Informatics in Biology, Health, and Food

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 2, Number 1, Jun. 2025 DOI: 10.22034/ibhf.2025.501631.1018

Original Article

Prevalence of *vanA* and *vanB* Genes in Vancomycin Resistant Gram-positive Bacteria from ESKAPE Group Isolated from Hospitalized Patients

Bibi Rachelle Hosseini [1,2], Zohreh Sedaghat Kermanshahi [1], Nazanin Ataee *[1], Maria Beihaghi [1], Maryam Afzali [3].

[1] Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran.
[2] Razavi Hospital, Mashhad, Iran.
[3] Department of Laboratory Sciences, MMS.C.,Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: 2025/01/23 **Accepted:** 2025/04/24 **Online Published:** 2025/04/26

Abstract

ESKAPE group, comprises six bacterial pathogens: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecium*, which are major contributors to nosocomial infections due to their opportunistic nature and high levels of antibiotic resistance. this study aimed to assess the prevalence of vancomycin resistance and detect the presence of *vanA* and *vanB* genes in *S. aureus* and *Enterococcus* isolates collected from hospitalized patients in Mashhad. In this study, *S. aureus* and *Enterococcus* isolates were collected from clinical samples of patients during 6 months. All gram-positive isolates of ESKAPE group were identified by standard microbiology and biochemical tests. The sensitivity of the isolates to vancomycin antibiotic was evaluated by disk diffusion and E.test methods. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify *vanA* and *vanB* vancomycin resistance genes. The results showed that among 98 Gram-positive ESKAPE group isolates, 21 were *Enterococcus* species, of which three were resistant to vancomycin. Among these, one isolate carried only the *vanA* gene, and two isolates carried both *vanA* and *vanB* genes. Among 77 *S. aureus* isolates, 8 were resistant to vancomycin; 3 carried the *vanA* gene, and 1 carried both *vanA* and *vanB* genes. Based on the results, *vanA* and *vanB* genes play an important role in multidrug resistance among *S. aureus* and *Enterococcus* isolates. Identifying this type of genes, determining the pattern of antibiotic resistance, and also studying their distribution rate is important to determine the epidemiology and control of infections caused by these bacteria.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, ESKAPE, vancomycin, *vanA* and *vanB*, genes.

Cite this article: Hosseini BR, Sedaghat Kermanshahi Z, Ataee N, Beihaghi M, Afzali M. Prevalence of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant Gram-positive bacteria from ESKAPE group isolated from hospitalized patients. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):34-45.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education
Corresponding author: Nazanin Ataee **Email**: ataee1357@yahoo.com

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا
کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره ۲. شماره ۱. خرداد ۱۴۰۴ DOI: 10.22034/ibhf.2025.501631.1018

مقاله پژوهشی

بررسی میزان شیوع ژن‌های *vanA* و *vanB* مقاوم به ونکومایسین در باکتری‌های گرم مثبت گروه ESKAPE جداسازی شده از بیماران بستری

بی بی راحله حسینی[۲،۱]، زهره صداقت کرمانشاهی[۱]، نازنین عطایی[۱]*، ماریا بیهقی[۱]، مریم افضلی[۳]

[۱] گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی کاویان، مشهد ،ایران.
[۲] گروه میکروبیولوژی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۳] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۴ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۲/۴ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۲/۶

چکیده

گروه باکتریایی که شامل جنس‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اسینتوباکتر*، *سودموناس ائروجینوزا* و *انتروکوکوس*، با اختصار *ESKAPE*، به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب نقش مهمی در بروز عفونت‌های بیمارستانی دارند. هدف این تحقیق تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و شناسایی ژن‌های مقاوم به ونکومایسین در دو پاتوژن گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* جدا شده از بیماران بستری بیمارستان‌های شهر مشهد می باشد. در این پژوهش طی شش ماه جدایه‌های مورد نظر از نمونه های بالینی بیماران چهار بیمارستان در مشهد (امام رضا، قائم، رضوی واکبر) جداسازی شدند. حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین با روش‌های دیسک دیفیوژن برای *انتروکوکوس*ها و *E-test* برای *استافیلوکوکوس*ها بررسی شد. از واکنش زنجیره ای پلیمراز برای بررسی ژن‌های مقاوم به ونکومایسین، *vanA* و *vanB* استفاده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد، میان ۹۸ جدایه جمع‌آوری شده از مراکز درمانی،۲۱ جدایه *انتروکوکوس* شناسایی شد که ۱۵ جدایه آن متعلق به *انتروکوکوس فسیوم*،۶ جدایه آن متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* بود و۷۷ جدایه متعلق به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. همچنین از ۲۱ جدایه *انتروکوکوس*، سه جدایه دارای مقاومت به ونکومایسین بودند که یکی از جدایه‌ها دارای ژن *vanA* و دو جدایه دارای هر دو ژن بود. از ۷۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ، هشت جدایه دارای مقاومت به ونکومایسین بودند که سه جدایه دارای ژن *vanA* و یک جدایه دارای هر دو ژن بود. بر اساس نتایج به دست آمده، ژن‌های *vanA* و *vanB* نقش مهمی در مقاومت چند دارویی در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* دارند.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس*، ESKAPE، ونکومایسین، ژن *vanA* و*vanB* .

Cite this article: Hosseini BR, Sedaghat Kermanshahi Z, Ataee N, Beihaghi M, Afzali M. Prevalence of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant Gram-positive bacteria from ESKAPE group isolated from hospitalized patients. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1): 34-45.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education
Corresponding author: Nazanin Ataee **Email**: ataee1357@yahoo.com

مقدمه

باکتری‌های بیماری‌زای گروه ESKAPE، شامل *اشرشیاکلی*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[2]، *کلبسیلا پنومونیه*[3]، *اسینتوباکتر بومانی*[4]، *سودموناس ائروجینوزا*[5] وجنس *انتروکوکوس*[6] می‌باشند. همه باکتری‌های این گروه به جز *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس*، گرم منفی هستند. پاتوژن‌های گروه ESKAPE، بعنوان عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و به دلیل افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول مانند پنی‌سیلین، ونکومایسین و کارباپنم از سایر عوامل بیماری‌زا متمایز می‌شوند (۱).

عفونت بیمارستانی به عفونت‌هایی گفته میشوند که از ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از پذیرش بیمار در بیمارستان ویا طی دوره های مشخص ۱۰تا ۳۰ روز ظاهر می‌شوند. این عفونت‌ها در زمان پذیرش در بیمار وجود ندارند. عفونت‌های بیمارستانی سبب صرف هزینه‌های بالا، افزایش طول مدت بستری و مرگ بیماران می‌شوند (۲) .

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های گرم مثبت گروه ESKAPE که قادر به کلونیزاسیون روی پوست و غشای مخاطی می‌باشد. همه انسان‌ها در طول زندگی خود عفونت این پاتوژن را از یک مسمومیت غذایی تا عفونت تهدید کننده زندگی تجربه کردند. این میکروارگانیسم عامل عفونت بیمارستانی، عمدتا عفونت زخم بعد از جراحی را ایجاد می کند و در بخش مراقبت‌های ویژه شیوع بالایی دارد. این باکتری عامل بسیاری از بیماری‌ها از قبیل عفونت‌های پوستی، سپتی سمی، اندوکاردیت، زخم و پنومونی است (۳).

انتروکوکوس یکی دیگر از باکتری‌های گرم مثبت گروه ESKAPE می‌باشد که موجب ایجاد عفونت‌هایی شامل عفونت‌های مجاری ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت می‌گردد. *انتروکوکوس*‌ها در نوزادان مننژیت و در بزرگسالان اندوکاردیت ایجاد میکنند. *انتروکوکوس* دومین عامل عفونت ادراری است. این باکتری‌ها به طور عموم توسط دست‌های پرسنل بیمارستان و از طریق وسایل پزشکی منتقل می‌شوند (۴). از سال ۱۹۹۰ میلادی روش‌های مولکولی به خصوص PCR و روش‌های فنوتیپی برای شناسایی آن‌ها استفاده می‌شود (۵).

در سال‌های اخیر، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک، باعث شده تا مقاومت میکروبی به سرعت و به شدت افزایش یابد و به یک موضوع مهم بهداشت عمومی تبدیل شود (۶). بنابراین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش مهمی در انتخاب بهترین آنتی‌بیوتیک برای درمان را ایفا می‌کند. ایجاد گونه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارند، این وضعیت را دشوارتر کرده‌اند. امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی چالش مهمی در درمان بیماری‌های بیمارستانی به شمار می‌رود (۷،۸).

در دهه ۱۹۵۰، ونکومایسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مفید جهت درمان عفونت‌های حاصل از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین معرفی شد. پس از گذشت سه دهه از مصرف ونکومایسین، *استافیلوکوکوس* کوآگولاز منفی مقاوم به آن گزارش شده است (۹). آنتی‌بیوتیک ونکومایسین گلیکوپتیدی است که ساخت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را دچار اختلال می‌کند در نتیجه به طور قابل توجهی اتصال ونکومایسین را کاهش می‌دهد. در سال ۱۹۹۸ در آلمان باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین همچنین مقاوم به ونکومایسین گزارش شده است (۴). برای درمان *استافیلوکوکوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)[7]، از آنتی‌بیوتیک ونکومایسین استفاده می‌شود. در دهه ۱۹۸۰ میلادی، ونکومایسین برای درمان عفونت‌های MRSA در بسیاری از موسسات بهداشتی استفاده شد. ناگهان ظهور جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با کاهش حساسیت به ونکومایسین و سایر گلیکوپپتیدها پدیدار شدند (۱۰). متاسفانه به دلیل مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک، سویه‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ونکومایسین هم مقاومت نشان دادند (VRSA)[8]. جدایه‌های با مقاومت میانه به ونکومایسین را VISA[9] می‌گویند. وجود ژن *vanA* به باکتری این امکان را می‌دهد که پپتیدوگلیکان را تغییر دهد و مانع از اتصال آنتی‌بیوتیک ونکومایسین شود. مکانیسم مقاومت به ونکومایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* بین سویه‌های VISA و VRSA متفاوت است. در VISA، مقاومت از طریق تغییرات تطبیقی دیواره سلولی، به ویژه ضخیم شدن لایه پپتیدوگلیکان ایجاد می‌شود، که مولکول‌های ونکومایسین را به دام می‌اندازد و مانع از رسیدن مؤثر آنها به هدفشان می‌شود. انتهای D-Ala-D-Ala پیش سازهای دیواره سلولی جایگاه هدف ونکومایسین می‌باشد.

[1] *Escherichia coli*
[2] *Staphylococcus aureus*
[3] *Klebsiella pneumoniae*
[4] *Acinetobacter baumannii*
[5] *Pseudomonas aeruginosa*
[6] *Enterococcus spp*

[7] *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
[8] Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*
[9] Vancomycin intermediate *staphylococcus aureus*
[3] Clinical & Laboratory Standards Institute

این شامل اکتساب ژن نیست، بلکه ناشی از جهش‌ها و تغییرات تنظیمی در ژنوم باکتری است. در مقابل، VRSA مقاومت در سطح بالا را به دلیل دستیابی به خوشه ژنی *vanA* از گونه *انتروکوک* از طریق انتقال افقی ژن نشان می‌دهد. ژن *vanA* منجر به جایگزینی D-Ala-D-Ala با D-Ala-D-Lac در پیش‌سازهای پپتیدوگلیکان می‌شود که میل ترکیبی ونکومایسین را تا حدود ۱۰۰۰ برابر کاهش می‌دهد و آنتی‌بیوتیک را بی اثر می‌کند (۱۰-۱۲).

ژن‌های مقاوم به ونکومایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* *vanA*، *vanB*، *van C1*، *van C2* و*van C3* است. مهمترین ژن‌ها *vanA* و *vanB* است. ژن *vanC* کروموزومی است. ژن‌های مقاومت در *استافیلوکوکوس* *vanA* برروی ترانسپوزون‌های *Tn1546* و *vanB* روی ترانسپوزون *Tn1547* ، روی کروموزوم قرار گرفته‌اند (۱۱).

انتروکوکوس‌ها در محیط بیمارستان، به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت، مقاومت ذاتی دارند. *انتروکوکوس*‌های مقاوم دارای ژن *vanA* اغلب *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* هستند. با وجود شباهت ژنتیکی بین دو ژن *vanA* و *vanB* الگوی مقاومت متفاوتی نسبت به گلیکو پپتیدها دارند (۱۱). *انتروکوکوس*‌ها ژن مقاومت به ونکومایسین را به باکتری‌های بیماریزای دیگر مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین منتقل می‌کنند. در واقع ژنوتیپ *vanA* و *vanB*، توانایی این انتقال را در محیط آزمایشگاهی دارند (۱۳). شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و بررسی اپیدمیولوژی این مقاوت‌ها می‌تواند نقش مؤثری در درمان داشته باشد از این‌رو، این پژوهش با هدف شناسایی ژن‌های مقاوم به ونکومایسین در باکتری‌های گِرم مثبت گروه ESKAPE جدا شده از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های امام رضا (ع)، قائم ، رضوی و اکبر در مشهد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

در این مطالعه، طی شش ماه در بازه زمانی مهر ۱۴۰۱ تا اسفند ۱۴۰۱، جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* از نمونه‌های بالینی مختلف، شامل تراشه، ترشحات گلو، زخم، خون، ادرار و مدفوع از چهار بیمارستان امام رضا، قائم، اکبر و رضوی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت، تست کاتالاز، کواگولاز، مانیتول سالت آگار، بایل اسکولین و تخمیر قند آرابینوز *استافیلوکوکوس اورئوس* و گونه‌های *انتروکوکوس* تشخیص داده شد.

بررسی فنوتیپی مقاومت جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین

طبق دستورالعمل مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی CLSI[3]، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *انتروکوکوس* به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک آنتی بیوتیکی ونکومایسین (۳۰ µg) شرکت پادتن طب ایران و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش E-Test و با استفاده از نوار E.test شرکت ایتالیا Liofilchem در محیط مولر هینتون آگار انجام شد. در این روش از سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک فارلند استفاده شد. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه گردید. هاله عدم رشد بررسی شد و تفسیر نتایج با استفاده از راهنمای CLSI انجام شد. همچنین، برای کنترل کیفی نوار آنتی‌بیوتیک ونکومایسین از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 و به جهت کنترل کیفی دیسک ونکومایسین از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 استفاده شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1]

پس از جداسازی جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین، استخراج DNA با استفاده از پروتکل کیت شرکت Roche آلمان انجام شد. اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده، با استفاده از دستگاه نانودراپ و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰و۲۸۰ نانومتر، اندازه‌گیری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *vanA* و *vanB*، ساخت شرکت بایونیر کشور کره جنوبی انجام شد. برای ژن *vanA* پرایمرهای F-5′ AATACTGTTTGGGGGTTGCTC-3′ و R-5′ CTTTTTCCGGCTCGACTTCCT-3′ و برای ژن *vanB* پرایمرهای F-5′GCGGGGAGGATG GTGCGA-3′ و R-5′ GGAAGATACCGTGGCTCAAAC-3′ استفاده گردید. در این مطالعه از سویه‌های استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 51299 و ATCC 700802 / V583 به عنوان

[1]Polymerase chain reaction

کنترل مثبت برای تأیید ژن‌های *vanA* و *vanB* و از آب مقطر برای کنترل منفی استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۸میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۲ میکرولیتر تگ پلی‌مراز، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs، پرایمرهای فوروارد و ریورس هر کدام به غلظت ۱ میکرولیتر، ۵ میکرولیترDNA الگو و ۱۴/۱ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه استفاده شد. برنامه ترموسایکلر برای واکنش PCR به صورت دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۳۰چرخه به ترتیب دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای انیلینگ پرایمرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد.

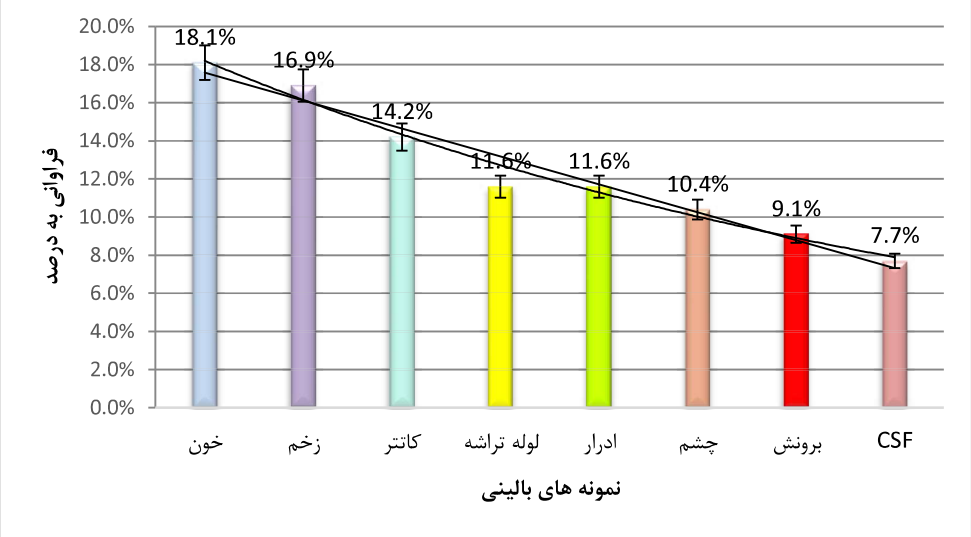
ارزیابی محصولات PCR بر اساس طول قطعه بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز شرکت پایا پژوهش، ایران انجام شد. جهت مقایسه اندازه قطعات PCR از Ladder (100 bp) وبه جهت رنگ‌آمیزی از رنگ گرین ویور شرکت سیناژن استفاده شد. منبع تغذیه‌ای الکتروفورز روی ولتاژ ۹۰ به مدت ۵۰ دقیقه تنظیم گردید. نتایج محصولات PCR با دستگاه ژل داک Protein Simple, USA مشاهده و ژن‌های مرتبط براساس وجود یا عدم وجود باند با وزن مشخص برای هر ژن در عکس ژل ثبت شد.

نتایج

بررسی نمونه‌ها

نتایج مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده، مانند میزان فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از قسمت‌های مختلف بدن بیماران و درصد فراوانی نمونه‌های براساس بخش‌های بستری و جنسیت تعیین گردید. از میان ۱۰۰۷ نمونه جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی مختلف شامل تراشه، ترشحات گلو، زخم، خون، ادرار و مدفوع بیماران از بیمارستان‌های مورد نظر ، ۹۸ جدایه مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* بودند. ۲۱/۴ درصد معادل ۲۱ جدایه مربوط به جدایه *انتروکوکوس* بودکه ۷۱/۴ درصد این جدایه ها متعلق به *انتروکوکوس فسیوم* و ۲۸/۵ درصد متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* بود. همچنین ۷۸/۶ درصد معادل ۷۷ جدایه‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* تعلق داشت.

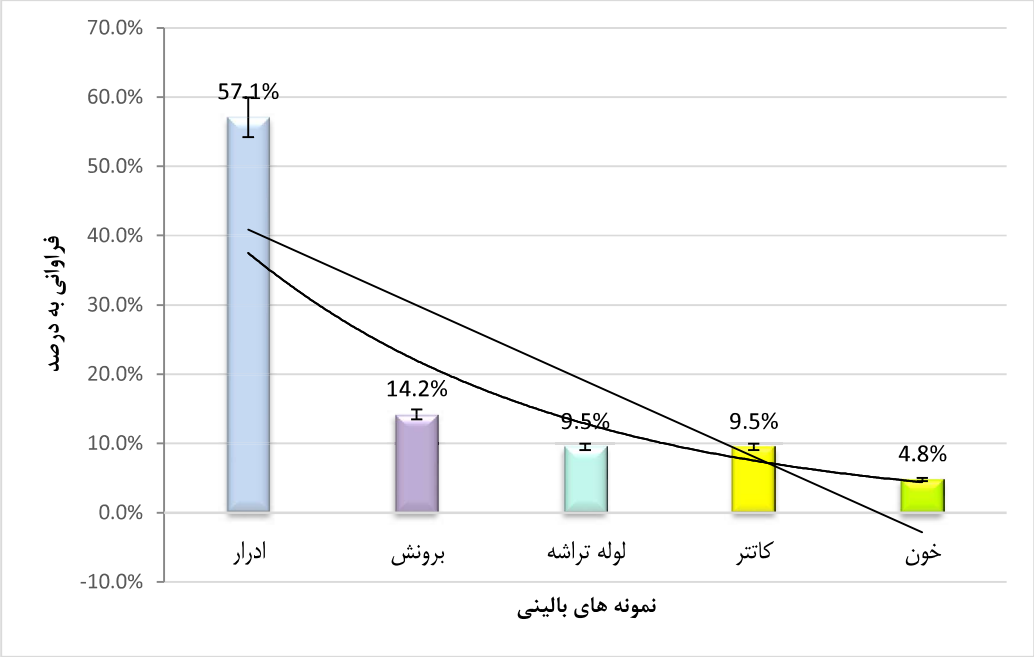
از ۷۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی، بیشترین تعداد نمونه بالینی مربوط به نمونه‌های خون، زخم و کاتتر به ترتیب ۱۸/۱، ۱۶/۹ و ۱۴/۲ درصد بودند. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بالینی مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بالینی مختلف.

Figure1. Relative frequency distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in different clinical samples.

از مجموع ۲۱ جدایه *انتروکوکوس* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی، بیشترین تعداد نمونه بالینی مربوط به نمونه ادرار با ۵۷/۱ درصد جدایه بود. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *انتروکوکوس* در نمونه‌های بالینی مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل۲. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های بالینی مختلف.

Figure 2. Relative distribution of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates in different clinical samples.

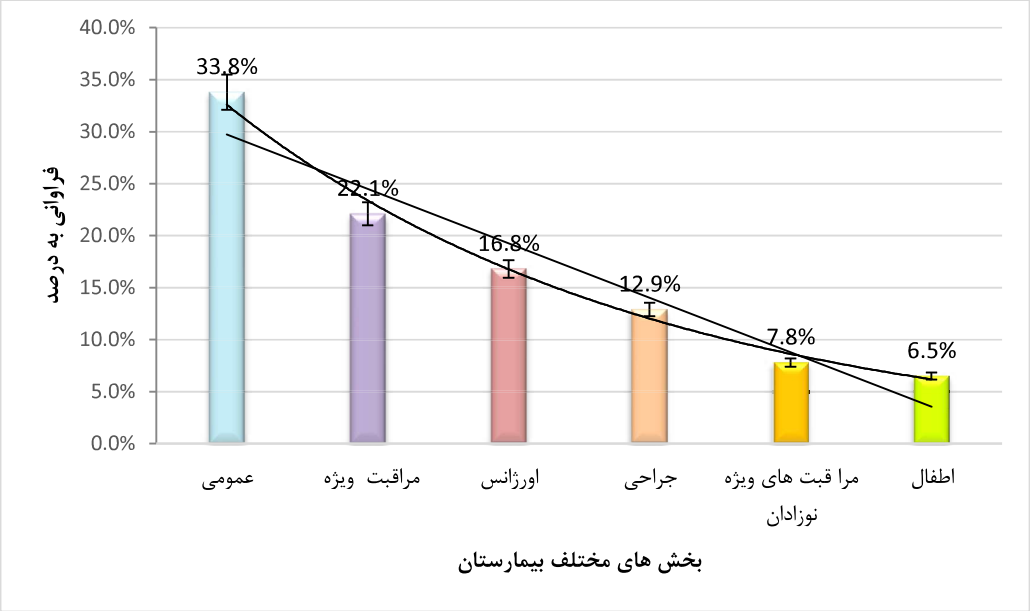
جداسازی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* بر اساس بخش‌های مختلف بیمارستانی

از مجموع ۷۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه-های بالینی، بیشترین تعداد نمونه بالینی مربوط به بخش عمومی با فراوانی ۳۳/۸ درصد و کمترین تعداد نمونه مربوط به بخش اطفال با فراوانی ۶/۵ درصد گزارش شد. در شکل ۳ فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده به تفکیک هر بخش نشان داده شده است.

از مجموع ۲۱ جدایه *انتروکوکوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی، بیشترین تعداد نمونه بالینی مربوط به بخش اورژانس با فراوانی ۴۷/۶ درصد و کمترین تعداد نمونه مربوط به بخش جراحی با فراوانی ۹/۵ درصد بودند. در شکل ۴ فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده به تفکیک هر بخش نشان داده شده است.

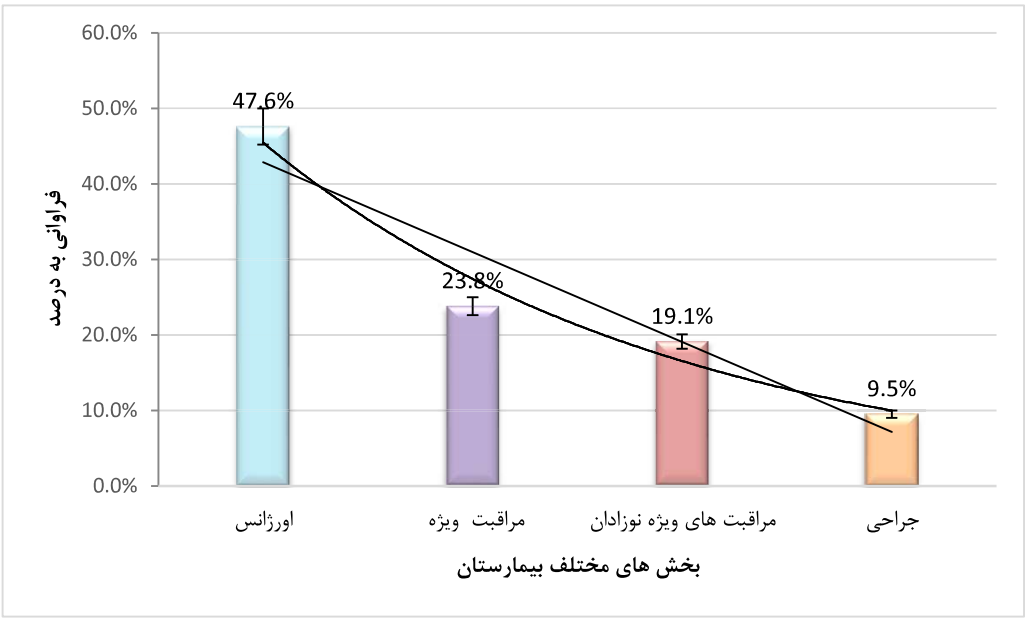
نتایج حساسیت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین

نتایج بررسی هاله عدم رشد دیسک ونکومایسین برای *انتروکوکوس* و نوار E-Test برای *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که از ۹۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* ۱۱ جدایه به ونکومایسین مقاوم بودند. سه جدایه متعلق به *انتروکوکوس فکالیس* و هشت جدایه متعلق *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.



شکل ۳. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بخش‌های مختلف بیمارستانی.

Figure 3. Distribution of relative frequency of *Staphylococcus aureus* isolates in different hospital departments.

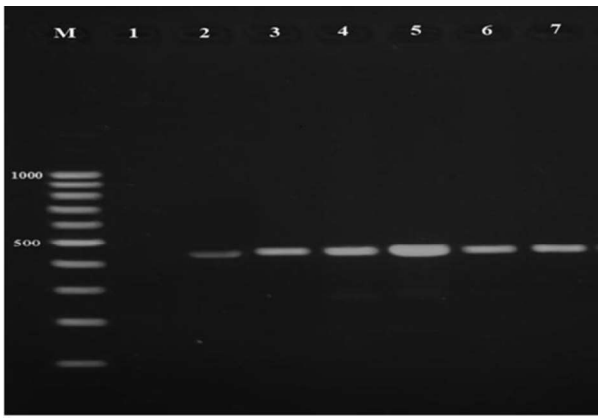


شکل ۴. توزیع فراوانی نسبی جدایه‌های *انتروکوکوس فسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* در بخش‌های مختلف. بیمارستانی

Figure 4. Relative distribution of *Enterococcus faecium* and *faecalis* isolates in different hospital departments.

نتایج ارزیابی ژن‌های *vanA* و *vanB* به روش PCR

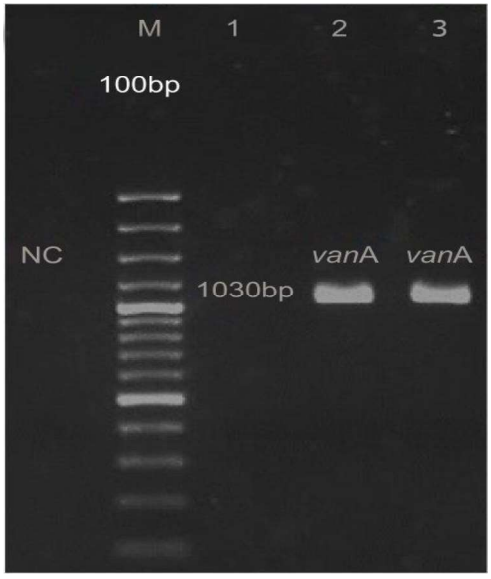
حضور ژن‌های مقاومت *vanA* و*vanB* در جدایه‌های بالینی *انتروکوکوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش PCR نشان داد که در مجموع از ۱۱ جدایه مقاوم به ونکومایسین، هفت جدایه با فراوانی ۶۳/۶ درصد دارای ژن‌های *vanA* و سه جدایه با فراوانی ۲۷/۴ درصد دارای ژن *vanB*بودند. از سه جدایه *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین، دو جدایه دارای هر دو ژن *vanA* و *vanB* و یک جدایه دارای ژن *vanA* بود و از هشت جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین، سه جدایه دارای ژن *vanA* و یک جدایه دارای هر دو ژم *vanA* و *vanB* بودند. در چهار جدایه هیچکدام از ژن های مذکور گزارش نشد. درچهار جدایه هیچ کدام از ژن‌های مقاومت به ونکومایسین گزارش نشد . نتایج PCR برای شناسایی ژن‌های *vanA* و *vanB*در شکل های ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل ۵. الکتروفورز محصول ژن *vanB* . M: سایز مارکر ۱۰۰*bp*، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳ تا ۷ جدایه‌های مثبت.
Figure 5. *vanB* gene product electrophoresis. M: DNA marker size 100 bp, well 1: negative control, well 2: positive contol, well 3–7: positive isolates.

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دلیل استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک یکی از مهمترین تهدیدهای میکروبی بیمارستانی به شمار می‌رود. در سال‌های اخیر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده تا مقاومت میکروبی به سرعت افزایش یافته و به یک موضوع مهم بهداشت عمومی تبدیل شود. پیدایش سویه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند، این وضع را دشوار و هزینه زیادی برای بیماران و جامعه ایجاد کرده است. باکتری‌ها قادرند ژن مقاومت را از طریق جهش ژنتیکی و یا انتقال افقی ژن‌های مقاومت به دست آورند. این ژن‌های مقاومت ضد میکروبی بر روی پلاسمید و کروموزوم باکتریایی و ترانسپوزون حمل می شوند. ضرورت این پژوهش این است که سازمان‌های بهداشت بین المللی از جمله مرکز اروپایی پیشگیری و کنترل درمان (ECDC) و سازمان بهداشت جهانی(WHO)، مقاومت ضد باکتریایی را به عنوان یکی از مهمترین مشکلات سلامت انسان بیان می‌کند و از اصطلاح بحران و فاجعه باردر مورد آن استفاده می‌کند. بنابراین مشخص شدن الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر ناحیه جغرافیایی، جهت برنامه‌ریزی برای پروتکل درمانی به منظور جلوگیری از ظهور ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از روش‌های استاندارد و دقیق در آزمایشگاه‌های بالینی، کمک شایانی در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثرمی‌نماید (۱۴). در اکثر مطالعه‌ها استفاده بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، موارد زیادی از مقاومت دارویی درارگانیسم‌های بیماری‌زارا نشان داده است و این امر، سبب عدم موفقیت در درمان و پیدایش بسیاری از عوارض جبران ناپذیر علیرغم صرف هزینه‌های هنگفت درمانی می‌گردد (۱۵،۱۶). لذا در این پروژه مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بررسی شد.



شکل ۶. الکتروفرز محصول ژن *vanA* . M: سایز مارکر ۱۰۰*bp*، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: جدایه مثبت.
Figure 6. *vanA* gene product electrophoresis. M: DNA marker size 100 bp, well 1: negative control, well 2: positive control, well 3: positive isolate.

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت و از مهمترین بیماری‌زاهای انسانی است. طی چند دهه گذشته این پاتوژن

تبدیل به یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی شده است. علیرغم دستاوردهای زیاد در سیستم‌های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده‌ای از عوامل ضد میکروبی، *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهمترین عوامل رایج ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌باشد. با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده است. برخی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند متی‌سیلین و ونکومایسین مقاوم شده‌اند. ونکومایسین، آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که به طور گسترده در درمان بیماری‌های باکتریایی استفاده میشود. در نقاط مختلف جهان پژوهش‌هایی که در مورد پیدایش *استافیلوکوکوس*‌های مقاوم به ونکومایسین انجام شده که نشان دهنده تعداد محدودی از جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۹).

درسال ۱۹۹۷ اولین جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت متوسط در برابر ونکومایسین در ژاپن گزارش شد و پس از مدتی در آمریکا و کره مشاهده شد (۱۷). در سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ میزان مصرف آنتی‌بیوتیک توسط انسان ۲۰ درصد افزایش یافت. در سال ۲۰۱۶ بیماران بستری در بیمارستان‌های فرانسه که با عفونت حاد مواجه شدند را از نظر میکروارگانیسم‌های آلوده مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و فراوانی مقاومت باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر متی‌سیلین و ونکومایسین را مشاهده کردند (۶).

منصوری قیاسی و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای در زمینه مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی کارکنان بخش جراحی بیمارستان شهید رجایی تنکابن انجام داد. تحقیق آن‌ها نشان داد که ۹۰ درصد جدایه‌ها به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، متی‌سیلین و ونکومایسین مقاوم بودند که زنگ خطری برای مدیریت عفونت‌های بیمارستانی ساری و قائم شهر بود (۱۸).

در این مطالعه از تعداد ۹۸ جدایه گرم مثبت متعلق به گروه ESKAPE، ۷۷ (۷۸/۶درصد) جدایه به *استافیلوکوکوس اورئوس* تعلق داشت. از ۷۷ مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۸ جدایه مقاوم به ونکوکایسین گزارش شد که سه جدایه دارای ژن *vanA* و یک جدایه دارای هر دو ژن *vanA* و *vanB* بودند. در چهار جدایه فاقد ژن‌های مذکور گزارش شدند. گزارش سانکاک و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بیمارستان مرکزی ترکیه به روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که ۲ درصد سویه‌ها نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها به ونکومایسین از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی شده و ژن‌های مقاومت *vanA* در ۲ نمونه و *vanB* در یک نمونه مشاهده شد (۱۴). در سال ۲۰۱۲ عظیمیان و همکاران جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین را از نمونه تنفسی بیمار بستری مرد ۲۶ ساله در بیمارستان مشهد جدا کردند که حداقل غلظت مهارکننده (MIC)[1] ونکومایسین در این جدایه بین محدوده ۰/۱۲۵ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۹). رهبر و همکاران در سال۲۰۱۷ ، از ۳۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیمارستانی در تهران، با روش انتشار از دیسک و E تست، ۲ جدایه دارای مقاومت به ونکومایسین با MIC بیشتر از ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر را گزارش کردند (۲۰).

گزارش‌های اولیه مربوط به پیدایش جدایه‌های *انتروکوکوس فسیوم* مقاوم به ونکومایسین در اروپا و *انتروکوکوس فکالیس* در آمریکا هشداری جدی در بروز جدایه‌های *انتروکوکوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌آید.

در سال ۱۹۸۶ *انتروکوکوس*هایی کشف شد که به ونکومایسین مقاوم بودند. در واقع دو فنوتیپ *vanA* و *vanB* مقاومت اکتسابی به ونکومایسین دارند. حداقل غلظت مهاری (MIC) فنوتیپ *vanA*بیشتر از ۶۴ میلی‌گرم در لیتر است. این مقاومت به واسطه پلاسمید ایجاد می‌شود و قابلیت انتقال به میکروب‌های بیماری‌زای دیگر را دارد(۲۱). افزایش *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین مشکل جدی در درمان عفونت‌های *انتروکوکوس* ایجاد کرده است و میزان مرگ و میر بالا و انتقال ژن‌های مقاومت به ونکومایسین به دیگر پاتوژن‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، آنها را به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل کرده است. در این مطالعه از تعداد ۹۸ جدایه گرم مثبت متعلق به گروه ESKAPE، ۲۱ جدایه (۲۱/۴درصد) به *انتروکوکوس* تعلق داشت. نتایج PCR نشان داد که در مجموع از سه جدایه *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین، یک جدایه دارای ژن *vanA* و ۲ جدایه دارای ژن‌های *vanA* و *vanB* بودند. نتایج مطالعه اکرمی و همکاران در بیمارستان امام خمینی اهواز نشان داد *انتروکوکوس*ها از نظر بیماری‌زایی بعد از *اشرشیاکلی*،

[1] Minimum Inhibitory Concentration

کلبسیلا، *استافیلوکوکوس*، *انتروباکتر* و *سودوموناس* در رتبه ششم قرار گرفتند (۲۲).

در سال ۱۹۸۸ *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین توسط UTTLEY درانگلیس گزارش شد که ۶ فنوتیپ مقاوم در برابر ونکومایسین شناسایی گردید. ژن‌های *vanA* و *vanB* دارای سطح مقاومت بالا بودند (۱۳).

Schwab و همکاران، عفونت‌های بیمارستانی انتروکوکی را از سال۲۰۰۶ تا سال ۲۰۱۵ در بیمارستان‌های آلمان بررسی کردند. در این سال‌ها عفونت انتروکوکی از ۱۱۲۱ به ۱۴۱۲ مورد افزایش یافت. بیشتر این عفونت‌های بیمارستانی شامل عفونت *انتروکوکی فسیوم* بود (۲۳).

مقیم بیکی و همکاران، شیوع مقاومت به ونکومایسین در نمونه‌های *انتروکوکوس* را طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۱ را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که عفونت‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* شایع تر از *انتروکوکوس فسیوم* است اما مقاومت دارویی در برابر ونکومایسین در جدایه *انتروکوکوس فسیوم* به علت وجود ژن‌های *vanA* و *vanB* بالاتر است (۲۴).

شیوع ژن‌های مقاومت به ونکومایسین، به ویژه *vanA* و *vanB*، در مناطق مختلف متفاوت است. در ایران، مطالعات به طور مداوم شیوع بالایی از ژن *vanA* را در بین *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش کرده‌اند. یک بررسی سیستماتیک و متاآنالیز نشان داد که تقریباً ۸۰ تا ۸۶ درصد از جدایه‌های VRE در ایران دارای ژن *vanA* بودند، در حالی که ۱۴ تا ۲۰ درصد دارای *vanB* بودند (۲۴). به طور مشابه، مطالعه‌ای بر روی بیماران ICU در اهواز، جنوب غربی ایران، نشان داد که ۹۱.۵ درصد از ایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین دارای ژن *vanA* هستند، بدون اینکه *vanB* تشخیص داده شود (۲۵). در مقابل، کشورهای اروپایی الگوهای متفاوتی را نشان می‌دهند. برای مثال، آلمان در سال‌های اخیر تغییری از تسلط *vanA* به *vanB* را گزارش کرده است (۲۶).

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه، فقدان داده‌های دموگرافیک و اطلاعات بالینی مربوط به بیماران بود که امکان برآورد دقیق شیوع واقعی هر یک از ایزوله‌ها را محدود ساخت. همچنین، به دلیل محدودیت‌های مالی، انجام آنالیزهای مولکولی و تعیین توالی ژنتیکی ایزوله‌ها میسر نبود، که این موضوع نیز از جمله موانع مهم در تفسیر دقیق‌تر یافته‌ها محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت ضد میکروبی جدایه‌های *انتروکوکوس* و *استافیلوکوکوس* در گروه ESKAPE می‌باشد . باتوجه به مشاهده روزافزون مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییرات گسترده طیف اثر بخشی نسبت به داروها و جلوگیری از افزایش موارد مقاوم به دارو اجرای آزمون‌های حساسیت دارویی قبل از تجویز آنتی بیوتیک‌ها ضروری می‌باشد. ژن *vanA* و *vanB* نقش مهمی در مقاومت چند دارویی در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* دارند. لذا شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به ونکومایسین و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها و همچنین مطالعه میزان انتشار این گونه‌ها برای تعیین اپیدمیولوژی و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مهم است. همچنین مشخص شدن الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ویژه هر ناحیه‌ی جغرافیایی می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی پروتکل درمانی به منظور جلوگیری از ظهور و گسترش ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری دانشگاه علوم پزشکی مشهد و پرسنل آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های امام رضا (ع)، قائم، اکبر و رضوی جهت جمع‌آوری نمونه‌های باکتریایی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

Refrances

1. Navidinia M. the Clinical Importance of Emerging ESKAPE Pathogens in Nosocomial Infections. J Paramed Sci. 2016 Vol 7 No 3 (2016), 5 June 2016 , P.43-57 doi:10.22037/jps.v7i3.12584

2. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology [Internet]. New York: Mcgraw-Hill Education; 2016. Available from: https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1551

3. Kosecka-Strojek M, Wolska M, Żabicka D, Sadowy E, Międzobrodzki J. Identification of clinically relevant streptococcus and enterococcus species based on biochemical methods and 16s rRNA, SODA, TUF, RPOB, and RECA gene sequencing. Pathogens. 2020;Vol 9 issue 11 P.1–21. doi:10.3390/pathogens9110939

4. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology. Microbiology society. 2009. Vol 155 P.1749-1757. doi:10.1099/mic.0.026385-0.

5. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. Clinical Infectious Diseases, Volume 24, Issue Supplement_1, January 1997, Pages S80–S84. doi:10.1093/clinids/24.Supplement_1.S80

6. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria.2014 Vol. 5 issue 4. doi:10.3389/fmicb.2014.00643

7. Grammatico-Guillon L, Thiolet J-M, Bernillon P, Coignard B, Khoshnood B, Desenclos J-C. Relationship between the Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection and Indicators of Nosocomial Infection Control Measures A Population-Based Study in French Hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009. Vol 30. Issue 9.P.861-869. doi:10.1086/599774

8. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed. 2014

9. Saga T, Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. Jmaj. 2009 Mar;52(2):103-8.

10. Zilahi G, Artigas A, Martin-Loeches I. What's new in multidrug-resistant pathogens in the ICU? Ann Intensive Care. 2016. Vol 6. Issue 1. doi:10.1186/s13613-016-0199-4.

11. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Investigation. 2003 Vol 111. issue 9.P.1265-1273. doi:10.1172/JCI18535

12. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG. Presence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 1999 Vol 18, p.691–696. doi:10.1007/s100960050380

13. Uttley AC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. The Lancet. 1988 Jan 9;331(8575):57-8. doi:10.1016/S0140-6736(88)91037-9.

14. Snkac B, Erics S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu S, Hasçelik G. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital.Jurnal of Antimicrobial chemotherapy.2005 vol 56 issue 3 p.519-523. doi:10.1093/jac/dki272

15. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Research International. Bio Med research international 2016. doi:10.1155/2016/2475067

16. Rice LB. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010. Vol 31. Issue 1 P.7–10. doi: 10.1086/655995.

17. Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Öberg S, Karlsson L, Åhrén C. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus t034. Emerg Infect Dis. 2008; doi:10.3201/eid1408.071427

18. MansouriGhiasi MA, NasrolahiOmran A, Hashemi M, RajabzadeKanafi P, JahangiriRadManjili M.The prevalence of antibiotic resistance pattern of Staphylococcous aureus isolated from nasal carriage of surgical ward s staff in Shahid Rajaee hospital of Tonekabon, Iran.2013 Vol7 issue 1 P.35-39.

19. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Mirab Samiee S, Soleimani M, Najar Peerayeh S. Genetic Characterization of a Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Isolate from the Respiratory Tract of a Patient in a University Hospital in Northeastern Iran. Jurnal of clinical microbiology. 2012 Vol 50. Issue 11. doi:10.1128/jcm.01727-12

20. Rahbar M, Karami S, Vand Yousefi J. Evaluation of five phenotypic methods for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Iranian Journal of Pathology. 2011 Jan 1;6(1):27-31. www.ijp.iranpath.org.

21. Dailey CM. Epidemiology and innate immune monocyte function of Staphylococcus aureus carriers and non-carriers in a medical school community: A pilot study. ProQuest Dissertations andTheses.2012.http://elischolar.library.yale.edu/ymtdl/1703?utm_source=elischolar.library.yale.edu%2Fymtdl%2F1703&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages

22. Akrami S, Abouali R, Heidary Lal-Abady R, Olapour M M, Yousefi Avarvand A. Antibiotic Resistance Pattern of Enterococci Isolates from Nosocomial Infections in Imam Khomeini Hospital, Ahvaz City. JSSU 2023; 31 (3):6519-6525. http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-5823-fa.html.

23. Schwab F, Geffers C, Behnke M, Gastmeier P. ICU mortality following ICU-acquired primary bloodstream infections according to the type of pathogen: a prospective cohort study in 937 Germany ICUs (2006-2015). PloS one. 2018 Mar 8;13(3):e0194210. doi:10.1371/journal.pone.0194210.

24. Moghimbeigi A, Moghimbeygi M, Dousti M, Kiani F, Sayehmiri F, Sadeghifard N, Nazari A. Prevalence of vancomycin resistance among isolates of enterococci in Iran: a systematic review and meta-analysis. Adolesc Health Med Ther. 2018 Nov 15;9:177-188. doi: 10.2147/AHMT.S180489.

25. Moosavian M, Ghadri H, Samli Z. Molecular detection of vanA and vanB genes among vancomycin-resistant enterococci in ICU-hospitalized patients in Ahvaz in southwest of Iran. Infection and Drug Resistance. 2018 Nov 11:2269-75. doi:10.2147/IDR.S177886.

26. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. 2008;13(47):19046. https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/766/27Yn5UCtz9hOs.pdf?sequence=