور طبیعی بعضی از حیوانات وجود دارد که نگرانی گسترش VRE را بیشتر کرده است (۷-۱). شیوع سویه های VRE و مقاوم به سایر گلیکوپپتیدها، به خصوص در عفونت های بیمارستانی، موجب بروز مشکل بسیار جدی در سطح جهان شده است. محدودیت انتخاب دارو در عفونت های سویه های VRE و همچنین قابلیت انتقال ژن های پلاسمیدی عامل مقاومت به ونکومايسين از انتروکوکها به سایر باکتری های بیماری زا مانند استافیلوکوکها یا سایر سویه های حساس انتروکوک، اهمیت تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های مقاوم را آشکار می کند. شواهدی از انتشار VRE بین بیماران و همچنین بخش های مختلف بیمارستانی وجود دارد که نشان دهنده آن است که بیمار کلونیزه شده با سویه های VRE، در فلور طبیعی خود برای مدت طولانی حتی چند ماه آن را با خود حمل می کند که موجب انتشار بیشتر آن می شود (۸-۵). با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارش هایی مبنی بر پراکندگی متفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی این گونه از سویه ها در تحقیقات انجام شده، در این مطالعه ابتدا تعداد ۱۹۳ سویه انتروکوک از بیماران بستری و سرپایی جدا شد و با استفاده از روش های استاندارد، نوع گونه ها مشخص گردید. از مجموع ۱۹۳ سویه ایزوله شده، تعداد ۱۲۰ سویه از مدفوع، سواب رکتال و نمونه های بالینی بیماران بستری و ۷۳ سویه از بیماران سرپایی جدا شد (جدول ۳). از مجموع ۱۹۳ سویه، تعداد ۱۷۸ سویه انتروکوکوس فکالیس (۹۲٪) و تعداد ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم (۸٪) تشخیص داده شدند (جدول ۴).

از آنجایی که میزان ایزولاسیون سویه های انتروکوکوس فکالیس بیشتر از سویه های انتروکوکوس فسیوم بود، نتیجه به دست آمده با مطالعات مختلف همخوانی دارد (۲۰-۱۵). به طوری که در مطالعات Schouten در اروپا، انتروکوکوس فکالیس جدا شده ۸۳٪ و انتروکوکوس فسیوم ۱۴٪ بود (۱۵). Shafiyabi در بررسی خود در سال ۲۰۱۳ در هند، میزان انتروکوکوس فکالیس جدا شده در بین ۴۰ نمونه مورد مطالعه

های ۲ و ۱). از مجموع ۲۲ سویه VRE، در ۱۲ سویه *VanA* و ۱۰ سویه *VanB* شناسایی شد. از مجموع ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم، در ۱۰ سویه *VanA* و در ۵ سویه *VanB* مشاهده شد. از مجموع ۷ سویه انتروکوکوس فکالیس، در ۲ سویه *VanA* و در ۵ سویه *VanB* شناسایی گردید (جدول ۴). جهت تایید صحت محصولات PCR ژن های *VanA* و *VanB*، سه نمونه از محصولات PCR ژن *VanA* و ۲ نمونه از محصولات PCR ژن *VanB* برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان ارسال گردید. آنالیز نتایج تعیین توالی، درستی وجود ژن های *VanA* و *VanB* در ایزوله های مربوطه را تایید کرد.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR برول ژل یک % ژن *VanA*. ستون های ۱ تا ۷ ایزوله های انتروکوک *VanA*⁺، ستون ۸ کنترل مثبت و ستون ۹ کنترل منفی سویه حساس به ونکومايسين، ستون ۱۰ سایز مارکر (1kb Ladder)



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ژن *VanB*. ستون های ۱ تا ۴ ایزوله های انتروکوک *VanB*⁺، ستون ۵ کنترل مثبت، ستون ۶ کنترل منفی سویه حساس به ونکومايسين و ستون ۷ سایز مارکر (1kb Ladder).

گزارش شده است، به همین علت توصیه می‌شود این سویه‌ها با تکنیک‌های تعیین MIC و نکومایسین، به خصوص در بیماران بستری با بیماری‌های مهلک، دوباره بررسی شده و مقاوم بودن آنها نسبت به نکومایسین به طور قطعی مشخص شود. برای مثال با تکنیک دیسک دیفیوژن در اروپا، میزان شیوع VRE در جامعه و در بین بیماران بستری به ترتیب ۲٪ و ۵٪ گزارش شده است، گرچه گزارش‌های نادری از درصدهای بالای مقاومت (تا ۴۰٪) نیز انتشار یافته است (۲۳، ۸-۵، ۱). Lavery (۲۴) در ایرلند با روش دیسک دیفیوژن، میزان مقاومت به نکومایسین را ۲٪ گزارش کرد. در بررسی‌های Toledano (۲۵) در سال ۱۹۹۷ در اورشلیم ۱۴٪ و در بیمارستانی در فیلادلفیا طی سال‌های ۱۹۹۵-۱۹۹۳، از مجموع ۲۶۰ سویه انتروکوک ایجاد کننده باکتریمی، ۲۷٪ به عنوان سویه‌های VRE گزارش شد. در گزارش تیمورنژاد و همکاران (۲۶)، ۴۵٪ از سویه‌ها با روش دیسک دیفیوژن مقاوم بودند، ولی با روش تعیین MIC در آگار دایلوشن، ۶٪ نسبت به نکومایسین مقاوم تشخیص داده شدند. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در مورد میزان مقاومت به نکومایسین با روش دیسک دیفیوژن با نتایج حاصل از مطالعات اشاره شده، قابل مقایسه است، ولی نتایج تیمورنژاد و همکاران (۲۶) با نتایج به دست آمده از این مطالعه فاصله دارد. استفاده از دیسک‌های مختلف در این مطالعات می‌تواند یکی از عوامل اختلاف باشد.

در مطالعه حاضر، از مجموع ۲۲ سویه VRE، ۱۲ سویه انتروکوکوس فسیوم و ۱۰ سویه انتروکوکوس فکالیس شناسایی شدند. در ایالات متحده آمریکا از نمونه‌های بالینی جدا شده از ادرار، ۸۹٪ انتروکوکوس فسیوم و ۱۲٪ انتروکوکوس فکالیس گزارش شده است (۵). در اروپا از مجموع ۱۳۱۴ سویه، فراوانی VRE ۳٪ گزارش شده است که از این تعداد، ۷۳٪ آنها انتروکوکوس فسیوم بودند. در آمریکا، سویه‌های VRE بیشتری گزارش شده است که به علت استفاده از آنالوگ نکومایسین (آووپاریسین) جهت فرجه سازی دام و طیور است که با ایجاد مقاومت متقاطع، باعث مقاوم شدن انتروکوک‌ها نسبت به نکومایسین می‌شود (۱، ۲). تیمورنژاد و همکاران (۲۶)، تمامی ۲۳ سویه VRE خود را به عنوان انتروکوکوس فسیوم شناسایی کردند. وهابی و همکاران (۲۷) در تبریز، از مجموع ۲۹۱ سویه VRE، ۶۵٪ را انتروکوکوس فکالیس و ۲۹٪ را انتروکوکوس فسیوم شناسایی کردند که از این تعداد ۷٪، VRE بودند. شریفی و همکاران (۲۸) از ۴۸ سویه VRE ایزوله شده در تبریز و ارومیه، ۸۹٪ را

خود را ۹۵٪ و انتروکوکوس فسیوم را ۵٪ گزارش کرد (۱۶). در مطالعه میرزایی و همکاران (۱۷) که در سال ۱۳۹۰ در شش بیمارستان در شهرهای تهران و قزوین انجام گرفت، ۸۲٪ از نمونه‌های جدا شده انتروکوکوس فکالیس و ۱۴٪ انتروکوکوس فسیوم بودند. در تحقیق انجام شده توسط محمدی و همکاران (۱۹) در ایران، جهت بررسی میزان وجود ژن‌های مقاوم به نکومایسین در سویه‌های جدا شده از نمونه بالینی بیماران، از مجموع ۱۸۰ سویه مورد بررسی، تعداد ۱۲۸ سویه (۷۱٪) انتروکوکوس فکالیس و ۵۲ سویه (۲۹٪) انتروکوکوس فسیوم بود. در مطالعه انجام شده توسط گودرزی و همکاران (۲۰)، از مجموع ۱۸۸ سویه انتروکوکوس جدا شده، ۱۸۴ مورد (۹۸٪) انتروکوکوس فکالیس و ۴ مورد (۲٪) انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند. طی بررسی دیگری که توسط رضائی و همکاران (۲۱) در تهران به عنوان عوامل عفونت‌های بیمارستانی انتروکوکوس انجام شد، ۷۵٪ سویه‌ها انتروکوکوس فکالیس و ۲۰٪ انتروکوکوس فسیوم بودند. نتایج حاصل از بررسی‌های مطالعه حاضر، نشان دهنده آن است که سویه‌های انتروکوکوس جدا شده، اغلب از گونه انتروکوکوس فکالیس می‌باشد. باید در نظر داشت که سویه‌های ایزوله شده این تحقیق، از نمونه‌های مختلفی مانند نمونه مدفوع بیماران بستری و یا بیماران سرپایی که به هر علتی به پزشک مراجعه کرده بودند و احتمالاً تحت درمان دارویی نیز قرار گرفته بودند تشکیل شده بود که می‌تواند در ترکیب ایزولاسیون گونه‌های مختلف تاثیر بگذارد، ولی به طور کلی می‌توان همخوانی مطالعه حاضر را با مطالعات ذکر شده از جهت تعداد بالای ایزولاسیون انتروکوکوس فکالیس نسبت به انتروکوکوس فسیوم مشاهده کرد.

در این مطالعه از مجموع ۱۹۳ سویه انتروکوکوس، میزان بروز مقاومت نسبت به نکومایسین با روش دیسک دیفیوژن ۱۸٪ (۳۵ سویه) بود که با روش ماکرودایلوژن برات، تعداد VRE به میزان ۱۱/۳٪ (۲۲ سویه) تایید شد. در سال ۱۹۸۶، سویه‌های VRE از آمریکا گزارش شد. طی سال‌های گذشته، میزان ایزولاسیون این سویه در سطح جهان همواره رو به افزایش بوده است، چنانچه در مطالعه‌ای در آمریکا، تا ۴۰٪ و در اروپا طی دو دهه گذشته، بین ۳۱ کشور ۴-۱٪ گزارش شده است (۲۴، ۲۳، ۲۰، ۱). در مطالعه‌ای در استانبول طی سال‌های ۱۹۹۹-۱۹۹۸، مقاومت در سطح متوسط گزارش شد، ولی در سال‌های اخیر، درصدهای مختلفی از ایزولاسیون VRE در این کشور هم مشاهده شده است (۶-۱). با روش دیسک دیفیوژن، درصدهای متفاوتی از سویه‌های VRE در سنوات مختلف

و در ۲۱٪ آنها *VanB* را گزارش کردند. در مطالعه گسترده‌ای در ۳۱ کشور اروپایی، شیوع سویه‌های VRE، ۴۰-۱٪ مشخص گردید و شایع‌ترین ژن‌ها، به ترتیب *VanA* و *VanB* تشخیص داده شدند (۱). در ژاپن، بررسی‌های انجام شده در دهه‌ها بیمارستان در سال ۲۰۱۰ نشان داد که در ۳۵ بیمارستان، *VanA* و در ۱۲ بیمارستان، *VanB* بیشترین شیوع را داشته است (۲). در مطالعه‌ای در تهران، ۲۰۰ سویه انتروکوک‌های گونه‌های انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس کاسی فلاوس، انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس آویوم ایزوله شد که بیشترین گونه را انتروکوکوس فکالیس (۸۰٪) داشته است. میزان فراوانی ژن‌های عامل مقاومت *VanA* ۳۵٪، *VanB* ۲۵٪ و *VanC* ۶٪ بود. در تحقیق مذکور، مقاومت به لینزولید که در عفونت‌های VRE استفاده می‌شود، ۲٪ بود (۳۱). مطالعات انجام شده در کشورمان و سایر کشورها نشان دهنده آن است که ژنوتیپ *VanA* نسبت به *VanB* بیشتر است که با تحقیق حاضر همخوانی دارد.

طی دو دهه گذشته، انتروکوک‌ها مقاومت گسترده‌ای نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کسب کرده اند که باعث پیچیدگی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها شده است. VRE به طور فزاینده‌ای از سراسر دنیا گزارش می‌شود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، کلونیزاسیون روده ای و جدا شدن VRE از نمونه‌های بالینی بیماران با درصد‌های متفاوتی در کشورمان و در آذربایجان شرقی و همچنین در مطالعات جهانی گزارش شده است. پراکندگی ژن‌های *VanA, B, C* در سویه‌های VRE متفاوت است و همانند ایزوله‌های این تحقیق، در سویه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم که بیشترین سویه‌های ایزوله شده VRE می‌باشد، *VanC* دیده نشده است. شیوع *VanA* بیشتر از *VanB* است. روش دیسک دیفیوژن، گرچه در شناسایی سویه‌ها در مراحل اولیه کاربرد دارد ولی باید با روش‌های مناسب تعیین MIC ونکومایسین مانند ماکرودایلوشن برات، آگار دایلوشن و یا E test تأیید شود. ژن‌های *VanA* و *VanB* ژن‌های اصلی عامل مقاومت به ونکومایسین هستند. همچنین *VanA* می‌تواند باعث ایجاد مقاومت نسبت به گلیکولیبید دیگر شود. بنابراین، تحقیقات گسترده ملی در کنترل و شناسایی سویه‌های VRE پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه که در انجام این پژوهش

به عنوان انتروکوکوس فکالیس شناسایی نمودند. با توجه به موارد بالا و متفاوت بودن نوع سویه‌های جدا شده VRE، همچنین با توجه به مناطق مختلف جغرافیایی ایران و سایر کشورها، امروزه تعداد سویه‌های VRE به عنوان عامل عفونی و یا به عنوان سویه‌های کلونیزه شده در فلور طبیعی رو به افزایش است. به علت نبود انسجام در مطالعات داخلی و پروژه کشوری در خصوص سویه‌های ایزوله شده VRE، همچنین از آنجایی که اغلب گزارش‌ها در کشورمان مربوط به نمونه‌های بالینی می‌باشد، امکان مقایسه و جمع بندی دقیق وجود ندارد. ولی به طور کلی وجود سویه‌های VRE در نمونه‌های بالینی و بیمارانی که با این سویه‌ها کلونیزه شده اند، هشدار برای پیگیری جدی آن می‌باشد.

در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۹۳ سویه، ۲۲ سویه با $MIC \geq 32 \mu g/ml$ به عنوان VRE جدا شدند. از این ۲۲ سویه VRE، ۷ مورد انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ مورد انتروکوکوس فسیوم بودند. سویه‌های VRE از نمونه ادرار (۱۶ سویه)، مدفوع و یا سواب رکتال (۶ سویه) بیماران بستری جدا شده بودند. از نمونه‌های بیماران سرپایی، سویه‌های VRE جدا نشد، ولی از نمونه ادرار یکی از این بیماران، یک مورد سویه انتروکوکوس فکالیس مقاوم در حد متوسط جدا گردید. از مجموع ۲۲ سویه VRE، در ۱۵ سویه *VanA* و در ۷ سویه *VanB* شناسایی گردید. از مجموع ۱۵ سویه انتروکوکوس فسیوم، در ۱۰ سویه *VanA* و در ۲ سویه *VanB* مشاهده شد. از مجموع ۷ سویه انتروکوکوس فکالیس، در ۲ سویه *VanA* و در ۵ سویه *VanB* شناسایی شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده شیوع بیشتر ژنوتیپ *VanA* نسبت به *VanB* در سویه‌های مورد مطالعه بود.

وهایی و همکاران (۲۷) در تبریز، از مجموع ۵۷ سویه VRE مورد بررسی، در ۲۴ سویه *VanA* و در ۳۰ سویه *VanB* شناسایی کردند، ولی در ۳ سویه، ژن‌های *VanA/B* مشاهده نشد. از مجموع ۴۲ سویه انتروکوکوس فسیوم، در ۱۸ سویه *VanA* و در ۲۱ سویه *VanB* مشاهده شد، ولی در ۳ سویه، ژن‌های *VanA/B* مشاهده نشد. از مجموع ۱۵ سویه انتروکوکوس فکالیس، در ۶ سویه *VanA* و در ۹ سویه *VanB* شناسایی کردند. شریفی و همکاران (۲۸) در سویه‌های ایزوله شده در تبریز و ارومیه، از مجموع ۴۸ سویه VRE، در ۸۹٪ موارد *VanA* و در ۱۱٪ موارد *VanB* را تشخیص دادند. محمدی و همکاران (۱۹)، از مجموع ۱۵ سویه VRE، در ۱۲ سویه ژنوتیپ *VanA* را شناسایی کردند. ناطقیان و همکاران (۲۲)، در سویه‌های VRE ایزوله شده از مدفوع کودکان لوسمیک، در ۷۹٪ سویه‌ها *VanA*

REFERENCES

1. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008;20:19046.
2. Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, et al. Regional spread and control of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto Japan. *Eur J Clin Microbiol Dis* 2012; 31:311095-100.
3. Moaddab SR, Rafi A. Species identification and investigation of Vancomycin and high-level Aminoglycoside among clinical isolates of Enterococcal strains. *MJIRI* 2002; 16:165-68.
4. Olawale KO, Fadio SO, Taiwo SS. Prevalence of hospital – acquired enterococci infections in two primary – care hospitals in Osogbo, Southwestern Nigeria. *Afr J Infec Dis* 2011;5:40-46.
5. Metallidis S, Chatzidimitriou M, Tsona A, Bisiklis A, Lazaraki G, Koumentaki E, Gikas A, et al. Vancomycin resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a university hospital in Greece. *Braz J Infect Dis* 2006;10:179-84.
6. Littvik AM, López TN, González SE, Fernández CM, Pavan JV. Colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE) in intensive care unit patients in Cordoba City, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2006;38:28-30.
7. Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, et al. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3307-19.
8. Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). *J Antimicrob Chemother* 2003;52:382-88.
9. Murray PA, Rosenthal KE, Kobayashi GE, Pfaller MI, eds. *Medical microbiology*. 3rd ed. USA: Mosby; 1997. P.206-208.
10. Baron EL, Finegold SY, eds. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 8th ed. USA: Mosby; 1990. P.171-85.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 9th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. P:2-9.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. P. M7-A7.
13. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR 3rd. Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 Genes in Enterococci. *J Clin Microbiol* 1997;35:703-707.
14. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol Rev* 1993; 6:428-42.
15. Schouten MA, Hoogkamp. Korstaje JA, Meis JF, Voss A. Prevalence of vancomycin resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol* 2000; 19: 816-22.
16. 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: 111-13.
17. Mirzaei B, Naserpoor Farivar T, Juhari P, Aslani Mehr M, Babaei R. Investigation of the Prevalence of vanA and vanB genes in vancomycin resistant enterococcus (VRE) by Taq Man real time PCR Assay. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 2013; 3: 192-98.
18. Peset V, Tallon P, Sola C, Sanchez E, Sarrion A, Perez- Belles C, et al. Epidemiological, microbiological, clinical and prognostic factors of bacteremia caused by high level vancomycin resistant enterococcus species. *Eur J Clin Microbiol* 2000;19:742-49.
19. Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N, Ghafoorian S, Maleki A, Davoodian E, et al. Evaluation of drug resistance frequency among *Enterococci 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 Medici Sci* 2011;19:1-7. [In Persian]
20. Goodarzi H, Rajabiani A, Farahsh H, Sadeghi garmaroodi F. Isolation of Gram positive ,catalase negative cocci resistant to vancomycin from clinical specimens, 9th Iranian congress on infectious disease and tropical medicine. Tehran, Iran, 14-18 January 2001;. P: 67 of abstract book.

21. Ramazani A, Mohrez M, Asadi S, Nazgoei F, Islamifar A. Investigation of hospital infections caused by enterococci in Tehran hospitals. *Iran J Trop Infect Dis* 2002;7: 11-15. [In Persian]
22. Nateghian A, Robinson JL, Arjmandi K, Vosough P, Karimi A, Behzad A, et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in children with acute lymphoblastic leukemia at two referral centers in Tehran, Iran: a descriptive study. *Int J Infect Dis* 2011;15: 332-35.
23. Stosor V, Kruszynski J, Surianno T, Noskin G, Peterson LR. Molecular epidemiology of VRE. *Infect control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 653-59.
24. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, Keane CT. Incidence and detection of multidrug resistant enterococci in Dublin hospitals. *J Med Microbiol* 1997;46:150-56.
25. Toledano H, Schlesinger Y, Raveh D, Rudensky B, Attias D, Eidelman AI, et al. Prospective surveillance of vancomycin resistant enterococci in neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19: 282-87.
26. Teymornejad O, Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R. Epidemiologic evaluation of vancomycin resistant genes in *Enterococcus* spp. isolated from clinical samples. *J Fasa Uni Med Sci* 2011;1: 59-64. [In Persian]
27. Vahabi A, Hasani A, Nahaee MR, Farajnia S. Prevalence of ampicillin, gentamicin and vancomycin-resistant Enterococci in fecal samples from hospitalized and non-hospitalized patients in three educational hospitals of Tabriz University of Medical Sciences. *Med J Tabriz Uni of Med Sci and Health Serv* 2011;33:78-85. [In Persian]
28. 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;6:34-39.
29. Salem-Bekhit MM, Moussa IM, Muharram MM, Alanazy FK, Hefni HM. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of multidrug-resistant enterococci isolated from clinical specimens. *Indian J Med Microbiol* 2012;30:44-51.
30. Dombrádi Z, Dobay O, Nagy K, Kozák A, Dombrádi V, Szabó J. Prevalence of vanC vancomycin-resistant enterococci in the teaching hospitals of the University of Debrecen, Hungary. *Microb Drug Resist* 2012;18:47-51.
31. Yasliani S, Mobarez MA, Hosseini Doust R, Satari M, Teymornejad O. Linezolid vancomycin resistant *Enterococcus* isolated from clinical samples in Tehran hospitals. *Indian J Med Sci* 2009;63:297-302.