



نهمین کنگره بین المللی و چهاردهمین کنگره کشوری ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی تشخیص پزشکی ایران

۳۱ فروردین تا ۳ اردیبهشت ماه ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی زنجان

دپارتمان میکروبیولوژی و ویروس شناسی

فراوانی ژن های **vanA** و **vanB** در انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين جداشده
از نمونه های بالینی

وحید لهراسبی

کارشناسی ارشد میکروبیولوژی و ویروس شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

دکتر حبیب ضیغمی ، دکتر فخری حقی

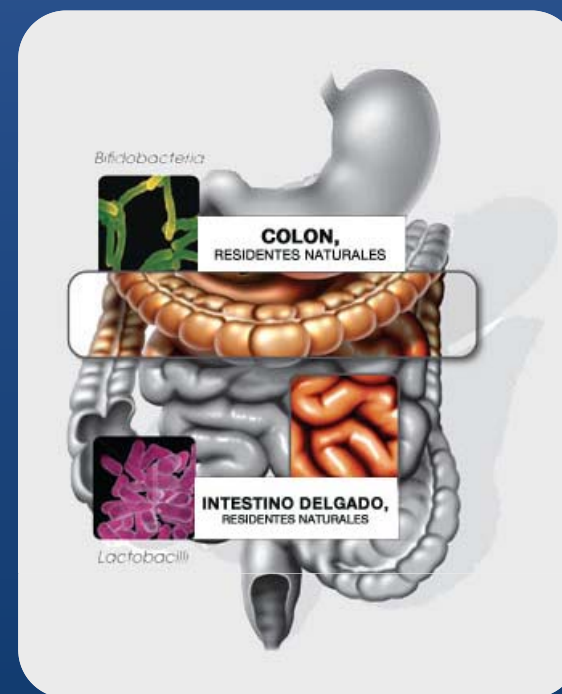
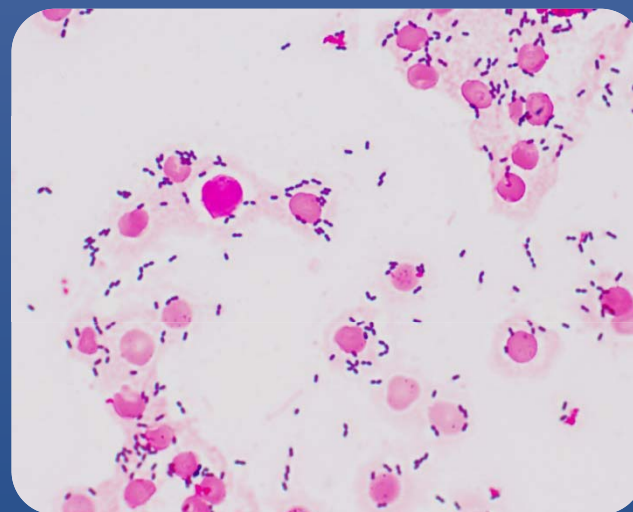
دکترای باکتری شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

مقدمه و هدف

انتروکوک ها

فلور طبیعی روده

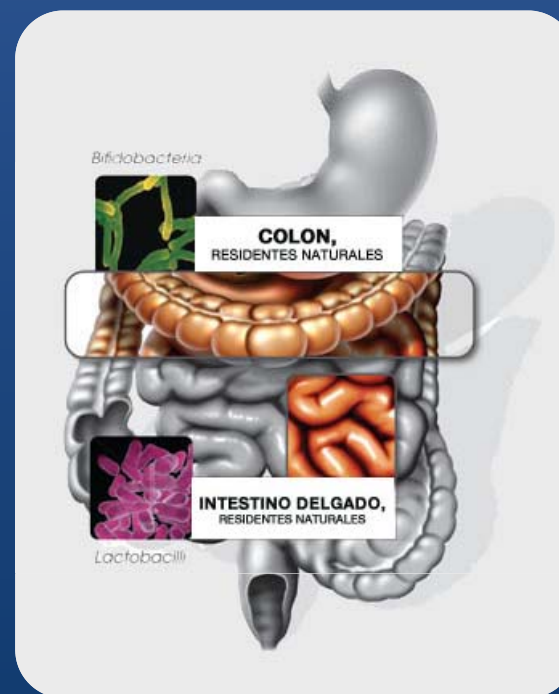
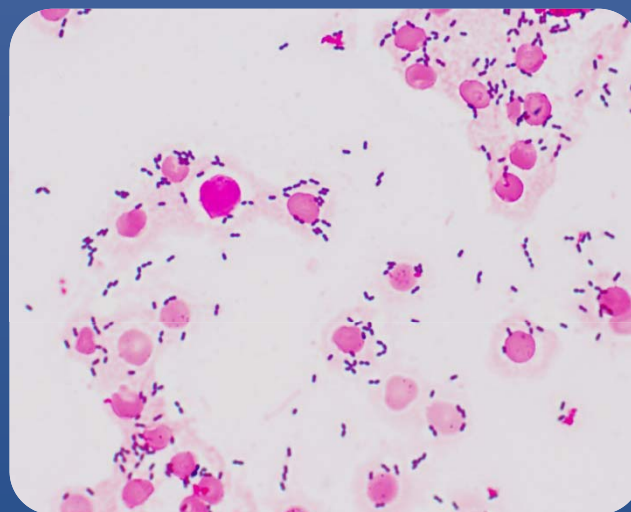
دوست



انتروکوک ها

فلور طبیعی روده

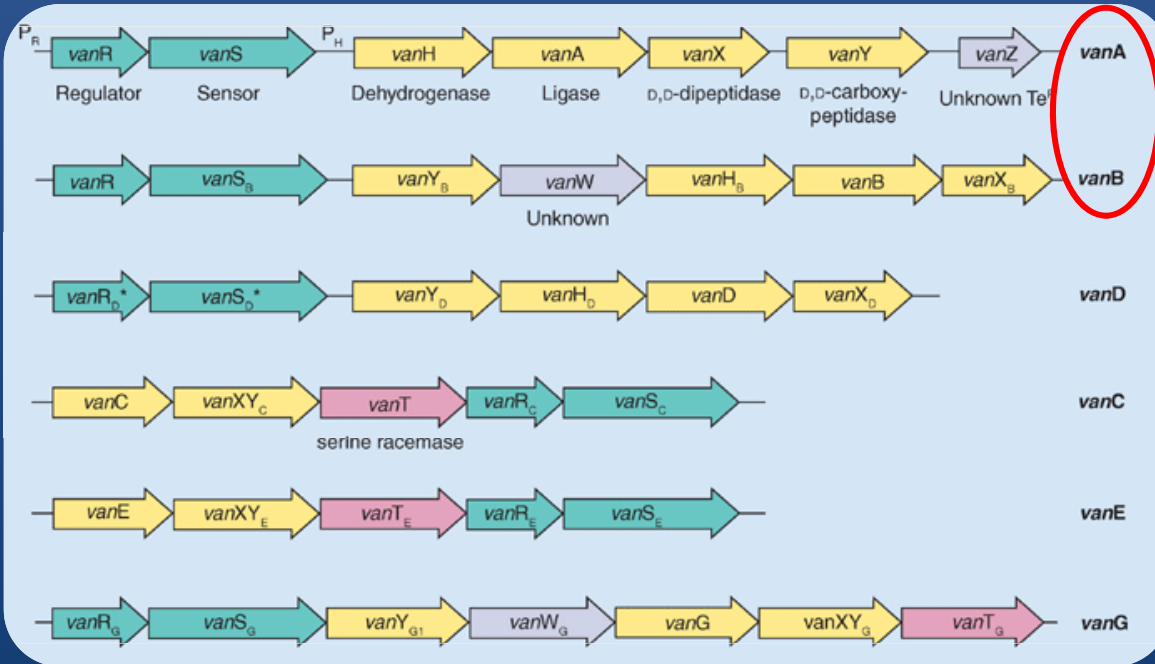
دشمن



۱. عفونت‌های بیمارستانی

۲. انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين

انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)



vanA

مقاومت به ونکومايسين و تايکوپلانیين

vanB

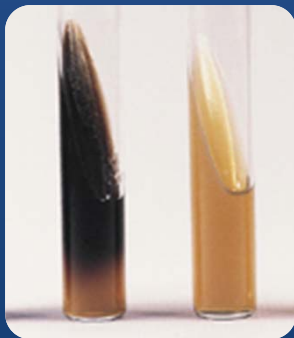
مقاومت به ونکومايسين

مواد و روش ها

جمع آوری ۱۰۰ نمونه های بالینی انتروکوک تایید شده

انجام تست های تشخیصی و تاییدی و شناسایی باکتری در سطح جنس

محیط بایل اسکولین آگار



محیط بلاد آگار



محیط ۶/۵ درصد نمک



رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز

تست آنتی بیوگرام
Disk diffusion

دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد نیاز

(شرکت راین، نماینده شرکت Mast انگلستان)



Ampicillin (25 μ g)

Linezolid (30 μ g)

Vancomycin (30 μ g)

Gentamicin (10 μ g)

Ciprofloxacin (5 μ g)

Tetracycline (30 μ g)

تست MIC ۲۱ نمونه ی مقاوم به ونکومايسين در آنتی بیوگرام



۱. تهیه محیط BHI آگار با ۱۰ رقت مختلف از ونکومايسين

۲. تلقیح یک Spot از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند ایزوله ها بر روی محیط



رقت های
ونکومايسين

۰/۵ ۱ ۲ ۴ ۸ ۱۶ ۳۲ ۶۴ ۱۲۸ ۲۵۶

استخراج DNA از ایزوله های انتروکوک ها به روش

Boiling

بررسی کیفی DNA استخراج شده توسط

الکتروفورز ژل آگارز

شناسایی نمونه ها در سطح گونه

و

شناسایی ژن های vanA و vanB به روش PCR

پرایمرهای مورد استفاده

حجم و غلظت مواد مصرفی PCR

نام پرایمر	توالی 5'→3'
VanA	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA
	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA
VanB	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA
	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA
E.faecalis	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG
	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT
E.faecium	TTGAGGCAGACCAGATTGACG
	TATGACAGCGACTCCGATTCC

ترکیبات واکنش	Single PCR	Doublex PCR
Master Mix	۱۲.۵	۱۲.۵
Primer Forward	۱	۲ × ۱
Primer Reverse	۱	۲ × ۱
D.W.	۵/۵	۳.۵
Template DNA	۵	۵
Final volume	۲۵	۲۵

Primers Reference: Kariyama R et al. (Journal of clinical microbiology)

برنامه دمایی واکنش های PCR

نام پرایمر	سیکل اول	سیکل دوم			سیکل سوم	
	دنا تورا سیون اولیه (۱ سیکل)	دنا تورا سیون	اتصال پرایمرها (annealing)	تکثیر	تعداد سیکل ها	تکثیر نهایی (۱ سیکل)
VanA	۹۴ °C, ۵min	۹۴°C, ۱min	۵۴°C, ۴۵ s	۷۲°C, ۱min	۳۰	۷۲°C, ۱۰min
VanB	۹۴ °C, ۵min	۹۴°C, ۱min	۵۴°C, ۴۵ s	۷۲° C, ۱min	۳۰	۷۲°C, ۱۰min
E.faecalis	۹۴°C, ۵min	۹۴°C, ۱min	۵۸°C, ۴۵ s	۷۲° C, ۱min	۳۰	۷۲°C, ۱۰min
E.faecium	۹۴°C, ۵min	۹۴°C, ۱min	۵۸°C, ۴۵ s	۷۲° C, ۱min	۳۰	۷۲°C, ۱۰min

✓ کنترل مثبت: انتروکوکوس فاسیوم ATCC51559 و انتروکوکوس فکالیس ATCC51299

✓ کنترل منفی: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213

نتایج

نتایج آنتی بیوگرام

تعداد (%) کل ایزوله‌های مقاوم (۱۰۰ = n)	تعداد (%) مقاومت در Other Enterococcus	تعداد (%) مقاومت در Enterococcus faecium	تعداد (%) مقاومت در Enterococcus faecalis	آنتی‌بیوتیک‌ها
(۲۱) ۲۱	(۶۷) ۱۴	(۷۰) ۷	۰	ونکومايسين
(۲۲) ۲۲	(۵۷) ۱۲	(۱۰۰) ۱۰	۰	آمپی سیلین
(۱۶) ۱۶	(۷۱) ۱۵	(۹۰) ۹	(۹۰) ۶۲	تتراسیکلین
(۵۰) ۵۰	(۵۷) ۱۲	(۷۰) ۷	(۴۵) ۳۱	جنتامایسین
(۵) ۵	(۵) ۱	۰	(۶) ۴	لینه‌زولاید
(۷۳) ۷۳	(۸۱) ۱۷	(۹۰) ۹	(۶۸) ۴۷	سیپروفلوکساسین

نتایج MIC و PCR

تعداد (٪) ژن های van			تعداد (٪) MIC (n = 21)			انتروکوک های مقاومت به ونکومايسين
Negetive	vanB	vanA	مقاوم	حدواسط	حساس	
			(۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر)	(۸-۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر)	(۴ میکروگرم بر میلی لیتر)	
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱. فکاليس
۲	۰	۵	۷ (۳۳٪)	۰	۰	۱. فاسيوم
۱۴	۰	۰	۸ (۳۸٪)	۰	۶ (۲۸٪)	سایر انتروکوک ها

بیت

آنتی بیوگرام

مطالعه

ونکومایسین	سیپروفلوکساسین	جتتاملیسین	آمپی سیلین	مطالعه
۰٪	۶۲٪	۶۲٪	۸۷٪	Jena و همکاران ۲۰۱۵ ۱۵۲۱ ایزوله International Journal of Biomedical Research
۲۱٪	۷۳٪	۵۰٪	۲۲٪	مطالعه ما

نتایج ما	نتایج مطالعه	نام ژن	مطالعه
۵٪	۷٪	vanA	Praharaj و همکاران ۲۰۱۳ هند
۰٪	۰/۱۵٪	vanB	۳۶۷ ایزوله بالینی
۵٪	۱۳٪	vanA	Cekin و همکاران ۲۰۱۳
۰٪	۱٪	vanB	ترکیه ۱۹۳ ایزوله بالینی

Tripathi و همکاران

۲۰۱۶

Journal of Medical Microbiology

از ۱۴۸۸ ایزوله بالینی

۶۱٪ = انتروکوک فکالیس

۳۹٪ = انتروکوک فاسیوم

۸٪ = مقاوم به ونکومايسين

نتیجہ گیری

سپاس فراوان

