

مقاومت به ونکومايسين با روشهای فنوتیپی و ژنوتیپی در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران

آسیه ایزانلو^۱، معصومه بحرینی^{۲*}، محمدرضا شریف مقدم^۲، ساغر صفامنش^۳، امیر عظیمیان^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ کارشناس ارشد ویروس شناسی، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۴ استادیار، گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

*نویسنده مسئول: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم

پست الکترونیک: mbahreini@ferdowsi.um.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم بیماریزای انسان است که باعث ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها می شود و ونکومايسين از بهترین داروها برای درمان عفونت های ناشی از آن است. استفاده بی رویه از ونکومايسين باعث بوجود آمدن ایزوله های مقاوم می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی احتمال حضور ایزوله های مقاوم به ونکومايسين و تعیین الگوی آنتی بیوتیکی آنها بود.

مواد و روش کار: در این پژوهش طی یک سال ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی بیماران جدا سازی شد. تمامی ایزوله ها به کمک تستهای کوآگولاز، کاتالاز، DNase و تخمیر قند مانیتول تعیین هویت شدند و حساسیت ایزوله ها برای ۹ آنتی بیوتیک با روش انتشار دیسک در آگار و همچنین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) ونکومايسين به روش رقت در آگار مطابق توصیه های موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی ژن مقاومت به ونکومايسين (vanA) استفاده شد.

یافته ها: در ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران، محدوده MIC ونکومايسين بین ۲-۰/۱۲۵ µg/ml بود و کلیه ایزوله ها به ونکومايسين حساس بودند. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد بیشترین میزان مقاومت مربوط به آمپی سیلین (۸۰٪) و کمترین میزان مربوط به ونکومايسين (۰٪) است.

نتیجه گیری: خوشبختانه هیچ نمونه مقاوم به ونکومايسين در بین ایزوله ها مشاهده نشد و این دارو هنوز کارایی لازم برای درمان عفونتهای استافیلوکوکوس اورئوس را دارد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت دارویی، ونکومايسين، ژن vanA

مقدمه

از سال ۱۹۸۰ میکروارگانیزم های گرم مثبت به خصوص استافیلوکوکوس اورئوسها به عنوان عامل اصلی عفونت های بیمارستانی پدیدار شدند [۱]. استافیلوکوکوس اورئوس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها، از عفونت های خفیف پوستی تا بیماری های سیستمیک تهدید کننده حیات مانند سپتیمی، اندوکاردیت، پنومونی و آبسه های عمیق پوستی می باشد [۲-۴]. علاوه بر بیماریهای ذکر شده، از دیگر دلایل اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت های آنتی بیوتیکی شاخص آن است که این امر به دلیل استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها، وجود توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای مقاومتی است [۵]. متی سیلین یک پنی سیلین مقاوم به پنی سیلیناز است که در سال ۱۹۶۰ عرضه شد. یک سال بعد از ورود متی سیلین به بازار گزارشی از اولین مورد از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA=Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) مشاهده گردید [۶]. پس از آن شیوع MRSA در سرتاسر دنیا به سرعت افزایش یافت و در سال ۲۰۰۳ موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) مقاومت به متی سیلین را ۶۴/۴٪ گزارش کرد [۷،۸]. ونکومايسين گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت اختلال ایجاد می کند و یکی از بهترین درمان ها علیه عفونت های MRSA در سه دهه ای اخیر بوده است؛ اما ظهور ایزوله هایی از استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت متوسط (Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus) و یا ایزوله های مقاوم به ونکومايسين (VISA= aureus) و VRSA= Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus) منجر به یک نگرانی جهانی درباره ی درمان عفونت های استافیلوکوکی گشته است [۹-۱۱]. در سال ۱۹۹۷ اولین مورد از ایزوله های VISA در ژاپن گزارش شد [۱۲]. پس از مدت اندکی در آمریکا و اروپا و کره نیز ایزوله های VISA مشاهده گشت [۱۳-۱۵]. در سال ۲۰۰۲ دو سویه از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين (VRSA) برای اولین بار از میشیگان و پنسیلوانیای آمریکا گزارش گردید [۱۶،۱۷].

ژن vanA بیشتر در *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* دیده شده و تنها ژن مقاومت به ونکومايسين می باشد که در استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است. این ژن بر روی ترانسپوزون ۱۵۴۶ Tn قرار دارد. این ترانسپوزون باعث انتقال این ژن به استافیلوکوکوس اورئوسهای مقاوم به متی سیلین شده و در نتیجه این ایزوله ها را به ایزوله های مقاوم به ونکومايسين تبدیل می کند [۱۸]. روش انتشار دیسک در آگار، روش قابل اعتمادی برای شناسایی ایزوله های مقاوم به ونکومايسين نمی باشد؛ لذا باید یک تست ونکومايسين آگار اسکرین برای شناسایی ایزوله های مقاوم به ونکومايسين به آزمایش ها اضافه شود [۱۹]. مطابق دستور العمل های CLSI استافیلوکوکوسهایی که دارای $MIC \leq 4 \mu g/ml$ (ونکومايسين) باشند، به عنوان ایزوله حساس به ونکومايسين (VSSA=Vancomycin-Susceptible Staphylococcus aureus)، ایزوله های دارای $MIC = 8-16 \mu g/ml$ را به عنوان ایزوله های با مقاومت حدواسط به ونکومايسين (VISA) و ایزوله هایی که دارای $MIC \geq 32 \mu g/ml$ باشند را ایزوله های مقاوم به ونکومايسين (VRSA) در نظر می گیرند و مقاومت به متی سیلین با MIC مساوی یا بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی لیتر و حساسیت به آن با MIC مساوی یا کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تعریف شده است [۲۰]. استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت هتروژن به ونکومايسين (Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus) سویه هایی از این باکتری می باشند که شامل زیرگروه های جمعیتی از سلولهای دختری VISA هستند ولی محدوده MIC ونکومايسين در سویه های والد $4-1 \mu g/ml$ بوده و حساس می باشند [۲۱،۲۲]. در سال ۲۰۱۲ عظیمیان و همکارانش توانستند یک نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين را از دستگاه تنفسی یک مرد ۲۶ ساله بستری شده در بیمارستان مشهد جداسازی نمایند و ویژگی های ژنتیکی این ایزوله را بطور کامل بررسی نمودند [۱۱]. وجود این نمونه مقاوم در مشهد باعث بوجود آمدن این احتمال شد که در منطقه بجنورد به دلیل داشتن موقعیت جغرافیایی نزدیک به مشهد، امکان حضور ایزوله

های مقاوم وجود دارد. از طرفی اغلب مطالعات صورت گرفته پیشین در منطقه بجنورد تنها محدود به آزمون انتشار دیسک بود اما در مطالعه حاضر بغیر از آزمون انتشار دیسک از روش حداقل غلظت مهاری و نکومایسین، و نکومایسین آگار اسکرین و واکنش زنجیره ای پلیمرز برای بررسی ژن *vanA* نیز استفاده شد.

شناسایی گونه های مقاوم به و نکومایسین و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها و همچنین مطالعه میزان انتشار این گونه ها برای تعیین اپیدمیولوژی و کنترل عفونت های ناشی از این باکتری ها بسیار مهم می باشد؛ لذا این مطالعه جهت بررسی حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از نمونه های بالینی نسبت به و نکومایسین و ارزیابی حضور *VRSA* در بجنورد طراحی شد.

روش کار

نمونه گیری: در این مطالعه توصیفی و آینده نگر و از نوع Cross-sectional طی یک سال از آبان ۹۳ تا مهر ۹۴ در بیمارستان امام رضا (ع) بجنورد انجام شد، تعداد ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های کلینیکی (زخم، خون، ادرار، CSF، کاتتر و غیره) جدا گشت. روش نمونه گیری غیرتصادفی آسان بود. نمونه های جدا شده از بیماران، ابتدا بر روی محیط آگار خوندار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شد. نمونه های کشت مثبت از نظر جنس استافیلوکوکوس که از بیمارستان امام رضا جمع آوری شده بودند مجدداً در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی بجنورد از نظر صحت هویت مورد بررسی قرار گرفت و مطابق روش های استاندارد میکروب شناسی، ایزوله های مشکوک به استافیلوکوک اورئوس با استفاده از تستهای رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز، DNase و کشت در محیط مانیتول سالت آگار شناسایی شد.

تست آنتی بیوگرام به روش Disk diffusion: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش انتشار دیسک در آگار کربی-بائر (Kirby-Baure) بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و با استفاده از سوسپانسیون باکتریایی برابر با کدورت نیم مک فارلند مطابق استاندارد توصیه شده CLSI برای دیسک های و نکومایسین،

تتراسایکلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمپی سیلین، کلیندامایسین، کوتریموکسازول، ریفامپین و سفوکسیتین (روسکو، دانمارک) تعیین شد. بدین ترتیب که نمونه ها با کمک سوآپ استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از آن با استفاده از پنس استریل دیسکهای آنتی بیوتیکی روی سطح محیط کشت قرار گرفت و پس از ۱۶ تا ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و طبق جدول استاندارد CLSI تفسیر گردید. کنترل کیفی دیسک ها نیز با استفاده از ایزوله استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC25923 انجام گرفت [۲۳-۲۵].

تست و نکومایسین آگار اسکرین: این تست جهت تایید نتایج تست دیسک دیفیوژن صورت می گیرد که در آن برای غربالگری ایزوله های *VRSA* از محیط BHI آگار حاوی ۶ میکروگرم در میلی لیتر پودر و نکومایسین (سیگما، آمریکا) استفاده شد. برای کنترل آزمایش از سویه های استاندارد *ATCC 29212 Enterococcus faecalis* استفاده شد [۲۳-۲۵].

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش رقت در آگار: مطابق توصیه CLSI برای تعیین MIC از محیط مولر هینتون آگار شامل رقت های متوالی از پودر آنتی بیوتیکهای و نکومایسین و اگزاسیلین (سیگما، آمریکا) به میزان ۴ رقت بالاتر از حد مقاوم و حساس استفاده شد که برای و نکومایسین شامل غلظتهای ۰/۱۲۵-۶۴ μg/ml و برای اگزاسیلین شامل غلظتهای ۰/۱۲۵-۲۵۶ μg/ml بود. لازم به ذکر است برای تعیین MIC اگزاسیلین محیط مولر هینتون آگار باید حاوی ۲/۵٪ NaCl باشد. به علت پایداری بیشتر اگزاسیلین که هم خانواده متی سیلین است، در تشخیص سویه های *MRSA* بجای متی سیلین از اگزاسیلین استفاده می شود.

یک میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری که به میزان یک دهم رقیق شده بود به محیط کشت های آماده تلقیح گشت. بعد از ۲۴ ساعت نتایج بررسی و پایین ترین غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد باکتری شده بود به عنوان MIC یادداشت گردید و مطابق استاندارد CLSI تفسیر شد. از سویه *Staphylococcus*

شناسایی محصول PCR: ژل آگاروز ۱٪ حاوی DNA Safe Stain تهیه گردید و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR نمونه های بالینی، کنترل مثبت شامل سویه Enterococcus faecalis ATCC 52199 و Staphylococcus aureus 43300 کنترل منفی شامل آب درون چاهک های ژل قرار داده شد و الکتروفورز صورت گرفت.

یافته ها

منابع و تعداد سویه های ایزوله شده استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه در نمودار ۱ نمایش داده شده است که نشان می دهد بیشترین ایزوله ها مربوط به نمونه زخم بودند. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۳۷ سال بود و از حداقل ۱ سال تا حداکثر ۹۰ سال متغیر بود. ۶۵ بیماران مرد و ۳۵ زن بودند. نتایج تست آنتی بیوگرام نشان داد که ایزوله های مورد مطالعه بیشترین مقاومت را به آمپی سیلین (۸۰٪) و کمترین مقاومت را به ونکومايسين (۰٪) داشتند. میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها در نمودار ۲ نمایش داده شده است.

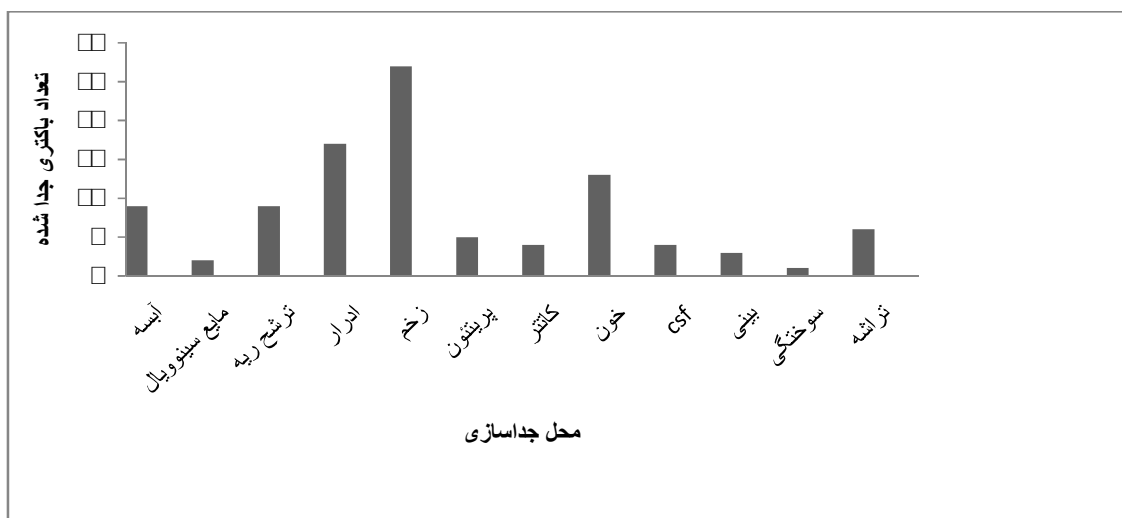
در آزمون حداقل غلظت مهاري اگزاسیلین ۴۴٪ ایزوله ها مقاوم بودند که این مقدار بیشتر از نتایج آزمون انتشار دیسک سفوکسیتین بود. بیشترین غلظت اگزاسیلین که ایزوله ها توانستند در آن رشد کنند ۳۲ µg/ml گزارش گردید و MIC اگزاسیلین بین محدوده ۳۲-۱۲۵/۰

ATCC 29212 aureus ATCC 29213 به عنوان ایزوله استاندارد در این مطالعه استفاده گردید [۲۶].

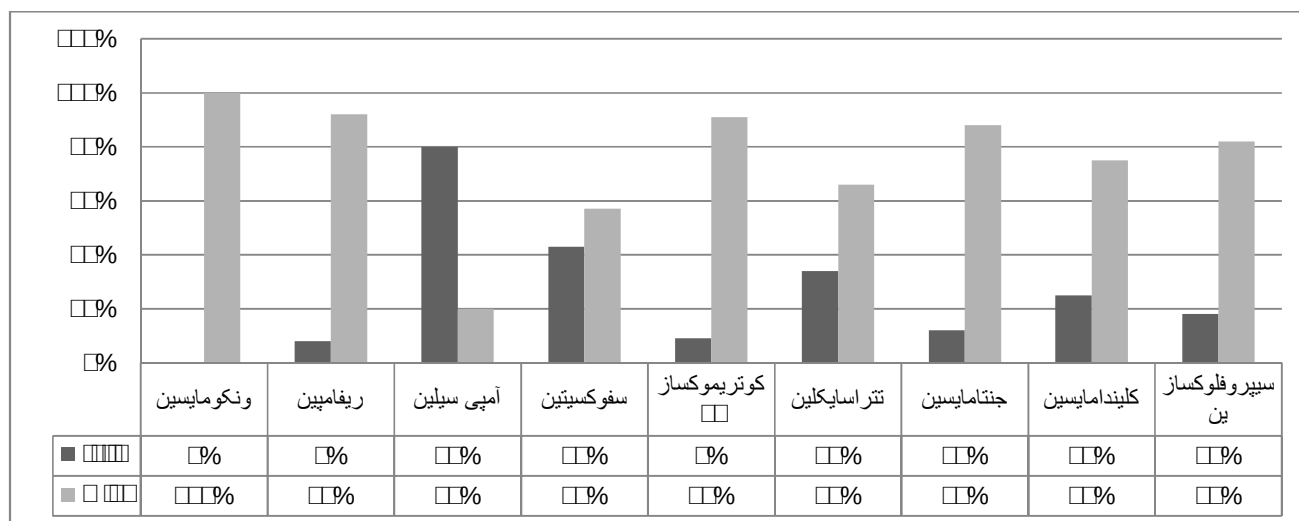
استخراج DNA از باکتری ها: برای استخراج DNA ایزوله های مورد مطالعه از کیت Genet Bio محصول کشور کره جنوبی استفاده شد که تمام مراحل استخراج طبق دستور العمل کیت انجام گردید.

PCR برای شناسایی ژن VanA: برای انجام PCR از آغازگرهای (Primer) معرفی شده برای ژن vanA استفاده شد [۱۱]. ترادف بازی این پرایمر ها عبارتند از vanA F 5' GGCAAGTCAGGTGAAGATG 3':
vanA R: 5' ATCAAGCGGTCAATCAGTTC 3'

برای انجام واکنش PCR از ۲۵ µl مخلوط حاوی: یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲ µl مسترمیکس شرکت GenetBio کشور کره جنوبی، ۵ µl از DNA الگو و ۶ µl آب دیونیزه استفاده شد. تکثیر قطعه مورد نظر با دمای واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس واسرشت سازی با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و سنتز قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. سپس ۴۰ چرخه تکرار شد و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.



نمودار ۱: منابع و تعداد ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه



نمودار ۲: مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در آزمون انتشار دیسک

جدول ۱: حداقل غلظت مهاری اگزاسیلین در ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

MIC	تعداد نمونه ها
۰/۱۲۵	۸
۰/۲۵	۱۴
۰/۵	۱۲
۱	۱۵
۲	۷
۴	۱۳
۸	۱۰
۱۶	۹
۳۲	۱۲
۶۴-۲۵۶	۰

جدول ۲: حداقل غلظت مهاری ونکومايسين در ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

MIC	تعداد نمونه ها
۰/۱۲۵	۴
۰/۲۵	۷
۰/۵	۲۰
۱	۴۰
۲	۲۹
۶۴-۴	۰

مورد مقاوم و یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین یافت نشد و MIC ونکومایسین حدود $3-1/5 \mu\text{g/ml}$ گزارش گردید [۲۹]. در مطالعه صفاری و همکاران در سال ۱۳۸۸ در کاشان MIC ونکومایسین حدود $4-0/5 \mu\text{g/ml}$ گزارش شد [۳۰] که تمام نتایج فوق با نتایج ما همخوانی دارد.

در سال ۲۰۰۸ علیقلی و همکارانش با مطالعه روی ۳۵۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس آنها را از نظر مقاومت به ونکومایسین مورد بررسی قرار دادند که ۲ مورد از نمونه ها VRSA بودند [۳۱]. در مطالعه ای که توسط تاتی^۳ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام گردید از ۳۵۶ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس ۷ مورد VRSA گزارش شد [۳۲]. در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۳ توسط مهاجری و همکارانش انجام گردید از ۸۵ ایزوله MRSA ۳۹ ایزوله hVISA بودند [۳۳].

در سال ۲۰۱۵ عبدالغدير^۴ و الحسن^۵ با مطالعه بر روی ۱۲۳ ایزوله MRSA آنها را از نظر مقاومت به ونکومایسین مورد بررسی قرار دادند که ۶/۵٪ آنها مقاوم بودند [۳۴] که نتایج فوق با مطالعه ما متفاوت می باشد. بانرجی^۶ و آنوپوربا^۷ در سال ۲۰۱۲ در هند دوسویه استافیلوکوکوس اورئوس یافتند که علی رغم داشتن ژن *vanA* مقاومت کامل را نشان نمی دادند [۳۵]. سعادت و همکارانش نیز ۶ سویه دارای ژن *vanA* یافتند که مقاومت را نشان نمی دادند [۳۶]. لذا در این مطالعه علی رغم اینکه در مراحل آزمون انتشار دیسک ونکومایسین، ونکومایسین آگار اسکرین و حداقل غلظت مهاري ونکومایسین تمام سویه ها حساس اعلام شدند؛ اما برای اطمینان از عدم حضور ژن مقاومت به ونکومایسین، واکنش PCR نیز انجام شد.

اهمیت ارگانایسم های VRSA و VISA از آنجاست که در صورت ایجاد عفونت ناشی از آنها درمان با ونکومایسین موفقیت آمیز نخواهد بود [۳۷]. بنابراین لازم است پزشکان و متخصصین عفونی اهمیت شناسایی ایزوله های

قرار داشت. نتایج MIC اگزاسیلین ایزوله های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در آزمون حداقل غلظت مهاري ونکومایسین کلیه ایزوله ها حساس به ونکومایسین بودند و هیچ ایزوله با مقاومت حد واسط یا مقام به ونکومایسین یافت نشد. بیشترین غلظت ونکومایسین که ایزوله ها توانستند در آن رشد کنند برابر $2 \mu\text{g/ml}$ بود که این نتایج نشان دهنده حساسیت ایزوله ها نسبت به ونکومایسین می باشد و MIC ونکومایسین بین محدوده $0/125-2 \mu\text{g/ml}$ قرار داشت. نتایج MIC ونکومایسین ایزوله های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در آزمون ونکومایسین آگار اسکرین نیز هیچ ایزوله ای رشد نکرد که تایید کننده تست حداقل غلظت مهاري است که نشان می دهد هیچ ایزوله مقاوم به ونکومایسینی مشاهده نشده است. در بررسی نتایج PCR نیز هیچ ژن مقاومی مشاهده نشد.

بحث

شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به ونکومایسین و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها و همچنین مطالعه میزان انتشار این گونه ها برای تعیین اپیدمیولوژی و کنترل عفونت های ناشی از این باکتری ها مهم است؛ لذا این مطالعه جهت بررسی حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از نمونه های بالینی نسبت به متی سیلین و ونکومایسین در بجنورد طراحی شد که ۴۴٪ ایزوله ها مقاوم به متی سیلین و تمامی ایزوله حساس به ونکومایسین بودند.

در این مطالعه نمونه های با مقاومت حد واسط به ونکومایسین (VISA) و مقاوم به ونکومایسین (VRSA) یافت نشد و MIC ونکومایسین بین محدوده $0/125-2 \mu\text{g/ml}$ گزارش گردید.

در مطالعه سنکیک^۱ در سال ۲۰۰۵ در ترکیه مقادیر MIC ونکومایسین $4-0/125 \mu\text{g/ml}$ گزارش گردید و همه ایزوله ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند [۲۷]. در مطالعه لئونارد^۲ و همکارانش در آمریکا در سال ۲۰۰۷ MIC ونکومایسین $2-0/125 \mu\text{g/ml}$ گزارش گردید [۲۸]. در مطالعه دیگری در تبریز در سال ۱۳۸۵ نیز هیچ

3 -Thati
4-Abdelgadeir
5 -Elhassan
6 -Banerjee
7 -Anupurba

1 -Sancak
2 -Leonard

VRSA و VISA را در عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته و سعی کنند بیماران را از این نظر مورد بررسی قرار دهند و با انجام تست حساسیت دقیق بر روی باکتریهای جدا شده از بیماران، اقدام به درمان های مؤثر نمایند.

نتیجه گیری

در نقاط مختلف جهان پژوهش هایی که در مورد پیدایش استافیلوکوک های مقاوم به ونکومايسين انجام شده نشان دهنده تعداد معدودی از ایزوله های مقاوم به ونکومايسين در گونه های استافیلوکوکوس اورئوس است. در پژوهش حاضر نیز سویه های دارای مقاومت کامل و مقاومت حد واسط به ونکومايسين شناسایی نشد و این یک یافته امیدوار کننده در درمان عفونت های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است اما مقاومت به آگزايسيلين (۴۴٪) میزان قابل توجه و نگران کننده ای را نشان می دهد که لازم است سیستم های نظارتی موثری برای کنترل عفونت های ناشی از MRSA های مقاوم به چند دارو وجود داشته باشد و برای درمان صحیح عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مؤثر باید استفاده غیر ضروری از آنتی بیوتیک های در دسترس را منع کرد. با توجه به افزایش هر ساله ایزوله های مقاوم به متی سیلین و تغییر الگوی آنتی بیوتیکی در استافیلوکوک ها لازم است که بررسی های دوره ای ۲ تا ۳ سال یک بار انجام شود.

همچنین پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی حجم نمونه افزایش یابد و از بیمارستان های متعدد در نقاط دیگر شهر نیز نمونه برداری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که بخشی از هزینه های این پژوهش را تقبل نمودند (کد ۳/۳۸۵۷۹) و نیز از سرکار خانوم نجومی کارشناس آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) و سرکار خانم معماریانی کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی بجنورد که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند اعلام می دارند.

References

1. Silva ECBFd, Antas MdGC, Neto B, Monteiro A, Rabelo MA, Melo FLd, Maciel MAV, Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* in health care workers at a university hospital of Recife-PE, "Braz J Infect Dis. 2008;12(6):504-8.
2. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E, Patients with Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation, *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2012;3(1):48-55.
3. Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, "et al", LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol*, 2011;49(1):111-7.
4. 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.
5. Chambers HF, DeLeo FR, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era, *Nat Rev Microbiol*, 2009;7(9):629-41.
6. Mohanasoundaram K, Lalitha M, Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Indian J Med Res*. 2008;127(1):78.
7. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, "et al", Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003, *Clin Infect Dis*. 2006;42(3):389-91.
8. System NNIS, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, *Am J Infect Control*. 2004;32(8):470
9. Burnham C-AD, Weber CJ, Dunne WM, Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microb*, 2010;48(3):949-51.
10. Satola S, Lessa F, Ray S, Bulens S, Lynfield R, Schaffner W, "et al", Clinical and laboratory characteristics of invasive infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates demonstrating a vancomycin MIC of 2 micrograms per milliliter: lack of effect of heteroresistant vancomycin-intermediate *S. aureus* phenotype, *J Clin Microb*, 2011;49(4):1583-7.
11. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, "et al", Genetic, characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran, *J Clin Microb*. 2012;50(11):3581-5[Persian]
12. Lowy FD, Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*, *J Clin Invest*, 2003;111(9):1265-73.
13. Centers for Disease control and prevention *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United states, *Morb Mortal WKLY Rep* 1997; 46: 765-6.
14. Ploy M, Grelaud C, Martin C, De Lumley L, Denis F, First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital, *The Lancet*, 1998;351(9110):1212.
15. Kim M-N, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K, Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea, *J Clin Microbiol*, 2000;38(10):3879-81.
16. Center for Disease control and prevention, Prevention, *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51(26):565.
17. Center for Disease control and prevention, Prevention, Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51(40):902.
18. Eshraghi Ss, Talebi M, Pourshafie M, Salari M, The prevalence and molecular characterization of vancomycin resistant gram positive cocci isolated from patients in Tehran, Iran *J Med Microbiol*, 2007;1(3):9-15[Persian]
19. Schmitz F-J, Krey A, Geisel R, Verhoef J, Heinz H-P, Fluit A, Susceptibility of 302 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(7):528-30.
20. CLSI C, M100-S22: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement, CLSI document M100-S22. 2012.

21. Kim ES, Bae I-G, Cho JE, Choi YJ, Kim I-H, Kang G-S, "et al", Clinical and Molecular Characterization of Invasive Heteroresistant Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Infections in Korean Hospitals, J Clin Microbiol, 2016;54(3):760-3.
22. Song J-H, Hiramatsu K, Suh JY, Ko KS, Ito T, Kapi M, "et al", Emergence in Asian countries of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin, Antimicrob Agents Chemother, 2004;48(12):4926-8.
23. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Standard - 11th ed CLSI document M02-A11. CLSI, 950 West Valley Rd., Suite 2500 2010.
24. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard - 11th ed 2010.
25. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, Molecular cloning, A laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory press; 2003.
26. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-9th ed 2012, CLSI document M07-A9.
27. Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu Ş, Haşcelik G, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital, J Antimicrob Chemother, 2005;56(3):519-23.
28. Leonard SN, Cheung CM, Rybak MJ, Activities of ceftobiprole, linezolid, vancomycin and daptomycin against community-associated and hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Antimicrob Agents Chemother 2008;52(8):2974-6.
29. AHMADI SS, Nahaei M, AMIR MN, Sensitivity of staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens against vancomycin by using E-test in Tabriz, Med J Tabriz Univ Med Sci 2008 Jun;30(2):17-23 [Persian]
30. Saffari M, Jokar M, Shajary GR, Piroozmand A, Mousavi SGA, Minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus isolates collected from clinical samples of Shahid Beheshti hospital, kashan during 2009, Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences, 2010;14(3) [Persian]
31. Aligholi M, Emameini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H, Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran, Med Princ Pract. 2008;17(5):432-4 [Persian]
32. Thati V, Shivannavar CT, Gaddad SM, Vancomycin resistance among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad, Indian J Med Res. 2011;134(5):704.
33. Mohajeri P, Farahani A, Davoodabadi A, Ghaderi O, Rahnema M, Heidarzadeh S, Prevalence of Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus, J Kerman Univ Med Sci 2014;21(5):394-404 [Persian]
34. Abdelgadeir LM, Elhassan MM, Van B Positive Vancomycin-Resistant Staphylococcus Aureus among Clinical Isolates in Shendi City, Northern Sudan, IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS), 2015; 1(14):87-91.
35. Banerjee T, Anupurba S, Colonization with vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strains containing the vanA resistance gene in a tertiary-care center in north India, J Clin Microbiol, 2012;50(5):1730-2.
36. Saadat S, Solhjoo K, Norooz-Nejad M-J, Kazemi A, VanA and vanB positive vancomycin-resistant Staphylococcus aureus among clinical isolates in Shiraz, south of Iran, Oman Med J, 2014;29(5):335 [Persian]
37. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson Dunn B, "et al", Emergence of vancomycin resistance Staphylococcus aureus, Glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus working Group, N Engl J Med 1999; 340(7): 493-501

Evaluation of vancomycin resistance by Phenotypic and genotypic methods among *S. aureus* strains isolated from patients

Izanloo A¹, Bahreini M^{2*}, Sharifmoghadam MR², safamanesh S³, Azimian A⁴

¹Ms in Microbiology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University Of Mashhad, Mashhad, Iran

²Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³Ms in Virology, Department of Pathobiology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

***Corresponding Author:** Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
mbahreini@ferdowsi.um.ac.ir

Abstract

Background & Objective: *Staphylococcus aureus* is one the main human pathogens which is involved in a wide range of infections. Although, Vancomycin is one of the best drugs to treat infections which are caused by *S. aureus*, indiscriminate use of vancomycin causes resistant strains. The aim of this study was to investigate the possible presence of vancomycin resistant strains and determination of their antibiogram patterns.

Material and Methods: In the present study, *Staphylococcus aureus* was isolated from the 100 clinical specimens. All the isolates were identified using gram staining, catalase test, tube coagulase test, growth on Mannitol salt agar medium, and the DNase test. Susceptibility of the isolates against 9 different antimicrobial agents was investigated using the standard disk diffusion. MIC values of vancomycin was also tested by agar dilution methods, according to the CLSI. Moreover, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to detect the *vanA* gene.

Results: All of the *Staphylococcus aureus* isolates were sensitive to vancomycin (MIC value ranged from 0.125 to 2 µg/mL). Ampicillin and vancomycin revealed the highest and lowest resistance rates with 80% and 1%, respectively.

Conclusion: Fortunately, vancomycin resistant *staphylococcus aureus* was not found among the tested isolates in this study. Therefore, vancomycin can still be used in treatment of *Staphylococcus aureus* infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Vancomycin, *vanA* gene