Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

مقاله پژوهشی

تشخیص ژن‌های vanA, vanB, vanC با روش Multiplex-PCR در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در بیماران بستری

سیدرضا مؤدب[1]، بهزاد کاظمی حکی*[2]، نادر ابراهیمی آتش خسرو[3]

تاریخ دریافت 1394/01/23 تاریخ پذیرش 1394/03/27

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: بعد از اولین شناسایی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin Resistant Enterococci:VRE) در اواسط دهه ۸۰ میلادی ایزوله‌هایVRE به‌سرعت در سطح جهان شیوع یافته و یکی از مشکلات جدی در بیمارستان‌ها بخصوص در میان بیماران بستری شدند. از میان گونه‌های مختلف انتروکوک‌ها، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم از علل مهم و مهلک بیماری‌های عفونی محسوب می‌شوند. ژن‌های vanA/B/C عامل مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک‌ها هستند. هدف این تحقیق شناسایی ژن‌هایvanA/B/C در ایزوله‌های جداشده از بیماران بستری در برخی از بیمارستان‌های تبریز بود.

مواد و روش‌ها: درمجموع ۱۲۰ ایزوله غیرتکراری انتروکوک، از بعضی از بیمارستان‌های تبریز جمع‌آوری گردیدند. ایزوله‌ها از نمونه‌های سواب رکتال و سایر نمونه‌های بیماران بستری جداشده و با آزمون‌های استاندارد میکروب‌شناسی تعیین گونه شدند. تعیین MIC ونکومایسین با روش ماکرودایلوشن براث، انجام شد. برای تشخیص ژن‌هایvanA/B/C از Multiplex PCR با کاربردن سه سری پرایمر انجام گردید.

یافته‌ها: از تعداد ۱۲۰ ایزوله، تعداد ۱۰۵ ایزوله به‌عنوان انتروکوکوس فکالیس و تعداد ۱۵ ایزوله به‌عنوان انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند از تعداد ۱۲۰ ایزوله تعداد در تعداد ۲۲ ایزوله (۱۸،۳%) به‌عنوان ایزوله‌های VRE شناسایی گردیدند. این ایزوله‌ها، تعداد ۶ ایزوله از نمونه مدفوعی و ۱۶ ایزوله از ادرار جدا شده بودند. با روش PCR، ژنوتیپ vanA در ۱۰ انتروکوکوس فسیوم و در ۲ انتروکوکوس فکالیس شناسایی شد. همچنین vanB در ۵ انتروکوکوس فسیوم و در ۵ انتروکوکوس فکالیس تشخیص داده شد. ژنوتیپ vanC در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: مشابه نتایج ما، مطالعات انجام‌شده منطقه‌ای، کشوری و بین‌المللی نشان می‌دهد که ایزوله‌های VRE از نمونه‌های بیماران و از فلور طبیعی آن‌ها جدا می‌شوند. از طرف دیگر ژنوتیپ vanA شایع‌تر از vanB می‌باشد. تشخیص ایزوله‌های VRE در بیماران و افراد کلونیزه شده برای جلوگیری از گسترش این ایزوله‌ها اساسی می‌باشد.

واژگان کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم،vanA/B/C, Multiplex PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره پنجم، ص 369-359، مرداد 1394

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تلفن: ۰۹۱۴۹۳۸۰۷۶۵

Email: Behzad_emt@yahoo.co

مقدمه

انتروکوک‌ها به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب شامل بیش از ده‌ها گونه می‌شود که از باکتری‌های گرم مثبت، جز فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و بعضی از حیوانات شناخته می‌شوند. بعد از تشخیص اولین ایزوله[۴]VRE در سال ۱۹۸۸ در اروپا، گزارش‌های متعددی مبنی بر گسترش ایزوله‌ها در سطح جهانی و کشوری انتشار یافت. انتروکوک‌ها به علت توانمندی حصول مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز، می‌توانند موجب مشکلات جدی و حتی کشنده بخصوص در بیماران بستری گردند.

---

[۱] دانشیار مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، خدمات بهداشتی درمانی تبریز

[۲] کارشناس بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی تبریز (نویسنده مسئول)

[۳] کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

[۴] Vancomycin Resistant Enterococci

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

این باکتری‌ها در محیط مانند خاک، آب‌های سطحی، گیاهان، سبزیجات و مواد غذایی نیز کلونیزه می‌شوند. کلونیزه شدن انتروکوک‌ها در فلور طبیعی بیماران بستری، بخصوص ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، شرایطی برای بیمار فراهم می‌سازد که در صورت مداخلات درمانی مانند جراحی، استفاده از کاتترها و شانت‌ها، عفونت‌های فرصت‌طلب بسیار جدی ایجاد می‌کنند (۶-۱).

انتروکوک‌ها به‌طور ذاتی مقاومت بیشتری نسبت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم مثبت مشابه نشان می‌دهند ولی نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاومت کمتری دارند. روند مقاوم شدن انتروکوک‌ها بخصوص به گلیکوپپتیدها ازجمله ونکومایسین و تایکوپلانین به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. مقاوم شدن این‌گونه از باکتری‌ها، اغلب با پلاسمیدها اتفاق می‌افتد که می‌توانند به سرعت بین ایزوله‌های یک گونه و یا گونه‌های دیگر انتقال یابند. ظهور ایزوله‌های VRE، معضلی است که به‌عنوان 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 (۸ و ۷). 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 ونکومایسن، به استافیلوکوک ها 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 ونکومایسین، وجود ژن‌های VanA/B/C/D/E/G/L می‌باشد (۸-۶،۱).

به علت اهمیت و گسترش ایزوله‌های VRE, شناسایی ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به ونکومایسین برای کنترل شیوع 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 ایزوله‌ها، 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، همچنین از نمونه‌های بالینی، ایزوله‌های VRE را شناسایی کرده و میزان شیوع ژن‌های vanC، vanA،vanB را تشخیص دهیم. در تحقیقات قبلی vanC در انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس کاسی فلاوس شناسایی شده بود که در سال ۲۰۱۴ اولین ایزوله انتروکوکوس فسیوم از نمونه بالینی دارای ژن vanC نیز شناسایی گردید (۸-۵).

مواد و روش‌ها

این تحقیق بر روی نمونه‌های کشت داده‌شده مدفوع، سواب رکتال و همچنین نمونه‌های بالینی بیماران بستری ارسال‌شده به آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بیمارستان‌های امام رضا، سینا، شهید مدنی و آزمایشگاه استان آذربایجان شرقی، طی مدت شش ماه (اول اردیبهشت‌ماه تا پایان مهرماه ۱۳۸۹) انجام شده است. ایزوله‌های مشکوک به انتروکوک پس از انتقال به آزمایشگاه سل و بیماری‌های ریوی تبریز (به علت وجود تجهیزات لازم مولکولی در آن مرکز)، بر روی محیط اختصاصی انتروکوک آگار[1] تلقیح شده، انکوبه گردید. سپس آزمایش‌های تشخیصی بر روی ایزوله‌ها با رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. با استفاده از تست کاتالاز، کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی جدا شدند. سپس ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی، با تست هیدرولیز بایل اسکولین و رشد در ۶/۵ درصد نمک شناسایی شدند. تعیین گونه با استفاده از مصرف قندهای مانیتول، آرابینوز، سوربیتول، سوکروز و رافینوز، همچنین تولید پیگمان در محیط BHI انجام گردید (۱۲-۷).

بر اساس پروتکل‌های CLSI[2]، جهت تعیین حساسیت دارویی به ونکومایسین، ابتدا از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. سپس برای تعیین MIC[3] از روش ماکرودایلوشن براثاستفاده شد که مقاومت به ونکومایسین را اثبات می‌کند (۱۲-۹).

در ایزوله‌های VRE، برای شناسایی ژن‌های vanC، vanB، vanA از روش Multiplex PCR استفاده گردید. جداسازی DNA با روش جوشاندن در تریس بافر استریل به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفوژ در ۱۵۰۰g انجام شد و مایع رویی به‌عنوان نمونه DNA باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در PCR، برای شناسایی ژن‌های عامل مقاومت از ۳ جفت پرایمراستفاده شد (جدول ۱). ترکیب بافر واکنش در PCR مطابق جدول ۲ 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

[1] Enterococcus Agar
[2] Clinical and Laboratory Standards Institute
[3] Minimum Inhition Concentration

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

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 ۱درصد در کنار سایزمارکر (1Kb DNA Ladder) در ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت استفاده شد (جدول‌های ۲ و ۱) (۱۴-۱۳).

به منظورکنترل کیفی، جهت تأیید 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 ایزوله‌ها به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش‌های PCR ژن‌های VanA و VanB مورد استفاده قرار گرفت. از یک ایزوله استاندارد حساس به ونکومایسین نیز در آزمایش PCR استفاده شد که فاقد ژن عامل مقاومت بود.

یافته‌ها

در این تحقیق، طی مدت ۶ ماه (اول اردیبهشت ماه تا پایان مهرماه سال ۱۳۸۹)، تعداد ۱۲۰ ایزوله جمع‌آوری شد که از این تعداد، ۱۰۵ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم بودند. تمامی ۱۲۰ ایزوله از نمونه‌های بیماران بستری شامل مدفوع، سواب رکتال و نمونه‌های بالینی شامل ادرار، مایع آسیت، ترشحات زخم وخون جدا شده بود (جدول‌های ۴ و ۳).

از مجموع ۱۲۰ ایزوله، تعداد ۳۵ ایزوله (۲۹درصد) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، مقاوم به ونکومایسین تشخیص داده شد. حداقل غلظت مهار کننده در ماکرودایلوشن براث ۲۲ ایزوله (۱۸،۳درصد) VRE، (MIC ≥۳۲ µg/ml) بود که از این تعداد، ۱۶ ایزوله از نمونه ادرار و ۶ ایزوله از نمونه مدفوع و سواب رکتال بیماران بستری ایزوله شده بود. از مجموع ۲۲ ایزوله VRE، تعداد ۷ مورد انتروکوکوس فکالیس و تعداد ۱۵ مورد انتروکوکوس فسیوم بود (جدول ۴ و ۳).

برای شناسایی ژن‌های vanC، vanB، vanA، با روش Multiplex PCR، در ژل الکترفورز محصول PCR ژن‌های vanA و vanB در ۲۲ ایزوله VRE مشاهده شد که از این تعداد، ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم و ۷ ایزوله انتروکوکوس فکالیس بود ولی در این ایزوله‌ها، ژن vanC دیده نشد (اشکال ۲ و ۱). از مجموع ۲۲ ایزوله VRE، در ۱۲ ایزوله vanA و ۱۰ ایزوله vanB شناسایی شد. از مجموع ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم، در ۱۰ ایزوله vanA و در ۵ ایزوله vanB مشاهده شد. از مجموع ۷ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، در ۲ ایزوله vanA و در ۵ ایزوله vanB شناسایی گردید (جدول ۴).

جهت تأیید صحت محصولات PCR ژن‌های 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 ژن‌های vanA و vanB در ایزوله‌های مربوطه را تأیید کرد.

جدول (1): پرایمرهای بکار رفته در PCR

Gene	Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	PCR product size (bp)
vanA	vanA-FOR vanAB-REV	CATGACGTATCGGTAAAATC ACCGGGCAGRGTATTGAC	885
vanB	vanB-FOR vanAB-REV	CATGATGTGTCGGTAAAATC ACCGGGCAGRGTATTGAC	885
vanC	vanC123-FOR vanC1-REV	GATGGCWGTATCCAAGGA GTGATCGTGGCGCTG	467

جدول (2): ترکیب بافر واکنش در PCR

10 x PCR buffer	100mM Tris-HCL,PH8/6 500mM KCL 15mM MgCl2 %1 Triton x-100	Final Concentration 1x

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

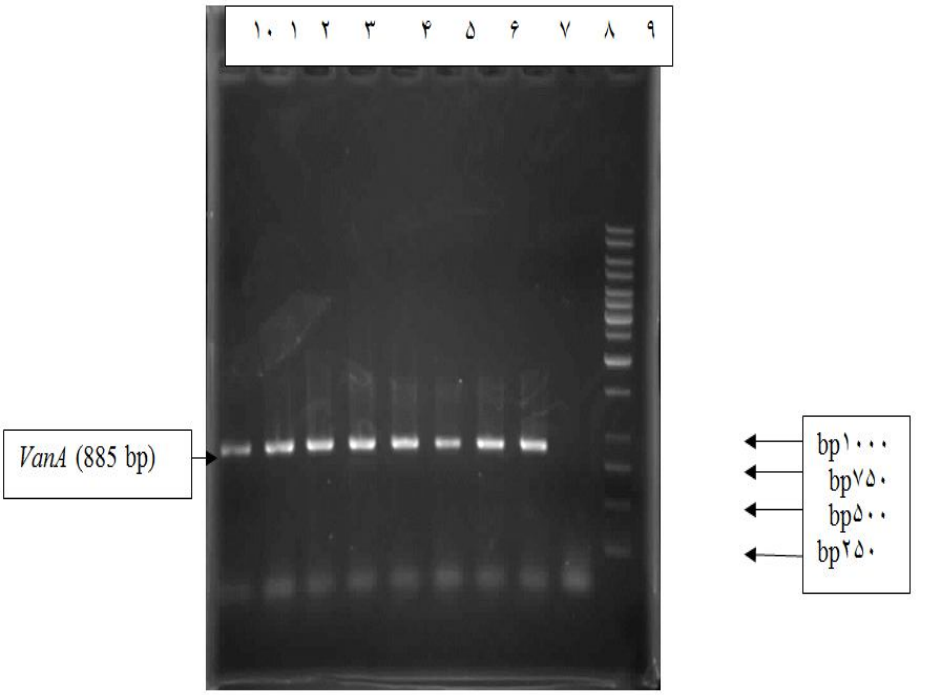
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

جدول (3): توزیع فراوانی ایزوله‌های VRE جدا شده از نمونه‌های مختلف در بیماران بستری

منبع	تعداد ایزوله‌های جدا شده	تعداد ایزوله‌های جداشده VRE
مدفوع و سواب رکتال	۷۰	۶
ادرار	۳۰	۱۶
مایع آسیت	۱۰	-
ترشحات زخم	۸	-
خون	۲	-
مجموع	۱۲۰	۲۲

جدول (4): تعداد ایزوله‌های ایزوله شده با ژنوتیپ های VanA و VanB در گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم

گونه (تعداد)	VanA	VanB
انتروکوکوس فکالیس (۷)	۲	۵
انتروکوکوس فسیوم (۱۵)	۱۰	۵
مجموع (۲۲)	۱۲	۱۰

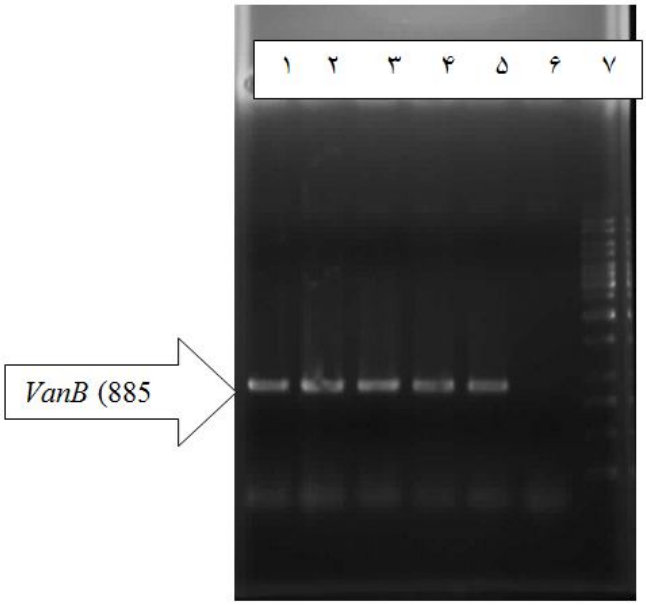


شکل (1): الکتروفورز محصول PCR برول ژل یک ٪ ژن VanA

ستون‌های ۱ تا ۷ ایزوله‌های انتروکوک $VanA^+$

ستون ۸ کنترل مثبت و ستون ۹ کنترل منفی ایزوله حساس به ونکومایسین، ستون ۱۰ سایز مارکر ((1kb Ladder

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017



شکل (1): الکتروفورز محصول PCR ژن VanB

ستون‌های ۱ تا ۴ ایزوله‌های انتروکوک $VanB^+$

ستون ۵, کنترل مثبت، ستون ۶ کنترل منفی ایزوله حساس به ونکو مایسین،

ستون ۷ سایز مارکر ((1kb Ladder

بحث

ایزوله‌های انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (VRE) بصورت فزاینده ای چه در خارج از کشور و چه در تحقیقات انجام شده در ایران هرچند با توجه به موقعیت جغرافیایی، در حال گسترش هستند. شیوع ایزوله‌های VRE بخصوص در عفونت‌های بیمارستانی، موجب بروز مشکلات بسیار جدی در سطح جهان شده است. محدودیت انتخاب دارو در عفونت‌های ایزوله‌های VRE، همچنین قابلیت انتقال ژن‌های پلاسمیدی عامل مقاومت به ونکومایسین از انتروکوک‌ها به سایر باکتری‌های بیماری زا مانند استافیلوکوک ها یا سایر ایزوله‌های حساس انتروکوک، اهمیت تحقیقات هرچه بیشتر جهت تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی ایزوله‌های مقاوم را آشکارتر می‌کند. تحقیقات اخیر نشان داده است که بیمار کلونیزه شده با ایزوله‌های VRE، در فلور طبیعی خود برای مدت طولانی حتی بیش از سه سال آن را با خود حمل می‌کند که موجب انتشار بیشتر آن‌ها می‌شوند (۸-۱).

با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارش‌هایی مبنی بر پراکندگی متفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی این‌گونه از ایزوله‌ها در تحقیقات انجام شده، در این مطالعه از تعداد ۱۲۰ ایزوله انتروکوک جدا شده از بیماران بستری، تعداد ۱۰۵ ایزوله انتروکوکوس فکالیس (۸۷،۵درصد) و تعداد ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم (۱۲،۵درصد) تشخیص داده شد (جدول ۴).

از آنجایی که میزان ایزولاسیون ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس بیشتر از ایزوله‌های انتروکوکوس فسیوم بود، نتیجه بدست آمده با مطالعات مختلف همخوانی دارد (۲۰-۱۵). به‌طوری که در مطالعات Schouten (۱۵) در سال ۱۹۹۷ در اروپا، انتروکوکوس فکالیس جدا شده ۸۳درصد و انتروکوکوس فسیوم ۱۴درصد بوده است. در بررسی Fontana (۱۶) در سال ۱۹۹۸ در ایتالیا، میزان انتروکوکوس فکالیس جدا شده ۵۷درصد و انتروکوکوس فسیوم ۴درصد بوده است که در این تحقیق به دلیل نزدیک بودن محل مطالعه به مزارع، مرغداری‌ها و محل‌های پرورش بوقلمون، تعدادی ایزوله انتروکوکوس گالیناروم دیده شده است که نشان دهنده تأثیر محل زندگی و نوع مواد غذایی است که روی انواع میکروبی فلور طبیعی تأثیر می‌گذارد. نمونه‌های مختلفی از انتروکوک‌ها در مواد غذایی وجود دارد (۶-۱). در مطالعه Peset (۱۷) طی سال‌های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۶ در اسپانیا، ۷۶درصد از نمونه‌های جدا شده، انتروکوکوس فکالیس و ۱۹درصد انتروکوکوس فسیوم بوده است. در تحقیق انجام شده توسط محمدی و همکاران (۱۸) در ایران، جهت بررسی میزان وجود ژن‌های مقاوم به ونکومایسین در ایزوله‌های جدا شده از نمونه بالینی بیماران، از مجموع ۱۸۰ ایزوله مورد بررسی، تعداد ۱۲۸ ایزوله (۷۱درصد) انتروکوکوس فکالیس و ۵۲ ایزوله (۲۹درصد) انتروکوکوس فسیوم بود. در مطالعه انجام شده توسط گودرزی و همکاران (۱۹)، از مجموع ۱۸۸ ایزوله

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

انتروکوکوس جدا شده، ۱۸۴ مورد (۹۸درصد) انتروکوکوس فکالیس و ۴ مورد (۲درصد) انتروکوکوس فسیوم شناسایی شد. طی بررسی دیگری که توسط رمضانی و همکاران (۲۰) در تهران به‌عنوان عوامل عفونت‌های بیمارستانی انتروکوکی انجام شد، ۷۵درصد از ایزوله‌ها، انتروکوکوس فکالیس و ۲۰درصد انتروکوکوس فسیوم گزارش شد. نتایج حاصل از بررسی‌های مطالعه حاضر، نشان دهنده آن است که ایزوله‌های انتروکوکی جدا شده، اغلب از گونه انتروکوکوس فکالیس می‌باشد.

در این مطالعه از مجموع ۱۲۰ ایزوله انتروکوک، میزان بروز مقاومت نسبت به ونکومایسین با روش دیسک دیفیوژن، ۳۵ ایزوله (۲۹درصد) بود که با روش ماکرودایلوشن براث، تعداد VRE به میزان ۲۲ ایزوله (۳ /۱۸درصد) تأیید شد. در سال ۱۹۸۸، ایزوله‌های VRE از اروپا گزارش شد. طی سال‌های گذشته، میزان ایزولاسیون این ایزوله‌ها در سطح جهان همواره رو به افزایش بوده است، چنانچه در مطالعه ای در آمریکا تا ۴۰درصد و در اروپا طی دو دهه گذشته، بین ۳۱ کشور ۴-۱درصد گزارش شده است (۱،۲،۲۲،۲۳). در مطالعه ای 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، ایزوله‌های VRE با درصدهای متفاوتی در سنوات مختلف گزارش شده است، به همین علت توصیه می‌شود این ایزوله‌ها با تکنیک‌های تعیین MIC ونکومایسین، بخصوص در بیماران بستری با بیماری‌های مهلک، مجدداً" بررسی شده و مقاوم بودن آن‌ها نسبت به ونکومایسین به‌طور قطعی مشخص شود. برای مثال با تکنیک دیسک دیفیوژن در اروپا، میزان شیوع VRE در جامعه و در بین بیماران بستری به ترتیب ۲درصد تا ۵درصد گزارش شده است، گرچه گزارش‌های نادری از درصدهای بالای مقاومت (تا ۴۰درصد) نیز انتشار یافته است (۲۲ و ۸-۵ و ۱). Lavery (۲۳) در ایرلند با روش دیسک دیفیوژن، میزان مقاومت به ونکومایسین را ۲درصد گزارش کرده است. در بررسی‌های Toledano (۲۴) در سال ۱۹۹۷ در اورشلیم ۱۴درصد و در بیمارستانی در فیلادلفیا طی سال‌های ۱۹۹۵-۱۹۹۳، از مجموع ۲۶۰ ایزوله انتروکوک ایجاد کننده باکتریمی، ۲۷درصد به‌عنوان ایزوله‌هایVRE گزارش شده است. در گزارش تیمورنژاد و همکاران (۲۵)، ۴۵درصد از ایزوله‌ها با روش دیسک دیفیوژن مقاوم بودند ولی با روش تعیین MIC در آگار دایلوشن، ۶درصد نسبت به ونکومایسین مقاوم تشخیص داده شدند. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در مورد میزان مقاومت به ونکومایسین با روش دیسک دیفیوژن با نتایج حاصل از مطالعات اشاره شده، قابل مقایسه است ولی نتایج تیمورنژاد و همکاران (۲۵) با نتایج بدست آمده از این مطالعه فاصله دارد. استفاده از دیسک‌های مختلف در این مطالعات می‌تواند یکی از عوامل اختلاف باشد.

در مطالعه حاضر، ازمجموع ۲۲ ایزوله VRE، تعداد ۱۲ ایزوله انتروکوکوس فسیوم و تعداد ۱۰ ایزوله انتروکوکوس فکالیس شناسایی شد. در ایالات متحده آمریکا از نمونه‌های بالینی جدا شده از ادرار، ۸۹درصد انتروکوکوس فسیوم و ۱۲درصد انتروکوکوس فکالیس گزارش شده است (۵). در اروپا از مجموع ۱۳۱۴ ایزوله، تعداد موارد VRE، ۳درصد گزارش شده است که از این تعداد، ۷۳درصد از موارد، انتروکوکوس فسیوم بود. در آمریکا، ایزوله‌های VRE بیشتر گزارش شده است که به علت استفاده از آنالوگ ونکومایسین (آووپاریسین) جهت فربه سازی دام و طیور است که با ایجاد مقاومت متقاطع، باعث مقاوم شدن انتروکوک‌ها نسبت به ونکومایسین می‌شود (۲ و ۱). در مطالعه Peset و همکاران (۱۷) در اسپانیا، از مجموع ۱۷ ایزوله VRE جدا شده، تعداد ۱۶ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ۱ ایزوله انتروکوکوس فسیوم شناسایی شد. تیمورنژاد و همکاران (۲۵)، تمامی ۲۳ ایزوله را انتروکوکوس فسیوم شناسایی کردند. وهابی و همکاران (۲۶) در تبریز، از مجموع ۲۹۱ ایزوله انتروکوک، ۶۵درصد را انتروکوکوس فکالیس و ۲۹درصد را انتروکوکوس فسیوم شناسایی کردند که ازاین تعداد ۷درصد،VRE بودند. شریفی و همکاران (۲۷) از ۴۸ ایزوله VRE در تبریز و ارومیه، ۸۹درصد را به‌عنوان انتروکوکوس فکالیس شناسایی نمودند. با توجه به موارد بالا و متفاوت بودن نوع ایزوله‌های جدا شده VRE، همچنین با توجه به مناطق مختلف جغرافیایی ایران از جمله در مطالعات انجام شده در تهران و سایر کشورها، امروزه تعداد ایزوله‌های VRE رو به افزایش است (۶). به علت نبودن انسجام در مطالعات داخلی و پروژه کشوری در خصوص ایزوله‌های VRE، همچنین از آنجایی که اغلب گزارش‌ها در کشورمان مربوط به نمونه‌های بالینی می‌باشد، امکان مقایسه و جمع بندی دقیق وجود ندارد ولی به‌طورکلی وجود ایزوله‌های VRE در نمونه‌های بالینی و بیمارانی که با این ایزوله‌ها کلونیزه شده‌اند، هشداری برای پیگیری جدی آن می‌باشد.

در این مطالعه، از مجموع ۱۲۰ ایزوله، تعداد ۲۲ ایزوله (۱۸/۳درصد) با MIC ≥۳۲μg/ml به‌عنوان VRE جدا شدند. از این ۲۲ ایزوله VRE، ۷ مورد انتروکوکوس فکالیس و ۱۵ مورد انتروکوکوس فسیوم بودند. ایزوله‌های VRE از ۱۶ نمونه ادرار، تعداد ۶ ایزوله ازمدفوع و یا سواب رکتال بیماران بستری جدا شده بودند. در مطالعه دیگری در تبریز در یک بیمارستان میزان VRE را ۲۴درصد گزارش کرده‌اند (جدول ۳) (۵).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

از مجموع ۲۲ ایزوله VRE، در ۱۵ ایزوله vanA و در ۷ ایزوله vanB شناسایی گردید. از مجموع ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فسیوم، در ۱۰ ایزوله vanA و در ۲ ایزوله vanBمشاهده شد. از مجموع ۷ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، در ۲ ایزوله vanA و در ۵ ایزوله vanB شناسایی شد. نتایج بدست آمده نشان دهنده شیوع بیشتر ژنوتیپ vanA نسبت به vanB در ایزوله‌های مورد مطالعه بود.

وهابی و همکاران (۲۶) در تبریز، از مجموع ۵۷ ایزوله VRE مورد بررسی، در ۲۴ ایزوله vanA و در ۳۰ ایزوله vanB شناسایی کردند ولی در ۳ ایزوله، ژن‌های VanA/B مشاهده نشد. از مجموع ۴۲ ایزوله انتروکوکوس فسیوم، در ۱۸ ایزوله vanA و در ۲۱ ایزوله vanBمشاهده کردند ولی در ۳ ایزوله، ژن‌های VanA/B مشاهده نشد. از مجموع ۱۵ ایزوله انتروکوکوس فکالیس، در ۶ ایزوله vanA و در ۹ ایزوله vanB شناسایی کردند. شریفی و همکاران (۲۷) در ایزوله‌های تبریز و ارومیه، از مجموع ۴۸ ایزوله VRE، در ۸۹درصد از موارد، vanA و در ۱۱درصد، vanB تشخیص دادند. محمدی و همکاران (۱۸)، ازمجموع ۱۵ ایزوله VRE، در ۱۲ ایزوله ژنوتیپ، vanA شناسایی کردند. ناطقیان و همکاران (۲۱)، در ایزوله‌های VRE ایزوله شده از مدفوع کودکان لوسمیک، در ۷۹درصد از ایزوله‌ها، vanA و در ۲۱درصد، vanB گزارش کردند. در مطالعه گسترده ای در ۳۱ کشور اروپایی، شیوع ایزوله‌های VRE، ۴۰-۱درصد مشخص گردید و شایع‌ترین ژن‌ها، به ترتیب vanA و vanB تشخیص داده شد (۱). در ژاپن، بررسی‌های انجام شده در ده‌ها بیمارستان نشان داد که در ۳۵ بیمارستان، vanA و در ۱۲ بیمارستان،vanB ژن‌های غلب بودند (۲). در مطالعه ای در تهران، ۲۰۰ ایزوله انتروکوکی شامل انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس کاسی فلاوس، انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس آویوم، بیشترین گونه انتروکوکوس فکالیس (۸۰درصد) بوده است. میزان فراوانی ژن‌های عامل مقاومت vanA(۳۵درصد)، vanB(۲۵درصد)، vanC (۶درصد) بوده است. در تحقیق مذکور، مقاومت به لینزولید که در عفونت‌های VRE استفاده می‌شود ۲درصد بوده است. همچنین در این تحقیق vanC از انتروکوکس گالیناروم جداشده بود ولی در مطالعه اخیری در ژاپن که در سال ۲۰۱۵ انتشار یافت نشان داد که در ۴درصد ایزوله‌های های محیطی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم این ژن نیز وجود دارد گرچه اغلب در سویه‌های انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس کاسی فلاوس مشاهده می‌شود. در سال ۲۰۱۴ از یک نمونه بالینی انتروکوکوس فسیوم نیز وجود van C شناسایی شده بود ولی در سویه‌های ما این ژن شناسایی نشد (۸،۳۰،۳۱).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش مبین وجود ایزوله‌های VRE هم در نمونه‌های بالینی و هم در فلور طبیعی به‌عنوان کلونیزاسیون روده ای در بیماران بستری در بیمارستان‌های تبریز است. ایزوله‌های VRE به‌طور فزاینده ای از سراسر دنیا و ایران گزارش می‌شود. پراکندگی ژن‌های VanA,B,C در ایزوله‌های VRE متفاوت است و همانند ایزوله‌های این تحقیق، در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم که بیشترین ایزوله‌های VRE می‌باشد، شیوع VanA بیشتر از VanB می‌باشد در این پژوهش VanC شناسایی نشد. ولی به علت جدا شدن این ژن از نمونه بالینی و نمونه‌های محیطی در گونه‌های بیماریزاتر پیشنهاد بررسی وجود ژن vanC در ایزوله‌های بیمارستانی و محیطی پیشنهاد می‌گردد. گرچه در امور روتین، آزمایشگاه‌ها در مراحل اولیه روش دیسک دیفیوژن را در شناسایی ایزوله‌ها بکار می‌برند ولی باید با روش‌های مناسب تعیین MIC ونکومایسین، مانند ماکرودایلوشن براث، آگار دایلوشن و یا E test مقاومت به ونکومایسین تائید شود. ژن‌های VanA و VanB، ژن‌های اصلی عامل مقاومت به ونکومایسین هستند. همچنین VanA می‌تواند باعث ایجاد مقاومت نسبت به گلیکولیپید های دیگر شود. بنابراین، تحقیقات گسترده ملی در کنترل و شناسایی ایزوله‌هایVRE پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز که در انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی ما را یاری کرده‌اند و از نهایت توجه همکاران آزمایشگاه‌های میکروبشناسی بیمارستان‌های امام رضا (ع)، سینا، آزمایشگاه استان و شهید مدنی و همچنین کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌شود.

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;13(47).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

2. Karki S, Land G, Aitchison S, Kennon J, Johnson PDR, Ballard SA, et al. Long-term carriage of vancomycin-resistant enterococci in patients discharged from hospitals: a 12-year retrospective cohort study. J Clin Microbiol 2013;51(10):3374–9.
3. Matsushma A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, ShiranoM, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N, Ichiyama S. Reginonal spread and control of vancomycin resisrant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in Kyoto Japan. Eur J Clin Microbiol Dis 2012; 31:311095-100.
4. Moaddab SR, Rafi A.Species identification and investigation of Vancomycin and high-level Aminoglycoside among clinical isolates of Enterococcal strains. MJIRI 2002; 16(3):165-8.
5. Talebi M, Sadeghi J, Pourshafie MR. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolated from Intensive Care Units. Curr Microbiol 2014; 68:615–20.
6. Kafil HS, Asgharzadeh M. Vancomycin-Resistant Enteroccus Faecium and Enterococcus Faecalis Isolated from Education Hospital of Iran. Maedica (Buchar) 2014; 9(4): 323–7.
7. 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(1):28-30.
8. Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, Sundsfjord A, Pruzzo C, Donelli G, Facinelli B.VanA-type enterococci from humans, animals, and food:species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. Appl Environ Microbiol 2007;73(10):3307-19.
9. Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Lei Tian L, Sun Z. The first report of the vanC 1 gene in Enterococcus faecium isolated from a human clinical specimen. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014; 109(6): 712–5.
10. Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. NAVRESS Group. 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(3):382-8.
11. Murray PA, Rosenthal KE, Kobayashi GE, Pfaller MI. Medical microbiology, 3rd ed. USA: Mosby; 1997. P. 206-208.
12. Baron EL, Finegold SY. Bailey & Scott s diagnostic Microbiology, 8th ed. USA: Mosby; 1990. P. 171-185.
13. 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.
14. 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.
15. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR. 3rd ed. Multiplex PCR Detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 Genes in Enterococci. J Clin Microbiol 1997;35(3):703-7.
16. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6:428–42.
17. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A, European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19(11):816–22.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

18. Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(9):1980–3.
19. Peset V, Tallon P, Sola C, Sanchez E, Sarrion A, Perez. Belles C, Vindel A. Epidemiological, microbiological, clinical and prognostic factors of bacteremia caused by high level vancomycin resistant enterococcus species. Eur J Clin Microbiol 2000;19:742-9.
20. 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 Medicl Sci 2011;19(2).1-7.
21. 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. 2000.P. 67.
22. Ramazani A, Mohrez M, Asadi S, Nazgoei F, Islamifar A. Investigation of hospital infections caused by enteroccoci in Tehran hospitals. J Trop Infect Dis 2002;7(19): 11-5.
23. Nateghian A, Robinson JL, Arjmandi K, Vosough P, Karimi A, Behzad A, Navidnia M. 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(5): 332-5.
24. Stosor V, Kruszynski J, Surianno T, Noskin G, Peterson LR. Molecular epidemiology of VRE. Infect control Hosp Epidemiol 1999;20(10):653-9.
25. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, Keane CT. Incidence and detection of multidrug resistant enterococci in Dublin hospitals. J Med Microbiol 1997;46:150-6.
26. 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(4): 282-7.
27. Teymournejad 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(2): 59-64.
28. 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 Univ Med Sci 2011;33(3) :78-85.
29. 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;6:34-9.
30. 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(1):44-51.
31. 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(1):47-51.

32. 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(7):297-302.

33. Nishiyama M1, Iguchi A, Suzuki Y. Identification of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis as vanC-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2015;50(1):16-25.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017

Original Article

DETECTION OF VANA, VANB, VANC GENES BY MULTIPLEX PCR IN ENTEROCOCCUS FEACALIS AND ENTEROCOCCUS FEACIUM ISOLATES IN HOSPITALIZED PATIENTS

Seyed Reza Moaddab[1], Behzad Kazemi Haki[2], Nader Ebrahimi Atash Khosroo[3]*

Received: 12 Apr , 2015; Accepted: 17 June , 2015

Abstract

***Background & Aims*:** After Vancomycin resistant Enterococci (VRE) was first detected in the mid 1980s, VRE spread rapidly worldwide and became one of the most serious problems in many hospitals specially in hospitalized patients. Among different enterococcal species Enterococcus feacalis and Enterococus faecium are the leading causes of life threatening infections. VanA/B/C genes are responsible for resistance to vancomycin. The aim of this research was to detect the type of genes VanA/B/C in E. faecalis and E**.** faecium isolates in some Tabriz hospitals.

***Material & Methods*:** In total non-repetitive 120 isolates of enteroccci were collected from some hospitals in Tabriz. Isolates were taken from rectal swap, stool, and different clinical samples and identified as enterococci by standard microbiological tests. Determination of Vancomycin MIC was done by the macrodilution broth method and for detection of VanA, VanB and VanC genes in VRE isolates multiplex PCR was carried out by using three sets of primers.

***Results*:** Out of 120 enterococci isolates, 105 strains were identified as E. faecalis and 15 isolates were identified as E.faecium. Out of 120 isolates, 22(18.3%) isolates were found to be resistant to vancomycin (VRE). All of these isolates were isolated from fecal (6 isolates) or from urine samples (16 isolates). The PCR analyses showed that VanA genotype was present in 10 E.faecium and in 2 E**.** faecalis isolates where as VanB genotype was detected in 5 E.faecium and 5 E.feacalis isolates. None of the VRE isolates had VanC genotype.

***Conclusion*:** like our findings, regional, national and international studies show the VRE isolates are from normal flora and clinical samples. On the other hand the VanA genotype is more prevalent than VanB among VRE isolates. Detection of infected or colonized patients with VRE is essential for preventing VRE spread.

***Keywords*:** Enterococcus faecalis, Enterococcus faceium, VRE, vanA/B/C Multiplex PCR

***Address*:** Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Tel: +98 9149380765
E-mail: behzad_emt@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015: 26(5): 369 ISSN: 1027-3727

[1] *Associate Professor, Research Centre for TB and Pulmonary Diseases, Paramedical Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[2] *BSc in Anesthesia, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*
[3] *MSc in Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:20 +0330 on Wednesday November 22nd 2017