Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Vancomycin sensitivity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates collected from clinical specimens of Tabriz Imam Reza and Sina hospitals by E-test method, agar screening plate and PCR

Peyman Bohlouli[1], Mohammad Reza Nahaei[2], Safar Farajnia[3], Mojtaba Varshochi[4], Morteza Ghojazadeh[5], Mohammad Akbari Dibavar[2], Firozeh Safaeeyan[2]

1. Infectious and Tropical Diseases Research Centre, Department of Microbiology, International Branch of Aras Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Infectious and Tropical Diseases Research Centre & Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Infectious and Tropical Diseases Research Centre, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
5. Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center,School of Medicine,Tabriz University of Medical Sciences,Tabriz,Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/11/16
Accepted: 2015/04/28
Available online:2015/06/28

Article Subject:
Antibiotic Resistance

IJMM 1395; 10(1): 66-75

Corresponding author at:
Dr. Mohammad Reza Nahaei

Infectious and Tropical Diseases Research Centre & Department of Microbiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel:
+98 41 33364661

Email:
Nahaeim@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Vancomycin is one of the last drugs used by human for treatment of infections caused by Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates. Since *s.` aureus* with heterogeneous, intermediate and complete resistance to vancomycin are in relation to high mortality rate and are increasing in the world, so investigating the incidence of these isolates is necessary.

Materials and Methods: By using several phenotypic tests such as Gram stain, catalase, coagulase, DNase and mannitol fermentations and by screening resistance to methicillin, 100 MRSA isolates were identified. For identifying resistance to vancomycin, phenotypic tests with the disc diffusion method, determining MIC by E-test method and screening test in BHIA (Brain Heart Infusion Agar) containing vancomycin and molecular PCR test were carried out in order to identify *femB*, *mecA* and *vanA* genes.

Results: Resistance to methicillin was 59%. Ranges of vancomycin MICs were between 0.75 µg/ml to 4 µg/ml. By E-test method 92% of isolates were sensitive and 8% showed heterogeneous resistance to vancomycin. However, screening tests in BHIA, containing 3 µg/ml and 4 µg/ml vancomycin, detected 18% heterogeneous resistance and 4% intermediate resistance to vancomycin, respectively. In screening tests using BHIA, with 6 µg/ml vancomycin no isolate was able to grow. Although all of the isolates contained *femB* and *mecA* genes, but none of them contained *vanA* gene.

Conclusions: E-test alone was not able to identify all *S.aureus* isolates of heterogeneous resistance and intermediate resistance to vancomycin. As a result, the screening tests also should be used along with MIC tests.

Key Words: Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin, E-test, Drug screening assays, PCRV

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Bohlouli P, Nahaei M R, Farajnia S, Varshochi M, Ghojazadeh M, Akbari Dibavar M et al . Vancomycin sensitivity of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates collected from clinical specimens of Tabriz Imam Reza and Sina hospitals by E-test method, agar screening plate and PCR. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :66-75

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی حساسیت ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های بالینی در مراکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) و سینای تبریز در برابر وانکومایسین با روش E-test، آگار اسکرینینگ پلیت و PCR

پیمان بهلولی[۱]، محمد رضا نهائی[۲]، صفر فرج نیا[۳]، مجتبی ورشوچی[۴]، مرتضی قوجازاده[۵]، محمد اکبری دیباور[۲]، فیروزه صفائیان[۲]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری، گروه میکروب شناسی، شعبه بین الملل ارس، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری و دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۵. مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
مقاومت پادزیستی
IJMM 1395; 10(1): 66-75

نویسنده مسئول:
دکتر محمدرضا نهائی
مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری و دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
تلفن: ۰۴۱۳۳۳۶۴۶۶۱
پست الکترونیک:
nahaeim@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: آنتی بیوتیک وانکومایسین یکی از مهمترین داروهای موجود در درمان عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) می باشد. از آنجایی که *استافیلوکوکوس اورئوس* های با کاهش حساسیت به وانکومایسین در ارتباط با مورتالیتی بالایی بوده و در حال افزایش در جهان هستند، لذا بررسی شیوع این سویه ها ضروری به نظر می رسد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ ایزوله MRSA با استفاده از تستهای فنوتیپی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، DNase، تخمیر مانیتول و آزمون مقاومت به متی سیلین مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تشخیص مقاومت به وانکومایسین تستهای فنوتیپی با روش دیسک آگار دیفیوژن، تعیین MIC با روش E-test و آزمونهای غربالی در محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (BHIA) حاوی وانکومایسین انجام و آزمون مولکولی PCR برای شناسائی ژنهای *fèmB*، *mecA* و *vanA* مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان مقاومت به متی سیلین ۵۹٪ بود. دامنه MIC وانکومایسین بین ۰/۷۵ µg/ml تا ۴ µg/ml قرار داشت. با روش E-test، ۹۲٪ ایزوله ها حساس و ۸٪ دارای مقاومت هتروژن به وانکومایسین بودند، ولی آزمونهای غربالی در محیط کشت BHIA حاوی ۳ µg/ml و ۴ µg/ml وانکومایسین بترتیب ۱۸٪ مقاومت هتروژن و ۴٪ مقاومت بینابینی به وانکومایسین را شناسایی نمود. در آزمون غربالی در BHIA محتوی ۶ µg/ml وانکومایسین هیچ ایزوله ای قادر به رشد نبود. ۱۰۰٪ ایزوله ها دارای ژنهای *fèmB* و *mecA* بودند، ولی هیچ ایزوله ای حاوی ژن *vanA* نبود.

نتیجه‌گیری: آزمون E-test به تنهایی قادر به شناسایی تمامی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت هتروژن و بینابینی به وانکومایسین نبود، لذا استفاده از آزمونهای غربالی در کنار آزمونهای MIC الزامی است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، وانکومایسین، E-test، آزمون غربالی، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونتهای جدی در بیمارستان و جامعه است. متی سیلین بعنوان اولین پنی سیلین صناعی در سال ۱۹۶۱ برای درمان عفونتهای *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید. اولین *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین Methicillin Rsistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) در انگلستان در همان سال مورد شناسایی قرار گرفت پس از آن سویه های MRSA به سرعت در جهان گسترش یافتند (۱). از آنجایی که عفونتهای ناشی از سویه های MRSA منجر به مرگ و میر بالایی می شوند، استفاده از آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی در دهه ۱۹۶۰ آغاز گردید (۲). اولین ایزوله Heterogenous Vancomycin Intermediate *S.aureus*(hVISA) که به نام Mu3 خوانده می شود در سال ۱۹۹۶ از خلط بیمار ۶۴

ساله که به پنومونی MRSA مبتلا بود و به درمان با وانکومایسین جواب نمی داد جدا شد (۳). اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت بینابینی به وانکومایسین یا VISA (Vancomycin intermediate *S.aureus*) با MIC=۸ µg/ml در سال ۱۹۹۷ از ژاپن گزارش گردید (۴) و بالاخره اولین سویه با مقاومت کامل به وانکومایسین یا VRSA (Vancomycin Resistance *Staphylococcus aureus*) در سال ۲۰۰۲ از میشگان آمریکا گزارش شد (۵).

کشت از اگزودای ناحیه خروجی کاتتر و نوک کاتتر رشد همزمان VRSA با MIC ≥ ۳۲µg/ml و *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به وانکومایسین با MIC ≥ ۳۲µg/ml را نشان داده بود. قبل از شناسایی VRSA بیمار به مدت ۶/۵ هفته از آنتی بیوتیک وانکومایسین استفاده می نمود. یکی از دوستان نزدیک بیمار حامل MRSA حساس به وانکومایسین بود که در PFGE الگوی مشابهی را با VRSA شناسایی شده نشان می داد. این موضوع به اهمیت تلاش برای پیشگیری و کم کردن انتشار MRSA و VRSA در مجاورت وسایل بیماران تحت درمان تاکید می کند (۵). در شرایط آزمایشگاهی انتقال از طریق کونژوگاسیون ژن *vanA* از انتروکوک‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* ثابت شده است. ساطع شدن فرومون جنسی از *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به وانکومایسین که در مجاورت *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به وانکومایسین حاوی پلاسمید کد کننده *vanA* است، نقش اصلی را در انتقال ژن مقاومت (*vanA*) از انتروکوک‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* ایفا می کند (۳). افراد ناقل *استافیلوکوکوس ارئوس* حساس به وانکومایسین و مقاوم به متی سیلین می‌توانند نقش اصلی را در دریافت ژن مقاومت از انتروکوک ایفاء کنند. افراد ناقل در خطر ابتلاء به باکتریمي بیمارستانی هستند (۶).

ایزوله های hVISA، ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* با MIC وانکومایسین درون طیف حساس می باشند لیکن در آن یک نسبت از جمعیت سلولها در محدودهٔ با مقاومت بینابینی قرار می گیرند (MIC=۳ µg/ml). به طور معمول جمعیت های مقاوم در یک فرکانس از $۱۰^{-۵}$ تا $۱۰^{-۶}$ حضور دارند (۷). سویه‌های MRSA با حساسیت کاهش یافته نسبت به وانکومایسین (hVISA، VISA و VRSA) به نارسایی درمان با وانکومایسین ارتباط داده شده‌اند. این سویه ها در ارتباط با مورتالیتی بالایی بوده و ظهور این سویه ها تهدید جدی برای بیشتر گزینه های درمانی در دسترس پزشکان برای عفونتهای ناشی از MRSA می باشد (۳).

موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) در سال ۲۰۰۶ Break point وانکومایسین را به شرح ذیل باز تعریف نمود. سویه های حساس دارای MIC ≤۲ µg/ml، سویه های با مقاومت بینابینی دارای MIC=۴-۸ µg/ml و سویه های مقاوم دارای MIC ≥ ۱۶µg/ml (۸). در حال حاضر روشهای براث دایلوشن، آگاردایلوشن و E-test بعنوان بهترین روش برای شناسایی کاهش حساسیت نسبت به وانکومایسین می باشند. CDC استفاده از آزمونهای غربالی در BHIA حاوی ۴ µg/ml و ۶ µg/ml وانکومایسین را برای شناسایی سویه های با کاهش حساسیت به وانکومایسین توصیه نموده است (۹).

مشکل موجود در روش دیسک آگار دیفیوژن ناشی از انتشار ضعیف آنتی بیوتیک در بستر محیط کشت می باشد. این روش تنها برای شناسایی سویه هایی VRSA که اندازه هاله آنها برابر ۶ میلی متر می باشد کاربرد دارد. علیرغم معایب روش دیسک آگار دیفیوژن این روش همچنان استفاده می شود (۷). از روش‌های ژنوتیپی نیز که برای تعیین هویت *استافیلوکوکوس اورئوس*، شناسایی مقاومت به متی سیلین و وانکومایسین استفاده می شود به روش PCR برای ژنهای *femB*، *mecA* و *vanA* می توان اشاره نمود. ژن *femB* فاکتور اختصاصی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد و در سایر گونه های استافیلوکوکی دیده نشده است (۱۱، ۱۰).

علیرغم این حقیقت که مقاومت میکروبی به وانکومایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار نادر باقی مانده است در سال‌های اخیر شاهد نوعی تغییر رو به افزایش در MIC وانکومایسین (MIC creep) در طیف حساسیتی می‌باشیم که دارای تاثیرات مهمی بر کارایی وانکومایسین در پنومونی و باکتریمي MRSA می‌باشد (۱۲). با توجه به گزارش سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* با حساسیت کاهش یافته و مقاوم به وانکومایسین از نقاط مختلف کشور و جهان، بر آن شدیم تا حساسیت سویه‌های MRSA در برابر آنتی بیوتیک وانکومایسین را با روش‌های فنوتیپی و مولکولی مورد بررسی قرار دهیم. اطلاعات بدست آمده از این مطالعه می‌تواند در کاربرد صحیح از آنتی بیوتیک وانکومایسین در درمان عفونت‌های ناشی از MRSA نقش مهمی ایفاء نماید.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی به صورت توصیفی- مقطعی در محدوده زمانی فروردین ۱۳۹۱ تا فروردین ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز و زیر نظر پردیس بین الملل ارس دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مراجعه کننده به بخشهای مختلف بیمارستان های امام رضا (ع) (امام خمینی سابق) و سینای تبریز بود. از ۶۰۸ بیمار ۱۴۷۵ نمونه بالینی اخذ گردید (ایزوله های تکراری از مطالعه حذف شدند). برای هر بیمار فرم رضایت آگاهانه تهیه و اصول اخلاقی رعایت گردید.

نمونه ها به محیط کشت نوترینت براث (Merck) تلقیح و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه و کلنی ها از نظر گرم مثبت بودن، تولید کاتالاز، کواگولاز، همولیزین، DNase، حساسیت یا مقاومت به باستیراسین (۰/۰۴ U) و سفوکسیتین (۳۰µg) ساخت شرکت Mast diagnostic, UK مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). نهایتاً ۱۰۰ MRSA ایزوله گردید. از سویه های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ (حساس به متی سیلین) و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۳۳۵۹۱ (مقاوم به متی سیلین) به عنوان سویه های کنترل کیفی استفاده شد (۸).

برای انجام آزمایش دیسک آگار دیفیوژن و E-test، غلظت نیم مک فارلند تهیه و با استفاده از سواب پنبه ای کشت به روش استاندارد بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) انجام شد و در نهایت پس از قرار دادن دیسک وانکومایسین (۳۰ µg) ساخت Mast diagnostic, UK و نوار E-test وانکومایسین (Liofilchem) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵°C انکوبه گردید. نتایج بدست آمده مطابق دستور العمل CLSI (۲۰۱۱) قرائت و ارزیابی شد.

سویه های آزمایشی در آزمونهای غربالی در محیط کشت BHIA محتوی غلظتهای ۳ µg/ml، ۴ µg/ml و ۶ µg/ml وانکومایسین از لحاظ کاهش حساسیت به وانکومایسین مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵، ۱۴، ۸). برای انجام آزمون غربالی از پودر لیوفیلیزه وانکومایسین (Mast diagnostic, UK) استفاده گردید که ابتدا رقت ۱۰۰ µg/ml به عنوان محلول ذخیره تهیه گردیده و متعاقباً جهت استریل شدن در یک لوله در پیچ دار استریل با استفاده از فیلتر ۰/۲ µm (Nagene)، فیلتر شد. این محلول ذخیره در دمای ۲۰°C- نگهداری می شد. در مرحله بعد محیط BHIA متناسب با حجم مورد نیاز و دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه و اتوکلاو گردید. پس از اینکه دمای محیط کشت به ۴۵°C رسید محلول آنتی بیوتیک اضافه شد. برای تهیه محیط BHIA حاوی غلظتهای ۳ µg/ml، ۴ µg/ml، ۶ µg/ml وانکومایسین با استفاده از فرمول N۲V۲ =N۱V۱ مقدار مشخص از محلول ذخیره وانکومایسن (۱۰۰ µg/ml) به محیط BHIA اضافه گردید. برای هر ایزوله باکتریایی سوسپانسیون با کدورت MF ۰/۵ (نیم مک فارلند) در سرم فیزیولوژی تهیه گردید و مقدار ۱۰ µl از این سوسپانیسون بصورت نقاطی (مطابق دستورالعمل CDC) در سطح محیط BHIA حاوی غلظت‌های ۳، ۴ و۶ میکروگرم در میلی لیتر وانکومایسین پخش شد (۹). با اینکار ۱/۵×۱۰^۶ (CFU) از باکتری در سطح BHIA حاوی آنتی‌بیوتیک وانکومایسین تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵°C انکوبه گردید، نتایج در مقابل چراغ مطالعه بررسی گردید (۸)، رشد ۲ کلنی یا بیشتر بعنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شد (۹).

برای تایید هویت ایزوله های MRSA و مقاومت افزایش یافته به وانکومایسین با استفاده از متد مولکولی (۱۸، ۱۷، ۱۶)، تکثیر ژن های *femB* (factor essential for methicillin resistance) (ژن تعیین هویت *استافیلوکوکوس اورئوس*)، *mecA* (ژن مقاومت به متی سیلین) و *vanA* (ژن مقاومت به وانکومایسین) در یک واکنش مولتی پلکس PCR انجام شد. برای استخراج DNA ایزوله ها از روش CTAB استفاده شد (۱۹).

برای انجام مولتی پلکس PCR از کیت Qiagen استفاده شد. پرایمرهای واکنش مربوط به ژنهای *mecA* (۱۶)، *vanA* (۱۷) و *femB* (۱۸) بودند. ترکیب واکنش شامل ۲۵ µl مسترمیکس (حاوی Taq پلی مراز، $MgCL_2$ و dNTP)، ۵ µl پرایمر میکس با غلظت ۲ µM از پرایمرهای *mecA*-F(3´-GTGAAGATATACCAAGTGATT-5´)، *mecA*-R(5´-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3´)، *vanA*-F(3´-CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-5´)، *vanA*-R(5´-CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3´)، *femB*-F(5´-CGTGAGAATGATGGCTTTGA-3´)، *femB*-R(5´-TTAATACGCCCATCCATCGT-3´)؛ ۸ µl آب RNase-free، ۱۰ µl محلول Q-solution و ۲ µl از Template DNA بود. اندازه قطعات تکثیر شده برای ژنهای *mecA*، *vanA* و *femB* به ترتیب ۱۴۷، ۱۰۳۰ و ۳۸۸ جفت باز

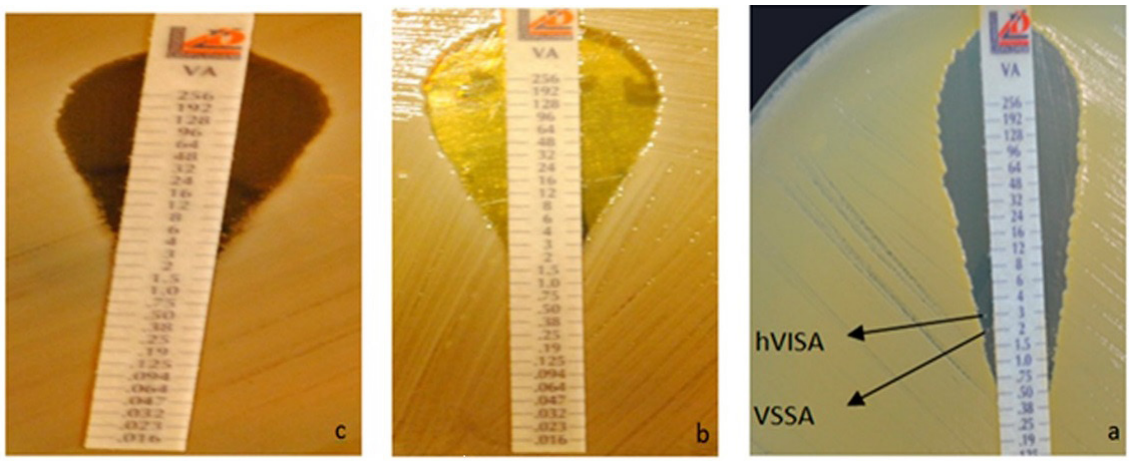
بود.

برنامه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۵C° به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی در ۹۴C° بمدت به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵C° بمدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن زنجیره در ۷۲C° به مدت ۱ دقیقه و بالاخره طویل شدن نهایی در ۷۲C° به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) بود. الکتروفورز محصول PCR در ژل ۱/۸ درصد آگاروز به مدت ۷۵ دقیقه در ۹۰ ولت انجام و پس از رنگ آمیزی ژل یا اتیدیم بروماید، با دستگاه Transluminator مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

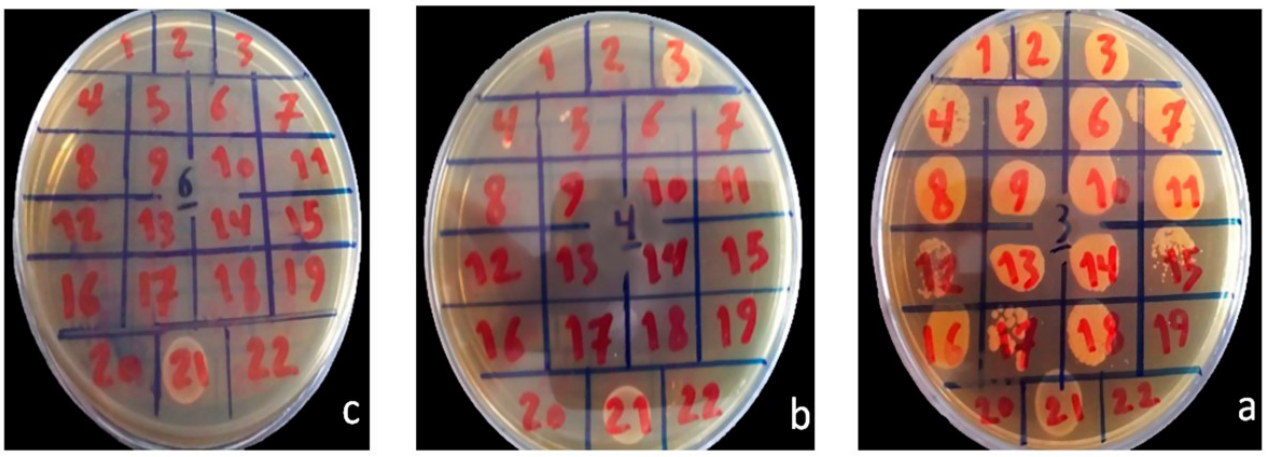
از سویه های استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC ۲۹۲۱۲ بعنوان کنترل منفی (حساس به وانکومایسین)، *انتروکوکوس فکالیس* ATCC ۵۱۲۹۹ بعنوان کنترل مثبت (مقاوم به وانکومایسین)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۹۲۱۳ بعنوان کنترل منفی حساس به متی سیلین) و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۳۳۵۹۱ بعنوان کنترل مثبت (مقاوم به متی سیلین) استفاده شد (۸). از مارکر DNA (۱۰۰ bp و ۱ kb) برای تعیین وزن مولکولی در مطالعه استفاده شد. داده های بدست آمده با استفاده از روشهای آماری توصیفی (فراوانی - درصد و Mean±SD) و با استفاده از آزمون Chi-square در نرم افزار SPSS-18 مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

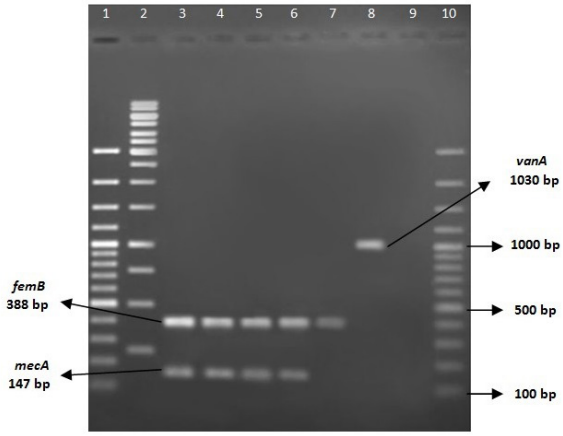
از بین ۶۰۸ بیمار مورد مطالعه ۶۷٪ مرد و ۳۳٪ زن بودند. از نظر سنی بیماران دارای حداقل ۲ سال و حداکثر ۸۸ سال سن داشتند. میانگین سن بیماران ۲۲/۳±۵۶/۹ سال بود. حداقل و حداکثر زمان بستری شدن به ترتیب ۱ روز و ۸۱ روز بود. میانگین



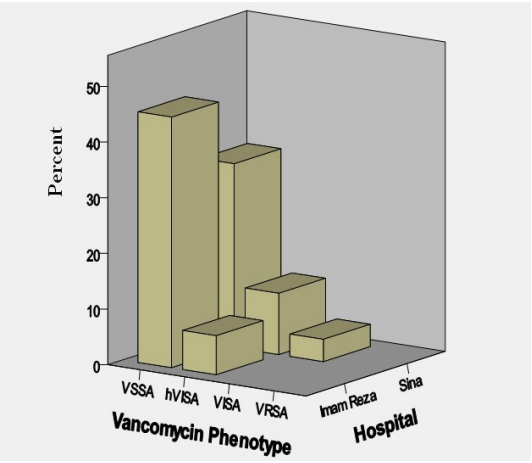
شکل ۱ : نتایج E-test، شکل a ایزوله شماره ۷۷ با MIC=۰/۷۵ µg/ml که زیر جمعیت‌هایی از ارگانیسم (hVISA) در آزمون غربالی (BHIA حاوی ۳ µg/ml وانکومایسین) قادر به رشد بودند. شکلهای b و c به ترتیب ایزوله های بالینی ۶۳ و ۵۴ با MIC= ۳ µg/ml و MIC= ۴ µg/ml را نشان می دهند.



شکل ۱ : نتایج آزمونهای غربالی، در شکل a شماره ۱ تا ۱۸ به ترتیب مربوط به ۱۸ ایزوله بالینی (۳۰-۲۲، ۶۵-۵۸ و ۷۷) با MIC= ۳ µg/ml (hVISA) می‌باشد که قادر به رشد در BHIA حاوی ۳ µg/ml وانکومایسن بودند. در شکل b شماره ۵-۳ به ترتیب مربوط به ۳ ایزوله بالینی (۶، ۱۵ و ۵۴) با MIC= ۴ µg/ml می باشد (VISA) که قادر به رشد در BHIA حاوی ۴ µg/ml وانکومایسین بودند (یکی از ایزوله های VISA نشان داده نشده است). در BHIA حاوی ۶ µg/ml وانکومایسین (شکل c) هیچ ایزوله ای قادر به رشد نبود. در هر ۳ شکل شماره های ۲۱ و ۲۲ به ترتیب مربوط به سویه های استاندارد ATCC ۵۱۲۹۹ (مقاوم به وانکومایسین) و ATCC ۲۹۲۱۲ (حساس به وانکومایسین) می باشد.



نتایج آمپلی فیکاسیون ژنهای *femB*، *mecA* و *vanA* در یک مولتی پلکس PCR برای ایزوله های بالینی و سویه های استاندارد. Lane ۱ و Lane ۱۰ سایز مارکر؛۱۰۰ Lane bp ۲ سایز مارکر؛۱ Lane kp ۳ تا Lane ۵ به ترتیب ایزوله های بالینی MRSA (ایزوله های ۵، ۳۴ و ۸۱)؛ Lane ۶ سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* CCTA ۳۳۵۹۱ (به عنوان کنترل مثبت برای ژنهای *femB* و *mecA*)؛ Lane ۷ سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۹۲۱۳ (به عنوان کنترل مثبت برای ژن *femB* و کنترل منفی برای ژن *mecA*)؛ Lane ۸ سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC ۵۱۲۹۹ (کنترل مثبت برای ژن *vanA* و کنترل منفی برای ژنهای *Bmef* و *mecA*)؛ Lane ۹ سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* ATCC ۲۹۲۱۲ (کنترل منفی برای ژنهای *vanA*، *femB* و *mecA*).



نمودار ۱ : فراوانی فنوتیپهای مقاوم به وانکومایسین در MRSA های جدا شده در بیمارستانهای سینا وامام رضا (ع) تبریز.

بستری (میانه) این بیماران ۶ روز بود.

از ۱۶۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع آوری شده، ۱۰۰ ایزوله MRSA جداسازی شد. میزان مقاومت به متی سیلین با دیسک سفوکسیتین ۵۹٪ بود. با روش PCR نیز ۱۰۰٪ ایزوله‌های MRSA ژن *mecA* را نشان دادند. بیشترین میزان جداسازی MRSA مربوط به نمونه بینی (۲۴٪) بود. در بین بخش‌های بیمارستانی، بخش ICU بیشترین (۳۰٪) و ENT کمترین (صفر درصد) میزان فراوانی MRSA را به خود اختصاص دادند. ۸۸٪ نمونه های گلو و ۸۵٪ از نمونه های مربوط به تراشه حاوی MRSA بودند که نشان می دهد حضور MRSA در ترشحات تنفسی بیماران معنی دار بوده است ($p<۰/۰۵$).

فراوانی MIC وانکومایسین به ترتیب ذیل بود: ۷۵ MIC=۰/μg/ml (۱۴٪)، MIC=۱/۵ μg/ml (۲۴٪)، MIC=۲ μg/ml (۴۰٪)، MIC=۳ μg/ml (۱۸٪) و MIC=۴ μg/ml (۴٪). از بین ۶۰۸ بیمار مورد مطالعه ۴۹ بیمار آنتی بیوتیک وانکومایسین دریافت می نمودند. از ۱۳ ایزوله MRSA که از این بیماران (دریافت کننده وانکومایسین) جدا شده بود، همگی دارای MIC ≥ ۲μg/ml بودند. آزمون فیشر تفاوت معنی داری را در بیمارانی که علیرغم دریافت آنتی بیوتیک وانکومایسین که سویه های MRSA از آنها جدا شده بود نشان نداد ($p=۰/۰۵۴$). با روش دیسک آگار دیفیوژن با دیسک وانکومایسین میانگین قطر هاله عدم رشد برابر با ۰/۴ ± ۱۶/۵ میلی متر بدست آمد. دامنه مقادیر بدست آمده در محدوده ۱۰ تا ۱۹ میلی متر قرار داشت. با این روش هیچ موردی از VRSA مورد شناسایی قرار نگرفت. با روش E-test تنها ۱۰ ایزوله hVISA (با MIC= ۳ μg/ml) شناسایی شد، اما هیچ موردی از VISA و VRSA مورد شناسایی قرار نگرفتند (شکل ۱). در محیط BHIAV-۳ μg/ml، ۱۸ ایزوله hVISA با MIC= ۳ μg/ml شناسایی شد. در محیط BHIAV-۴ μg/ml، ۴ ایزوله VISA (با MIC=۴ μg/ml) شناسایی شد. در محیط BHIAV-۶ μg/ml هیچ ایزوله ای قادر به رشد نبود (شکل ۲).

در مطالعه حاضر مجموعاً با روش E-test و آزمونهای غربالی، میانگین MIC وانکومایسین ۰/۷ μg/ml ±۱/۹ بدست آمد. دامنه MIC بین ۰/۷۵ μg/ml تا ۴ μg/ml بود. $MIC_{۵۰}$ و $MIC_{۹۰}$ به ترتیب ۲ μg/ml و ۳ μg/ml بود. مقادیر میانه و نما نیز با هم برابر (۲ μg/ml) و تفاضل چارکی (Quartiles difference) برابر ۰/۵ μg/ml (۱/۵-۲) محاسبه شد. در این مطالعه ۱۴ (۷۸٪) ایزوله hVISA از مجاری تنفسی (گلو و بینی) و تراشه جدا شدند. در حالیکه ۲ (۵۰٪) ایزوله VISA از نمونه های زخم جداسازی شدند. با روش PCR، ۱۰۰٪ ایزوله های MRSA دارای ژن های *femB* و *mecA* بودند و در مقابل هیچ موردی از VRSA (حاوی ژن *vanA*) مورد شناسائی قرار نگرفت.

بحث

در بیست سال گذشته به علت افزایش شیوع مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده از آنتی بیوتیک

وانکوماسین بطور چشمگیری افزایش یافته است. سویه‌های MRSA با حساسیت کاهش یافته نسبت به وانکومایسین (hVISA و VISA) به نارسایی درمان با وانکومایسین ارتباط داده شده‌اند.

محدودیت ها در روش شناسایی آزمایشگاهی برای سویه های با کاهش حساسیت به وانکومایسین به طور گسترده مورد بحث قرار گرفته است (۲۱). مشکل با روش دیسک آگار دیفیوژن ناشی از انتشار ضعیف آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی می باشد، لذا توصیه شده است از روشهای تعیین MIC و آزمون غربالی در BHIA حاوی وانکومایسین استفاده شود. متدهای جایگزین از قبیل E-test به طور موثر در تشخیص hVISA، VISA و VRSA استفاده می گردد؛ اما روش آنالیز جمعیتی (روش استاندارد شناسی hVISA) که جهت مرتفع کردن نتایج MIC وانکومایسین استفاده می شود روش پر زحمتی می باشد.

سیستمهای اتوماتیک تجاری با دقت غیر قابل قبولی برای شناسایی hVISA، VISA و VRSA مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲). تست دیسک آگار دیفیوژن علیرغم عدم توانایی در تشخیص hVISA و VISA از MRSA همچنان استفاده می‌شود. سویه های VRSA علاوه بر روشهای MIC و E-test با روش دیسک آگار دیفیوژن نیز قابل تشخیص می باشند (۸). CLSI آزمون غربالی در BHIA حاوی ۶ µg/ml وانکومایسین را برای شناسایی VRSA توصیه نموده است. در مطالعه حاضر میانگین MIC با روش E-test برای سویه هایی که با روش دیسک آگار دیفیوژن قطر هاله عدم رشد آنها بین ۱۰ تا ۱۲ میلی متر بود، برابر ۲±۰/۰۷ µg/ml و برای سویه های با قطر هاله عدم رشد ۱۳ تا ۱۵ میلی متر برابر ۱/۶۸±۰/۱۱ µg/ml بود. همانطور که مشاهده می گردد در روش دیسک آگار دیفیوژن میزان نفوذ آنتی بیوتیک وانکومایسین به خوبی انجام نشده و سبب شده است که نتایج به صورت سویه های با کاهش حساسیت به وانکومایسن نشان داده شود.

علاوه بر آنالیز جمعیتی، روشهای جایگزین برای شناسایی hVISA شامل آزمون غربالی در حاوی ۳ µg/ml وانکومایسین و Macromethod E-test می باشد (۳). در این مطالعه آزمون E-test قادر به شناسایی تمامی ایزوله های hVISA نبود. در مطالعه انجام شده در تبریز در سال ۱۳۸۵ نیز تعداد سویه های با MIC= ۳ μg/ml (hVISA) مورد (۱۵٪) شناسایی شده بود (۲۳). یک مشکل آشکار در تفسیر متون در مورد hVISA و VISA استفاده از روش‌های متفاوت برای شناسایی VISA و نبود روش استاندار برای شناسایی hVISA می باشد که سبب شده است hVISA در جهان متفاوت گزارش شود. به عنوان مثال در مطالعه انجام شده توسط Hiramatsu در سال ۱۹۹۷ در ژاپن، ۲۰٪ از MRSA های ایزوله شده hVISA بودند (۳) در حالیکه در مطالعات دیگر در ژاپن که متعاقبا انجام شد، در بین ۶۶۲۵ ایزوله هیچ موردی از hVISA پیدا نشد (۲۴). درک صحیح اپیدمیولوژی hVISA نیازمند معیارهای استاندارد می باشند (۲۵).

در این مطالعه هیچ موردی از VISA با استفاده از متد E-test (در مرحله اول) مورد شناسایی قرار نگرفت؛ اما در آزمون غربالی در BHIA حاوی ۴ µg/ml چهار ایزوله MRSA قادر به رشد بودند. این ایزوله ها در مرحله بعد با آزمون E-test، MIC = ۴ µg/ml را نشان داده و پس از تعیین هویت مجدد به عنوان VISA قلمداد شدند. در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۸۵ در تبریز، ۲ مورد از ایزوله ها VISA با MIC=۴ µg/ml گزارش گردید (۲۳). در مطالعات انجام شده در بندر عباس در سال ۱۳۹۰ تعداد ۴ سویه VISA شناسایی شد (۲۶).

در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی هر ۳ فنوتیپ (VSSA، hVISA و VISA) مربوط به بخش ICU بود. فراوانی این فنوتیپها در هر دو بیمارستان تحت مطالعه به تفکیک در نمودار ۱ نشان داده شده است. در مطالعه Tiwari و همکاران در سال ۲۰۰۹ در نپال بر روی ۷۸۳ سویه استافیلوکوکوس ۶ سویه VISA و ۲ سویه VRSA شناسایی شد (۲۷). پیدایش سویه های VISA و VRSA همواره از سویه های MRSA می باشد که به طور مداوم در محیط بیمارستان با وانکومایسین مواجه بوده اند و مهمترین علت ایجاد آن مصرف بی رویه وانکومایسین می باشد. اهمیت ارگانیسمهای VISA و VRSA از آنجاست که در صورت ایجاد عفونت ناشی از آنها درمان با وانکومایسین موفقیت آمیز نخواهد بود (۲۲).

در مطالعه حاضر از بین بیمارانی که ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه های بالینی آنها جدا شده است، ۴۷٪ داروهای گروه سفالوسپورین، ۱۷٪ سیپروفلوکساسین، ۱۴٪ مروپنم، ۱۳٪ وانکومایسین، ۱۰٪ کلیندامایسین، ۶٪ مترونیدازول، ۴٪ جنتامیسین و درصد کمی از بیماران نیز از سایر آنتی بیوتیک ها استفاده نموده بودند. به علت پایین بودن تعداد MRSA های ایزوله شده (۱۳ ایزوله) از بیماران دریافت کننده آنتی بیوتیک وانکومایسین (۴۹ بیمار) آزمون فیشر تفاوت معنی داری را در بیمارانی که علیرغم دریافت آنتی بیوتیک وانکومایسین که سویه های MRSA از آنها جدا شده بود نشان نداد (p=۰/۰۵۴). در مقابل در تعدادی

از مطالعات یک ارتباط معنی دار بین دریافت آنتی بیوتیک وانکومایسین و شیوع MRSA ($p<$ ۰/۰۵) نشان داده شده است (۲۹، ۲۸).

در تعدادی از مطالعات حساسیت و ویژگی روش BHIAV-۳μg/ml در شناسایی hVISA با MIC= ۳ μg/ml به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۴/۶٪ بوده و حساسیت و ویژگی روش BHIAV- ۴ μg/ml در شناسایی سویه های VISA با MIC= ۴ μg/ml به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۲/۲٪ بوده است (۱۵، ۱۴). لذا روش ما درشناسایی سویه های hVISA و VISA از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار بوده است. در ضمن انجام آزمون مجدد MIC با روش E-test بر روی ایزوله های رشد کرده در محیطهای کشت غربالی صحت ایزوله های hVISA و VISA را تایید نمود.

در مطالعه انجام شده در تبریز در سال ۱۳۸۵ مقادیر MIC وانکومایسین در محدوده ۱/۵-۴ μg/ml گزارش شد (۲۳). در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۸۸ در کاشان مقادیر MIC وانکومایسین در محدوده ۰/۵-۴ μg/ml قرار داشت (۳۰). نتایج فوق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه Sancak در سال ۲۰۰۵ در ترکیه مقادیر MIC وانکومایسین در محدوده ۰/۱۲-۴ μg/ml بود (۲۵). نتایج این مطالعه در مقایسه با مطالعه انجام شده در سال ۱۳۸۵ در تبریز (۲۳) حاکی از تغییرات اندک در میزان فراوانی hVISA و VISA می باشد (hVISA، ۱۸٪ در مقابل ۱۵٪ و VISA، ۴٪ در مقابل ۲٪ بود)؛ اما فراوانی hVISA در هر دو مطالعه نسبت به سایر مطالعات بالا بوده است (۳۱،۲۶).

علیرغم اینکه در مطالعه حاضر سویه VRSA (حاوی ژن *vanA*) مورد شناسایی قرار نگرفت، ولی ژن *vanA* از سویه استاندارد *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC ۵۱۲۹۹) به خوبی در یک مولتی پلکس PCR مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۳). استفاده از این متد می تواند علاوه بر تعیین هویت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*femB*) در بررسی توام مقاومت سطح بالا به متی سیلین (*mecA*) و وانکومایسین (*vanA*) در *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز نقش مهمی داشته باشد.

با توجه به گزارشهای متعدد از شیوع VISA در نقاط مختلف کشور و اخیراً گزارش ۱ مورد سویه VRSA از شهر مشهد در ایران نگرانی هایی را در استفاده از این آنتی بیوتیک با ارزش و مهم در درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* را مطرح می سازد (۳۱، ۲۶، ۲). بالاخره با توجه به اینکه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* با MIC≥۲μg/ml در ارتباط با میزان مرگ بالایی هستند (۶)، پیشنهاد می شود سویه هایی که در آزمون اولیه با MIC= ۳ μg/ml می باشند (هموژن) بعنوان VISA قلمداد گردند.

نتایج این مطالعه مؤید حضور مقاومت بالا نسبت به متی‌سیلین در بین ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد به نحوی که این مقاومت از ۳۸٪ در سال ۱۳۸۵ (۲۳) به ۵۹٪ در سال ۱۳۹۳ (۲۱٪ افزایش) رسیده است. این مطالعه همچنین نشان داد که آزمون MIC وانکومایسین با روش E-test به تنهایی قادر به شناسایی تمامی ایزوله های با مقاومت هتروژن و بینابینی به وانکومایسین نمی باشد لذا استفاده از آزمونهای غربالی در کنار آزمونهای MIC الزامی است.

در این مطالعه با روشهای فنوتیپی و مولکولی هیچ ایزوله‌ای با مقاومت کامل به وانکومایسین (VRSA) مورد شناسایی قرار نگرفت؛ اما ایزوله های با کاهش حساسیت نسبت به وانکومایسین (hVISA و VISA) با روشهای فنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه های hVISA، VISA و VRSA به سرعت در حال گسترش هستند (۲۶) و بنحوی که مشاهده می شود کسب مقاومت نسبت به وانکومایسین در کشور ما نیز مطرح می باشد. افزایش مداخلات درمانی و استفاده غیر مدبرانه از وانکومایسین شرایطی را فراهم کرده است که تحقیق در مورد سویه های hVISA، VISA و VRSA را بیش از پیش گوشزد می نماید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق طرح مصوب مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری تبریز با کد ۰۲-۹۱ و منتج از پایان نامه آقای پیمان بهلولی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پردیس بین الملل ارس دانشگاه علوم پزشکی تبریز می باشد. از حمایتهای مالی مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و پردیس بین الملل ارس دانشگاه علوم پزشکی تبریز تقدیر و تشکر به عمل می آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Johnston Bl, Bryce E. hospital infection control strategies for vancomycin-resistant enterococcus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Clostridium difficile. Can Med Ass J. 2009; 180(6): 627-31.

2. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolated from respiratory tract of a hospitalized patient in a university hospital in North East of Iran. J Clin Microbiol. 2012; 50(11): 3581-5.

3. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus,including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(4): 99-139.

4. Tiwari KB. Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus may occur faster than expected. Int J Life Sci. 2009; 3(7): 6-13.

5. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348(5): 1342-7.

6. Horne KC, Howden BP, Grabsch EA, Graham M, Ward PB, et al. Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. J Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(8): 3447-3452.

7. Jones RN. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect re-sistant strains. Clin Infect Dis. 2006; 42(1): 13-24.

8. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th ed. CLSI document M100-S21. CLSI 2011, Wayne PA.

9. CDC-VISA/VRSA-vancomycin-Intermediate/Resistant Staphylococcus aureus -Fact Sheet. (1998). Morb Mortal Wkly Rep. 2002;48(51): 1167-71

10. Manikandan SG, Hemalatha M, Lakshminarasimhan C, Thajuddin N. Isolation and amplification of femA gene from MRSA isolates. Int J Pharma Bio Sci. 2011; 2(3): 28-32.

11. Khan F, Shukla I, Rivzi M. The role of non-β-lactam antimicrobials and screening for vancomycin resistance in methicillin resistant Staphylococcus aureus. Malays J Microbiol. 2010; 7(2): 66-70.

12. Moise PA, Smyth DS, Robinson DA, Fawal NE, McCalla C, Sakoulas G. Genotypic and phenotypic relationships among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from three multicentre bacteraemia studies. J Antimicrob Chemother. 2009; 35(6): 1425-1433.

13. McDougal LK, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003; 41(11): 5113-5120.

14. Burnham CA, Weber CJ, Michael WM. Novel Screening Agar for Detection of Vancomycin- Nonsusceptible Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2010; 48(3): 949-51.

15. Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and he terogeneous Staphylococcus aureus isolates: compare- ison of E-test and agar screening methods. J Clin Microbiol. 2011; 49(6): 2147-2150.

16. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR Assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2005; 43(10): 5026-5033.

17. Liu D. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. Taylor and Francis CRC Press Publ, Florida, USA. 2011.

18. Naseer BS, Jayaraj YM. Identification of multiresistant Staphylococcus aureus in clinical specimens. J Res Med Sci. 2010; 4: 204-207.

19. Kalia A, Rattan A, Chopra P. (1999). A method for extraction of high-quality and high quality genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. Anal Biochem. 1999; 275(1): 1-5.

20. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, van Belkum A, Neela V. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. 2010; 59(4): 1135-1139.

21. Horne KC, Howden BP, Grabsch EA, Graham M, Ward PB, et al. Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. J Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(8): 3447-3452.

22. Jones RN. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. Clin Infect Dis. 2006; 42(1): 13-24.

23. Ahmadishoar SH, Nahaei MR, Amirmozafari N. Sensitivity of Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens against vancomycin by using E-test in Tabriz. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2008; 30(2): 17-23 [In Persian].

24. Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M. Where has vancomycin-heterogeneously resistant Staphylococcus aureus gone? Lancet. 2004; 363(9418): 1401-26.

25. 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(8): 519-523.

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

27. Tiwari KB. Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus may occur faster than expected. Int J Life Sc. 2009; 3(12): 6-13.

28. Mohraz M, Joneidi N, Rasouli Nejad M, Boroumand MA, Aligholi M, Shahsavan Sh. Determination of prevalence of Methicillin resistant Staphylococcus infections through measurement of MICs of Staphylococcus aureus isolates, Imam Hospital, November 2001 to January 2003. J Teh Fac Med. 2003; 61(3): 182-192[In Persian].

29. Graffunder EM, Venezia RA. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. J Antimicrob Chemother. 2002; 49(6): 999-1005.

30. Saffari M, Jokar M, Shajary GR, Piroozmand A, Mousavi GA. Minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus isolates collected from clinical samples of Shahid Beheshti hospital, Kashan during 2009. Feyz J Kashan Uni Med Sci. 2010; 14(3): 234-241[In Persian].

31. Haghgoo SM, Moaddab SR, Rafi A. Study of antibiotic resistance pattern of Staphylococcus aureus strains in isolated from blood cultures in Tabriz Shahid Madani Hospital. J Jentashapir. 2012; 3(2): 383-390.