Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Frequency of vancomycin resistance and *vanA* gene in enterococci isolated from Tabriz Children's teaching and treatment center.

Shiva Khanmohammadi[1], Mohammad Reza Nahaei[2]*, Mohammad Ahangarzadeh Rezaee[3], Javid Sadeghi[4]

[1]M.Sc. Student in Higher Education, Institute of Raberashid, Tabriz, Iran.
[2]Department of Microbiology and Laboratory Sciences, School of Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[3]Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[4]Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
*Corresponding author; E-mail: nahaeim@yahoo.com

Received: 17 September 2016 Accepted: 27 November 2016 First Published online: 22 September 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 October-November; 40(4):16-23

Abstract

Background: Enterococci are part of the normal flora of both the human and animal gastrointestinal tract. The aim of the present study was to compare vancomycin resistance and *vanA* gene in clinical and stool isolates in children specimens.

Methods: One hundred enterococcal isolates were identified by laboratory tests and then they were examined for their antibiotic resistance. Resistant isolates were also studied by PCR for *vanA* gene.

Results: Of 50 stool isolates, 48 were *Enterococcus faecium* and 2 isolates were identified as *Enterococcus faecalis*. In our 50 clinical isolates, 23 were belonged to *Enterococcus faecium* while 27 isolates were *Enterococcus faecalis*. The stool isolates showed higher resistance to vancomycin than those from clinical isolates. In our stool isolates the rate of vancomycin resistance was 52%, while the vancomycin resistance rate in the clinical isolates was 32%. According to PCR results, in the 26 vancomycin resistant isolates from stool specimens, *vanA* gene was found in 1 isolate, though in our 16 vancomycin resistant isolates from clinical specimens, *vanA* gene was found in 10 isolates.

Conclusion: Vancomycin resistant enterococci are of public health concern, especially in hospitals. Our results showed that stool isolates had higher resistance to antibiotics than those from clinical isolates. In the stool isolates the rate of vancomycin resistance was 52%, while the vancomycin resistance rate in our clinical isolates was 32%, but *vanA* gene was more prevalent among clinical isolates than stool isolates.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, Clinical isolate, Stool isolate, Vancomycin resistance, *VanA* gene

How to cite this article: Khanmohammadi Sh, Nahaei M R, Ahangarzadeh Rezaee M, Sadeghi J. [Frequency of vancomycin resistance and *vanA* gene in enterococci isolated from Tabriz Children's teaching and treatment center]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 October-November;40(4):16-23. Persian.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

بررسی مقاومت به وانکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز و فراوانی ژن *vanA* در ایزوله های آزمایشی

شیوا خان محمدی[۱]، محمد رضا نهائی[۲*]، محمد آهنگرزاده رضایی[۳]، جاوید صادقی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، موسسه آموزش عالی ربع رشید، تبریز، ایران.
[۲]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه میکروب شناسی و علوم آزمایشگاهی، تبریز، ایران.
[۳]مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
[۴]دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل: nahaeim@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۷ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۶/۳۱
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ مهر و آبان؛ ۴۰(۴):۱۶-۲۳

چکیده

زمینه: انتروکوک‌ها به عنوان بخشی از فلور طبیعی روده در انسان و حیوانات مختلف می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی مقاومت به وانکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز و بررسی ژن *vanA* در آن‌ها بود.

روش کار: تعداد ۱۰۰ ایزوله انتروکوک با روش های آزمایشگاهی تعیین هویت و تعیین گونه شدند. سپس تست حساسیت آنتی بیوتیکی انجام گرفت. جهت تشخیص ژن مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (*vanA*) از روش PCR استفاده شد.

یافته ها: از ۵۰ ایزوله جمع آوری شده از مدفوع، ۴۸ ایزوله *انتروکوکوس فیسیوم* (*Enterococcus faecium*) و ۲ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecalis*) بودند. از ۵۰ ایزوله بالینی، ۲۳ ایزوله *انتروکوکوس فیسیوم* و ۲۷ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* بودند. میزان مقاومت به وانکومایسین در ایزوله‌های مدفوعی بیشتر از ایزوله‌های بالینی بود، به این صورت که در ۵۲٪ از ایزوله‌های مدفوعی و ۳۲٪ از ایزوله‌های بالینی مقاومت به وانکومایسین مشاهده شد.

پس از انجام PCR نتایج حاصله نشان داد که، از ۲۶ ایزوله مدفوعی مقاوم به وانکومایسین، پس از انجام الکتروفورز، تنها یک ایزوله دارای ژن *vanA* بود و از ۱۶ ایزوله بالینی مقاوم به وانکومایسین ۱۰ ایزوله دارای ژن *vanA* بودند.

نتیجه گیری: مقاومت انتروکوک ها در برابر وانکومایسین دارای اهمیت پزشکی است که در بیمارستان ها مشکلات درمانی ایجاد می کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که انتروکوک‌های جدا شده از مدفوع در مجموع نسبت به انتروکوک‌های جدا شده از نمونه های بالینی، سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری دارند. در مورد وانکومایسین مقاومت در ایزوله های مدفوعی ۵۲٪ و در ایزوله های بالینی ۳۲٪ به دست آمد اما ظهور ژن مقاومت به وانکومایسین (*vanA*) در نمونه‌های بالینی بیشتر از نمونه‌های مدفوعی بود.

کلید واژه ها: *انتروکوکوس فیسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس*، ایزوله بالینی، ایزوله مدفوعی، مقاومت به وانکومایسین، ژن *vanA*.

نحوه استناد به این مقاله: خان محمدی ش، نهائی م ر، آهنگرزاده رضایی م، صادقی ج. بررسی مقاومت به وانکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز و فراوانی ژن *vanA* در ایزوله های آزمایشی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۴):۱۶-۲۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

انتروکوک‌ها به طور طبیعی در دستگاه گوارش انسان و حیوانات مختلف ساکن هستند (۱). این باکتری‌ها ممکن است در خاک، آب، گیاهان، سبزیجات و همچنین در برخی ازمواد غذایی و به عنوان پروبیوتیک‌های انسانی مطرح باشند (۲و۳). انتروکوک‌ها از جمله شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی، به ویژه در بخش‌های مراقبت‌های ویژه هستند (۴). این باکتری‌ها در سالمندان و یا کسانی که سیستم ایمنی بدن آنها آسیب دیده باشد و در افراد دارای بیماری‌های شدید مثل دیابت، بدخیمی‌ها، عفونت‌های عمقی و زخم بستر و همچنین در دستکاری و استفاده از وسایل تشخیصی، درمانی و کاترگذاری در دستگاه گوارش، ادراری و تنفسی، عفونت‌هایی مثل باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت‌های ادراری، عفونت‌های زخم و عفونت در مجاری صفراوی را موجب می‌شوند (۷-۵). توانایی اتصال به بافت‌ها و ایجاد بیوفیلم به واسطه‌ی پروتئین‌های سطحی، گلیکولیپیدهای غشایی، ژلاتیناز و پیلی و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از عوامل ویرولانس این باکتری محسوب می‌شوند (۸). زمانی که فرد در بیمارستان بستری می‌شود، باکتری در دستگاه گوارش فرد کلونیزه شده و سپس این باکتری تحت شرایط مناسب رشد کرده و از محل استقرار اولیه به دستگاه ادراری، زخم‌های ناشی از جراحی‌ها و یا جریان خون راه پیدا کرده و ایجاد بیماری و عفونت می‌کند. مقاومت دارویی نقش ضروری در پاتوژنز انتروکوک ندارد ولی کلونیزاسیون آنها را در دستگاه گوارش تسهیل می‌کند. همچنین یکی از چندین فاکتور کلونیزاسیون یا به عنوان یک فاکتور بغرنج کننده درمان عفونت‌های انتروکوکی است (۹). پروتئین‌های سطحی انتروکوک‌ها هم از عوامل دیگر افزایش کلونیزاسیون در بیماران بستری در بیمارستان می‌باشند (۱۰). پروتئین‌های سطحی انتروکوک به دیواره سلولی متصل‌اند و در تشکیل بیوفیلم تاثیر می‌گذارند (۱۱). برای کشتن انتروکوک‌ها به اثر سینرژیستیک پنی‌سیلین و یک آمینوگلیکوزید مثل جنتامیسین نیاز است. با این حال مقاومت به این دو آنتی‌بیوتیک نیز گزارش شده است (۱۲). در گونه‌های مقاوم به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و آمینوگلیکوزید می‌توان از درمان با گلیکوپپتیدها مانند وانکومایسین و تیکوپلانین استفاده کرد ولی مقاومت به این داروها نیز به طور روزافزون افزایش یافته است (۱). وانکومایسین یک آنتی‌بیوتیک باکتریسید است که با مهار سنتز دیواره سلولی و مسدود کردن پلی‌مریزه شدن گلیکوپپتید باکتری‌های حساس به آن، عمل می‌کند (۱۳). تاکنون دخالت ژن‌های مختلفی در مقاومت به وانکومایسین در جهان گزارش شده است که شامل (*vanA*، *vanB*، *vanC*، *vanD*، *vanE* و *vanG*) می‌باشد (۱۴). ژن مسئول ایجاد مقاومت به وانکومایسین، موسوم به ژن *van* می‌باشد. مجموعه ژنی *vanA* بر روی ترانسپوزون Tn1546 قرار دارند که توانایی ورود در پلاسمید کونژوگاتیو را دارد که این پلاسمید علاوه بر توانایی انتقال در بین گونه‌های مختلف انتروکوک، به جنس‌های دیگر باکتری از قبیل استافیلوکوک نیز منتقل می‌شود. سه ژن اصلی موجود بر روی این مجموعه ژنی، ژن‌های *vanH*، *vanA* و *vanX* می‌باشند. *vanA* آنزیم لیگاز را کد می‌کند که یک باند استری را بین د ـ آلانین و د ـ لاکتات کد می‌کند. *vanH* آنزیم دهیدروژناز را کد می‌کند که پیرووات را به د ـ لاکتات احیا می‌کند و دی پپتید د ـ آلانین ـ د ـ لاکتات ایجاد شده را جایگزین د ـ آلانین ـ د ـ آلانین در سنتز پپتیدوگلیکان می‌کند؛ این جایگزینی افینیتی برای گلیکوپپتید را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. ژن *vanX* نیز د ـ آلانین ـ د ـ آلانین ایجاد شده توسط لیگاز میزبان را هیدرولیز می‌کند (۱۷-۱۵). مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است، در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط اسدیان و همکاران در شیراز صورت گرفت، از ۱۴۶ نفر مورد بررسی ۹ نفر(۶/۲ ٪) برای VRE مثبت بودند (۱۸). در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۰ توسط محمدی و همکاران در ایلام و کرمانشاه صورت گرفت از بین ۱۸۰ ایزوله، ۱۲۸ ایزوله (۷۱٪) انتروکوکوس فکالیس و ۵۲ ایزوله (۲۹٪) انتروکوکوس فیسیوم شناسایی شدند که، ۸/۳٪ مقاوم به وانکومایسین بودند و از بین ۱۵ ایزوله ی مقاوم، در ۱۲ ایزوله ژن *vanA* مشاهده گردید (۱۹). در مطالعه ای که در سال۲۰۱۳ توسط پوراکبری و همکاران در ایران صورت گرفت، از ۹۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، ۱۵ مورد(۱۶٪) به وانکومایسین مقاوم بودند (۲۰). لذا، با توجه به افزایش انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین و تبدیل آن به تهدیدی جدی برای بیماران بستری در بیمارستان، در این مطالعه فراوانی مقاومت به وانکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز و همچنین حضور ژن *vanA* در انتروکوک‌های مقاوم مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

تعداد ۱۰۰ ایزوله انتروکوک از بخش های مختلف مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز در طی یک سال جمع آوری شد که تعداد ۵۰ ایزوله از نمونه های بالینی بیماران و ۵۰ ایزوله از نمونه‌های مدفوعی بیماران به دست آمد. ایزوله های بالینی از نمونه های مختلف از بخش های سرپایی، داخلی A، داخلی B، اورژانس، عفونی، ICU، NICU، هماتولوژی و نوزادان جمع آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیماران پس از تعیین هویت به محیط TSB (Merck) حاوی ۱۵٪ گلیسرول منتقل و در ۲۰°C- فریز شدند. در آماده‌سازی نمونه‌های مدفوعی نمونه‌ها مستقیماً از مدفوع برداشته شده و بلافاصله به محیط اختصاصی M- Enterococcus agar (QUELAB) منتقل شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار

گرفتند. پس از انکوباسیون، رشد مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌ها از نظر مرفولوژی به صورت ریز و به رنگ شیری مایل به صورتی روشن با اطراف صاف و محدب بودند. پس از تایید انتروکوک‌ها به منظور خالص سازی بیشتر، کلنی‌ها به محیط Blood agar (Liofilchem) منتقل شده و ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت کلنی‌هایی به صورت ریز و به رنگ سفید که برخی دارای همولیز بودند نمایان شدند. پس از تکمیل تست‌های تاییدی، به منظور ذخیره سازی برای انجام آزمایش های بعدی، کلنی‌ها به محیط TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول منتقل شده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مشاهده کدورت، به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. برای تایید تشخیص جنس ایزوله های انتروکوکوس از کشت روی محیط M- Enterococcus Agar، آزمون کاتالاز، کشت در محیط Bile esculin agar (Merck)، رشد در محیط کشت محتوی 5/ 6% NaCl، استفاده شد (۲۱). به منظور شناسایی گونه انتروکوک از آزمون حرکت و تخمیر قندها استفاده شد (۲۲و۲۳). تست حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل وانکومایسین (۳۰µg)، جنتامیسین (µg ۱۰)، اریترومایسین (۱۵µg) و تتراسایکلین (µg ۳۰) انجام گرفت، به این صورت که برای تست تعیین حساسیت از کشت‌های تازه ۲۴ ـ ۱۸ ساعته باکتری در محیط Blood Agar استفاده شد. در ابتدا از کلنی‌های رشد یافته، تک کلنی توسط لوپ برداشته شد و به لوله آزمایش حاوی ۴ میلی لیتر محیط TSB استریل تلقیح و به مدت ۴ ـ ۲ ساعت در دمای ۳۷ ـ ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس میزان کدورت بررسی شد که باید کدورتی برابر با ۰/۵ مک فارلند به دست آید. ظرف ۱۵ دقیقه پس از تنظیم کدورت، یک سوآپ استریل پنبه‌ای در داخل سوسپانسیون باکتری فرو برده شد سپس سوآپ روی تمام محیط صاف و خشک Muller-Hinton Agar (ATD) و در تمام جهات کشت داده شد. محیط کشت به مدت ۵ ـ ۳ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد تا رطوبت آن جذب شود. سپس با استفاده از یک پنس استریل، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله حداقل mm ۲۴ از هم بر روی پتری دیش قرار داده شدند. پتری دیش‌ها تا ۱۵ دقیقه بعد از گذاشتن دیسک‌ها به انکوباتور ۳۷̊C به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه گیری شده و بصورت مقاوم، حساسیت بینابینی و حساس گزارش شدند. برای اطمینان از صحت نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی از سویه های استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC25923 و *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 استفاده شد (۲۴ و۲۵).

برای استخراج DNA از روش Tissue buffer استفاده شد. مقداری کلنی باکتریایی را در ۲۰µl بافر تی‌شو حل گردید و سپس برای شکستن دیواره باکتری در دمای ۹۵̊C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰g و با دمای ۵ درجه سانتریفیوژ انجام شد. بدین منظور از سانتریفیوژ Vision یخچال‌دار و با دور بالا استفاده شد. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی که حاوی ژن است برداشته و به آن ۱۸۰µl آب دیونیزه اضافه شد که محلول به دست آمده مورد مصرف واقع شد (۲۶). جهت انجام PCR از پرایمرهای

F: 5'- CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-3'
و R: 5'- CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3'

استفاده شد (۲۷). جهت تکثیر این ژن از سیکل حرارتی زیر استفاده شد: دناتوراسیون اولیه در ۹۵̊ C به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل شامل (دناتوراسیون در ۹۵̊C به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۴̊C به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی در ۷۲̊C به مدت ۱ دقیقه) و طویل شدن نهایی در ۷۲̊C به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۲۷). مواد استفاده شده در آزمایش‌های PCR این تحقیق از شرکت‌های سینا کلون و یکتا تجهیز آزما تهیه شد و جهت آزمایش‌های PCR از دستگاه‌های ترموسایکلر Eppendorf و BIO RAD استفاده شد. پس از اتمام PCR محصول آن با استفاده از بافر TBE در ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز شده و سپس با اتیدیوم بروماید (۰.۵µg/ml) رنگ آمیزی شده و با gel document مدل UVP از ژل عکس برداری شد. سویه استاندارد ATCC25923 *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 به عنوان کنترل منفی و *Enterococcus faecalis* V583 به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

یافته ها

ایزوله‌ها پس از رشد روی محیط کشت اختصاصی به روش گرم، رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ بررسی شدند که از این بین ۵۰ ایزوله مدفوعی و ۵۰ ایزوله بالینی، کوکسی گرم مثبت مدور به صورت زنجیره‌ای و یا دوتایی بودند. تمام ۱۰۰ ایزوله بررسی شده در این مطالعه، کاتالاز منفی بودند و نشانگر عدم وجود آنزیم کاتالاز بود. پس از تلقیح ۲ الی ۳ کلنی به محیط بایل اسکولین آگار، بعد از ۲ ساعت قسمتی از محیط و حداکثر تا ۲۴ ساعت تمام محیط به رنگ سیاه تغییر یافت. ایجاد کدورت حاصل از تلقیح کلنی به محیط نوترینت براث حاوی ۶/۵٪ NaCl نشانگر مثبت بودن آزمایش و تایید جنس انتروکوک بود. در تمام ۱۰۰ ایزوله که از نظر جنس انتروکوک تایید شدند. آزمون حرکت منفی بود بدین معنی که رد آنس مشاهده شد و محیط شفاف بود. آزمایش تخمیر قند توسط قندهای آرابینوز و سوربیتول که به صورت دیسک تهیه شده بودند انجام گرفت. رنگ زرد نشانگر مثبت بودن آزمایش و رنگ صورتی تا قرمز نشانگر منفی بودن آزمایش بود. جدول ۱ توزیع فراوانی گونه‌های انتروکوکوس جدا سازی شده را در ایزوله های مورد بررسی نشان می دهد.

در ایزوله‌های جدا شده از مدفوع مقاومت به وانکومایسین بیشتر از ایزوله‌های بالینی بود. همچنین در ایزوله‌های جدا شده از مدفوع و ایزوله‌های بالینی بیشترین مقاومت مربوط به جنتامیسین و کمترین مقاومت مربوط به وانکومایسین بود. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین ایزوله های مدفوعی وایزوله های بالینی نسبت به وانکومایسین وجود داشت (P=۰/۰۰۴)، اما اختلاف معنی دار بین ایزوله های مدفوعی وایزوله های بالینی نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها وجود نداشت. جدول ۲ توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های انتروکوکوس از منابع مختلف نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی را نشان می دهد. در بین ایزوله های بالینی بیشترین تعداد ایزوله از نمونه های ادراری بدست آمد (۸۲٪). جدول ۳ توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی به تفکیک نوع نمونه را نشان می دهد. آنالیز آماری با استفاده از t-test نشان داد که اختلاف بین ایزوله های بالینی در رابطه با مقاومت به تتراسایکلین معنی دار نبود (P=۰/۳۳۱) ولی نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵).

در این مطالعه بررسی حضور ژن مقاومت در برابر وانکومایسین (*vanA*) با پرایمرهای اختصاصی بر روی کلیه سویه‌های جدا شده انجام گرفت. پس از بهینه سازی شرایط و انجام آزمون PCR برروی ایزوله‌هایی که در تست آنتی‌بیوگرام نسبت به وانکومایسین مقاوم بودند، محصول PCR ژن *vanA* با وزن مولکولی ۱۰۳۰ جفت باز به دست آمد. در مورد ژن *vanA*، از ۲۶ ایزوله جدا شده از مدفوع که به وانکومایسین مقاوم بودند فقط ۱ ایزوله دارای ژن *vanA* بود ولی از ۱۶ ایزوله بالینی که به وانکومایسین مقاوم بودند ۱۰ ایزوله دارای ژن *vanA* بودند. شکل ۱ ژن مقاومت به وانکومایسین را در انتروکوک ها به روش PCR نمایش می دهد.

جدول ۱: توزیع فراوانی گونه‌های انتروکوکوس جدا سازی شده

نمونه آزمایشی (تعداد ایزوله)	گونه	تعداد (٪)
مدفوع (۵۰)	*E. faecium*	(۹۶) ۴۸
	E. faecalis	(۴) ۲
بالینی (۵۰)	*E. faecium*	(۴۶) ۲۳
	E. faecalis	(۵۴) ۲۷

جدول ۲: توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های انتروکوکوس از منابع مختلف نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

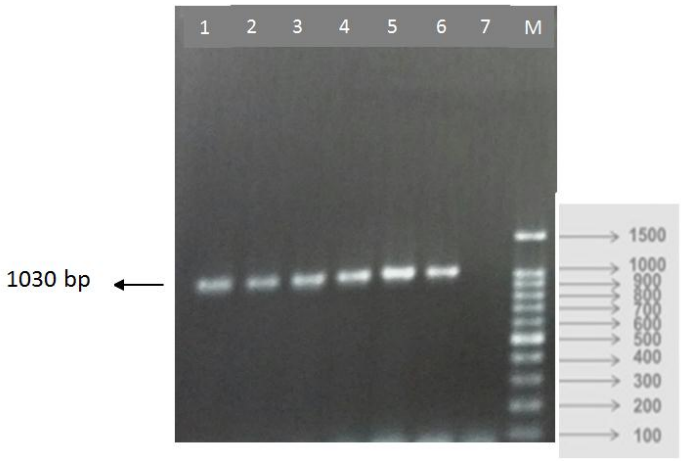
محل جداسازی ایزوله ها	مقاومت آنتی‌بیوتیکی تعداد (٪)			
	V	GM	E	TE
نمونه‌های مدفوعی	(۵۲) ۲۶	(۸۴) ۴۲	(۸۰) ۴۰	(۷۶) ۳۸
نمونه‌های بالینی	(۳۲) ۱۶	(۸۲) ۴۱	(۸۰) ۴۰	(۷۲) ۳۶

V: Vancomycin، GM: Gentamicin، E: Erythromycin ، TE: Tetracycline

جدول ۳: توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی به تفکیک نوع نمونه

منشا جداسازی ایزوله ها	مقاومت آنتی‌بیوتیکی تعداد (٪)			
	V	GM	E	TE
ادرار	(۲۹/۲۶) ۱۲	(۸۲/۹۲) ۳۴	(۸۰/۴۸) ۳۳	(۷۸/۰۴) ۳۲
خون	(۲۰) ۱	(۶۰) ۳	(۶۰) ۳	(۲۰) ۱
ترشحات گوش	۰	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱
زخم	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱
مایع آسیت	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱
بیوپسی بافت پوست	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	(۱۰۰) ۱	۰

V: Vancomycin، GM: Gentamicin، E: Erythromycin ، TE: Tetracycline



شکل ۱: نمایش ژن مقاومت به وانکومایسین در انتروکوک ها به روش PCR
M: سایز مارکر (۱۰۰ bp DNA)
۱-۵: ایزوله های محتوی ژن *vanA* (۱۰۳۰ bp)
۶: نمونه کنترل مثبت *E. faecalis* V583 دارای ژن *vanA*
۷: ایزوله فاقد ژن *vanA*

بحث

انتروکوک‌ها فلور نرمال پایدار در دستگاه گوارش انسان بوده و مسئول ایجاد عفونت‌های شدیدی مانند اندوکاردیت عفونی می‌باشند، که انتروکوکوس فکالیس شایع‌ترین عامل این بیماری‌ها می‌باشند (۲۸). در میان نمونه‌های جداسازی شده از مدفوع، گونه غالب انتروکوکوس فیسیوم بود. نتایجی مشابه با نتایج این مطالعه در مطالعات قبلی مشاهده شده است به این صورت که در مطالعه انجام شده در جیمیا واتیوپی، ۳۵/۱٪ از جدایه‌های به دست آمده انتروکوکوس فیسیوم و ۲۹/۵٪ انتروکوکوس فکالیس بودند (۲۹). همچنین در کویت و برزیل هم نتایجی مشابه با نتیجه این مطالعه به دست آمده است (۲۹).

ولی در مطالعه انجام گرفته در ایالات متحده، نتایج در تضاد با نتیجه این مطالعه بود (۲۹). در مورد نمونه‌های بالینی در این مطالعه همانطور که انتظار می‌رفت گونه غالب انتروکوکوس فکالیس بود که ۵۴٪ به دست آمد. نتایجی مشابه با نتایج این مطالعه در مطالعات قبلی مشاهده شده است. به این صورت که در مطالعه انجام شده در چین ۶۳/۲٪ از جدایه‌های به دست آمده انتروکوکوس فکالیس و ۳۶/۸٪ انتروکوکوس فیسیوم بودند (۳۰). ولی در مطالعات دیگری که در هند انجام گرفته، نتایج در تضاد با نتیجه این مطالعه بود (۳۱). این اختلاف احتمالا به دلیل تفاوت در نمونه گیری در فصول سرد و گرم سال، همچنین تفاوت در تعداد ایزوله ها می باشد.

وانکومایسین برای درمان عفونت‌های انتروکوکی، اولین بار در سال ۱۹۷۲ در موارد بالینی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ ایزوله انتروکوک از بخش های مختلف بیمارستان کودکان تبریز جمع آوری شد که در ایزوله های جدا شده از مدفوع و ایزوله‌های بالینی بیشترین مقاومت مربوط به جنتامیسین و کمترین مقاومت مربوط به وانکومایسین بود. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین ایزوله های مدفوعی وایزوله های بالینی نسبت به وانکومایسین وجود داشت (P=۰/۰۰۴)، اما اختلاف معنی دار بین ایزوله های مدفوعی وایزوله های بالینی نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها وجود نداشت (P>۰/۰۵). در این مطالعه مقاومت ۵۲٪ به وانکومایسین در نمونه‌های جدا شده از مدفوع مشاهده شد. در مطالعه‌ای که در جیمما و اتیوپی انجام گرفته بود، ۵٪ VRE، در مدفوع بیماران بستری گزارش شده بود (۲۹). در مطالعه‌ای در ایران نیز ۱۵٪ از انتروکوک‌های جدا شده از مدفوع نسبت به وانکومایسین مقاومت نشان داده بودند (۳۲). در این مطالعه، مقاومت ۳۲٪ به وانکومایسین در نمونه‌های جدا شده از بالین مشاهده شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ در ایالات متحده (US) انجام گرفته بود، ۳۰/۴٪ VRE از نمونه‌های بالینی گزارش شده بود (۳۳). در این مطالعه، از ۲۶ ایزوله مدفوعی مقاوم به وانکومایسین، تنها ۱ ایزوله دارای ژن *vanA* بود و از ۱۶ ایزوله بالینی مقاوم به وانکومایسین، ۱۰ ایزوله دارای ژن *vanA* بودند. در مطالعه‌ای در چین از ۱۲۵ ایزوله مورد بررسی، تنها ۸ انتروکوکوس فیسیوم مقاوم در برابر وانکومایسین دارای ژن *vanA* بودند (۳۰). در مطالعه جامعی که توسط Bouchillon و همکاران در ۱۳ بیمارستان اروپا و ۳ بیمارستان خاورمیانه و ۱ بیمارستان در آفریقا انجام گرفت اکثریت سویه‌های جدا شده دارای مقاومت از نوع *vanA* بودند و فقط تعداد کمی دارای مقاومت از نوع *vanB* بودند (۳۴). از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که انتروکوک‌های جدا شده از مدفوع، دارای سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت به

انتروکوک‌های جدا شده از بالین می‌باشند، اما ظهور ژن مقاومت به وانکومایسین (*vanA*) در نمونه‌های بالینی نسبت به نمونه‌های مدفوعی بیشتر می‌باشد.

نتیجه گیری

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که در مجموع انتروکوک‌های جدا شده از مدفوع، دارای سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت به انتروکوک‌های جدا شده از نمونه های بالینی می‌باشند؛ در مورد وانکومایسین مقاومت در ایزوله های مدفوعی ۵۲٪ و در ایزوله های بالینی ۳۲٪ به دست آمد. اما ظهور ژن مقاومت به وانکومایسین (*vanA*) در نمونه‌های بالینی نسبت به نمونه‌های مدفوعی بیشتر بود.

قدردانی

نتایج این مطالعه مربوط به پایاننامه خانم شیوا خان محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز می باشد. در ضمن از همکاری های پرسنل محترم آزمایشگاه مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز که در این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی ندارد.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ش خ، م ن و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را به عهده داشته، همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

References

1. Rafiei Tabatabai S, Vosogiyan Z, Navidynya M, Moradi A, Karimi A. The prevalence of vancomycin resistance in enterococci isolated from patients at Mofid Children's Hospital. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2009; **14**(2): 35-38. (Persian).
2. Doming K J, Mayer H K, Knetel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization, and identification of Enterococcus SPP. Media for isolation and enumeration. *Int J food Microbiol* 2008; **88**(2-3): 147-164. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00177-6
3. Mannul L, Paba A, Pes M, Fioris R, Scintu M F, Morelli L. Strain typing among enterococci isolated from home-made pecorino sardo cheese. *FEMS Microbiol Lett* 1999; **170**: 25-30. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13351.x
4. Aslani Mehr M, Peymani A, Darzi Ramndy D, Naseripour Farivar T. The frequency of genes *ermA, B, C* in resistance to erythromycin Enterococci isolated from clinical samples of patients admitted in university hospitals in Qazvin and Tehran. *Med J Mashad Univ Med Sci* 2014; **57**(4): 655-662. (Persian).
5. Morrison D, Wood ford N, Barrett SP, Sisson P, Cook Son B D. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1084-1091.
6. Rahimi M K. *Compressed Medical Microbiology*. 2nd ed. 3rd print. Tehran, Ayizh Pub, 2009; PP: 121. (Persian).
7. Soltani Arabshahi K, Forouhesh Tehrani H, Mahmoud Arabi S. Enterococci resistant to vancomycin in hospitalized patients. *J Iran Univ Med Sci* 2008; **6**(4): 302-309. (Persian).
8. Patrick R M, Kem S R, Michael A F, Translation Zeighami H, Haggi F, Al boyeh M, et al. *Murray Medical Microbiology*. 7th ed. 1st print. Tehran, Etminan Pub, 2013; PP: 279-282.
9. Facklam R R, Carvalho M G, Teixeria L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococcus. In: *The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. (Gilmore M.S). Washington D.C, American Society for Microbiology, 2002; PP: 1-46. doi: 10.1128/9781555817923.ch1
10. Hallgren A, Clesson C, Saeedi B, Monstein H-J, Hanberger, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol* 2009; **299**(5): 323-332. doi: 0.1016/j.ijmm.2008.10.001
11. Arias C A, Murray B E. The rise of the enterococcus: beyond vancomysin resistance. *Nat Rev Microbial* 2012; **10**(4): 266-278. doi: 10.1038/nrmicro2761
12. Jawetz E, Levinson W. Translation by Setoodenia A. Under the supervision of Malek nezhad P. *Summary and analysis of Medical Microbiology*. 7th ed. 1st print. Tehran, Nasleh farda Pub, 2005; PP: 139-146. (Persian).

13. Saebi A. *Clinical Pharmacology generic drugs Iran*. 15th ed. 1st print. Tehran, Ayizh Pub, 2001; PP: 266-268. (Persian).
14. Oskoee M, Farrokh B. Phenotypic and genotypic characterization of strains of vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical samples. *Iran J Med Microbiol* 2008; **2**(1): 15-22. (Persian).
15. .Murray P R. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington D.C, 1995; PP: 172-174.
16. Viera T C, Tsiodras S, Gold H S, Coakley E. P. G, Wennersten C, Eliopoulos G M, et al. Restoration of vancomycin susceptibility in *Enterococcus faecalis* by Antiresistant determinate gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(3): 973-976. doi: 10.1128/AAC.45.3.973-975.2001
17. Kak V, Chow J W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. (Clewell D. B, Courvalin P, Dunny G. M, Murray B. E, Rice L. B). ASM Press, Washington, DC, 2002; PP: 355-383. doi: 10.1128/9781555817923
18. Assadian O, Askarian M, Stadler M, Shaghaghian S. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients. *BMC Infect Dis* 2007; **7**: 52. (Persian). doi: 10.1186/1471-2334-7-52
19. Mohammadi F, Tabraee B, Davodiyan A, Maleki A, Malek niya SH, Sadeghi fard N, et al. Study of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains drug resistant and *vanA/B* gene identified among vancomycin resistant strains with PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. *Iran J Med Microbiol* 2011; **5**(5): 14-18. (Persian).
20. Pour akbari B, Mahmoudi S, Aghdam M K, Sabouni F, Eshaghi H, Alizadeh S, et al. Clonal spread of vancomycin resistance Enterococcus faecalis in an Iranian referral pediatrics center. *G prev Med Hyg* 2013; **54**(2): 87-89. (Persian).
21. Winn C, Allen S D, Janda W M, Koneman E W, Paul C. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Washington, Schreckenberger, 2005; PP: 672-764.
22. Trigan and Palyam. Translation by Nahaei M R, Jalali A. *Microbiology Laboratory Methods*. Tabriz, Zoghi Publications, 1987; PP: 14-26. (Persian).
23. Hehman D C, Mahon C R, Suvarna K. Streptococcus, Enterococcus and other catalase-negative Gram positive cocci. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. (eds: Mahon C R, Hehman D C, Manuselis G). 5th ed. Maryland, Sunders, 2015; PP: 341.
24. *National Committee for clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that aerobically*. 5th ed. Approved Standards M7-A5. 20(2): National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 2000. 428-486.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 23rd Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute document, Wayne, PA, M100-S23.
26. Open Wet Ware Contributors. Gill: Rapid bacterial DNA Prep, Open Wet Ware, 17 January 2014. < http:// Open Wet Ware. Org/ index. Php? Title = Gill: Rapid_Bacterial-DNA- Prep 8 ol did= 765014> [accessed 24Janury 2016].
27. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow J W, Clewell D B, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3092-3095.
28. Murray B E. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 1990; **3**(1): 46-65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46
29. Abamech A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC Research Notes* 2015; **8**: 213. doi: 10.1186/s13104-015-1200-2
30. Jiajia Y, Jinfang S H, Rulke Z H, Qingzhen H, Xuefeng Q, Guohao G, et al. Molecular characterization and resistant spectrum of Enterococci isolated from a haematology unit in china. *J Clin Diagn Res* 2015; **9**(6): DCO4-DCO7. doi: 10.7860/jcdr/2015/12864.6097
31. Leavis H L, Bonten M J, Willems R J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 454-460. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.001
32. Afkhamzadeh A, Asgarian M, Barari M, Hadinia B, Jowkar M. Intestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci in wards compared to surgical wards in Nemazee hospital. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2008; **13**: 7-14. (Persian).
33. Sader H S, Moet G J, Farrell D J, Jones R N. Antimicrobial susceptibility of daptomycin and comparator agents tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: trend analysis of a 6-year period in US medical centers (2005–2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**(3): 412–416. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.02.008
34. Bouchillon S K, Hoban D J, Johnson B M. In vitro evaluation of tigecycline and comparative agents in 3049 clinical isolates: 2001-2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**(4): 291-295. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.11.006