عزل بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للفانكومايسين بمستوى عالي(HLR-VRSA) في بغداد

أ.د عباس عبود فرحان

أحمد عيسى جعفر

قسم علوم الحياة /كلية العلوم –جامعة ديالى

أ.م. د.محمد فرج المرجاني

قسم علوم الحياة /كلية العلوم –الجامعة المستنصرية

الخلاصة

تم الحصول على (105) عزلة تعود لبكتريا ***Staphylococcus*** من عينات سريرية مختلفة للفتره من 2011/9/1 لغاية 2012/1/1 ، أعتمد عدد من الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لتمييز بكتريا ***S. aureus*** عن الانواع البكتيريه الاخرى.

أختبرت حساسية جميع العزلات المحليه لبكتريا ***S. aureus*** للفانكومايسين أظهرت النتائج أن (16) عزلة (15.23%) مقاومة للفانكومايسين ، اما بالنسبه للعزلات السالبه لفحص co- agulase (coagulase –ve *staphylococcus*) فكانت (6) عزله منها (5.71 %) مقاومه للفانكومايسين.

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للفانكومايسين لعزلات بكتريا ***S. aureus*** التي أظهرت مقاومه تجاه هذا المضاد في فحص الحساسيه ، وقد بينت النتائج ان قيمة MIC تراوحت بين (16_512) مايكروغرام /مل وكانت هناك عزلتان ذات MIC 512 مايكروغرام /مل وهي التي توصف بعزلات HLR-VRSA.

المقدمة :

صنف جنس ***Staphylococcus*** ضمن عائلة *Micrococaceae* وهي بكتريا موجبة لصبغة كرام غير متحركة وغير مكونة للسبورات والمحفظة (capsule) ؛ كروية الشكل مفرده أو ثنائية او بشكل سلاسل قصيره او تتجمع بشكل عناقيد(1). تسبب العديد من الامراض منها التهاب ذات الرئه وتسمم الدم والتهاب شغاف القلب ونقي العظم وأخماج الجروح بعد العمليات . يعود

الفانكومايسين لمجموعة Glycopeptides وهو ذو تركيب معقد استعمل في العلاج سنة 1950 ، يعد تأثيره قاتلاً أذ يثبط عملية تكوين جدار الخلية من خلال أيقاف عملية transpeptidation .(2)

يعد هذا المضاد فعالاً ضد معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهو العلاج الأمثل لاسيما للمرضى الذين يعانون حساسية تجاه البنسلين ، وهو فعال ضد بكتريا ***S. aureus*** المقاومة لمضاد المثيسلين (MRSA) وبكتريا *Enterococcus faecalis* و *Clostridium difficile*(3). عزلت سلالآت من بكتريا ***S. aureus*** مقاومة لمضاد الفانكومايسين لأول مره سنة 2002 في ولاية ميشغان في الولايات المتحدة الامريكية ، ولكن لم تسجل عزلات من هذه البكتريا تحمل جين *van* في قارة اسيا ما عدا ما تم تسجيله في اليابان وكوريا . أن ظهور سلالات مقاومة للفانكومايسسن أصبح يشكل أحد المشاكل الصحية الرئيسية لأن أنتشار هذه السلالات يقلل من خيارات العلاج الممكنه أمام الأطباء أضافه الى أن هذه المقاومه يمكن أن تنتقل بين الانواع والأجناس البكتيرية المختلفة (4) ، ورغم الاهميه الطبيه والوبائيه لآنتشار مثل هذه السلالات الا ان الدراسات المحلية عنها نادره أن لم تكن معدومه لذا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى دراسة أنتشار عزلات بكتريا ***S. aureus*** عالية المقاومه لمضاد الفانكومايسين High _Level Resistant _Vancomycin Resistant ***S. aureus*** في المستشفيات المحلية .

طرائق العمل

١. العزلات البكتيريه :

تم جمع عينات سريرية مختلفة شملت عينات الجروح والحروق والدم والادرار للتحري عن بكتريا ***staphylococcus*** للفتره من 2011/9/1 لغاية 2012/1/1 من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد شملت المختبرات التعليمية لمدينة الطب و مستشفى الإمام علي ومستشفى الكاظمية التعليمي ومستشفى الطفل المركزي ومستشفى العلوية للولادة ومستشفى ابن البلدي للولادة ومختبر الصحة المركزي. تم تشخيص عزلات بكتريا ***S. aureus*** اعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية وعدد من الفحوصات الكيموحيوية وحسب ما جاء في (5).

٢. فحص الحساسية لمضاد الفانكومايسين

تم أختبار حساسية عزلات بكتريا ***S. aureus*** لمضاد الفانكومايسين (30 مايكروغرام/مل) بطريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب ، وتم تحديد المقاومة والحساسية أعتماداً على الاقطار القياسية حسب CLSI(6).

٣. تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد الفانكومايسين

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد الفانكومايسين بطريقة التخافيف المتضاعفه المتسلسله بالوسط الزرعي الصلب وحسب ما ورد في (7).

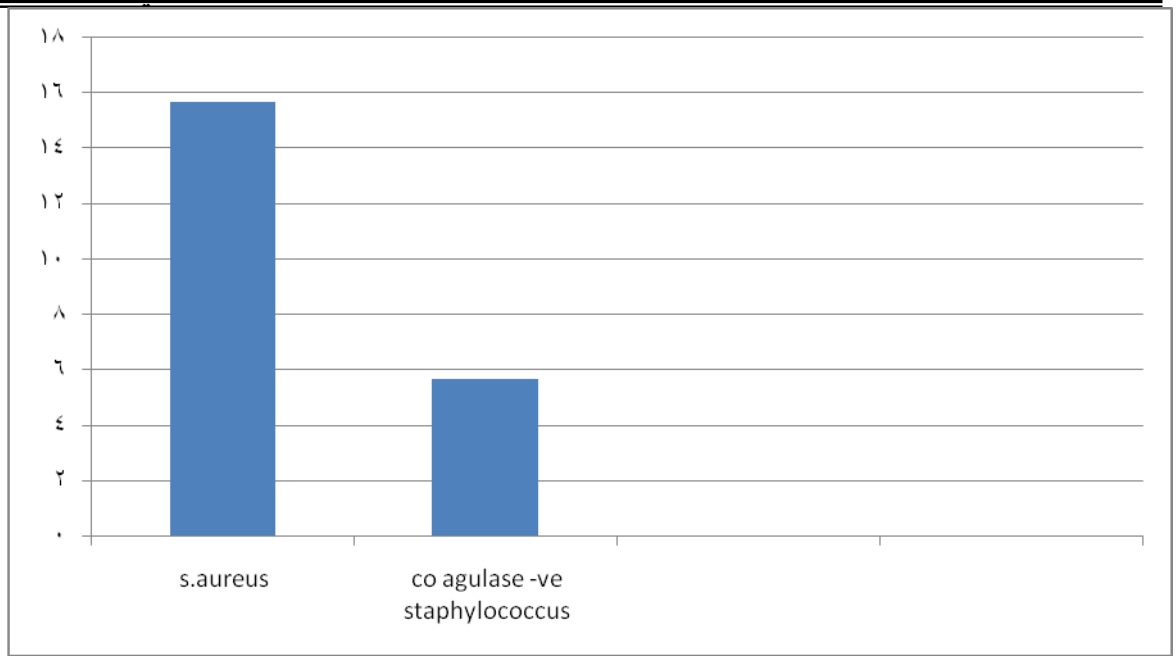
النتائج والمناقشة

تم الحصول على (105) عزلة تعود لبكتريا ***Staphylococcus*** من عينات سريرية مختلفة، أعتمد عدد من الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لتمييز بكتريا ***S. aureus*** عن الانواع البكتيريه الاخرى وحسب ما جاء في (5) .

أختبرت حساسية جميع العزلات المحليه لبكتريا ***S. aureus*** لمضاد الفانكومايسين أظهرت النتائج المبينه في الشكل(1) أن (16) عزلة (15.23%) مقاومة للفانكومايسين ، اما بالنسبه للعزلات السالبه لفحص co-agulase (*staphylococcus* coagulase –ve) فكانت (6) عزله منها (5.71 %) مقاومه للفانكومايسين .

عند مقارنة هذه النتائج مع الدراسات الأخرى وجد (8) نسبة مقاومه للفانكومايسين 7% بين عزلات بكتريا ***S. aureus*** التي درسها وأن 26 % من العزلات كانت متوسطة المقاومة للفانكومايسين.

أن الأستعمال الواسع للمضادات الكلايكوببتيديه ومن ضمنها الفانكومايسين ادى الى ظهور سلالات مقاومه لهذا المضاد من بكتريا *Enterococcus* و*Staphylococcus* ، وقد لوحظ وجود طريقتان لانتشار جينات مقاومة الفانكومايسين تتمثل الاولى بالآنتقال العمودي (Clonal spread) اما الثانيه فتحدث عن طريق الانتقال الافقي بواسطة الاقتران البكتيري (conjugation) ، وقد سجل أنتقال الجين *van* A المحمول على Tn 1546 بين سلالات المكورات المعوية فضلاً عن انتقاله الى بكتريا ***S. aureus*** (9) .



شكل 1 : نسب مقاومة مضاد الفانكومايسين بين العزلات الموجبة والسالبة لأنزيم coagulase.

تم تحديد التركيز المثبط الادنى للفانكومايسين لعزلات بكتريا ***S. aureus*** التي اظهرت مقاومه تجاه هذا المضاد في فحص الحساسيه بطريقة الاقراص واعتمدت نقطة التوقف (Break point) الموضوعه من قبل CLSI(6) كأساس لحساب الاستجابه ولتحديد عزلات HLR-VRSA وقد تم تحديد هذه العزلات بأنها التي تبدي MIC أعلى من أو يساوي 256 مايكروغرام/مل حسب (10) .

بينت النتائج (جدول 1) ان قيمة MIC تراوحت بين (16_512) مايكروغرام /مل وكانت هناك عزلتان ذات MIC 512 مايكروغرام /مل ، وهي العزلات التي توصف بأنها HLR-VRSA وتعد هذه الدراسه الاولى التي يتم فيها عزل بكتريا HLR-VRSA في مدينة بغداد.

إن من أهم العوامل التي أدت إلى إنتشار البكتريا المقاومة للفانكومايسين وخاصة التي تحمل جين *vanA* المحمول على الترانزبوزون *Tn1546* هو إستعمال بعض المضادات كمُحفزات للنمو وهي مضادات تضاف لأعلاف الحيوانات لزيادة معدلات نموها، إلا أن آلية عمل هذه المُحفزات غير معروفة لحد الآن ، تعمل هذه المواد على إختزال النّبيت الطبيعي للأمعاء الذي يُنافس المضيف على العناصر الغذائية بالإضافة للبكتريا الضّارة و بالتالي يُقلل من إمراضيتها والأعراض السريرية التي تُسببه . بعد عدة سنوات من إستعمال هذه المُحفزات تمكن بعض الباحثين من عزل بكتريا *Enterococcus* مقاومة للفانكومايسين من الخنازير والدواجن ، وكذلك من المزارع

التي تُربى فيها تلك الحيوانات ، مما دفع هولاء الباحثين للإعتقاد بأن هذه البكتريا قد تكون قادرة على الإنتقال للبشر إذ تم عزل هذه البكتريا في المانيا من البشر والخنازير والدواجن التي يُعتقد بأنها مرتبطة بإضافة المضادات الكلايكوببتيدية لأعلاف الحيوانات كمُحفزات للنمو وبعد أن دُرست السلالات المعزولة من الحيوانات وتلك المعزولة من الإنسان وجد أن بعضها يعود للمصدر نفسه وخاصة بعد زيادة نسبة الإصابة بهذه البكتريا وزيادة مستويات مقاومتها للمضادات الجرثومية بما فيها الفانكومايسين الأمر الذي دفع الإتحاد الأوروبي لمنع إستعمال مضاد Avoparcin لهذا الغرض (11) و(12).

تكمن خطورة الإصابة بالبكتريا المقاومة للفانكومايسين في قابليتها على إكتساب عوامل وراثية تشفر لمقاومة مضادات جرثومية عديدة ومنها Vancomycin و تبادل هذه العوامل مع أجناس أخرى مثل حالة تبادل هذه المقاومة بين بكتريا *S.aureus* والبكتريا الاخرى مما يشكل أحد المشاكل الصحية الرئيسية لأن أنتشار هذه السلالات يقلل من خيارات العلاج الممكنه أمام الأطباء.

جدول 1 : قيم MIC للفانكومايسين التي أبدتها عزلات ***S. aureus***

رقم العزلة	MICمايكروغرام/مل	رقم العزلة	MICمايكروغرام/مل
1	16	31	64
5	32	30	128
6	32	33	64
20	128	48	128
21	512	53	32
22	32	54	64
23	64	58	64
25	64	60	64
26	16	67	64
28	64	69	64
29	64	70	512

المصادر

1) Holden,M.T.G.Feil,E.J.;Lindsay,J.A;Enright,M.C.,Hurst;L ,Atkin; R. and Spratt, B.G.(2004).

2)**Levinson**, W.& Jawetz, E. (2002). Medical Microbiology&Immunology: Examination & Board Review.7th edition. TheMcGraw −Hill Co., USA.pp:77,96-98 .

3) **Depardieu** ,F.;Perichon ,B. &Courvalin ,P.(2004b) Detection of the *van* Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR.*J.Clinc.Microbiol*. 42(12): 5857-5860.

4) **Zirakzadeh**,A.& Patel,R. (2006). Vancomycin-Resistant Entero-cocci: Colonization,Infection,Detection, and Treatment.. May. Clin. Proc. 81:529-536.

5) Forbes, B.A.; Sahm, D.F. &Weissfeld, A.S. (2002). Baily and Scott s: Diagnostic Microbiology. 11th edition. Mosby, Inc. Baltimore, USA. p:236, 302-309.
6) CLSI (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th supplement, CLSI document M100-S19. 29(3).CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
7) **Morello**, J.A.; Granato, P.A. &Mizer, H.E. (2003). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology:Applications to patient Care. 17th edition. The Mc Grow-Hill Companies. p:97-99.
8) Alalem ,A.M. (2008). Antibiotic resistant *S.aureus* infection studies in hospitals .A thesis, Middle East Technical University.
9) **Zhu**, W.; Murray, P.R.; Huskins, W.C.; Jernigan, J.A.; McDonald, L. C.; Clark, N.C.; Anderson, K.F.; McDougal, L.K.; Hageman, J.C.; Olsen-Rasmussen, M.; Frace, M.; Alangaden, G.J.; Chenoweth, C.; Zervos, M.J.; Robinson-Dunn, B.; Schreckenberger, P.C.; Reller, L.B. ; Rudrik, J.T. &Ratel, J.B. (2010). Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-like *vanA* Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 54(10): 4314-4320.
10) Hageman, J.C; patel , J . ; Carey , R . ; Tenover , F.C. ; McDonalt , L . C (2006) Inveshgation & Control of VISA and VRSA .A Gwde for Health Departmet flufecton Contol persomel .
11) **Kolar**, M.; Pantucek, R.; Bardon, J.; Cekanova, L.; Kesselova, M.; Sauer, P.; Vagnerova, I. &Koukalova, D. (2005). Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in humans and animals in the Czech Republic between 2002 and 2004. *J. Med. Microbiol*. 54:965-967.
12) **Hasman**, H. &Aarestrup, F.M. (2005). Relationship between Copper, Glycopeptide, and Macrolide Resistance among *Enterococcusfaecium* strains Isolated from Pigs in Denmark between 1997 and 2003. *J. Antimicrob. Agent. Chemother.* 49(1):454-456.

Abstract

In the present study, 105 isolates of *Staphylococcus* were collected from different clinical samples in Baghdad during the period 1/9/2011 to 1/1/2012 . All isolates had been identified by morphological ,cultural and Biochemical tests .

The Vancomycin susceptibility test for all isolates was done & results showed that 16 (15.23)% of *S. aureus* isolates & 6 (5.71)% of co -agulase –ve isolates were resistant to this antibiotic. Minimum Inhibitory concentrations for vancomycin were determined, *S.aureus* isolates had MICs between (16 - 512) µg/ml, and two isolates had MICs 512 µg/ml.