● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ویکم، شمارهٔ ۵، ص ۴۰۴-۳۹۴، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

شیوع مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

پرویز مهاجری[۱]، عباس فراهانی[۲]، ابوالفضل داودآبادی[۳*]، عمر قادری[۲]، محسن رهنما[٤]، سیامک حیدرزاده[۳]

خلاصه

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم و شایع عفونت های بیمارستانی است. ونکومایسین مهم‌ترین داروی انتخابی درمان عفونت ناشی از سویه‌های MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) می‌باشد. بنابراین وجود سویه‌های مقاوم (Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus یا VRSA) یا حد واسط (Vancomycin intermediate staph aureus یا VISA) در برابر ونکومایسین هشداری برای جامعه پزشکی و درمانی است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی فراوانی مقاومت به ونکومایسین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بود.

روش: ۸۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از بینی بیماران بستری در بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه جدا شد و از نظر مقاومت به ونکومایسین با تست‌های میکرودایلوشن، E-test و PCR (Polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: هیچ کدام از سویه‌ها مقاومت کامل به ونکومایسین نداشتند، اما ۳۹ سویه (۴۵/۹ درصد) به عنوان سویه‌های hVISA (heteroVRSA) تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: اگرچه در مطالعه حاضر سویه‌های VISA و VRSA مشاهده نشد و این امر یک یافته امیدوار کننده در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بالینی در جامعه می‌باشد، اما از سوی دیگر فراوانی سویه‌های hVISA برابر با ۴۵/۹ درصد بود که شاید زنگ خطری برای مواجهه با سویه‌های مقاوم‌تر (VISA و VRSA) در آینده نزدیک در کشورمان باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ونکومایسین، بینی، متی‌سیلین، hVISA

۱- استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۲- کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۳- دانشجوی دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ۴- دانشجوی دکترای حرفه‌ای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: davoodabadi89@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۴/۲۴ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۸/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۹/۶

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریایی در انسان ها و حیوانات محسوب می‌شود که ده‌ها سال است عفونت‌های منشأ گرفته از جامعه (Community-acquired) و بیمارستان (Hospital-acquired) را ایجاد می‌کند (۲، ۱). این باکتری همچنین از نظر ایجاد عفونت‌های بیمارستانی پس از سودوموناس آئروژینوزا در مرتبه دوم قرار دارد و مسؤول بسیاری از عفونت‌های جدی مانند سپتی‌سمی (مسمومیت خونی)، اندوکاردیت و استئومیلیت در افراد بستری در بیمارستان‌ها و از عوامل شایع مرگ و میر در بیماران تحت همودیالیز می‌باشد (۳).

استافیلوکوک طلایی علاوه بر پراکندگی وسیع در طبیعت، ساکن بدن انسان می‌باشد و در سطح پوست و مخاط بدن اشخاص سالم یافت می‌گردد. تعداد زیادی از افراد (۴۰-۲۰ درصد) نیز حامل این باکتری در قسمت قدامی حفره بینی خود هستند (۴). در برخی از بیمارستان‌ها این باکتری در بخش ICU (Intensive care unit) شیوع بیشتری دارد و باعث مرگ و میر بیماران می‌شود (۵). در سال‌های اخیر با روش‌های مولکولی و اپیدمیولوژیک، یکسان بودن سویه‌های عفونت‌زای بیمارستانی با سویه‌های موجود در بینی حاملین به اثبات رسیده است (۶). بررسی‌ها نشان داده است که حذف این باکتری از بینی حاملین منجر به کاهش عفونت استافیلوکوکی می‌شود (۷). متی‌سیلین یکی از پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز است که در سال ۱۹۶۰ عرضه شد. تنها یک سال بعد بود که اولین مورد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به این دارو (MRSA یا Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) مشاهده گردید (۸).

ونکومایسین گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند. اطلاعات ژنتیکی مقاوم به ونکومایسین در اپرون vanA (vanA operon) قرار دارد. این عامل، سیستمی از ژن‌ها می‌باشد که بر روی پلاسمید قابل انتقال قرار گرفته است. این پلاسمید حاوی یک ترانسپوزون با ارتباط نزدیک به Tn۱۵۴۶ می‌باشد (۸).

ونکومایسین مهم‌ترین داروی انتخابی درمان عفونت ناشی از سویه‌های MRSA می‌باشد. بنابراین وجود سویه‌های مقاوم یا حد واسط در برابر ونکومایسین هشداری برای جامعه پزشکی و درمانی است. سویه‌های اجدادی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به ونکومایسین معروف به hVISA (heteroVRSA) اولین بار در ژاپن گزارش شد. این سویه‌ها شاید پس از استفاده از ونکومایسین و برخورد با آن به انواع مقاوم ونکومایسین تبدیل شوند (۹).

برخی از مطالعات ونکومایسین را به عنوان عامل تحریک‌کننده تولید سویه‌های مقاوم ذکر کرده‌اند (۱۰)، در حالی‌که با بررسی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در مطالعات دیگر این ارتباط تأیید نشد (۱۲، ۱۱). در حال حاضر مکانیسم VISA (Vancomycin intermediate staph aureus) ناشناخته است. انتقال ژن مقاوم vanA از VRE (Vancomycin-resistant enterococci) به استافیلوکوک اورئوس از راه سلول به سلول در آزمایشگاه به اثبات رسیده است. سویه‌های VISA دارای سرعت رشد به نسبت کمتر و نیز دیواره سلولی ضخیم‌تری نسبت به سویه‌های حساس هستند. به نظر می‌رسد، ضخیم شدن دیواره سلولی موجب افزایش MICs (Minimum inhibitory concentrations) در گونه‌های VISA می‌شود (۱۳).

مطابق توصیه انستیتو استاندارد آزمایشگاه بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute یا CLSI)، سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با مقدار ۴-۲ حداقل غلظت بازدارندگی میکروگرم ونکومایسین در هر میلی‌لیتر محیط کشت به عنوان hVRSA، سویه‌های با حداقل غلظت بازدارندگی بالاتر از ۴ باید داوطلب VISA در نظر گرفته شود، سویه‌های با MIC معادل ۱۶-۸ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان VISA و MIC معادل یا بالاتر از ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، VRSA در نظر گرفته می‌شود (۱۴).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی فراوانی مقاومت به ونکومایسین در طی سال‌های ۹۱-۱۳۸۸ در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بینی بیماران ناقل بستری در بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه بود.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

برای نمونه‌گیری، سواپ پنبه‌ای آغشته به سرم فیزیولوژی استریل در قسمت قدامی سوراخ‌های بینی بیماران وارد و در هر کدام ۵ بار چرخانده شد. سواپ‌ها در محل نمونه‌گیری بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار (Mannitol salt agar یا MSA) کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه گردید. کلنی‌های زرد رنگ (تخمیر کننده مانیتول) و مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس جهت آزمون‌های بعدی بر روی محیط بلاد آگار (Blood agar) کشت داده شد. طبق دستورالعمل Bergey، تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس با توجه به آزمون‌های مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، همولیز، کاتالاز، کواگولازلام، کواگولاز لوله‌ای و DNase انجام می‌گیرد (۱۵).

بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان به جز همودیالیز که کشت آن‌ها در نوبت اول (روز اول بستری شدن) از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مثبت شده بود، از مطالعه خارج شدند. از سایر بیماران باقی‌مانده هر ۴۸ ساعت یک بار نمونه‌گیری صورت گرفت تا نمونه از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس مثبت شود یا بیمار مرخص گردد. با این شرایط، موارد مثبت کشت به عنوان سویه کسب شده از بیمارستان در نظر گرفته شد. تمام بیماران بستری در بخش همودیالیز که کشت سواپ بینی آن‌ها در روز اول از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس مثبت به دست آمد، وارد مطالعه شدند. این نمونه‌ها به عنوان نمونه کسب شده از جامعه بود. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تا زمان انجام PCR (Polymerase chain reaction) و آنتی‌بیوگرام در محیط کشت نگهدارنده و در فریزر نگهداری شد.

تست‌های افتراقی برای تشخیص استافیلوکوکوس

در این مرحله، سویه‌های استافیلوکوک با استفاده از آزمون های مرسوم بیوشیمیایی مانند کاتالاز، همولیز، کواگولاز، DNase و مانیتول تشخیص داده شدند.

تعیین حساسیت به ونکومایسین به روش میکرودایلوشن براث

۱۰ میکرولیتر از محلول ونکومایسین با غلظت نهایی ۱۰۰۰۰ میکروگرم در لیتر به ۹۰ میکرولیتر مولر هینتون براث (Mueller hinton broth) حاوی ۵ درصد کلرید سدیم اضافه شد. با افزودن ۶/۴ میکرولیتر از محلول فوق به ۹۳/۶ میکرولیتر مولر هینتون براث غلظت نهایی به ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵۰ میکرولیتر مولر هینتون براث ریخته، به چاهک اول ۵۰ میکرولیتر از غلظت ۶۴ میکروگرم اضافه شد و رقت‌سازی در تمام چاهک‌ها انجام گرفت (۱۶).

طبق دستورالعمل CLSI، باید غلظت نهایی باکتری در هر چاهک ۵×۱۰^{۵} میکرولیتر در میلی‌لیتر باشد (۱۶). با افزودن ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نهایی ۵×۱۰^{۶} میکرولیتر در میلی‌لیتر به هر چاهک (حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط کشت با آنتی‌بیوتیک)، غلظت نهایی باکتری به ۵×۱۰^{۵} میکرولیتر در میلی‌لیتر خواهد رسید. غلظت نهایی لوله اول ۳۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر و غلظت نهایی لوله دوم ۱۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر و سایر لوله ها نیز به ترتیب با رقت یک دوم کاهش یافت.

تعیین حساسیت به ونکومایسین به روش E-test

ابتدا از کشت تازه باکتری روی محیط مانیتول سالت آگار، نیم McFarland تهیه شد. سپس از نیم McFarland تهیه شده توسط سواپ روی محیط مولر هینتون براث کشت

صورت گرفت و نوار ونکومایسین روی آن قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. طبق دستورالعمل CLSI نتیجه مثبت به صورت رشد در اطراف نوار حاوی آنتی‌بیوتیک گزارش گردید (۱۶).

روش تشخیص سویه‌های hVISA

برای انجام این آزمون، ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر پودر ونکومایسین به محیط BHI (Brain heart infusion) آگار اضافه شد و از کشت تازه باکتری سوسپانسیونی معادل نیم McFarland در محیط Nutrient broth تهیه گردید. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بر روی سطح پلیت BHI آگار دارای ونکومایسین کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. نتایج بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید. در صورت رشد و تشکیل حداقل دو کلنی بعد از ۲۴ ساعت بر روی محیط، سویه‌ها VISA هستند؛ ولی اگر بعد از ۴۸ ساعت حداقل دو کلنی تشکیل شود، سویه hVISA در نظر گرفته می‌شود (۱۶).

استخراج DNA از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

استخراج DNA (Deoxyribonucleic acid) از سویه‌ها به دو روش جوشاندن (Boiling) و روش فنول- کلروفرم انجام گرفت (۱۷).

انجام PCR جهت تشخیص ژن‌های مقاوم X، H، C، B و VanA

با استفاده از مطالعات انجام شده و آزمایش‌های صورت گرفته جهت بهینه‌سازی PCR، میزان مواد موردنیاز برای حجم ۵۰ میکرولیتر به قرار زیر تعیین شد:

۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP Mix، ۰/۲۵ واحد آنزیم Taq، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x و آب مقطر ۳۲/۲۵ میکرولیتر.

در مطالعه حاضر PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن‌های X، H، C، B و VanA اختصاصی Van بر اساس مطالعات قبلی (۱۸) انجام گرفت. PCR برای ژن‌های مقاوم با شرایطی مطابق جدول ۱ انجام شد و محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

جدول ۱. *شرایط PCR (Polymerase chain reaction)*

نام ژن	Denaturation اولیه	۳۵ دوره			گسترش نهایی
		دناتوراسیون	حرارت دادن	گسترش	
Van A و B ،C	۹۵ درجه، ۱۰ دقیقه	۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه	۵۸ درجه، ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۱۰ دقیقه
Van H	۹۸ درجه، ۲ دقیقه	۹۸ درجه، ۱۰ ثانیه	۵۰ درجه، ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۵ دقیقه
Van X	۹۸ درجه، ۲ دقیقه	۹۸ درجه، ۱۰ ثانیه	۵۰ درجه، ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه، ۵ دقیقه

روش‌های آماری

از آمار توصیفی مانند توزیع فراوانی، تعداد و درصد و نیز جداول یک بعدی و دو بعدی و نیز نمودارهای موردنیاز جهت پاسخ به سؤالات استفاده شد. برای مقایسه ژنوتیپیک سویه‌های با منشأ بیمارستانی و جامعه، آزمون χ^2 و در صورت نیاز آزمون Fisher's exact مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

از بین ۸۵ بیمار مورد مطالعه، ۴۵ نفر مرد (۵۲/۹ درصد) و ۴۰ نفر زن (۴۷/۱ درصد) بودند. در جامعه مورد بررسی، ۶۵ نفر (۷۶/۵ درصد) باکتری را از بیمارستان (Hospital aquired) و ۲۰ نفر (۲۳/۵ درصد) باقی‌مانده نیز این باکتری را از جامعه کسب کرده بودند (Community aquired). حداقل MIC تعیین شده با روش میکرودایلوشن، کمتر از ۱ و حداکثر آن ۴ بود. نتایج MIC Microdilution جامعه آماری مورد مطالعه در جدول ۲ ارایه شده است.

تعداد ۳۹ سویه (۴۵/۸ درصد) hVISA و نمونه‌های دیگر حساس به ونکومایسین بودند (Vancomycin susceptible Staphylococcus aureus یا VSSA). در مطالعه حاضر به نمونه‌های VISA و VRSA برخورد نشد.

از ۶۵ مورد سویه بیمارستانی، ۳۱ سویه دارای مقاومت از نوع hVISA و بقیه موارد (۳۴ سویه) VSSA بودند و در بین ۲۰ سویه کسب شده از اجتماع، ۸ سویه مقاومت از نوع hVISA و ۱۲ سویه VSSA داشتند. در بررسی رابطه منشأ بیماری با سویه‌های hVISA، مقدار P برابر با ۰/۵۴۶ به دست آمد و اختلاف در این مورد معنی‌دار نبود.

از ۴۵ مرد آلوده به MRSA، ۲۳ سویه hVISA و از ۴۰ بیمار زن، ۱۶ سویه hVISA بود. با توجه به سطح معنی داری χ^2 -که برابر با ۰/۳۰۵ می‌باشد و این مقدار از ۰/۰۵ بزرگ‌تر است- پس فرض استقلال دو متغیر پذیرفته می‌شود و می‌توان گفت که VISA از جنسیت مستقل است. به عبارت دیگر، جنسیت بر hVISA اثر ندارد.

در مورد سن، سطح معنی‌داری در آزمون χ^2 برابر با ۰/۴۹۶ به دست آمد؛ به دلیل این‌که مقدار حاصل شده از ۰/۰۵ بزرگ‌تر است، پس فرض استقلال دو متغیر در این مورد پذیرفته می‌شود. بنابراین hVISA از سن مستقل می‌باشد و سن نیز مانند جنس بر hVISA اثری ندارد.

جدول ۲. *بررسی MIC (Minimum inhibitory concentrations) ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس به دو روش میکرودایلوشن و E-test*

MIC Microdilution		E-test MIC	
فراوانی (درصد)	MIC	فراوانی (درصد)	E-test MIC
۴۴ (۵۱/۸)	۱>	۱ (۱/۲)	۰/۱۲۵
		۱ (۱/۲)	۰/۲۵۰
۳۷ (۴۳/۵)	۲	۱۳ (۱۵/۳)	۰/۳۸۰
		۱۱ (۱۲/۹)	۰/۵۰۰
۴ (۴/۷)	۴	۱۷ (۲۰/۰)	۰/۷۵۰
		۸ (۹/۴)	۱/۰۰۰
۸۵ (۱۰۰)	جمع	۲۳ (۲۷/۱)	۱/۵۰۰
		۱۱ (۱۲/۹)	۲/۰۰۰
		۸۵ (۱۰۰)	جمع

MIC: Minimum inhibitory concentrations

نتایج PCR

بررسی سویه‌های استافیلوکوک با روش PCR نشان داد که تمام آن‌ها از نظر ژن‌های X، H، C، B و VanA منفی می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، با افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی مواجه هستیم. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا به‌عنوان چالش مهمی برای جامعه پزشکی در درمان بیماری‌های عفونی مطرح شده است. مطالعات قبلی نشان داده است که کوکسی های گرم مثبت مانند استافیلوکوک های کواگولاز منفی، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوک ها از جمله عوامل مهم ایجاد عفونت در بیمارستان‌ها می‌باشند (۱۹).

ونکومایسین از آنتی‌بیوتیک‌هایی است که به فراوانی در محیط بیمارستان و به ویژه در مورد استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده می‌شود. با گزارش VRSA و گسترش آن، مشکل درمان MRSA مطرح می‌باشد و با وجود این‌که تاکنون تعداد معدودی از موارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین گزارش شده است، احتمال زیادی برای وجود بیشتر آن در آینده نزدیک وجود دارد (۲۰).

در مطالعه حاضر ۴۵/۸ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، hVISA بودند. در بررسی مهاجری و همکاران بر روی سویه‌های جدا شده از بینی افراد ناقل، مقاومتی در برابر ونکومایسین مشاهده نشد (۲۱)، اما حقگو و همکاران گزارش کردند که ۹ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت VISA بوده‌اند که از بین آن‌ها یک مورد نیز VRSA یافت شد (۲۲). در مطالعه مرادی و همکاران بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از انواع نمونه‌های بالینی، در ۳/۸ درصد مقاومت از نوع VISA مشاهده شد (۲۳). طبق مطالعه حسین زادگان و همکاران بر روی سویه‌های جدا شده از بینی کارکنان بیمارستانی، ۱/۳۳ درصد سویه‌های جدا شده دارای مقاومت VISA بودند (۲۴).

مطالعات مختلفی در مورد شیوع استافیلوکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در نقاط مختلف جهان انجام گرفت، اما در مورد استافیلوکوکوس اورئوس تنها تعداد معدودی از سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش شده است. در سویه‌های استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی نیز مقاومت به ونکومایسین ذکر شده است، اما این سویه‌ها با ژن‌های مقاوم همراه نبوده‌اند (۲۵).

بعد از گزارش اولین مورد VRSA در ژاپن، اگرچه انتشار سویه‌های VRSA و VISA در سطح پایینی باقی ماند، اما در بسیاری از کشورها سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به‌صورت hVISA در حال افزایش می‌باشد (۲۶). گزارش‌هایی نشان داده‌اند که عدم موفقیت در درمان با ونکوماسیون باعث به وجود آمدن سویه های hVISA می‌شود، البته آزمون‌های مورد استفاده جهت بررسی حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به ونکومایسین شامل روش‌های تعیین MIC (میکرودایلوشن براث، میکرودایلوشن آگار و E-test) می‌باشد (۲۷)؛ اما روش دیسک آگار دیفیوژن آزمون غیر قابل اعتمادی در شناسایی مقاومت به ونکومایسین است. بنابراین آزمایشگاه‌ها باید از روش‌های مورد تأیید CDC (Centers for Disease Control) و CLSI استفاده نمایند (۲۸، ۱۶). آزمون‌های مورد تأیید CDC جهت شناسایی سویه‌های hVISA/VISA شامل براث ماکرودایلوشن، تست غربالگری در محیط کشت BHI محتوی ۶ میکروگر بر میلی‌لیتر ونکومایسین و E-test می‌باشد (۲۹).

تا سال ۲۰۰۱ فقط ۸ مورد عفونت با GISA (Glycopeptide-intermediate S.aureus) در جهان گزارش شده بود که مهم‌ترین آن‌ها بیماران مبتلا به عفونت MRSA مربوط به کاتتر و همودیالیز مزمن بودند که به مدت طولانی تحت درمان با ونکومایسین قرار داشتند (۳۰).

بر اساس مطالعات انجام شده در ۱۲ کشور آسیایی، سویه‌های hVISA جمع‌آوری شد که میزان آن‌ها در هر

کشور مختلف بود. از ۱۳۵۷ سویه بالینی جمع‌آوری شده MRSA که آزمون BHIVA (Brain heart infusion vancomycinagar) در مورد آن‌ها انجام گرفت، حدود ۳۴۷ سویه MRSA (۲۵/۶ درصد) به عنوان سویه hVISA شناسایی شدند. سویه‌های مثبت جمع‌آوری شده از کشورهای کره جنوبی (۴۲ درصد) و ژاپن (۲۹/۹ درصد) بیشتر از سویه های مثبت محل های دیگر بود؛ در حالی که در سویه‌های جمع‌آوری شده از سنگاپور، سریلانکا و عربستان سعودی کمتر از ۱۰ درصد بود. از ۳۴۷ سویه مثبت، ۵۸ سویه (۴/۳ درصد از کل سویه‌های MRSA) به عنوان hVISA تأیید گردید که درصد آن در کشورهای مختلف به شرح زیر است: ژاپن (۸/۲ درصد)، هند (۶/۳ درصد)، کره جنوبی (۶/۱ درصد)، تایلند (۲/۱ درصد)، فیلیپین (۳/۶ درصد)، ویتنام (۲/۴ درصد) و سنگاپور (۲/۳ درصد)، اما هیچ سویه‌ای در چین، اندونزی، عربستان صعودی، سریلانکا و تایوان یافت نشد (۳۱). بر اساس این گزارش‌ها، میزان شیوع hVISA از صفر تا ۷۳/۷ درصد متغیر بود (۳۲، ۸).

در میان سویه‌های MRSA در کره جنوبی، hVISA با فراوانی پایینی (صفر تا ۰/۵ درصد) یافت شد (۳۳). با این وجود، داده‌ها نشان داد که ۶/۱ درصد از سویه‌های MRSA به‌صورت hVISA بودند. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق مشخص می‌شود که در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس سویه شده از بیمارستان های شهر کرمانشاه، مقاومت کامل در برابر ونکومایسین وجود ندارد و فقط دو مورد hVISA شناسایی شد که یکی از آن‌ها مربوط به تراشه در بخش ICU و دیگری مربوط به زخم در بخش توراکس بود.

در مطالعه Sancak و همکاران مقادیر MIC ونکومایسین ۴-۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید و همه سویه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۰). مطالعه دیگری نشان داد که هیچ مورد مقاوم یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین یافت نشد و MIC ونکومایسین حدود ۳-۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (۳۴).

با توجه به افزایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین در جهان، باید استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیماران به ویژه بیماران بستری و نیز کادر درمانی به صورت دقیق از لحاظ مقاومت و حساس بودن به ونکومایسین کنترل شوند. باید روش‌های دقیق تعیین مقاومت به ونکومایسین مانند E-test در آزمایشگاه‌های بالینی امکان‌پذیر و رایج گردد و کادر آزمایشگاه‌ها باید آموزش‌های لازم را در این مورد طی کنند و با اهمیت موضوع آشنا شوند.

لازم است پزشکان و متخصصین عفونی اهمیت شناسایی VSSA، Hvisa، VISA و VRSA را در عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در نظر بگیرند و سعی کنند بیماران را از این نظر مورد بررسی قرار دهند و با انجام تست حساسیت دقیق بر روی باکتری های جدا شده از بیماران، اقدام به درمان‌های مؤثر نمایند. همچنین لازم است با استفاده از روش‌های جدید ضد عفونی محیط به ویژه در بیمارستان‌ها، انتقال موارد VISA و VRSA را در بین کادر درمانی و بیماران بستری به حداقل رسانند.

اگرچه در مطالعه حاضر سویه های VISA و VRSA مشاهده نشد و این امر یک یافته امیدوار کننده در درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بالینی در جامعه می‌باشد، اما از سوی دیگر فراوانی سویه‌های hVISA شاید زنگ خطری برای مواجهه با سویه های مقاوم‌تر (VISA و VRSA) در آینده نزدیک در کشورمان باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که هزینه این تحقیق را در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۱۲٤ تقبل نمودند کمال تشکر را دارند

References

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology: with student consult Online Access. 6th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Health Sciences; 2008.
2. Nester E, Anderson D, Evans JRC. Microbiology: A Human Perspective. Boston, MA: McGraw-Hill Education; 2011.
3. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(3): 505-20.
4. Eveillard M, Martin Y, Hidri N, Boussougant Y, Joly-Guillou ML. Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(2): 114-20.
5. Oztoprak N, Cevik MA, Akinci E, Korkmaz M, Erbay A, Eren SS, et al. Risk factors for ICU-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Am J Infect Control* 2006; 34(1): 1-5.
6. Ahmed AO, van Belkum A, Fahal AH, Elnor AE, Abougroun ES, VandenBergh MF, et al. Nasal carriage of staphylococcus aureus and epidemiology of surgical-site infections in a Sudanese university hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3614-8.
7. Tamer A, Karabay O, Ekerbicer H. Staphylococcus aureus nasal carriage and associated factors in type 2 diabetic patients. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59(1): 10-4.
8. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Indian J Med Res* 2008; 127(1): 78-84.
9. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350(9092): 1670-3.
10. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hascelik G. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 519-23.
11. Reverdy ME, Jarraud S, Bobin-Dubreux S, Burel E, Girardo P, Lina G, et al. Incidence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(5): 267-72.
12. Lecaillon E, Gueudet P, Wooton M, Walsh TR, Macgowan AP, Jones ME. Endemic heteroresistant glycopeptide intermediate Staphylcoccus aureus (hGISA) comprising unrelated clonal types and not associated with vancomycin therapy. *Pathol Biol* (Paris) 2002; 50(9): 525-9. [In French].
13. Liu C, Chambers HF. Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10): 3040-5.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards* 2008; 26(3): 1-182.

15. Whitman WB, Parte A, Goodfellow M, Ka"mpfer P, Busse H, Trujillo ME, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Berlin, Germany: Springer; 2012.

16. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement. *nCCLS Document* M100-S14 2004; 24(1): 109.

17. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY: CSHL Press; 2001.

18. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5857-60.

19. Moza B, Varma AK, Buonpane RA, Zhu P, Herfst CA, Nicholson MJ, et al. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. *EMBO J* 2007; 26(4): 1187-97.

20. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 1998; 339(8): 520-32.

21. Mohajeri P, Izadi B, Rezaei M, Falahi B, Moradi Z, Zare ME. Study of nasal carriage Methicillin resistant Staphylococcus aureus in hemodialysis patients in Kermanshah. *Journal of Kermanshah Medical Sciences* 2012; 15(6): 485-92.

22. Haghgoo SM, Moadab SR, Rafei A. Study of antibiotic resistance pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from blood cultures in Tabriz Shahid Madani Hospital. *Jentashapir* 2012; 3(2): 383-90.

23. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of staphylococcus aureus to vancomycin. *Hormozgan Med J* 2011; 15(3): 169-77.

24. Hosain Zadegan H, Menati S, Tarrahi M, Mohammadi F. Screening of Methicillin and Vancomycin resistant Staphylococcus aureus in the nasal of hospital personnel of Khorram Abad. *Medical Laboratory Journal* 2008; 2(1): 26-32.

25. Spika JS, Peterson PK, Wilkinson BJ, Hammerschmidt DE, Verbrugh HA, Verhoef J, et al. Role of peptidoglycan from Staphylococcus aureus in leukopenia, thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteremia. *J Infect Dis* 1982; 146(2): 227-34.

26. Rich J, Lee JC. The pathogenesis of Staphylococcus aureus infection in the diabetic NOD mouse. *Diabetes* 2005; 54(10): 2904-10.

27. Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989; 219(1-2): 263-9.

28. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the mecA gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(4): 600-4.

29. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(6): 1000-18.

30. Hashemi H. Investigation on Vancomycin resistance in isulated Staphylococcus at Emam khomini medical center [Thesis]. Tabriz, Iran: Tabriz University of Medical Sciences; 2003.

31. Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of mecA-mediated resistance in Staphylococcus aureus in a large-scale study. *J Clin Microbiol* 2009; 47(1): 217-9.

32. Hsueh PR, Lee SY, Perng CL, Chang TY, Lu JJ. Clonal dissemination of meticillin-resistant and vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a Taiwanese hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(4): 307-12.

33. Warsa UC, Okubo T, Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of Staphylococcusaureus clinical isolates in Indonesia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 1996; 2(1): 29-33.

34. Ahmadi S, Nahaee M, Mozafari N. Study of antibiotic sensivity toward Vancomycin in *staphylocccusaureus* in clinical specimen in Tabriz. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2002; 30(2): 17-23.

Prevalence of Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

Parviz Mohajeri, Ph.D.[1], Abbas Farahani, M.Sc.[2], Abolfazl Davoodabadi, M.Sc.[3*], Omar Ghaderi, M.Sc.[2], Mohsen Rahnema, M.Sc.[4], Siamak Heidarzadeh, M.Sc.[3]

1. Assistant Professor of Bacteriology, Department of Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2. Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. Ph.D. Student, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Student, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding author; E-mail: davoodabadi89@gmail.com

(Received: 15 July 2013 Accepted: 27 Nov. 2013)

Abstract

Background & Aims: Staphylococcus aureus is one of the most common pathogens in nosocomial infections. Vancomycin is the most important therapeutic drug of choice for treatment of infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. Therefore, vancomycin-resistant Staphylococcus aureus (VRSA) or vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA) strains are warnings for the medical community. The aim of this study was to evaluate the prevalence of vancomycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from the nose of patients hospitalized in Imam Reza Hospital, Kermanshah, Iran.

Methods: In the present study, 85 strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus were isolated from patients in Imam Reza Hospital and evaluated for vancomycin resistance with microdilution test, Epsilometer test (E-test), and polymerase chain reaction (PCR).

Results: None of the strains were completely resistant to vancomycin; however, 39 strains (45.9%) were diagnosed as hetero-VRSA (hVISA) strains.

Conclusion: VISA and VRSA strains were not observed in this study which is a promising finding in the treatment of clinical infections due to Staphylococcus aureus in our society. However, in our study, the prevalence of hVISA strain was 45.9%, which is perhaps a sign of the appearance of more resistant strains (VISA and VRSA) in our country in the future.

Keywords: Staphylococcus aureus, Vancomycin, Nose, Methicillin, Hetero-vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA)

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(5): 394-404