



فصلنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال چهاردهم، شماره ۳، صفحه ۱۷۲ - ۱۶۵ (پاییز ۱۳۹۰)

بررسی شیوع مقاومت به متی‌سیلین و وانکومايسين در استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی

جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد ۱۳۸۸

لاله شریعتی<sup>۱</sup>، مانا شجاع‌پور<sup>۲</sup>، مجید ولیدی<sup>۱</sup>، غفت فرخی<sup>۱</sup>، محمدامین طباطبائی فرا<sup>۱</sup>، علی کریمی<sup>۱</sup>، محمدرضا نفیسی<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

<sup>۲</sup> گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

<sup>۴</sup> گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

## چکیده

**زمینه:** وانکومايسين به‌طور وسیع در درمان عفونت‌هایی با عامل استافیلوکوک کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین (MRCoNS) استفاده می‌گردد. پیدایش سویه‌های استافیلوکوک کواگولاز منفی با مقاومت کامل (VRCoNS) (Vancomycin Resistant Coagulase Negative Staphylococci) و حد واسط (VICoNS) (Vancomycin Intermediate Coagulase Negative Staphylococci) به وانکومايسين در نقاط مختلف جهان باعث نگرانی شده است. ما در این مطالعه میزان شیوع MRCoNS (Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci) و پیدایش VICoNS و VRCoNS را در بیمارستان‌های شهرکرد مورد مطالعه قرار دادیم.

**مواد و روش‌ها:** هشتاد و هشت ایزوله استافیلوکوک کواگولاز منفی (CoNS) از میان ۲۸۴ ایزوله استافیلوکوک جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های شهرکرد، شناسایی گردید. سپس الگوی حساسیت ضد میکروبی برای ۱۲ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با چندین روش شناسایی شدند: دیسک دیفیوژن، E-test و Real-time PCR استافیلوکوک کواگولاز منفی. سویه‌های مقاوم به وانکومايسين هم با چندین روش شناسایی شدند: E-test، آگار اسکرین و Duplex-PCR.

**یافته‌ها:** با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مشخص گردید که ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها مقاوم به پنی‌سیلین هستند، در حالی که کمترین مقاومت (۳۳ درصد) برای افلوکساسین مشاهده گردید. چهل و شش سویه CoNS مقاوم به متی‌سیلین بوده و هیچکدام از سویه‌ها دارای کاهش حساسیت به وانکومايسين نبوده و در روش PCR حامل ژن‌های vanA و vanB نبودند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه شیوع بالایی MRCoNS را در بیمارستان‌های شهرکرد نشان داد، اما هنوز خوشبختانه مقاومت به وانکومايسين مشاهده نشده است.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوک کواگولاز منفی، مقاوم به وانکومايسين، مقاوم به متی‌سیلین، شیوع

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۱۰ - پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۳۰

\*شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

E-mail: [mr\\_nafisi@yahoo.com](mailto:mr_nafisi@yahoo.com)

## مقدمه

استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی (Coagulase Negative Staphylococci, CoNS) پاتوژن‌های بسیار مهم فرصت‌طلب و عامل عفونت‌های حاد به‌خصوص در بیماران دارای نقص ایمنی و بیماران با وسایل تهاجمی می‌باشند (۱). به‌علاوه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه مقاومت به متی‌سیلین در گونه‌های این باکتری، همچون سویه‌های استافیلوکوک اورئوس، رو به افزایش است. درمان تجربی منتخب برای عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، اغلب وانکومایسین می‌باشد. تشخیص صحیح و سریع مقاومت به متی‌سیلین ضروری است تا درمان ضد میکروبی مناسب اتخاذ شود (۱ و ۲).

سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci, MRCoNS) در بیمارستان‌هایی که برای بیماران قلبی، دریچه‌های مصنوعی قلب به‌کار گرفته می‌شود مشکلات فراوانی را ایجاد می‌نمایند. وانکومایسین داروی انتخابی برای درمان اندوکاردیت حاصله از این سویه‌ها و سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus) (MRSA) محسوب می‌شود (۳). این داروی استراتژیک بهتر است فقط برای درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های سیستمیک مانند پنومونی و اندوکاردیت ناشی از این باکتری‌ها اختصاص داده شود. چنانچه وانکومایسین همراه با ریفامپین یا جنتامایسین مصرف شود توانائی آن در برابر چنین سویه‌هایی افزایش می‌یابد (۴). با این حال باید توجه داشت که نباید مصرف وانکومایسین به‌صورت بی‌رویه افزایش یابد، چون در این صورت با افزایش جمعیت انتروکوک‌های

واجد پلاسمید حاوی ژن مقاومت به وانکومایسین مواجه خواهیم شد و احتمال انتقال این پلاسمیدها از طریق کونژوگاسیون به سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس زیاد است (۵-۷).

مکانیسم مقاومت به وانکومایسین در سویه‌های CoNS هنوز ناشناخته است. وانکومایسین با اتصال غیرقابل برگشت به دی‌آلانیل-دی‌آلانین انتهائی پیش‌سازهای دی‌ساکارید - پنتاپتید دیواره عمل کرده و سنتز دیواره باکتری را مهار می‌کند. انتروکوک‌ها با جایگزین کردن لاکتات به جای آلانین انتهائی، که تمایل بسیار پائینی به وانکومایسین دارد، مقاومت به وانکومایسین را ایجاد می‌کند (۳ و ۸). تحقیقات در مورد مقاومت به وانکومایسین در CoNS نشان داده که پیش‌سازهای دیواره، به‌صورت تغییر شکل یافته‌ای سنتز شده است اما میزان آن برای این سطح مقاومت پائین می‌باشد. آنالیز پپتیدوگلیکان دیواره در CoNS بسیار مقاوم حضور پل‌های عرضی تغییر شکل یافته را نسبت به سویه‌های حساس نشان داده است. مشخص شده است که این پل‌های عرضی تغییر شکل یافته، اتصال وانکومایسین به پپتیدهای هدف را مهار می‌نماید، با این وجود، این فرضیه هنوز اثبات نشده است. مقاومت به وانکومایسین در CoNS چند عاملی است، ولی مکانیسم دقیق آن روشن نیست (۸).

هدف از این مطالعه، بررسی شیوع مقاومت به متی‌سیلین و پیدایش مقاومت به وانکومایسین در سویه‌های CoNS جدا شده می‌باشد، تا بتوان به یک پیش‌آگهی برای انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در برخورد با بیماران آلوده به باکتری‌های مزبور دست یابیم.

## مواد و روش کار

در این تحقیق توصیفی-تحلیلی از بین ۲۸۴ مورد استافیلوکوک که به‌طور تصادفی از نمونه‌های کلینیکی (زخم، خون، ادرار، CSF، کاتتر درون رگی و غیره) بیمارستان‌های آموزشی هاجر و کاشانی شهرکرد در سال ۱۳۸۸ جدا شدند، سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی (CoNS) با تست‌های بیوشیمیایی و آنزیمی نظیر کاتالاز، کوآگولاز و DNase شناسائی گردیدند. تعیین حساسیت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک به‌روش دیسک دیفیوژن. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه گردیدند (های‌مدیا-هندوستان) و تست دیسک دیفیوژن برای آنتی‌بیوتیک‌های آگراسیلین (۱ میکروگرم)، سپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، کوتریماکسازول (۲۵ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، جتتامایسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، افلوکساسین (۵ میکروگرم) با استفاده از روش Kirby-Bauer طبق استانداردهای CLSI انجام گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد. نتایج طبق جدول استانداردهای CLSI، ثبت گردید (۹). برای تعیین حساسیت نسبت به متی‌سیلین، بنا بر توصیه‌های NCCLS از آگراسیلین استفاده شد که در شرایط آزمایشگاهی پایدارتر از متی‌سیلین است و نیز قادر به تشخیص مقاومت تقاطعی می‌باشد. هم‌چنین روش Agar screen استفاده شد که نسبت به کاستی‌های دیسک دیفیوژن ارجح‌تر است (۹).

## روش وانکومایسین آگار اسکرین

غربال‌گری برای تشخیص مقاومت به وانکومایسین روی محیط عصاره مغز-قلب (Brain Heart Infusion, BHI)

محتوی ۶ میلی‌گرم وانکومایسین در هر لیتر همان‌طور که توسط Tiwary شرح داده شد انجام گردید (۱۰). تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (Determination of Minimum Inhibitory Concentration, MIC) کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) آگراسیلین و وانکومایسین با روش E-test (AB BIODISK, Solna, Sweden) تعیین گردید. ابتدا با سوآپ استریل از سوسپانسیون سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی واجد کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند، به‌طور یکنواخت بر روی محیط مولر هیتون آگار واجد ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم (NaCl) کشت داده شد. سپس به‌وسیله پنس، با دقت و رعایت شرایط آسپتیک، دو استریپ E-test آگراسیلین و وانکومایسین روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲۰-۱۶ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نتایج با مقیاس میکروگرم بر میلی‌لیتر ( $\mu\text{g/ml}$ ) خوانده شد. (آگراسیلین: حساس ( $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ) مقاوم ( $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ )) وانکومایسین: حساس ( $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ) حد واسط (۱۶-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقاوم ( $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ). سویه‌های استافیلوکوک اورئوس (ATCC 29213) و استافیلوکوک اورئوس (ATCC 43300) به‌ترتیب به‌عنوان کنترل حساس به متی‌سیلین و مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوک فکالیس (ATCC 29212) و انتروکوک فکالیس (A256) به‌ترتیب به‌عنوان کنترل حساس به وانکومایسین و مقاوم به وانکومایسین بکار برده شدند.

## تشخیص استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی از استافیلوکوک

## اورئوس با روش Real-time PCR

جهت استخراج DNA از کیت Magnesil (پرومگا، امریکا) استفاده شد. ژن nuc، یک ژن اختصاصی برای شناسائی استافیلوکوک اورئوس است. این ژن به‌روش Taqman Real-time PCR تشخیص داده شد. پرایمرها و پروب مورد استفاده در جدول شماره ۱

اپیدرمیدیس (ATCC 12228) و استافیلوکوک اورئوس (ATCC 43300) به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شدند.

#### تشخیص ژن *mecA* با تکنیک Real-time PCR

پرایمرها و پروب استفاده شده در جدول ۱ ذکر شده است (۱۱). تهیه مخلوط PCR مشابه آنچه در مرحله قبل گفته شد، انجام گردید. از سویه‌های استافیلوکوک اورئوس (ATCC 29213) و استافیلوکوک اورئوس (ATCC 43300) به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس و سایر استافیلوکوک‌ها یکسان است (۷).

ذکر شده است (۱۱). ۶/۲۵ میکرولیتر master mix (2x) (امپلیکون، امریکا)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (10PM) (متابیون، آلمان)، ۰/۵ میکرولیتر پروب (5 PM) (متابیون، آلمان)، ۱ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (50mM) (سیناژن، ایران)، ۱/۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲/۵ میکرولیتر DNA باکتری. سپس این مخلوط در دستگاه Real-time rotary analyzer (Rotor- Gene 3000) با سیکل دمایی: ۳۰ ثانیه 95°C (۳۰ سیکل) و ۱ دقیقه 60°C قرار داده شد. با این روش سویه‌های استافیلوکوک اورئوس شناسایی شده و سایر استافیلوکوک‌ها به عنوان استافیلوکوک کواگولاز منفی تلقی شدند. استافیلوکوک

جدول ۱) پرایمرها و پروب ژن *mecA* و *nuc* که به روش Real-time PCR شناسایی شدند

پرایمر و پروب	ترادف (۵'→۳')	رنگ نشانگر	غلظت واکنش دهنده (پیکوکول)
<b>nuc</b>			
nuc For	5'CAAAGCATCAAAAAGGTGTAGAGA3'		10
nuc Rev	5'TTCAATTTTCTTTGCATTTTCTACCA3'		10
nuc Probe	5'TTTTCGTAATGCACTTGCTTCAGGACCA3'	FAMa	5
<b>mecA</b>			
mecA For	5'GGCAATATTACCGCACCTCA3'		10
mecA Rev	5'GTCTGCCACTTTCTCCTTGT3'		10
mecA Probe	5'AGATCTTATGCAAACCTAATTGGCAAATCC3'	FAMa	5

(۵۰ میلی‌مولار) (سیناژن، ایران)، ۱۵/۲ میکرولیتر آب مقطر و ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم تک DNA پلیمراز و ۱ میکرولیتر DNA باکتری. مخلوط PCR در دستگاه ترموسایکلر ASTECT (فوکوکا، ژاپن) با برنامه دمایی: ۱۰ دقیقه در ۹۴ °C، ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه 95°C و ۳۰ ثانیه ۵۵ °C و ۳۰ ثانیه ۷۲ °C در انتها ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C قرار داده شد. پس از اتمام واکنش duplex PCR محصول آن روی ژل اکریل آمید بیس‌اکریل امید ۴۰ درصد برده شد و

#### تشخیص ژن *vanA* با تکنیک duplex PCR

در این مطالعه از ژن 16S rRNA به عنوان کنترل داخلی و برای تأیید انجام موفق PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است (۱۰ و ۱۲). مخلوط PCR (۲۵ میکرولیتر) شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (2X) (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ژن *vanA* (۱۰ پیکومول) (متابیون، آلمان)، ۰/۱ میکرولیتر از هر پرایمر ژن 16S rRNA، ۲ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>

پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، باندهای DNA به‌اندازه ۱۰۳۰ جفت باز مربوط به ژن *vanA* و ۴۷۹ جفت باز مربوط به ژن 16S rRNA مشاهده گردید.

#### جدول ۲) پرایمرها و پروب ژن *vanA* و *vanB* و 16S rRNA که به روش Duplex PCR

غلظت واکنش دهنده (پیکومول)	ترادف (۵'→۳')	پرایمر
10		<i>vanA</i>
10	5'CATGAATAGAAATAAAAAGTTGCAATA3'	<i>vanA</i> For
	5'CCCCTTTAAACGCTAATACGACGATCAA3'	<i>vanA</i> Rev
		<i>vanB</i>
10	5'GTGACAAAACCGGAGGCGAGGA3'	<i>vanB</i> For
10	5' CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA3'	<i>vanb</i> Rev
		16S rRNA
10	5'GGA ATT CAA ATG AAT TGA CGG GGG3'	16S rRNA For
10	5'CGG GAT CCC AGG CCC GGG ACC GTA TTC AC3'	16S rRNA Rev

درصد) مقاوم به آگراسیلین، ۳۷ (۴۲ درصد) مقاوم به جتتامایسین، ۴۱ (۴۶/۶ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۴۷ (۵۳/۴ درصد) مقاوم به اریترومايسين، ۵۴ (۶۱/۴ درصد) مقاوم به تتراسیکلین، ۳۴ (۳۸/۶ درصد) مقاوم به کوتریماکسازول، ۴۳ (۴۸/۹ درصد) مقاوم به کلیندامایسین، ۳۳ (۳۷/۵ درصد) مقاوم به سفازولین، ۲۹ (۳۳ درصد) مقاوم به افلوکساسین، ۴۶ (۵۲/۳ درصد) مقاوم به سفوکسیتین و ۷۳ (۸۳ درصد) مقاوم به آمپی‌سیلین.

MIC این سویه در مقابل آگراسیلین نشان داد که ۴۶ سویه مقاوم به آگراسیلین بودند ( $MIC \geq 4 \mu g/ml$ ). MIC همه سویه‌ها حساسیت به وانکومايسين را نشان داد ( $MIC \leq 4 \mu g/ml$ ) و MIC این سویه‌ها بین ۰/۳۳ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود، MIC ۲ سویه ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که هر دو آنها MRCoNS بودند. هیچ‌کدام از این سویه‌ها در محیط BHI محتوی ۶ میلی‌گرم وانکومايسين در هر لیتر رشد نکردند. همه ایزوله‌هایی که به‌روش E-test (۴۶ سویه، ۵۲/۳ درصد) مقاوم به آگراسیلین بودند دارای ژن *mecA* بودند و هیچ‌کدام از سویه‌ها حامل ژن‌های *vanA* و *vanB* نبودند.

سویه‌های انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212) و انتروکوکوس فکالیس (A256) به‌عنوان کنترل منفی و مثبت برای این ژن استفاده شدند.

#### تشخیص ژن *vanB* با تکنیک duplex PCR

شناسایی ژن *vanB* و 16S rRNA با تکنیک duplex PCR انجام گرفت. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است (۱۰ و ۱۲). تهیه مخلوط PCR و برنامه دمائی مشابه مرحله قبل می‌باشد. سویه‌های انتروکوکوس فکالیس (ATCC29212) و انتروکوکوس فکالیس (V583) به‌عنوان کنترل منفی و مثبت برای این ژن استفاده شدند.

#### نتایج

از بین ۲۸۴ ایزوله استافیلوکوک ۸۴ ایزوله دی-ان‌آز منفی، ۸۲ ایزوله کوآگولاز منفی بودند. ۹۲ ایزوله قادر به تخمیر مانیتول نبودند، و در ۸۸ ایزوله، ژن *nuc* وجود نداشت. بنابراین ۸۸ ایزوله به‌عنوان استافیلوکوک‌های غیر استافیلوکوک اورئوس تأیید شدند. یعنی عدم وجود ژن *nuc* به‌عنوان استاندارد طلائی در نظر گرفته شده است (۱۱). الگوی حساسیت ضد میکروبی این ۸۸ ایزوله به این گونه بود: ۸۸ (۱۰۰ درصد) مقاوم به پنی‌سیلین، ۴۶ (۵۲/۳

## بحث

در ایران انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا، به‌عنوان یک چالش مهم برای جامعه پزشکی مطرح است (۱۳). مطالعه ما نشان می‌دهد که در بین سویه‌های CoNS، ۱۰۰ درصد موارد، مقاوم به پنی‌سیلین و ۸۳ درصد مقاوم به آمپی‌سیلین بودند. در این مطالعه میزان مقاومت به سفوکسیتین و آگراسیلین کاملاً مشابه هم (۵۲/۳ درصد) بود و کمترین مقاومت، در افلوکسازین (۳۳ درصد) دیده شد. در یک مطالعه، مقاومت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین به‌ترتیب ۹۸/۱ درصد و ۹۵/۹ درصد گزارش شده است (۱۴). اما در مطالعه‌ای دیگر استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی بیشترین مقاومت را به‌ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های کلوزاسیلین (۸۰/۹ درصد)، سفیکسیم (۷۶/۹ درصد)، پنی‌سیلین (۶۷/۶ درصد) و آگراسیلین (۶۶/۷ درصد) نشان دادند (۱۵).

سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین یک مشکل مهم درمانی عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند. پایش مستمر این سویه‌ها در جمعیت‌های میکروبی خصوصاً در بیمارستان‌ها (که به‌طور بالقوه باعث عفونی شدن افراد مستعد و ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به‌درمان به‌صورت موردی یا اپیدمی می‌گردد) اقدامی ضروری محسوب می‌شوند (۱۶).

یکی از اهداف این پژوهش، تعیین میزان وفور مقاومت به آگراسیلین در بین ایزوله‌های CoNS جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد در سال ۱۳۸۸ بود. که براساس نتایج به‌دست آمده، ۵۲ درصد سویه‌ها، MRCoNS بودند. این یافته‌ها تا حدودی مطابق با مطالعات انجام شده در تهران (۴۳/۷ درصد) بوده است (۱۷). در حالی‌که در یک مطالعه در اهواز این میزان ۲۶/۶۷ درصد بوده است (۱۸).

عمده‌ترین مزیت این پژوهش نسبت به سایر مطالعات

انجام شده در کشور این است که سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی که تاکنون پژوهش کمتری بر روی آن صورت گرفته بود، بررسی شده‌اند. به‌علاوه زمان این مطالعه (یک سال) نسبت به بیشتر مطالعات انجام شده در کشور (بین ۱ تا ۶ ماه) طولانی‌تر بوده است. مزیت دیگر این بررسی در روش کار است به گونه‌ای که برای افزایش حساسیت و دقت در تشخیص MRCoNS، علاوه بر روش متداول دیسک دیفیوژن، از روش‌های تعیین MIC (E-test) و شناسایی ژن *mecA* (Real-time PCR) استفاده شد. حال آن‌که، در اکثر مطالعات دیگر تنها از روش دیسک دیفیوژن استفاده شده است. شباهت‌ها و تفاوت‌های دیده شده در مقادیر مقاومت در میان مطالعات مختلف عمدتاً می‌تواند ناشی از اختلاف در ناحیه جغرافیایی، زمان مطالعه، بیمارستان‌ها و بخش‌های مورد مطالعه، وضعیت بیماران (بستری یا سرپایی) و نوع عفونت (خون، سوختگی، عفونت‌های پوستی و غیره) باشند.

تأثیر عوامل فوق‌الذکر در دو مطالعه وسیع اپیدمیولوژی در سال ۲۰۰۳ در اروپا و در بین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ در ایالت متحده، کانادا، امریکای لاتین، اروپا و کشورهای جنوب شرقی آسیا بررسی شده و مورد تأکید قرار گرفته‌اند (۱۹ و ۲۰). با وجود اختلاف‌های موجود در مقادیر مقاومت بیمارستانی و افزایش سال به سال سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین، ضروری است به دلیل تغییر الگوی آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوک‌ها، بررسی دوره‌ای ۳ تا ۴ سال یک‌بار انجام شود (۲۱ و ۲۲).

در نقاط مختلف جهان مطالعاتی در مورد پیدایش استافیلوکوک‌های مقاوم به وانکومایسین انجام شده است. تعداد معدودی از سویه‌های مقاوم به وانکومایسین در بین گونه‌های استافیلوکوک اورئوس گزارش شده است. در مورد سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی نیز سویه‌های دارای مقاومت به وانکومایسین گزارش شده است، اما این

از سویه‌های مقاوم به آگراسیلین، به انکومایسین نیز مقاوم بودند. در همه سویه‌ها ژن *mecA* با تکنیک PCR شناسایی شد ولی هیچ‌یک از ایزوله‌ها ژن *vanA*، *vanB* و *vanC* را به روش مولکولی نشان نداد ولی با میکروسکوپ الکترونی ضخیم شدن دیواره مشاهده شد (۲۵).

نتایج این پژوهش نشان داد که شیوع MRCoNS در مراکز درمانی شهرکرد به سطح ۵۰ درصد رسیده است. یافته‌های تحقیق حاضر مشابه نتایج مطالعه دیگری است که قبلا در شهرکرد در مورد استافیلوکوس اورئوس در بهار ۱۳۸۶ انجام شده است (۱۲). به نظر می‌رسد که هم‌اکنون زمان مداخله مؤثر در محدود کردن شیوع MRCoNS در سطح مراکز بهداشتی و جامعه شهرکرد وجود دارد که به‌طور قطع این فرصت در آینده وجود نخواهد داشت. خوشبختانه کاهش مقاومت به انکومایسین در این مطالعه مشاهده نگردید.

#### تشکر و قدردانی

از همکاری‌های صمیمانه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی و گروه ایمنی‌شناسی و میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد قدردانی می‌نمایم.

#### References:

1. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 2009; 134: 45-54.
2. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-43.
3. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 147-55.
4. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 16-23.
5. Wang Z, Cao B, Liu YM, et al. Investigation of the prevalence of patients co-colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci in China: a hospital-based study. *Chin Med J* 2009; 122: 1283-8.
6. Oliveira AD, d'Azevedo PA, de Sousa LB, et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70: 667-75.
7. de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 428-35.
8. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, et al. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus*

سویه‌ها در ارتباط با ژن‌های مقاومت نبوده‌اند (۲۳). در این میان گسترش انتروکوک‌های مقاوم به انکومایسین از اهمیت به‌سزائی برخوردار است. زیرا گزارش‌هایی از انتقال ژن *vanA* از یک سویه انتروکوک فکالیس به استافیلوکوک اورئوس وجود دارد. بنابراین انتروکوک‌ها می‌توانند به‌عنوان مخزن ژن‌های متحرک در پیدایش و گسترش سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به انکومایسین باشد (۲۴).

در این مطالعه، با روش‌های E-test و انکومایسین آگار اسکرین (۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هیچ سویه استافیلوکوک کوآگولاز منفی مقاوم به انکومایسین مشاهده نشد. همچنین هیچ یک از ایزوله‌ها حامل ژن‌های *vanA* و *vanB* نبودند.

در ایران مطالعات کمی در مورد مقاومت به انکومایسین در سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی انجام شده است. در مطالعه‌ای درهند از ۵۱ سویه MRCoNS، یک سویه به انکومایسین مقاوم و یک سویه با حساسیت حد واسط به انکومایسین گزارش شده است. همه سویه‌های MRCoNS حامل ژن *mecA* بودند ولی در هیچ‌کدام از سویه‌های مقاوم به انکومایسین ژن‌های *vanA* و *vanB* با PCR شناسائی نگردید (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر ۲/۴ درصد

- aureus. *J infect Dis* 2006; 193: 1495-503.
9. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9th ed. CLSI; 2006.
  10. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC infect dis* 2006; 6:156
  11. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6147-9.
  12. Nafisi MR, Kalhor H, Zamanzad B, et al. Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord 2007. *J Arak Uni Med Sci* 2008; 11: 94-101.
  13. Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani MH, et al. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at Children's Medical Center, Tehran, Iran, 1996-2000. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 373-9.
  14. Ghotaslo R, Ghorashi S, Mohammadpoor A. Evaluation of the antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci in children. *J Lorestan Uni Med Sci* 2007; 9: 3-10.
  15. Shajari G, Khorshidi A, Moosavi G. Bacterial isolation and antibiotic resistance of nosocomial pneumonia in hospitalized patients - Kashan, Iran. *Hormozgan Med J* 2009; 13: 197-205.
  16. Chitsaz M. Frequency of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Isolates of Four Tehran University Hospitals and Their Susceptibility to 22 Other Antibiotics. *Med Daneshvar* 2006; 13: 13-22.
  17. Sepehri S. Methicillin-resistant in coagulase-negative staphylococci [dissertation]. School of Pharmacy: Tehran Uni Med Sci., 2000.
  18. Jamshidian M. methicillin resistance in staphylococcus strains isolated from clinical samples in Ahwaz. *Med J Tabriz Uni* 2001; 35: 29-33.
  19. Stephani S, Valardo PE. Update Epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococci* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1179-86.
  20. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of Infection Due to *Staphylococcus* species. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 21: 114-32.
  21. Muller A, Maumy F, Bertin M, et al. Relationship between spread of methicillin resistant *staphylococcus aureus* and antimicrobial use in a French university hospital. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 971-78.
  22. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, et al. Modification DNA extraction for rapid PCR detection of Methicillin-resistant *Staphylococci*. *Iran Biomed J* 2004; 8: 161-5.
  23. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42: S25-34.
  24. Willems RJ, Top J, van Santen M, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 821-8.
  25. Palazzo IC, Araujo ML, Darini AL. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 179-85.