مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۱ بهار ۱۳۸۹، صفحات۶۵-۵۸

فناوری PCR برای شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB* در حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در سه بیمارستان آموزشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

ابوالفضل وهابی*[۱]، آلکا حسنی[۲]، محمد رضا نهائی[۱]، صفر فرج نیا[۳]

۱)گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲)گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، مرکز بیماری‌های عفونی و طب گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳)مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
نویسنده رابط: ابوالفضل وهابی، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
همراه : ۰۹۱۴۱۲۸۴۷۴۹ a.vahhabi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۸/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۹/۲/۵

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک به‌صورت فزاینده عامل عفونت‌های شدید بیمارستانی است. مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، به‌ویژه ونکومایسین، آمپی سیلین و غلظت‌های زیاد آمینوگلیکوزیدها در آن شایع است. شناسائی سریع و درست انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistant enterococci : VRE) ، در مدیریت و درمان بیماران کلنیزه شده یا دچار عفونت انتروکوکی، بسیار حیاتی است و اجرای برنامه‌های درمانی مناسب برای پیشگیری از انتشارآن را فراهم می‌کند. هدف این مطالعه بکارگیری فناوری PCR ، جهت شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB* در حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین بود .

روش بررسی: ۴۳۲ نمونه مدفوع یا رکتال سوآب از بیمارانی که حداقل ۷۲ ساعت در بخش‌های پرخطر (ICU ، هماتولوژی/انکولوژی، عفونی و سوختگی) در سه بیمارستان آموزشی درمانی تبریز (سینا، کودکان و شهید قاضی طباطبائی) بستری بودند و همچنین بیماران سرپائی (مراجعه کننده به درمانگاه انکولوژی، درمانگاه عفونی و بخش همودیالیز) جمع آوری شد (۸۷-۱۳۸۶). نمونه‌ها در محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و سویه‌های انتروکوک جداسازی گردید. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) ونکومایسین ، با روش Agar dilution انجام شد و سویه‌های مقاوم با E-test تایید گردید. فناوری PCR جهت شناسائی ژن‌های *vanB*/*vanA* ، اجراء شد.

یافته‌ها: از ۴۳۲ نمونه ۲۹۱ (۶۷/۳٪) سویه انتروکوک ایزوله شد. ۱۸۹ سویه (۶۴/۹٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۸۶ سویه (۲۹/۵٪) *انتروکوکوس فسیوم* تعیین هویت شدند. تعیین MIC ، مقاومت کامل به ونکومایسین را در ۱۵ (۵/۱٪) سویه اثبات کرد که همگی *انتروکوکوس فسیوم* بودند. فناوری PCR ، حضور ژن‌های *vanA* یا *vanB* با مقاومت حد واسط (MICs, 8-16 µg/ml) یا مقاومت سطح بالا (MICs, ≥ 256 µg/ml) به ونکومایسین را در ۵۴ (۱۸/۵٪) سویه نشان داد. در مجموع ۴۲ (۶۶/۶٪) سویه مقاوم، *انتروکوکوس فسیوم* و ۱۵ (۲۳/۸٪) سویه *انتروکوکوس فکالیس* بودند. ۵۴ (۸۵/۷٪) سویه مقاوم به ونکومایسین از بیماران بستری و ۹ (۱۴/۲٪) سویه ازبیماران سرپائی بدست آمد.

نتیجه گیری: مقاومت کامل به ونکومایسین در *انتروکوکوس فسیوم* و در بیماران بستری یافت شد. مقاومت متوسط یا سطح بالای انتروکوک به ونکومایسین در بیماران بستری و سرپائی وجود دارد. فراوانی ژن *vanB* بیشتر از *vanA* است.

کلید واژه ها: انتروکوک، ونکومایسین، کلنیزاسیون، *vanA*، *vanB*

مقدمه:

در سال‌های اخیر انتروکوک به‌عنوان یک پاتوژن بیمارستانی پراهمیت جایگاه بسیار مهمی پیدا کرده است. مقاومت این باکتری در مقابل بسیاری ازآنتی بیوتیک ها، به‌ویژه گلیکوپپتیدها به یک معضل اساسی در پزشکی امروز مبدل شده است(۱). این ویژگی مقاومت می‌تواند به‌صورت ذاتی (مقاومت سطح پائین به پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها)و یااکتسابی (مقاومت به گلیکوپپتیدها وغلظت‌های زیاد آمینوگلیکوزیدها) بروز نماید. از زمان جداسازی اولیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistant enterococci : VRE) درانگلستان و فرانسه، عفونت‌های ناشی از این باکتری به‌صورت روزافزون در نقاط مختلف دنیا افزایش یافته است (۲). در حال حاضر انتروکوک مقاوم به ونکومایسین به‌عنوان دومین پاتوژن رایج در عفونت‌های کسب شده از بیمارستان معرفی می‌شود. از آنجائیکه ژن‌های عامل مقاومت به ونکومایسین، قابل انتقال به باکتری‌های دیگر هستند، ویژگی مقاومت به گلیکوپپتیدها می‌تواند به باکتری‌های دیگر همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant *Staphylococcous aureus* (MRSA) منتقل گردد. درنتیجه یک پاتوژن فوق‌العاده خطرناک ایجاد می‌شود که از بین بردن آن با آنتی بیوتیک های موجود بسیار مشکل خواهد بود(۳،۱).

ونکومایسین یکی از اعضای خانواده گلیکوپپتید می‌باشد. این آنتی بیوتیک‌ها با اتصال به واحدهای پیش ساز پپتیدوگلیکان،از سنتز دیواره سلولی باکتری ممانعت می‌کنند(٤). ژنوتیپ‌های مختلفی از مقاومت به گلیکوپپتیدها درانتروکوک شناسایی شده است که شامل ژنوتیپ‌های *vanA, vanB, vanC1/C2/C3, vanD, vanE, vanG* می‌باشد(۳). *vanA* و *vanB* ژنوتیپ‌های بسیار رایج مقاومت به گلیکوپپتید محسوب می‌شوند. *vanA* مقاومت سطح بالا به ونکومایسین و تیکوپلانین را القاء می کند و بیان آن به‌وسیله ونکومایسین یا تیکوپلانین تحریک می‌شود. ژنوتیپ *vanB* مقاومت به غلظت‌های مختلف ونکومایسین را القاء می‌کند، اما این سویه‌ها در برابر تیکوپلانین حساس می‌باشند و بیان این ژنوتیپ فقط به‌وسیله ونکومایسین تحریک می‌شود(۵).

روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، جهت شناسایی مقاومت به گلیکوپپتید، اولین بار در سال ۱۹۹۵ ارائه و اجراء گردید. امروزه بسیاری از آزمایشگاه‌های میکرب شناسی از PCR برای اثبات مقاومت به ونکومایسین استفاده می کنند. بکارگیری مستقیم این روش بر روی نمونه‌های بالینی و یا بر روی کشت می تواند زمان شناسایی سویه‌های انتروکوک مقاوم را کاهش دهد(٦).

کمیته‌های کنترل عفونت بیمارستانی، بررسی نمونه‌های مدفوع و یا رکتال سوآب بیماران بستری در بخش‌های پرخطر بیمارستانی را برای شناسائی اولیه بیماران کلونیزه شده با انتروکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، و پیشگیری ازانتقال شخص به شخص، همچنین شیوع اپیدمی‌های بیمارستانی با این باکتری‌ها ضروری می‌دانند(۷). تاکنون، گزارش مستندی از اپیدمیولوژی و فراوانی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در داخل و یا خارج محیط‌های بیمارستانی در شهر تبریز و منطقه شمال غرب کشور در دسترس نیست. از این‌رو، این مطالعه با هدف ارزیابی میزان کلونیزاسیون روده‌ای سویه‌های VRE در بیماران بستری و همچنین گروهی از بیماران سرپائی در دانشگاه علوم پزشکی تبریز طراحی و اجراء گردید.

مواد و روش‌ها:

بررسی میزان شیوع: در یک دوره ۹ ماهه(۱۳۸۷-۱۳۸٦)، از بیمارانی که حداقل ۷۲ ساعت در بخش‌های پرخطر همچون ICU ، هماتولوژی/انکولوژی، عفونی و سوختگی در سه بیمارستان آموزشی درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (سینا، کودکان و شهید قاضی طباطبائی) بستری شده بودند نمونه مدفوع یا رکتال سوآب (با توجه به شرایط بیمار) جمع‌آوری شد.از بیماران مراجعه‌کننده به بخش همودیالیز، درمانگاه‌های هماتولوژی/انکولوژی و عفونی به‌عنوان بیمار سرپائی نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها جهت جداسازی انتخابی سویه‌های VRE به آزمایشگاه میکرب - شناسی انتقال داده شدند.

کشت انتخابی و تعیین هویت بیوشیمیایی انتروکوک: نمونه‌ها در دو محیط انتخابی بایل اسکولین آزاید آگار و بایل اسکولین آزاید براث (Hi-media) تلقیح شدند (۸،۱). در این مرحله، کلنی‌های دارای هاله سیاه رنگ (مشکوک به انتروکوک)، با بکارگیری تست‌هایی همچون رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط حاوی NaCl ٦/۵٪ و واکنش بایل اسکولین به‌طور اولیه به‌عنوان انتروکوک شناسائی شد. با بررسی ویژگی‌های فیزیولوژی و

میکربیولوژی، انتروکوک‌ها تا حد گونه تعیین هویت شدند(۱۰،۹).

غربالگری: جهت ارزیابی اولیه میزان حساسیت سویه‌های جدا شده به ونکومایسین، کلنی‌های جوان انتروکوک بر روی محیط کشت حاوی ونکومایسین با غلظت‌های مختلف ٤، ٦ و ٨ میکروگرم در میلی‌ایتر تلقیح گردید. کلنی‌های رشدکرده بر روی ظروف حاوی آنتی‌بیوتیک، به‌عنوان سویه‌هائی با حساسیت پائین به ونکومایسین در نظر گرفته شدند(۸).

ارزیابی حساسیت به ونکومایسین: حداقل غلظت مهاری (MIC) و نکومایسین برای سویه‌های جدا شده، با روش استاندارد Agar dilution تعیین گردید. سویه‌های مقاوم به ونکومایسین، با روش E-test نیز مورد آزمایش و تائید قرار گرفت (۱۲،۱۱).

تکثیر ژن‌های vanA , vanB : جهت انجام روش PCR و تکثیر ژن‌های اختصاصی مورد نظر، از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی بکار رفته در مطالعه kariyema و همکاران استفاده شد(۱۳). استخراج DNA با جوشاندن سوسپانسیون باکتریای در تراس بافر استریل به مدت ۱۵ دقیقه و سپس سانتریفوژ در 1500 g انجام شد(۱). ترکیب کمپلکس PCR شامل PCR buffer (سیتاژن-ایران)، 0.2 mM dATP , dCTP , dGTP , dTTP , (سیتاژن-ایران) 0.5 µM از هر پرایمر (بیونر)، 2.5 , 1.5 mM MgC12 U Taq DNA Polymerase (سیتاژن-ایران)و ۵۰ نانو گرم DNA استخراج شده از سویه انتروکوک به عنوان الگو بود. پس از انجام فرایند آمپلیفیکاسیون DNA بر روی دستگاه ترموسیکلر (ASTEC) محصول بدست آمده، در کنار سایز مارکر(1Kd DNA Ladder) وDNA متعلق به سویه‌های کنترل (*انتروکوکوس فسیوم* با ژنوتیپvanA ATCC 51559) و (*انتروکوکوس فکالیس* فاقد ژنوتیپ‌های ATCC 29212vanA/vanB) بر روی ژل آگارز ۱٪ در 0.5X TBE الکتروفورز شد و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید(۱ ،۱۳).

یافته‌ها:

در مجموع ٤۳۲ بیمار شامل ۳۰۰(٦۹/٤٪) بیمار بستری و ۱۳۲ (۳۰/۵٪) بیمار سرپایی در این مطالعه شرکت داشتند. از میان آنها ۲۹۱ (٦۷/۳٪)سویه انتروکوک شناسائی شد. تمام ۲۹۱ سویه انتروکوک در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد و محیط حاوی ٦/۵٪ NaCl رشد کردند و واکنش های PYR و آرژینین دهیدرولاز مثبت داشتند. هیچ یک از سویه‌ها پیگمان زرد تولید نکردند. در نهایت، ۱۸۹ (٦٤/۹٪) سویه به‌عنوان *انتروکوکوس فکالیس* و۸٦ (۲۹/۵٪) سویه به‌عنوان *انتروکوکوس فسیوم* تعیین هویت شدند.

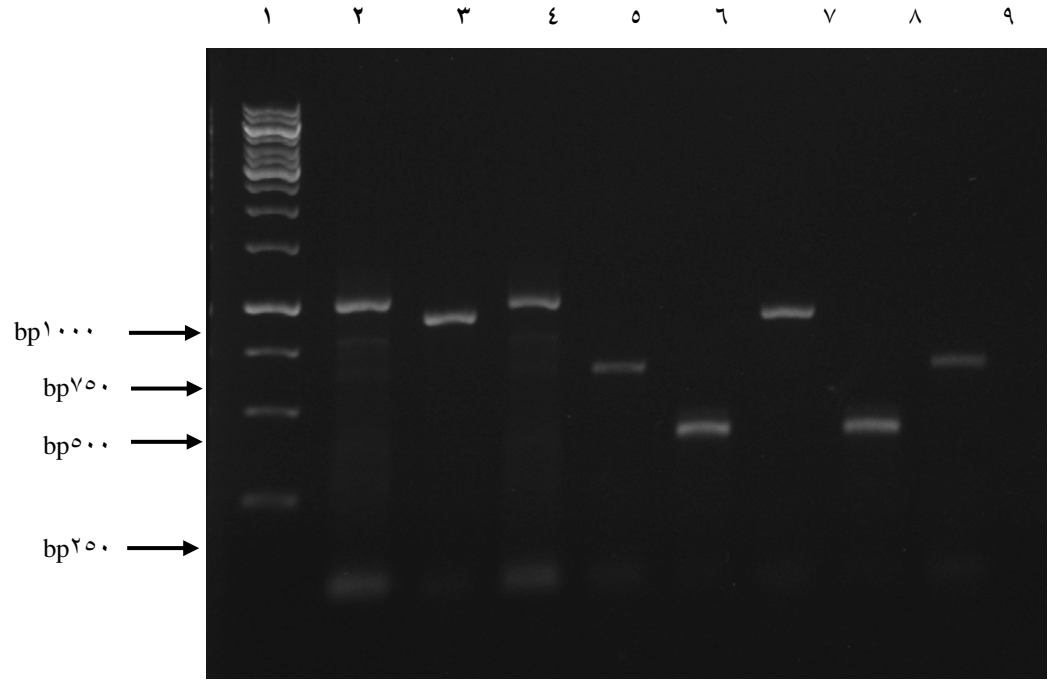
تعیین MIC، مقاومت به ونکومایسین را برای ٦۳ (۲۱/٦٪)سویه نشان داد. از این تعداد، ۱۵ (۲۳/۸٪)سویه *انتروکوکوس فسیوم* بود که مقاومت کامل به ونکومایسین داشتند (MICs, ≥32 µg/ml). ٤۸ (۷٦/۱٪)سویه دیگر، *انتروکوکوس فکالیس* یا *انتروکوکوس فسیوم* و دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین بودند (MICs, 8-16 µg/ml).

اجرای روش PCR، مقاومت به ونکومایسین را برای ۱۵(۵/۱٪)سویه انتروکوک اثبات کرد. این سویه‌ها همگی، *انتروووکوکوس فسیوم* بودند و ژنوتیپ مقاومت در آنها *vanA* (n=12) و *vanB* (n=3) بود. ٤۸ سویه دیگر که با روش‌های فنوتیپی، مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند دارای ژنوتیپ‌های *vanA* (n=12) و *vanB* (n=27) بودند. ۹ سویه انتروکوک که با روش‌های فنوتیپی، مقاومت حد واسط به ونکومایسین نشان دادند، ژن‌های *vanA* یا *vanB* در آنها شناسائی نشد. احتمال می‌رود این سویه‌ها متعلق به ژنوتیپ‌های دیگر غیراز *vanB/vanA* باشند که در این مطالعه بررسی نشدند. در مجموع، روش PCR وجود ژنوتیپ *vanA* را در ۲٤ سویه مقاوم ۳۸٪ و *vanB* را در ۳۰ سویه مقاوم ٤۷/٦٪ انتروکوک اثبات کرد. (جدول ۱، شکل ۱).

بیشترین سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین به ترتیب از بیماران بستری شده در بخش‌های هماتولوژی/انکولوژی وICU ایزوله گردید. مقاومت کامل به ونکومایسین (MICs, ≥32 µg/ml) در بخش‌های عفونی، سوختگی و بیماران سرپایی مشاهده نشد اما، سویه‌هایی با مقاومت حد واسط به ونکومایسین (MICs, 8-16 µg/ml) از این بیماران جدا گردید. در مجموع، مقاومت به ونکومایسین در بیماران بستری، با ٥٤(۸۵/۷٪) سویه دارای مقاومت کامل یا حد واسط به ونکومایسین به‌ویژه در بخش‌های (هماتولوژی/انکولوژی و ICU)در مقایسه با بیماران غیر بستری با ۹(۱٤/۲٪)سویه دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین، بیشتر بود. به‌علاوه، از بیماران سرپایی، انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین جدا نشد.

جدول۱ : آزمایش PCR برای سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین

ژنوتیپ (تعداد سویه)	ونکومایسین MIC (µg/ml)	سویه انتروکوک تعداد (درصد)
van A (۱۲) *van B* (۳)	۲۵۶	*انتروکوکوس فسیوم* ۴۲ (٪۶۶/۶)
van A (۶) *van B* (۱۸) Negative (۳)	۸ –۱۶	
van A (۶) *van B* (۹)	۸ –۱۶	*انتروکوکوس فکالیس* ۱۵ (٪۲۳/۸)
Negative (۶)	۸ –۱۶	انتروکوک غیر از گونه های *فکالیس/فسیوم* ۶ (٪۹/۵)



شکل ۱ : الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

ستون یک سایز مارکر (1 Kbp)، ستون‌های ۲و٤ *vanA* (1,030 bp)، ستون‌های ۳و۷ *انتروکوکوس فکالیس* (941 bp)،ستون‌های ۵و۹ *انتروکوکس فسیوم* (658 bp)، ستون‌های ٦و۸ *vanB* (433 bp).

بحث:

در این مطالعه میزان کلنیزاسیون روده‌ای سویه‌های VRE در میان بیماران بستری در بخش‌های بیمارستانی پرخطر و همچنین گروهی از بیماران سرپائی بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان حساسیت به ونکومایسین در سویه-های انتروکوک از بیماران بستری در مقایسه با بیماران سرپایی کاهش قابل توجهی دارد. بدین ترتیب که از مجموع سویه‌های مقاوم جداشده تنها ۱٤/۲درصد با مقاومت حد واسط از بیماران سرپایی جدا شد و انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین فقط از بیماران بستری جدا شد. به عبارت دیگر ۱٤/۲ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین از بیماران سرپائی جدا شد در حالیکه ۸۵/۷ درصد از این سویه‌ها متعلق به بیماران بستری است. شیوع زیاد مقاومت به ونکومایسین در بیماران بستری در مقایسه با افراد غیر بستری، در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است. از جمله Taylor و همکاران در مطالعه خود شیوع سویه‌های مقاوم به ونکومایسین را در بیماران بستری ۳۲ درصد و در بیماران غیر بستری ۲/۳ درصد گزارش کرده-اند(۱٤). در مطالعه مشابهی که Kolar و همکاران بر روی نمونه‌های رکتال سوآب افراد غیر بستری انجام دادند مقاومت به ونکومایسین، ۱/٦ درصد گزارش شد(۱۵). با این وجود، برخی مطالعات نیز مقادیر زیادتری از مقاومت را در بیماران غیر بستری گزارش می‌کنند. از جمله Gambarotto و همکاران مقاومت به ونکومایسین را در بیماران بستری ۳۷ درصد و در افراد غیر بستری ۱۱/۸ درصد گزارش می کنند(۱).

بررسی ژن‌های *vanA* و *vanB* با اجرای فناوری PCR، وجود مقاومت کامل به ونکومایسین را در ۵/۱ درصد از سویه‌های انتروکوک ثابت کرد. این سویه‌ها همگی *انتروکوکوس فسیوم* بود که ۸۰ درصد ژنوتیپ *vanA* و ۲۰ درصد ژنوتیپ *vanB* دارند. ۱۳/٤ درصد سویه‌های انتروکوک دارای مقاومت متوسط به ونکومایسین هستند، ژنوتیپ‌های *vanA* یا *vanB* دارند که شامل ۳۸/٤ درصد *انتروکوکوس فکالیس* و ٦۱/۵ درصد *انتروکوکوس فسیوم* هستند. نکته جالب توجه آنکه جداسازی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* (٦٤/۵ درصد) نسبت به *انتروکوکوس فسیوم* (۲۹/۵ درصد) بیشتر بود، اما مقاومت حد واسط یا مقاومت کامل به ونکومایسین، در ٦٦/٦ درصد از سویه‌های *انتروکوکوس فسیوم*وجود دارد. تنها ۲۳/۸ درصد از سویه‌ها با مقاومت حد واسط به ونکومایسین متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* هستند. این مورد می تواند تایید کننده فراوانی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و همچنین شیوع زیادتر مقاومت به ونکومایسین در میان سویه‌های *انتروکوکوس فسیوم* باشد. همچنانکه IVEN و همکاران در مطالعه سویه‌های انتروکوک جدا شده از مدفوع، شیوع مقاومت به ونکومایسین را در *انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب ۳۰/۲ درصد و ۱۳/۹ درصد گزارش کرده‌اند(۸). در مطالعه Kuriyama و همکاران، این مقاومت به ترتیب ٦٦/٤ درصد و ۳۳/۵ درصد گزارش شده‌است (۱٦).

با اینکه تعداد سویه‌های دارای مقاومت کامل به ونکومایسین در این مطالعه، نسبتا" کم است اما، این نتیجه از دو دیدگاه حائز اهمیت می‌باشد: اول اینکه سویه‌های انتروکوک با مقاومت کامل به ونکومایسین، مقاومت سطح بالا به ونکومایسین دارند (MICs, $\geq$ 256 µg/ml). دوم اینکه علی‌رغم تعداد نسبتا" کم مقاومت کامل به ونکومایسین، گروه بزرگتری از سویه‌ها مقاومت حد واسط به ونکومایسین دارند. این امر گویای پیشرفت مقاومت به این آنتی بیوتیک در میان سویه‌های انتروکوک در جمعیت بیماران مورد بررسی است. Bell و همکاران در مطالعه خود، مقاومت حد واسط را در ۲۰ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش کردند(۱۷). Gordts و همکاران مقاومت حد واسط را فقط در ۱۸/۱ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش کردند (۲). در صورتی که در مطالعه kolar و همکاران مقاومت حد واسط در ۷۷/۷ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش شده است (۱۵). در مطالعه حاضر مقاومت حد واسط در ۷٦/۱ درصد از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین مشاهده گردید. لذا، نسبت سویه‌های انتروکوک دارای مقاومت کامل یا حد واسط به ونکومایسین در مطالعات مختلف متفاوت است و با گونه‌های انتروکوک جدا شده و ژنوتیپ‌های مختلف عامل مقاومت متناسب می باشد.

با وجود اینکه بررسی نمونه‌های مدفوع یا رکتال سوآب در بیماران بخش‌های پرخطر جهت شناسائی اولیه انتروکوک‌های مقاوم به آنتی بیوتیک به‌ویژه سویه‌های VRE، توسط سازمان‌های بهداشتی و در مقالات متعدد بین المللی مورد تاکید قرار گرفته اما هنوز روش قابل قبول و مورد توافقی برای این کار معرفی نشده است. مطالعات متعدد در نقاط مختلف دنیا، استفاده از روش‌های

مختلف با بکارگیری محیط‌های کشت متفاوت، بدون آنتی بیوتیک یا همراه با غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک، را تجربه کرده‌اند(۲، ۵ ، ۸ ، ۱۳ ، ۱٤ ، ۱۷ ، ۱۸). بنابراین چون نتایج ارائه شده در مقالات مختلف ممکن است از نظر روش بکار رفته جهت جداسازی باکتری، محیط‌های کشت مورد استفاده، بیماران مورد نظر و حجم جامعه آماری متفاوت باشد، مقایسه نتایج را می‌تواند با مشکل مواجه کند. با این حال، میزان حاملین روده‌ای VRE را در نقاط مختلف دنیا متفاوت و اکثرا" رو به افزایش گزارش می کنند. Gordts و همکاران در بلژیک در سال ۱۹۹۵، حاملین روده‌ای VRE را ۳/۵ درصد گزارش کرده‌اند که ۸۲ درصد این سویه‌ها مقاومت سطح بالا و ۱۸ درصد مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند(۲). Iven و همکاران در بلژیک در سال ۱۹۹۹، حاملین روده‌ای VRE را ۱۲/۸ درصد گزارش کرده‌اند(۸). Taylor و همکاران در انگلستان در همان سال این میزان را ۱۲/۲ درصد گزارش کرده‌اند که شامل ۵۹ درصد ژنوتیپ *vanA* و ٤۱ درصد ژنوتیپ *vanB* می‌باشد. در این مطالعه فراوانی سویه‌های مقاوم در بیماران بستری ۳۲ درصد و در بیماران سرپائی ۲/۳ درصد گزارش شده‌است(۱٤). Gikas و همکاران در یونان در سال ۲۰۰۵، حاملین روده‌ای VRE را ۲۰/۵ درصد گزارش کرده‌اند(۱۸). در مطالعه حاضر میزان حاملین روده‌ای VRE در بیماران بخش‌های پر خطر بیمارستانی براساس شناسائی ژن‌های *vanA* و *vanB*، ۱۸/۵ درصد بود. در این مطالعه مقاومت کامل به ونکومایسین در سویه‌های جدا شده از بیماران سرپائی مشاهده نشد.اما، برخی مطالعات مشابه درصدهای بالائی از مقاومت را در این بیماران گزارش کرده‌اند(۱، ۱۹).

در مجموع، اجرای PCR ، وجود مقاومت با ژنوتیپ *vanA* را در ۸/۲ درصد و مقاومت با ژنوتیپ *vanB* را در ۱۰/۳ درصد از سویه‌های جدا شده اثبات کرد. با توجه به اینکه ژنوتیپ *vanB* در انتروکوک عمدتا" عامل ایجاد مقاومت متوسط تا سطح بالا به ونکومایسین می باشد(۳) شیوع سویه‌های دارای ژنوتیپ *vanB* در کنار شیوع سویه‌های انتروکوک با مقاومت حد واسط به ونکومایسین در این مطالعه می تواند تا حدی توجیه کننده این فراوانی باشد. هر چند که در برخی مطالعات نیز شیوع ژنوتیپ *vanA* گزارش شده‌است(۱٤).

امروزه انتروکوک مقاوم به گلیکوپپتید برای بیماران بستری در بیمارستان به یک معضل بزرگ درمانی مبدل شده‌است. VRE، نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA)، به‌عنوان یک عامل بسیار مهم در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، موجب افزایش میزان عفونت و مرگ و میر در بیماران بستری می‌شود(۲). با وجودی که به‌نظر می‌رسد در ایران، میزان شیوع سویه‌های VRE در نمونه‌های بالینی در حد نسبتا" کمی باشد، اما بروز مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک‌های جدا شده از موارد عفونت، در برخی از مطالعات می تواند زنگ خطری برای پیدایش عفونت‌های بیمارستانی مقاوم توسط این سویه‌ها باشد. از جمله می توان به مطالعه‌ای در بیمارستان لبافی نژاد تهران (در سال ۲۰۰۵) اشاره کرد. در این مطالعه تمام سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه-های ادرار بیماران بستری، حساس به ونکومایسین بود، در حالیکه، ۷۰ درصد سویه‌های *انتروکوکوس فیسیوم* مقاوم به ونکومایسین بودند(۲۰). با این وجود اطلاعات در مورد اپیدمیولوژی، میزان شیوع کلنیزاسیون روده‌ای و نسبت حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در داخل و خارج محیط‌های بیمارستانی در ایران بسیار اندک می باشد. مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که VRE می‌تواند به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی در روده بیماران، در محیط-های داخل و خارج بیمارستان مستقر شود و کلنیزاسیون روده‌ای مهم‌ترین و معمول‌ترین مسیر انتشار این باکتری‌ها محسوب می‌گردد(۲۲،۲۱). با وجود اینکه مطالعات بسیاری در مورد اپیدمیولوژی این باکتری‌ها در نمونه‌های مدفوع در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، اما اطلاعات مستند در مورد فراوانی این سویه‌ها در ایران بسیار اندک است و تجربیات موجود عمدتا" بر روی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی است.

همانطور که پیشتر اشاره شد اکثر مطالعات داخلی به بررسی مقاومت سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و موارد عفونت پرداخته‌اند. لذا، مطالعه بر روی حاملین روده‌ای انتروکوک محدوداست. در تجربه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در بیمارستان نمازی شیراز و بر روی نمونه مدفوع بیماران همودیالیزی انجام شد حاملین روده‌ای VRE، ٦/۲ درصد (۹ بیمار از مجموع ۱٤٦ بیمار) گزارش گردید(۲۳). در مطالعه مشابه در بیمارستان امیر علم تهران، میزان مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های انتروکوک جدا شده از نمونه مدفوع بیماران بستری ۱/٤۲ درصد و در بیماران دارای نارسائی کلیه و تحت همودیالیز، ۷/۵۲ درصد (۷ بیمار از مجموع ۹۳ بیمار همودیالیزی) گزارش شده

است(۲٤). میزان زیادتر مقاومت در بیماران همودیالیزی در مطالعه اخیر، با شرایط ویژه این بیماران، که جزو گروه‌های پر خطر برای کلنیزاسیون و عفونت انتروکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک محسوب می‌شوند سازگار است. در مطالعه حاضر از مجموع ۲٤ بیمار همودیالیزی، مقاومت به ونکومایسین در ۱۲/۵ درصد مشاهده شد. مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز جهت بررسی کلنیزاسیون روده‌ای VRE در بیماران بستری در بخش‌های مختلف، با روش Agar Dilution انجام شد نشان داد که ۱٤/۱ درصد از بیماران، حامل روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین هستند(۲۵).

نتایج مطالعه حاضر، در مقایسه با مطالعات مشابه نسبتا" بالا است که لزوم توجه جدی به این موضوع راگوشزد می‌کند. همانطورکه پیشتر اشاره شد انتروکوک، فلور طبیعی روده انسان است و اکثر عفونت‌های آن منشاء اندوژن دارند. لذا، کلنیزاسیون روده‌ای مهم‌ترین و معمول‌ترین مسیر برای انتشار این باکتری است(۱٦،۱۵). از سوی دیگر درمان عفونت‌های انتروکوکی به‌ویژه در بیماران بستری در بخش‌های خاص همیشه با مشکل مواجه است و تدابیر درمانی ویژه‌ای را طلب می‌کند.

نتیجه‌گیری:

برای عفونت‌های انتروکوکی مقاوم به بتالاکتام وآمینوگلیکوزید، ونکومایسین درمان جایگزین محسوب می‌شود. لذا، مقاومت به این آنتی بیوتیک درمان عفونت-های انتروکوکی را با مشکل جدی مواجه خواهد کرد. از سوی دیگر افزایش میزان حاملین روده‌ای انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در بیمارستان‌ها به‌عنوان یک منبع بالقوه عفونت بیمارستانی می‌تواند هشداری بسیار جدی برای انتشار این سویه‌ها باشد. لذا، کمیته‌های کنترل عفونت بیمارستانی جهت آگاهی از میزان کلنیزاسیون روده‌ای انتروکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک باید برنامه کشت‌های نظارتی از نمونه‌های مدفوع یا رکتال سوآب بیماران بستری شده در بیمارستان به‌ویژه بیماران دارای شرایط خاص را به‌صورت دوره‌های متناوب و منظم انجام دهند. با توجه به تجربه انجام شده در مطالعه حاضر، جداسازی سویه‌های انتروکوک از نمونه مدفوع و ارزیابی مقاومت این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک با روش‌های فنوتیپی همچون انتشار از دیسک ، تعیین MIC و انجام E-test کاری دشوار، پر هزینه و وقت گیر است و نتایج آن ممکن است صحت و دقت روش‌های مولکولی همچون PCR را نداشته باشد. در صورتیکه استفاده از پرایمرهای اختصاصی و بکارگیری مستقیم روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR جهت شناسایی مقاومت به گلیکوپپتید بر روی نمونه‌های بالینی و یا بر روی کشت می‌تواند علاوه بر تسریع شناسایی انتروکوک-های مقاوم، امکان شناسائی ژن‌های عامل مقاومت و تعیین گونه مقاوم را نیز فراهم آورد.

فهرست مراجع:

1. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, *et al*. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol*, 2000; **38**(2): 620-624.

2. Gordst B, VanLanduyt H, Ieven M, VanDamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 1995; **33**(11): 2842-2846.

3. Cetinkaya Y, Falk P, Glen Mayhall C. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbial Rev*, 2000; **13**(4): 686-707.

4. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptides resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; **37** (8): 1563-1571.

5. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; **33**(1): 24-27.

6. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AMG, Lambert EJ, *et al*. Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003; **41**(6): 2483-2486.

7. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997; **35**(9): 2325-2330.

8. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, VanLaer F, Goossens H. Comparision of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptides-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 1999; **37** (5): 1436-1440.
9. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbial*, 1989; **27**(12): 731-734.
10. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Envirom Microbio,*1999; **65**(10): 4425-4430.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 6th edition. CISI document, 2006; M7-A7. Wayne, Pa.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests: 16th informational supplement. CLSI document M100-S16, 2006; Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne, Pa.
13. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 2000; **38**(8): 3093-2-3095.
14. Taylor ME, Oppenheim BA, Chadwick PR, Weston D, Palepout MFI, Woodford N, *et al*. Detection of Glycopeptides-resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. *J Hosp Infect*, 1999; **43**: 25-32.
15. Kolar M, Cekanova L, Vagnerova I, Kesselova M, Sauer P, Koukalova D, *et al.* Molecular-Biological analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from a community in the Czech republic. *Biomed Papers*, 2004; **148**(2): 167-169.
16. Kuriyama T, Williams DW, Patel M, Lewis MAO, Jenkins LE, Hill DW, *et al.* Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. *J Med Microbial,* 2003; **52**(10): 821-827.
17. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vacomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbial*, 1998; **36**(8): 2187-2190.
18. Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikoladis P, Skoutelis A, levidiotou S, *et al*. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant Enterococci in Greek hospitals. *J Clin Microbial*, 2005; **43**(11): 5796-5799.
19. Heier KIH, Claus H, Bohme G, Marin S, Seltmann G, Hakenbeck R, *et al*. *E. faecium* strains with *vanA* mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animals foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist*, 1995; **1**:265-272.
20. Feizabadi MM, Sayadi S, Shokrzadeh L, Parvin M, Yadegaryian D. Increase in prevalence of vancomycin resistant isolates of *Enterococcous faecium* at Labbafinejad hospital. *Iran J Clin Infect Dis,* 2008; **3**(2): 73-77.
21. Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J Antim Microb Chemother*,1994; **34**: 515-528.
22. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, Perez-Diaz C, Baquero F. *Van-A* mediated vancomycin resistant *Enterococcus* spp. In sewage. *J Anntimicrob,* 1994; **33**: 553-561.
23. Assadian O, Askarian M, Stadler M, Shaghaghian S. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz, Iran. *BMC Infect Dis,* 2007; **7**(52): 1-5.
24. Hasibi M, Rezaii J, Mohajer Iravani B, Moslemi SB, Rahimi H, *et al*. Hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci: A report of 2-year experience. *Acta Medica Iranica,* 2009;**47**(6):469-472.
25. Askarian M, Afkhamzadeh R, Monabbati A, Daxboek F, Assadian O. Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in Shiraz, Iran. *Inter J Infect Dis*, 2008; **12**: 171-175.