مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۱۵-۲۲

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین جدا شده از نمونه های بالینی

مهوش اسکویی* ، پریسا فرخ

بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: مهوش اسکویی، بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵ oskoui1@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک ها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان می باشند، ولی تحت شرایطی می توانند باعث عفونت شوند و مهمتر اینکه یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی هستند. مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در انتروکوک ها، مصرف این دارو را محدود کرده است. با توجه به فراوانی فنوتیپ های *van*A و *van*B در میان انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین، در این مطالعه به شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی *van*A و *van*B در سویه های بالینی پرداخته شده است.

روش بررسی: ۳۲ سویه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین، از میان ایزوله های انتروکوک جدا شده از نمونه های ادرار و یک نمونه خون مورد بررسی قرار گرفتند. مقاومت این سویه ها نسبت به دیسک های ونکومایسین، تیکوپلانین، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسیین تعیین گردید. MIC ونکومایسین، برای تمام سویه ها با روش microdilution بدست آورده شد. بررسی وجود ژن های *van*A و *van*B برای ۳۱ ایزوله ای که MIC ≥۶µg/ml داشتند، توسط PCR انجام شد.

یافته ها: بر اساس نتایج آنتی بیوگرام تیکوپلانین وMIC ونکومایسین، ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *van*A و ۶ سویه دارای فنوتیپ *van*B بودند. تمام سویه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و به ترتیب٪ ۹۶/۸۷، ٪۸۱/۲۵ و ٪۷۸/۱۲ از سویه ها به دیسک های اریترومایسین، تتراساکلین و جنتامایسین مقاوم بودند. ژن های *van*A و *van*B به ترتیب در تمام ۲۵ ایزوله ای که فنوتیپ *van*A و ۶ سویه ای که *van*B داشتند، شناسایی شد. در ۱۳ سویه از ۲۵ سویه که دارای فنوتیپ *van*A بودند، هر دو ژن *van*A و *van*B توسط PCR تکثیر شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که از ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *van*A ۱۲ سویه انتروکوک، فنوتیپ و ژنوتیپ *van*A و ۱۳ ایزوله (٪۵۲) با وجود داشتن فنوتیپ *van*A، دارای هر دو ژن *van*A و *van*B بودند. ۶ سویه فنوتیپ و ژنوتیپ *van*B را دارند. با توجه به امکان ایجاد تغییر ژنوتیپی در انتروکوک ها، به نظر می رسد این ایزوله ها ژن *van*B را از طریق انتقال پلاسمیدی بدست آورده اند.

کلید واژه ها: انتروکوک، ونکومایسین، *van*A، *van*B .

مقدمه:

انتروکوک ها، کوکوس های گرم مثبتی می باشند که به عنوان پاتوژن های فرصت طلب قادرند، باعث انواع عفونت های مجاری ادراری- تناسلی، اندوکاردیت، منتژیت، عفونت های خونی و عفونت در نوزادان شوند (۱و۲و۳). این میکروارگانیسم ها سومین علت معمول بیماری های باکتریایی کسب شده در بیمارستان ها می باشند. از بیست گونه انتروکوکی که تا امروز شرح داده شده اند، *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* حدود ٪۹۰ از جدایه های بالینی را به خود اختصاص می دهند (۱و۲و۳و۴). فشار انتخابی حاصل از استفاده بیش از اندازه آنتی بیوتیک ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای انتروکوکوس ها برای کسب و انتشار عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی، از جمله عواملی هستند که باعث ایجاد مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها گردیده و ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی و اشاعه ژن های مقاومت بین این میکروارگانیسم ها و یا سایر گونه ها را موجب می شود (۵).

ونکومایسین در ترکیب با یک آمینوگلیکوزید، درمان جایگزین مؤثری را برای عفونت های شدید انتروکوکی فراهم می سازد. در بیمارانی که نمی توان آنتی بیوتیک های دسته پنی سیلین را همراه با آمینوگلیکوزیدها مورد استفاده قرار داد، گلیکوپپتیدها را می توان جایگزین نمود (۱). تاکنون شش نوع فنوتیپ مقاومت به ونکومایسین در جهان گزارش شده است (*van*A, *van*B, *van*C, *van*D, *van*E, *van*G) (۶و۷). در انتروکوک ها پیش سازهای نرمال پپتیدوگلیکان دارای انتهای D-Ala-D-Ala هستند که تمایل زیادی در اتصال به ونکومایسین دارند، در حالیکه انتروکوکوس های مقاوم به ونکومایسین، مسیرهای بیوسنتز دیگری را طی می کنند که پیش سازهای انتهایی D-Ala-D-Lac را دارا می باشند و به طور ضعیف به ونکومایسین اتصال می یابند. ژن های *van*A و *van*B لیگاندهای D-Ala-D-Lac را کد می کنند و مسئول مقاومت متوسط تا سطح بالای اکتسابی می باشند که عمدتاً در *E.faecalis* و *E. faecium* یافت می شوند (۷).

مقاومت القایی در برابر میزان بالای ونکومایسین و تیکوپلانین فنوتیپ *van*A را نشان می دهد که این نوع مقاومت نسبت به ونکومایسین، باعث کاهش فعالیت دیگر آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی (مثل تیکو پلانین) می گردد. مقاومت بالا به گلیکوپپتیدها، معمولاً به راحتی می تواند از طریق انتقال پلاسمیدی (Conjugation) به انتروکوک های حساس انتقال یابد (۷و۸).

اخیراً نشان داده شده است که ژن های لازم برای تظاهر فنوتیپ *van*A توسط یک ترانسپوزون به نام Tn*1546* حمل می شود. به نظر می رسد انتشار این ترانسپوزون مسئول گسترش مقاومت گلیکوپپتیدی سطح بالا بین ایزوله های بالینی انتروکوک ها است (۷و۸و۹).

شرح دقیق سویه های حساس به تیکوپلانین و مقاوم در برابر ونکومایسین (*van*B) اولین بار در آمریکا گزارش شده است. MIC این سویه ها برای ونکومایسین در محدوده ۶۴-۳۲ µg/ml (مقاوم) و برای تیکوپلانین کمتر از ۰/۵ µg/ml (حساس) است (۱). ژن کد کننده این فنوتیپ روی ترانسپوزون Tn*1547* حمل می شود، که ممکن است روی پلاسمیدها و یا روی کروموزوم یافت شوند(۵).

مقاومت آنتی بیوتیکی انتروکوک ها نسبت به گلیکوپپتیدها یک تهدید جهانی برای سلامت عمومی محسوب می شود. این امر به این دلیل است که آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی، مثل ونکومایسین و تیکوپلانین، داروهای انتخابی و اغلب اوقات آخرین گزینه ها برای درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از باکتری های گرم مثبت چند مقاومتی می باشند (۲و۵و۱۰).

مطالعات انجام شده در ایران نیز نشان می دهد که عفونت انتروکوکی در بیمارستان های تهران حالت اندمیک دارد (۱۱) و یک عامل مهم در عفونت های بیمارستانی به حساب می آید (۱۱ و۱۲). با توجه به این موضوع و اهمیت مقاومت انتروکوک ها به آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی وامکان انتقال ژن های مقاومت به سایر باکتری ها، و نظر به این که اطلاعات کافی در مورد میزان مقاومت سویه های انتروکوک جدا شده از نمونه های بالینی و خصوصیات ژنوتیپی آنها درایران در دست نمی باشد، لذا در این پژوهش ما به بررسی مولکولی مقاومت *van*A و *van*B و اثبات وجود ژن های فوق و همچنین بررسی میزان هماهنگی بین خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی در دستجات ژنی *van*A و*van*B جدا شده از نمونه های بالینی که مقاوم به ونکومایسین بودند پرداختیم .

مواد و روش ها:

جداسازی و شناسایی سویه ها: در این بررسی به روش توصیفی به مطالعه ۳۲ سویه انتروکوکی مقاوم به ونکومایسین از بین سویه های انتروکوک جدا شده از دو بیمارستان (میلاد و سینا) و

یک مرکز آزمایشگاهی (بهار) در شهر تهران، بین سال های ۱۳۸۴-۱۳۸۶ ، پرداخته شد. به جز یک سویه که از خون جدا شده بود بقیه سویه ها از ادرار جدا شده بودند.

تعیین هویت هر ایزوله با مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم و بررسی ویژگی های بیوشیمیایی متداول از جمله هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا، رشد در حضور NaCl ٪ ۶/۵، فعالیت پیرولیدونیل آریل آمیداز (PYR) انجام شد. برای تعیین گونه از آزمون تخمیر قندی (آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، لاکتوز و...) در لوله های حاوی محیط پایه قندی به نسبت ٪۱ از قندهای ذکر شده و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۱۳).

انجام آنتی بیوگرام با استفاده از روش انتشار از دیسک:

آنتی بیوگرام این سویه ها به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion) با تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی در محیط Muller Hinton agar انجام شد (۱۴). دیسک های استفاده شده در این پژوهش شامل: ونکومایسین (۳۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg) و تیکوپلانین (۳۰ µg) بودند که از شرکت MAST (انگلستان) تهیه گردید.

بررسی مقاومت به روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration):

سویه هایی که برای آنتی بیوتیک های ونکومایسین و تیکوپلانین دارای قطر هاله ≥۱۴میلی لیتر بودند، برای تعیین MIC انتخاب شدند. تعیین MIC به روش Micro dilution با استفاده از محیط مولر هینتون براث انجام شد. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها با غلظت نهایی $1/5\times10^{6}$CFU/ml تهیه شد و سپس این سوسپانسیون به میزان $\frac{1}{100}$ با استفاده از محیط مولر هینتون براث رقیق گشت. استوک آنتی بیوتیک ونکومایسین با غلظت ۱۰mg/ml، با استفاده از پودر خالص ونکومایسین (تهیه شده از شرکت SERVA) تهیه گردید و رقت های آنتی بیوتیکی برابر با ۱۵۳۶، ۷۶۸، ۳۸۴، ۱۹۲، ۹۶، ۴۸، ۲۴، ۱۲، ۶، ۳، ۱/۵، ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر از آن تهیه شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با رقت $\frac{1}{100}$ به همراه غلظت های تهیه شده از استوک آنتی بیوتیک به میکروپلیت ها اضافه شد و بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، MIC سویه ها تعیین گردید. کمترین غلظت آنتی بیوتیک که در حضور آن رشدی صورت نگرفته بود به عنوان MIC مشخص شد (۱۴و ۱۵و ۱۶). برای تعیین MIC از سویه های(حساس) *E.faecalis* ATCC 29212 و (مقاوم) *E.faecium* BM4147 به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد.

استخراج و تخلیص DNA : تمامی سویه هایی که کمترین میزان غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک ونکومایسین برای آنها MIC ≤ ۶ µg/ml بود، برای انجام آزمون PCR در نظر گرفته شدند. برای استخراج DNA کروموزومی از کیت mi-Bacterial Genomic DNA Isolation (metabion) استفاده شد. به منظورتهیه سوسپانسیون باکتری، چند کلنی از کشت تازه باکتری به ml ۲ محیط BHI مایع (Brain Heart Infusion) انتقال داده شد، سپس این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت و رسوب آن طبق دستور العمل کیت مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج پلاسمید نیز توسط کیت mi-plasmid Miniprep (metabion) انجام شد. برای استخراج پلاسمید ml ۲ از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI که جذب آن در nm ۶۰۰ ، دو یا بیشتر باشد، رسوب تهیه شد و بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

انجام آزمون PCR جهت تعیین ژن های *vanA* و*vanB* :

به منظور تکثیر ژن *van*A از پرایمرهای :$vanA_1$ ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATAC و $vanA_2$: CCCCTTTAACGCTAATACGAT استفاده شد (۱۷). مخلوط واکنش بعد از بهینه سازی شامل، µl ۱۴/۳ آب دو بار تقطیر، ۲µl PCR buffer (10X) ، ۲ mM $MgCl_2$ ، ۰/۴µl dNTP (۱۰ mM Fermentas)، µl ۰/۴ از هر کدام از پرایمرهای ذکر شده با غلظت ۱۰ pmol/ml، µl ۰/۲ µl Taq DNA polymerase (5u/ Fermentas) و ۵۰۰ ng DNA استخراج شده بود.

PCR ژن *van*B نیز با استفاده از جفت پرایمر $vanB_1$:CAAAGCTCCGCAGCTTGCATG و $vanB_2$:TGCATCCAAGCACCCGATATAC (۱۸) با مخلوط واکنش فوق انجام گرفت.

سویه های انتروکوکی استاندارد *E.faeium* BM4147 و *E.faecalis* V583 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای PCR ژن های *van*A و *van*B مورد استفاده قرار گرفتند. سویه

E.faecalis ATCC29212 هم به عنوان کنترل منفی برای هر دو ژن استفاده شد.

PCR ژن های مورد نظر با استفاده ازدستگاه ترموسایکلر(eppendorf) انجام گرفت. شرایط بهینه PCR برای هر دو ژن *van*A و *van*B شامل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه با دمای Denaturation ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای Annealing ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای Extension ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه می باشد. مرحله Extension نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه انجام شد.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید وبا استفاده از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ µg/ ml رنگ آمیزی و توسط دستگاه Gel Documentation مشاهده شد.

یافته ها:

در میان ۳۲ سویه انتروکوکی مورد بررسی در این تحقیق، با استفاده از روش های بیوشیمیایی، ۱۷ سویه *E.faecium* و۱۵ سویه *E.faecalis* شناسایی شدند. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام و MIC به ترتیب در شکل ۱ و جدول ۱ آمده است. تمام سویه ها به دیسک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و به ترتیب ٪ ۹۶/۸۷، ٪۸۱/۲۵ و ٪۷۸/۱۲ از سویه ها به آنتی بیوتیک های اریترومایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین نیز مقاوم بودند.

۱۶ سویه (٪۵۱/۶۱) از ایزوله های مورد بررسی، مقاومت سطح بالایی در برابر ونکومایسین داشتند (MIC≥۳۸۴ µg/ml) و به خوبی در اطراف دیسک ونکومایسین ۳۰ µg رشد کردند. آنها شامل ۷ سویه *E.faecalis* و ۹ سویه *E.faecium* بودند.

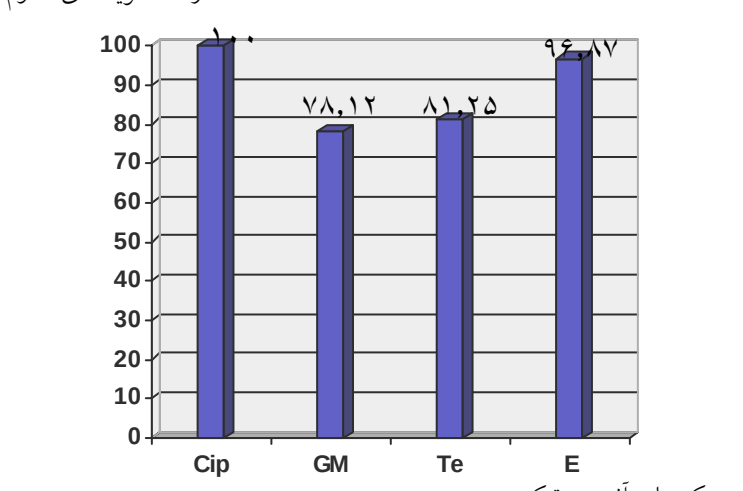
بر اساس نتایج بدست آمده از آنتی بیوگرام و MIC آنتی بیوتیک های تیوکوپلانین و ونکومایسین، ۲۵ سویه دارای فنوتیپ *van*A (به ونکومایسین و تیکوپلانین مقاوم بودند) و ۶ سویه دارای فنوتیپ *van*B (به ونکوما یسین مقاوم و به تیکوپلانین حساس می باشند) بودند.

۶ سویه انتروکوکی که فنوتیپ *van*B داشتند، دارای قطر هاله ۲۰ mm برای دیسک ۳۰ µg تیکوپلانین بودند (حساس به تیکوپلانین) و مقادیر MIC آنها برای ونکومایسین به صورت ۱۲ µg/ml (۱ سویه)، ۴۸ µ g/ml (۱ سویه)، ۱۹۲ µg/ml (۱ سویه)، ۷۶۸ µg/ml (۳ سویه) مشاهده گردید.

علاوه بر سویه های مذکور، در یکی از سویه های مورد بررسی (*E.faecium*) که فنوتیپ *van*A داشت، تک کلنی هایی در هاله عدم رشد دیسک تیکوپلانین مشاهده گردید. این سویه برای ونکومایسین MIC > ۱۵۳۶ µg/ml داشت. دو احتمال برای کلنی های رشد یافته در مرکز هاله عدم رشد دیسک های آنتی بیوتیکی وجود دارد، ممکن است آنها کلنی های جهش یافته ای باشند که به آنتی بیوتیک مقاوم شده اند و یا از ابتدا مخلوطی از دو سویه *E.faecium* متفاوت بوده اند (خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی کلنی های رشد یافته در هاله عدم رشد دیسک تیکوپلانین با *E.faecium* مطابقت داشت) . با استفاده از PFGE و Ribotyping برای کلنی های رشد یافته در مرکز هاله عدم رشد وکلنی های اطراف هاله، می توان به یکسان بودن آنها پی برد(۱۹). لذا در این مرحله این یک مورد کنار گذاشته شد و بر روی ۳۱ نمونه باقیمانده بررسی ژنوتیپی انجام شد.

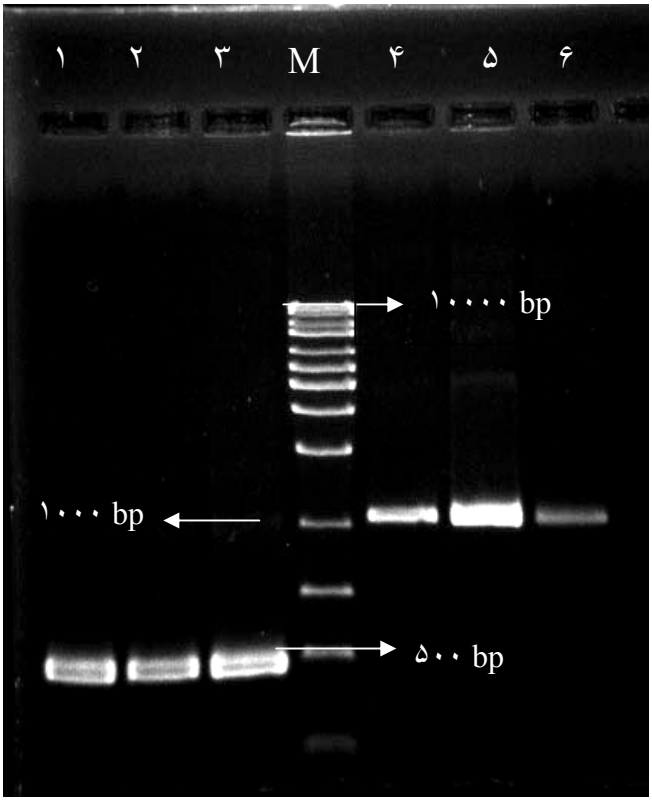
در ۲۵ سویه ژن *van*A با پرایمرهای اختصاصی این ژن توسط PCR شناسایی شدند. اندازه قطعه تکثیر شده با این پرایمرها bp ۱۰۳۰ است که معادل قطعه تکثیر شده با سویه *E. faecium* BM4147 بود. در۶ سویه با خصوصیات فنوتیپی *van*B ، ژن *van*B با پرایمرهای اختصاصی آن ، با اندازه bp ۴۳۳ شناسایی گردید که با قطعه تکثیر شده از سویه *E. faecalis* V583 مشابه بود (شکل ۲). در ۱۳ سویه از ۲۵ ایزوله دارای فنوتیپ *van*A هر دو ژن *van*A و*van*B قابل شناسایی بودند.

شکل ۱: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوکی. Cip (سیپروفلوکساسین)، GM (جنتامایسین)، Te (تتراسکلین)، E (اریترومایسین)



جدول ۱: محدوده MIC آنتی بیوتیک ونکومایسین در بین ۳۲ سویه جدا شده مقاوم به این آنتی بیوتیک

	MIC (minimum inhibitory concentration) µg/ml			
	۶-۲۴	۴۸ -۳۸۴	۷۶۸ -۱۵۳۶	>۱۵۳۶
(n) تعداد کل	۵	۱۱	۱۳	۳
E.faecium	۲	۶	۸	۲
E.faecalis	۳	۵	۵	۱
٪ درصد	۱۵/۶۲	۴۳/۳۷	۴۰/۶۲	۹/۳۷



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از دو ژن*van*B (۱، ۲ و۳) و *van*A (ستون های ۴،۵ و۶) . ستون۱ و ۴ به ترتیب سویه های کنترل مثبت *E.faecalis* V583 (۴۳۳ bp) و *E.faecium* BM4147 (۱۰۳۰ bp) هستند. M: 1 kb DNA Marker

بحث:

شیوع وسیع انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین و یا سایر گلیکوپپتید ها در نقاط مختلف جهان، مشکلات بسیاری را در جهت درمان عفونت های انتروکوکی به وجود آورده است. محدودیت انتخاب دارو در درمان این عفونت ها و از طرفی قابلیت انتقال ژن های پلاسمیدی مقاومت به ونکومایسین از انتروکوک ها به باکتری های بیماریزای مهم دیگر مثل *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pneumoniae* و یا سایر سویه های حساس انتروکوک، بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها را در آنها حائز اهمیت می سازد (۱۵).

بنابراین با توجه به اهمیت موضوع و وجود گزارشاتی مبنی بر ناهمگونی های فنوتیپی و ژنوتیپی در انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین (۱۸)، ما به بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی ۳۲ سویه انتروکوکی مقاوم به ونکومایسین که از بیماران دو بیمارستان و یک مرکز آزمایشگاهی در تهران جدا شده اند، پرداختیم.

مطالعات انجام شده در نقاط مختلف، نشان داده است که فنوتیپ *vanA* نسبت به *vanB* بسیار شایع تر می باشد (۲۰). بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز، از ۳۱ سویه مقاوم به ونکومایسین، ۲۵ سویه (٪۸۰/۶۴) دارای فنوتیپ *vanA* و ۶ ایزوله (٪۱۹/۳۵) دارای فنوتیپ *vanB* بودند. در مطالعه انجام شده روی انتروکوک های جدا شده از عفونت های بیمارستانی تهران توسط Talebi M. *et al*هم،٪ ۸۴ سویه های مورد بررسی فنوتیپ *vanA* داشتند(۱۲). بررسی حضور ژن های مرتبط با فنوتیپ های *vanA* و *vanB* توسط PCR نشان داد که تمام ۲۵ سویه با خصوصیات *vanA* دارای ژن *vanA* بودند (٪۱۰۰). وجود ژن *vanB* نیز در۶ ایزوله توسط PCR تأیید گردید. حائز اهمیت است که ۱۳ سویه (٪۵۲) از ۲۵ سویه دارای خصوصیات فنوتیپی *vanA*، وجود هر دو ژن *vanA* و*vanB* را نشان دادند. بنابراین ژن *vanB* در ۱۹ سویه (۶ سویه با فنوتیپ *vanB* و ۱۳ سویه با فنوتیپ *vanA*) مورد شناسایی قرار گرفت (۱۲).

طبق مطالعات انجام شده، حضور هم زمان هر دو ژن *vanA* و *vanB* در انتروکوک ها، در آمریکا، انگلستان و کره نیزگزارش گردیده است (۲۱و۲۲و۲۳). Woo-Joo Kim, et al در بررسی انتروکوک های جدا شده از یک بیمارستان در شیکاگو بین سال های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۳ نشان دادند که ٪۶۹ از بیماران دارای عفونت با سویه های *E.faecium* با ژنوتیپ *vanB* بودند. در سال ۱۹۹۳ یک سویه *E.faecium* با Multiplex PCR وجود هر دو ژن *vanA* و *vanB* را نشان داد وبعد ازآن تا سال ۱۹۹۶ میزان ژنوتیپ *vanA* به *vanB* به نسبت $\frac{2.2}{1}$ افزایش یافت (۲۱). مطالعات مشابهی هم در انگلستان (توسط N.Woodford, *et al* بین سال های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴) (۲۲) و در کره (توسط Lee W, *et al* بین سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹) (۲۳) بر روی سویه های انتروکوک جدا شده از بیماران انجام گرفته است. نتایج بدست آمده از هریک از این دو تحقیق نشان داد که اکثر سویه های جدا شده دارای فنوتیپ *vanB* بوده و تنها یک سویه دارای هر دو ژن *vanA* و*vanB* به طور همزمان بوده است. به نظر می رسد ایزوله هایی که هر دو ژن *vanA* و *vanB* را دارند، سویه های حد واسطی هستند که از ابتدا دارای یکی از ژن های مقاومت بوده و پلاسمید حاوی ژن دیگر را ازسایر سویه های دریافت کرده و به مرور زمان، پلاسمید اولیه خود را از دست داده اند (۲۲و۲۳). بررسی حضور هر دو پلاسمید MDa ۲۴ و MDa ۶۰ در سویه های حد واسط، که به ترتیب حاوی ژن های *vanA* و *vanB* هستند با روش ساترن بلات و پروب های اختصاصی ژن های *vanA* و *vanB* ، تأییدی براین ادعا است(۲۲). بنابراین این ایزوله ها در تغییر فنوتیپی- ژنوتیپی سویه ها و شیوع انتروکوک هایی با ژنوتیپ جدید در بیمارستان ها بسیار مؤثر هستند (۲۱و۲۲و۲۳).

مقاومت بالای بدست آمده در سویه های مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک های سیپرو فلوکساسین (٪۱۰۰)، اریترومایسین (٪۹۶/۸۷) و جنتامایسین (٪۷۸/۱۲) با نتایج حاصل از مطالعات قبلی بر روی نمونه های بالینی تا حدود زیادی مطابقت دارد. تنها افزایش قابل توجهی (در حدود ٪۴۰) در مقاومت به تتراساکلین در نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق، نسبت به گذشته در تهران مشاهده شده است (۱۲).

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این بررسی علاوه بر اینکه نشان می دهد در تمامی جدایه ها با فنوتیپ های *vanA* و *vanB* ژن های مورد پیش بینی وجود داشته و هماهنگی فنوتیپی و ژنوتیپی بین سویه ها موجود است. نکته مهمی را نشان می دهد و آن اینکه تعداد قابل توجهی از انتروکوک های جدا سازی شده در این مطالعه (۱۳ ایزوله)، سویه های حد واسطی هستند که حاوی هر دو ژن *vanA* و *vanB* بودند. با توجه به شیوع فنوتیپ *vanA* در سال های گذشته، به نظر می رسد که احتمالا تعدادی از سویه های انتروکوک توانسته اند دستجات ژنی *vanB* را از طریق کنژوگاسیون بدست

بیاورند و در حال تغییر ژنوتیپ خود از *van*A به *van*B می باشند. تأیید این یافته به مطالعه پیوسته سویه های انتروکوکی جدا شده از بیمارستان ها، در سال های آینده نیاز دارد. از آنجایی که گسترش یک ژن مقاومت جدید، می تواند دردسرآفرین بوده و روی سیاست درمانی آنتی بیوتیکی بیماران در سال های آتی تاثیر گذار باشد، توجه به الگوی مقاومتی و ژنتیکی انتروکوک ها اهمیت زیادی دارد و پژوهش های دیگری که درک و دانش ما را در مورد روش ها و قابلیت انتقال ژنتیکی این مقاومت ها را افزایش دهند مورد نیاز می باشند.

فهرست مراجع:

1. Donabedian, S., Ellie, H., Lee, A.T. and Chow, J.w. PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J.Bacteriol*. 2000; **50**(200):682-7.
2. Guardabassi, L.and Dalsgaard, A. Occurrence, structure, and mobility of Tn*1546*-like element in environmental isolates of vancomycin-resistant Enterococci. *Environ.Microbiol*. 2004; **70**(2) 984-90.
3. Biavasco F., Foglia G., Paoletti C., ZandriG., Magi G., Guaglianone E., et al. VanA-type Enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn*1546* typing and location, and virulence determinants. *Appl.Environ.Microbiol*. 2007; **73**(10):3307-19.
4. Oh JY, An S, Jin JS, Lee YC, Cho DT, Lee JC. . phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea. J.Microbiol. 2007; **45**(5):466-72.
5. Simjee, S., White, D.G., Dermott, P.F.M.C., Wagner, DF.D. and Zerros, M.J. Characterization of Tn*1546* in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated canine urinary tract infections: Evidence of gene exchange between human and animal Enterococci..*J.Clin.Microbiol*. 2003; **40**: 4659-65.
6. Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, Spicq C, Durrbach A, Nordmann P. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a vanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J.Clin.Microbiol* .2005; **43**(8):3642-9.
7. Michel, A., Richard, Q. Regulation of *van*A- and *van*B type glycopeptide resistance in enterococci. *ACC*. 2001; **45** (10):375-87.
8. Daniel, F.S., Jessica, A., Kissinger, M. and Gilmore, S. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *ACC*. 1989; **33**:1588-91.
9. Huh J.Y., Lee W.G., Lee K., Shin W.S., and Yoo J.H. Distribution of insertion sequences associated with Tn*1546*-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in korea.*J.Clin.Microbiol*.2004;**42**(5):1897-902.
10. Evers, S., Courvalin, P. Regulation of *van*B-type vancomycin resistance gene expression by the *van*S_B- *van*R_B two- component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J.Bacteriol*. 1996; **178**:1302-9.
11. Feizabadi MM., Aliahmadi A., Mobasheri F., Asgharzadeh A, Asadi S. and Etemadi G. Phenotypic characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000-2001.*Can J Microbiol*.2003;**49**(4):654-9.
12. Talebi M., Eshraghi SS., Pourshafie MR., Pourmand MR. and Eshraghian MR. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Iranian J Publ Health*.2007; **36**(4):20-5.
13. Manero A., Blanch A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl.Environ.Microbiol*.1999;**65**(10):4425-30.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne,Pa.
15. Mendez, A.S., Xiomara, P.Hernaadez. and C, M.F. Glycopeptide resistance in Enterococci. *Int. microbiol*. 2000 ; **3** :71-80.

16. Torres, C.V., Siodras, S.T., Gold, H.S. and Coakley, E.P.G. Restoration of vancomycin susceptibility in *Enterococcus faecalis* by antiresistance determinant gene transfer. *ACC*. 2001; **45**:973-5.
17. Miele A., Bandera M., and Goldstein B.P. Use of primers selective for vancomycin resistance genes in detection van genotype in enterococci and to study gene organization in *van*A isolates. *ACC*. 1995; **39**(8): 1772-8.
18. Dahl K.H., Simonsen G.S., Olsvik Q. Heterogeneity in the *van*B gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant Enterococci. *ACC*. 1999; **43**(5): 1105-10.
19. Cereda R.F., Sader H.S., Jones R.N., Sejas L., Machado A.M., Zanatta Y.P., et al. *Enterococcus faecalis* Resistant to Vancomycin and Teicoplanin (VanA Phenotype) Isolated from a Bone Marrow Transplanted Patient in Brazil. *Braz. j. infect. dis*.2001; **5**(1): 40-6
20. Jung W.K., Hong S.K., Lim S.K., Kwon N.H., Kim J.M., et al. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resistant Enterococci from hospitalized humans and from poultry in korea. *FEMS Microbiol lett*. 2006; **260**(2):193-200.
21. Kim W.J., Robert A. Weinstein, and Mary K. Hayden. The changing molecular epidemiology and established of endemicity of vancomycin resistance in Enterococci at one hospital over a 6-year period. *J. Infect. Dis*. 1999; **179**:163-71.
22. Woodford N., Chadwick P.R., Morrison D., and Cookson B.D. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their *van* genotype during outbreak. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**(11):2966-8.
23. Lee W, Kim M, Huh J, Kim Y, Hyun B. The conversion pattern of epidemiology among vancomycin resistant Enterococci: a transitional strain of *enterococcus faecium* containing both *van*A and *van*B genes. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agent Chemother*.2001; abstract no:C2-511.