Applied Biology, Volume 11, Issue 43, 2021

Research Article

Detection of *VanA, VanB, VanC* Genes in *Enterococcus* Species Isolated from Fecal sample of Patients in Qom province, Iran (Short Report)[1]

Ashkan Dirbazian MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. microbial_sci@yahoo.com

Samaneh Rouhi PhD. of Medical Bacteriology, Clinical Research Development Unite of Rouhani Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. roohi.samaneh@yahoo.com

Pegah Shakib Assistant Professor, Medical Bacteriology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran **(Corresponding Author).** shakib.pegah@yahoo.com

Abstract

Objectives: Intrinsic resistance of Enterococci to vancomycin and transmission to other gram-positive bacteria is a matter of concern. Therefore, the aim of this study was to identify vancomycin resistance genes in patients-isolated Enterococci.

Methods: A total of 100 fecal samples were collected from patients referred to health centers in Qom province in 2018. Microbiological tests were used to identify Enterococci. The pattern of antibiotic resistance was investigated by disk diffusion method. PCR was used to detect *van*A, *van*B, and *van*C genes in Enterococci.

Results: 60 Enterococci (60%) were isolated in this study. The highest antibiotic resistance was related to the ciprofloxacin (66.6%). The highest and lowest frequencies were for the *van*C (15%) and *van*A (5%) genes, respectively.

Conclusion: In the present study, resistance to vancomycin and other antibiotics, and the presence of *van* genes in resistant strains were observed. It is necessary to control and prevent the spread of enterococci in hospital and non-hospital settings.

Keywords: Vancomycin, Resistance Genes, Enterococcus, Fecal samples.

1. **How to Cite:** Dirbazian A, Rouhi S & Shakib P. Detection of *VanA, VanB, VanC* Genes in *Enterococcus* Species Isolated from Fecal sample of Patients in Qom province, Iran (Short Report). *Applied Biology*. 2021; 11(43): 53-62.

Received: 2021/04/10 ; **Revision:** 2021/06/10 ; **Accepted:** 2021/09/10

© the authors http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Publisher: Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۱، شماره ۴۳، ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی ژن‌های *VanC, VanB, VanA* در گونه‌های *انتروکوکوس* جدا شده از مدفوع بیماران در استان قم (گزارش کوتاه)[۱]

اشکان دیربازیان | کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. microbial_sci@yahoo.com
سمانه روحی | دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، واحد توسعه تحقیقات بیمارستان آیت‌الله روحانی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. roohi.samaneh@yahoo.com
پگاه شکیب | استادیار، باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران (**نویسنده مسئول**). shakib.pegah@yahoo.com

چکیده

هدف: مقاومت ذاتی *انتروکوکوس*‌ها به ونکومایسین و انتقال به سایر باکتری‌های گرم مثبت مسئله نگران‌کننده‌ای است. بنابراین، هدف مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌های مقاومت به ونکومایسین در *انتروکوکوس*‌های جدا شده از بیماران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۱۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی- درمانی استان قم در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شد. تست‌های میکروب‌شناسی جهت شناسایی *انتروکوکوس* بکار رفت. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک‌ها بررسی شد. همچنین از روش PCR جهت شناسایی ژن‌های *vanA*، *vanB* و *vanC* در *انتروکوکوس* استفاده شد.

نتایج: ۶۰ جدایه *انتروکوکوس* (۶۰ درصد) در این تحقیق جداسازی شد. بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با ۶۶/۶ درصد بود. بیشترین و کم‌ترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن *vanC* (۱۵ درصد) و *vanA* (۵ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر مقاومت به ونکومایسین و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، و وجود ژن‌های *van* در جدایه‌های مقاوم مشاهده شد. کنترل و جلوگیری از انتشار *انتروکوکوس*‌ها در محیط بیمارستانی و غیر بیمارستانی ضروری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ژن‌های مقاومت، ونکومایسین، انتروکوکوس، مدفوع بیماران، قم.

---

۱. **روش استناد به این پژوهش:** دیربازیان ا، روحی س، شکیب پ. بررسی ژن‌های *VanA, VanB, VanC* در گونه‌های *انتروکوکوس* جدا شده از مدفوع بیماران در استان قم (گزارش کوتاه). *بیولوژی کاربردی*. ۱۴۰۰؛ ۱۱(۴۳): ۵۳-۶۲.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱ ؛ **تاریخ اصلاح:** ۱۴۰۰/۰۳/۲۰ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۶/۱۹

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۱. مقدمه

مقاومت ذاتی در *انتروکوکوس‌وکوس‌ها* نسبت به ونکومایسین[1] باعث بروز عفونت‌های خطرناک بالینی و خطر مرگ بیمار می‌شود. ونکومایسین به طور گسترده جهت درمان عفونت با میکروارگانیسم‌های گرم مثبت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به کار می‌رود، و از طرفی ژن مقاومت به راحتی از *انتروکوکوس وکوس*‌ها به سایر باکتری‌های گرم مثبت قابل انتقال می‌باشد (۱). وجود ۶ خوشه ژنی *van* مختلف به نام‌های *van* A-G در *انتروکوکوس*‌ها علت مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی، از جمله ونکومایسین می‌باشد (۲). رایج‌ترین فنوتیپ مقاومت *انتروکوکوس*‌ها به ونکومایسین به دلیل خوشه‌های ژنی *vanA* و*vanB* و در مراحل بعدی *vanC* است (۵-۳). خان محمدی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که در ۵۲% از جدایه‌های مدفوعی *انتروکوکوس (*یک جدایه دارای ژن *vanA*) و ۳۲% از جدایه‌های بالینی *انتروکوکوس (*ده جدایه دارای ژن *vanA*) مقاومت به ونکومایسین مشاهده شد (۵). صمدی کفیل و اصغرزاده نیز در تحقیقی دیگر نشان دادند که از بین ۱۸۶ جدایه *انتروکوکوس*، ۲۰ جدایه واجد *van* A و ۴ سویه واجد *van* B بودند (۶). با مقاومت روزافزون به ونکومایسین و ابتلاء به مرگ و میر بالای ناشی از آن، کنترل *انتروکوکوس* مشکل‌تر شده و تعیین اپیدمیولوژی و عوامل خطرساز موثر در گسترس آن حیاتی به نظر می‌رسد. تعیین فراوانی فنوتیپ مولکولی مقاومت *انتروکوکوس* نیز اهمیت فراوانی دارد، چرا که تعیین این میزان فراوانی در هر بیمارستان، باعث درک اهمیت برنامه‌های غربالگری یا ارزیابی روزمره و پیشگیری و درمان به موقع بیماران می‌شود که به نوبه خود باعث کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی می‌گردد (۸، ۷). روش‌های پیشرفته مولکولی مبتنی بر PCR[2] به محققان این توانایی را داده است تا ژن مولد این مقاومت دارویی را با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی شناسایی کنند (۸). هدف پژوهش حاضر، بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت به ونکومایسین در جدایه‌های *انتروکوکوس* جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی- بهداشتی استان قم می‌باشد.

۲. مواد و روش کار

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، ۱۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز

1. VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci
2. PCR: Polymerase chain reaction

بهداشتی- درمانی استان قم در دی و بهمن سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. به منظور جداسازی باکتری‌های *انتروکوکوس*، نمونه‌ها بلافاصله پس از مخلوط شدن کامل نمونه بوسیله سواپ استریل به محیط کشت اختصاصی M-Entrococcus agar (Quelab، کانادا) حاوی ۶ میکروگرم/ میلی لیتر ونکومایسین منتقل شدند و سپس انکوباسیون برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (۹). بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری به صورت کلنی‌های ریز و صورتی رنگ مشاهده شد. برای تأیید تشخیص جنس جدایه‌های *انتروکوکوس* از آزمون کاتالاز (Padtanteb، ایران)، Pyrrolidonyl arylamidase (PYR) (Padtanteb، ایران)، کشت در محیطBile esculin agar (Merck، آلمان)، تست مقاومت به اپتوچین (Padtanteb، ایران)، رشد در محیط کشت محتوی ۶/۵ درصد نمک استفاده گردید (۱۰ و۸). تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک Kirby-Bauer در برابر دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (تهیه شده از شرکت Mast انگلستان) زیر مطابق با دستورالعمل Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام شد: سیپروفلوکساسین (۵µg)، آمپی سیلین (۱۰µg)، ونکومایسین (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، نئومایسین (۳۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg) و جنتامیسین (۱۲۰µg). جدایه *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 به عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (۵).

به منظور استخراج DNA سویه‌های *انتروکوکوس*، از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده گردید.

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های *vanA*، *vanB* و*vanC* (جدول ۱) با برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون آغازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای یک سیکل، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (سنتز شده توسط شرکت سیناکلون) در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد، مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل انجام شد. در نهایت، تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داك بررسی شد. جدایه‌های *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *انتروکوکوس فکالیس* V583 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)

به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شدند. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 با تست مربع کای با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ آنالیز شدند.

۳. یافته‌ها

در مجموع از بین ۱۰۰ نمونه مدفوع کشت داده شده، ۶۰ جدایه *انتروکوکوس* (۶۰ درصد) جداسازی شد. بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با ٦٦/٦ درصد و کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به نئومایسین با ٢١/٦ درصد بود (شکل ۱). از بین ۶۰ باکتری *انتروکوکوس* جدا شده، ۳ جدایه (۵ درصد) واجد ژن *vanA* (شکل ۲)، ۶ نمونه واجد (۱۰ درصد) *vanB* (تصویر شماره ۲)، ۹ نمونه (۱۵ درصد) واجد ژن *vanC* (شکل ۳)، ۲ (۳/۳۳ درصد) نمونه واجد دو ژن *vanA* و *vanB* و ۱ نمونه (۱/۶۶ درصد) واجد هر سه ژن بود (شکل ۴؛ جدول ۲).

٤. بحث

*انتروکوکوس*ها باکتری‌های فرصت‌طلبی می‌باشند که می‌توانند با کلونیزه شدن، موجب ایجاد بیماری‌های عفونی و مرگ و میر در بیماران بستری شوند. این باکتری دومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی و سومین عامل باکترمی بیمارستانی در آمریکا می‌باشد (۲۱، ۱۱).

در این مطالعه ۶۰ درصد از نمونه‌های مدفوع بیماران، آلوده به *انتروکوکوس* بودند. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *انتروکوکوس* جدا شده نشان داد که بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این بررسی به ترتیب مربوط به سیپروفلوکساسین (۶۶/۶ درصد)، تتراسایکلین (۶۳/۳ درصد)، آمپی سیلین (۳۸/۳ درصد)، ونکومایسین (۲۳/۳ درصد)، کلرامفنیکلول (۳۶/۶ درصد)، نئومایسین (۲۱/۶ درصد)، جنتامایسین (۲۸/۳ درصد) و آمیکاسین و توبرامایسین (هر کدام ۲۵ درصد) بود.

اربابی و همکاران در پژوهشی گزارش دادند که از بین ۱۲۰ جدایه *انتروکوکوس* جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی بیماران، ٤٥، ٨٨، ١٠٣، ٤٢، ٨٣، ٧٣، ٥٤ و ٩٥ جدایه به ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، تتراسیکلین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، پنیسیلین، آمپی سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۸).

در تحقیقی دیگر، مقیم بیگی و همکاران گزارش دادند که مقاومت حد واسط و حساسیت به ونکومایسین در جدایه‌های مورد مطالعه به ترتیب ۱۴ و ۷۴ درصد می‌باشد. همچنین الگوی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سرپایی (۱۶ درصد) بیشتر از بستری (۱ درصد) بود (۱۳). در این میان ۱۴ درصد از جدایه‌ها دارای ژن مقاومت *van*A و ۲۰ درصد دارای ژن *van*B بودند. نتایج مطالعات مشابه در ایران همانند مطالعه حاضر نشان‌دهنده میزان بالای مقاومت در *انتروکوکوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود. تغییرات ژنتیکی در بین جدایه‌ها و دریافت ژن‌های مقاومت از سایر گونه‌های مشابه، تفاوت در میزان ایمنی و فلور نرمال بیماران، تغییر در تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک در مناطق مختلف، علت تغییرات در فراوانی و میزان مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده است (۱۴). در تحقیق حاضر ۵ درصد از جدایه‌های *انتروکوکوس* حامل ژن *vanA*، ۱۰ درصد *vanB* و ۱۵ درصد *vanC* بودند. همچنین در این بررسی ۳/۳۳ درصد از جدایه‌ها دارای دو ژن *vanA* و *vanB* و ۱/۶۶ درصد (یک سویه) دارای هر سه ژن *vanA*، *vanB* و*vanC* به طور همزمان بودند.

رضوانی و همکاران در مطالعه‌ای مقاومت به ونکومایسین در ۶ درصد از جدایه های *انتروکوکوس* و مقاومت به کلرامفنیکول را در ۲۱ درصد از نمونه‌ها گزارش کردند. همچنین در این بررسی ۹۵ الی۱۰۰ درصد از نمونه‌ها مقاومت دارویی چندگانه داشتند (۱۴).

در این بررسی تمام جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین، دارای ژن‌های *van*A و *van*B بودند. در تحقیقی که Melese و همکاران انجام دادند، فراوانی جدایه‌های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین، ۱۴/۸ درصد گزارش شد. بیشترین میزان مقاومت نسبت به دئوکسی سیکلین (۵۵/۱ درصد) و تتراسایکیلین (۵۳/۷ درصد) بود. کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به داپتومایسین و لاینوزولید (هر کدام ۲/۳ درصد) بود (۱۵).

گودرزی و همکاران، از ۶۹۰ جدایه انتروکوک جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف از جمله خون، ادرار، مدفوع، زخم و تراشه، در بیمارستان‌های شهر بروجرد در سال ۹۳-۹۴ فراوانی ژن‌های *van*A و *van*B را به ترتیب ۷۲% و ۲۲% گزارش کردند (۱۶).

اختلاف نتایج این مطالعه با سایر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در نوع نمونه‌های مورد بررسی باشد، زیرا در مطالعه حاضر، نمونه مدفوع جدا شده از بیماران مورد بررسی قرار گرفت، اما در سایر مطالعات، نمونه‌های مختلف بالینی مانند ادرار، خون، زخم، مدفوع و... مورد ارزیابی قرار گرفته است. علاوه بر مورد فوق، الگوی مصرف آنتی‌بیوتیکی، مناطق جغرافیایی مورد ارزیابی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز می‌تواند در میزان مقاومت دارویی و فراوانی ژن‌ها موثر باشد.

Flipse و همکاران در پژوهشی گزارش دادند که ۲۷/۸ درصد از نمونه‌های بیماران، حامل ژن

*van*D بودند (۱۷). نتایج مطالعات بررسی شده در ایران و سایر کشورها تقریبا مشابه با مطالعه حاضر می‌باشد. گونه‌های *انتروکوکوس* به عنوان یک مخزن، جهت انتقال ژن‌های مقاومت به حساب می‌آیند، زیرا این جنس از باکتری‌ها به صورت ذاتی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم و حامل ژن‌های مقاومت، بخصوص ژن‌های مقاومت به ونکومایسین می‌باشد.

بنابر نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، پزشکان در تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها می‌بایست محتاط‌تر عمل کرده و از تجویز غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها پیشگیری نمایند. از طرفی انتروک‌ها در محیط‌های خارج بیمارستانی و در طبیعت و در حیوانات به فراوانی یافت می‌شوند، بنابراین، رعایت نکات بهداشتی بخصوص برای افرادی که در محیط‌های طبیعی، با حیوانات و مزارع در ارتباط می‌باشند، توصیه می‌شود. در مطالعه حاضر مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های بکار گرفته شده و بخصوص ونکومایسین مشاهده شد.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر که وجود ژن‌های *van* و مقاومت به ونکومایسین در جدایه‌های انتروکوکوس جدا شده از نمونه مدفوع بیماران در استان قم گزارش شد، این امر می‌تواند منجر به محدود کردن گزینه‌های درمانی و احتمال انتقال ژن‌های مقاومت به سایر باکتری‌ها باشد و این موضوع برای سیستم درمانی نگران‌کننده است.

٦. تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که در انجام پژوهش حاضر همکاری داشتند، تشکر می‌گردد (کد: ۵/۴۶۲۱۴۵).

References

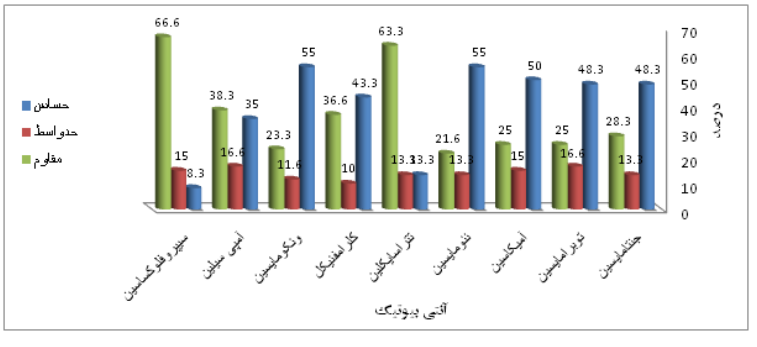
1. Farivar TN, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Hashemi HJ & Mirzaui B. Development and evaluation of a quadruplex taq man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and their *van*A and *van*B genotypes. *Iran. J. Microbiol*. 2014; 6(5): 335-40.
2. Al-Ahdal M, Abozaid S, Al-Shammary H, Bohol M, Al-Thawadi S, Al-Jaberi A, Senok AC, Shibl AM & Al-Qahtani AA. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of *van*B phenotype–*van*A genotype incongruence in the Middle East. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(11): 3223-9.
3. Sood S, Malhotra M, Das B & Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian. J. Med. Res.* 2008; 128(2): 111-21.
4. Ramirez MS & Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug. Resist. Update*. 2010; 13(6): 151-71.
5. Khanmohammadi Sh, Nahaei MR, Ahangarzadeh Rezaee M & Sadeghi J. Frequency of vancomycin resistance and *van*A gene in Enterococci isolated from Tabriz Children's teaching and treatment center. *Med. J. Tabriz. Univ. Med. Sci. Health. Serv*. 2018; 40(4): 16-23.
6. Samadi Kafil H & Asgharzadeh M. Vancomycin-resistant *Enteroccus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from education hospital of Iran. *Maedica. J. Clin. Med.* 2014; 9(4): 323-327.
7. Hosseini M, Asghar A, Khoramrooz S, Marashifard M, Parhizgari N & Mansouri F. Frequency of the genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized burn patients. *J. Mazandaran. Univ. Med. Sci*. 2016; 25(134): 147-57.
8. Arbabi L, Boustanshenas M, Adabi M, Fathizadeh S, Rasouli koohi S, Afshar M, Rahbar M, Majidpour A, Talebi M & Talebi Taher M. Isolation and antibiotic susceptibility pattern among vancomycin resistant Enterococci isolated from clinical samples of different parts of Rasoul-E-Akram hospital. *J. Ardabil. Univ. Med. Sci*. 2016; 15(4): 404-413.
9. Talebi M & et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2007; 185(1): 111-9.
10. Murray PK, Rosenthal KS & Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8th[ed]. Tehran: Andisheherafi; 2016: 251-2.
11. Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N & Ichiyama S. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2012; 31(6): 1095-100.
12. Soltani Arabshahi K, Foroohesh Tehrani H & Mahmood Arabi SM. Vancomycin-resistant Enterococci in hospitalized patients. *R. J. M. S*. 2000; 6(4): 302-9.
13. Moghimbeigi A & et al. Prevalence of vancomycin resistance among isolates of Enterococci in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Adolesc. Health. Med. Ther*. 2018; 9: 177-88.

14. Rezvani J, Nasr R, Shamsabadi FT & Akbari Eidgahi MR. Frequency of *van*A, *van*b and *van*H variants amongst vancomycin-resistant Enterococci isolated from patients in a University hospital in the central region of Iran. Gastroenterol. Hepatol. *Bed. Bench*. 2016; 9(4): 308-15.
15. Melese A, Genet C & Andualem T. Prevalence of Vancomycin resistant Enterococci (VRE) in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC. Infect. Dis.* 2020; 20(1): 124.
16. Goudarzi M, Mohabati Mobarez A, Najar-Peerayeh S & Mirzaei M. Prevalence of Multidrug Resistance in Enterococcus faecium Isolated from Patients and Environment of Hospitals in Lorestan Province,(Iran). *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2018; 12(5): 71-8.
17. Flipe J & et al. Appearance of *van*D-positive Enterococcus faecium in a tertiary hospital in the Netherlands: prevalence of *van*C and *van*D in hospitalized patients. *Scientific. Repo. Rts*. 2019; 9: 6949.

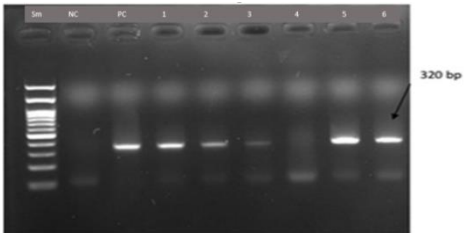
پیوست

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

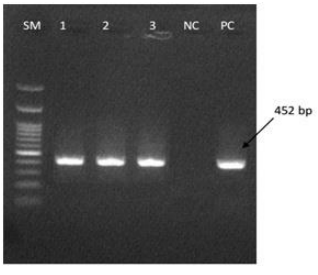
نام ژن	توالی پرایمر	محصول PCR (bp)
vanA	F: 5'-TGGCAGCTACGTTTACCTATCCT-3' R: 3'-TGCTGAAAGGTCTGCGGG-5'	۳۲۰
vanB	F: 5'-AATGCGGGGAGGATGGTG-3' R: 3'-TTTTTCCGGCTCGTTTTCC-5'	۴۵۲
vanC	F: 5'-TGATGTCCTCTTTCCAGTCTTGC-3' R: 3'-CGTTTGTCCTCCTCTGCCAG-5'	۷۶۵



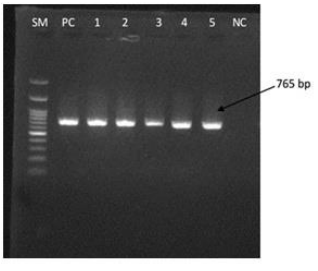
شکل ۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های *انتروکوکوس* جدا شده



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *van*A، Sm: سایز مارکر (Ladder 1kb)،NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، ستون‌های ۳-۱، ۵ و ٦: جدایه‌های *انتروکوکوس* واجد ژن *van*A، ستون ٤: جدایه *انتروکوکوس* فاقد ژن *van*A



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن vanB، Sm: سایز مارکر (Ladder 1kb)،NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، ستون های ۳-۱: جدایه های انتروکوکوس واجد ژن vanB



شکل٤- الکتروفورز محصول PCR ژن vanC، Sm: سایز مارکر (Ladder 1kb)،NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، ستون‌های ٥-١: جدایه‌های انتروکوکوس واجد ژن vanC

جدول ۲*- فراوانی ژن‌های *van*A، *van*B و *van*C در جدایه‌های *انتروکوکوس

ژن‌های مورد بررسی	تعداد (فراوانی)
ژن *vanA*	۳ (۵ درصد)
ژن *vanB*	۶ (۱۰ درصد)
ژن *vanC*	۹ (۱۵ درصد)
ژن *vanA* و *vanB*	۲ (۳/۳۳ درصد)
ژن‌های *vanA*، *vanB* و *vanC*	۱ (۱/۶۶ درصد)