

Prevalence of MRSA and VRSA Strains of Staphylococcus aureus in Healthcare Staff and Inpatients

Fatemeh Firouzi¹,
Javad Akhtari²,
Mohtaram Nasrolahei³

¹ MSc Student in Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Microbiology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 28, 2016 ; Accepted October 22, 2016)

Abstract

Background and purpose: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is specific strain of *S.aureus* that is a major cause of nosocomial infection. Nowadays, Vancomycin is the first-line treatment of severe MRSA infections. However, resistance to Vancomycin is reported in the form of Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) too. This study aimed at determining the prevalence of MRSA and VRSA in healthcare staff and inpatients.

Materials and methods: The study was performed in 447 healthcare workers and inpatients in Teaching Hospitals, in Sari, Iran, 2015. *Staphylococcus aureus* were isolated from the subjects using diagnostic tests. Then antibiotic resistance patterns of the isolates was determined by disk diffusion method. E-TEST was used for the methicillin and Vancomycin resistant isolates. Prevalence of mecA resistant gene in the isolates was analyzed by PCR. Finally, Induced resistance to Clindamycin was investigated.

Results: E-TEST showed that 31.31% of the isolates were resistant to methicillin and 16.1% were vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA). Prevalence of mecA gene in resistant isolates was 96.8%. The highest resistance was detected against Gentamicin (45.5%) and the lowest resistance rates were found against Vancomycin (0%) and Amikacin (14.1%). We also found that 12.9% of MRSA isolates were inducible resistance to Clindamycin.

Conclusion: This study revealed that MRSA isolates have a high resistance to Erythromycin, Clindamycin, Gentamicin, and Ciprofloxacin. Also, a high rate of multidrug-resistant was seen in MRSA isolates. But despite intermediate resistance to Vancomycin, this antibiotic can be used as a valuable drug in treatment of MRSA.

Keywords: nosocomial infection, polymerase chain reaction, Mazandaran, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*,

بررسی فراوانی سویه های MRSA و VRSA استافیلوکوک اورئوس در میان پرسنل درمانی و بیماران بستری

فاطمه فیروزی^۱
جواد اختری^۲
محترم نصرالهی^۳

چکیده

سابقه و هدف: سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)، یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. وانکومايسين اولین داروی انتخابی جهت درمان (عفونت های ایجاد شده توسط MRSA می باشد. اگرچه مقاومت در نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومايسين (VRSA) نیز گزارش شده است. بر این اساس هدف از این مطالعه بررسی فراوانی سویه های MRSA و VRSA/استافیلوکوکوس اورئوس در میان پرسنل درمانی و بیماران بستری در بیمارستان می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق که در سال ۱۳۹۴ انجام شد، از ۴۴۷ بیمار بستری و پرسنل درمانی، بیمارستان های آموزشی شهر ساری استافیلوکوکوس اورئوس با آزمایش های تشخیصی جدا سازی گردید. سپس مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها به روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. از روش E-TEST جهت تعیین MIC و شناسایی سویه های MRSA استفاده گردید. فراوانی ژن مقاومت mecA در ایزوله ها با روش PCR بررسی شد و در نهایت مقاومت القایی کلیندامایسین بررسی گردید. **یافته ها:** نتایج حاصل از تعیین MIC به روش E-TEST نشان داد که ۳۱/۳۱ درصد ایزوله ها مقاوم به متی سیلین بودند و ۱۶/۱ درصد ایزوله های MRSA دارای مقاومت نسبی به وانکومايسين بوده اند. شیوع ژن mecA در ایزوله های مقاوم ۹۶/۸ درصد بود. بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک جنتامایسین (۴۵/۵ درصد) و کمترین مقاومت به وانکومايسين (صفر درصد) و آمیکاسین (۱۴/۱ درصد) بود. در بین ایزوله های MRSA، ۱۲/۹ درصد مقاومت القایی به دیسک کلیندامایسین مشاهده شد. **استنتاج:** این تحقیق نشان داد که مقاومت نسبتاً بالایی به اریترومايسين، کلیندامایسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین در بین ایزوله های مقاوم به متی سیلین وجود دارد و درصد بالایی از مقاومت چند دارویی در میان ایزوله های MRSA مشاهده گردید. ولی علی رغم مقاومت نسبی به وانکومايسين، این آنتی بیوتیک کماکان داروی با ارزشی در درمان MRSA می باشد.

واژه های کلیدی: عفونت بیمارستانی، واکنش زنجیره ای پلیمرز، مازندران، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومايسين

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت، خانواده میکروکواسیه ها می باشد که به عنوان دومین بدون اسپور و غیر متحرک، به قطر ۱۰/۵ میکرون از پاتوژن شایع عفونت های بیمارستانی شناخته شده

E-mail: mnasrolahei@yahoo.ca

مؤلف مسئول: محترم نصرالهی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیام اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱

مدت طولانی در بیمارستان‌ها پایدار می‌مانند (۹-۱۱). امروزه با غربالگری پرسنل و نیز بیماران بستری در بیمارستان‌ها (با مدت بستری بیش از ۴۸ ساعت)، ناقلین سویه MRSA را ایزوله کرده و با درمان این افراد به وسیله سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز با استفاده از ضد عفونی‌کننده‌های موضعی، از میزان بروز بیماری‌های ناشی از این باکتری تا حدود زیادی جلوگیری به عمل می‌آید (۹).

با ظهور سویه‌های MRSA و شیوع آن در بیمارستان‌های سرتاسر دنیا، وانکومايسين به عنوان اولین خط درمان عفونت‌های ناشی از MRSA مطرح شد (۱۲). ولی از سال ۱۹۹۷، اولین گزارش مقاومت نسبی به وانکومايسين از ژاپن گزارش شد. در سال ۲۰۰۲ نیز اولین سویه مقاوم به وانکومايسين (VRSA) در بیمارستانی در میشیگان آمریکا گزارش گردید (۱). امروزه شیوع سویه‌های با مقاومت نسبی (VISA) و با مقاومت کامل (VRSA) از نقاط مختلف جهان و از جمله کشور ما گزارش می‌شود (۶).

مقاومت به وانکومايسين در استافیلوکوکوس اورئوس به سه شکل VISA=Vancomycin Intermediate *S.aureus*، hVISA=hetero Vancomycin intermediate *S.aureus* و VISA=Vancomycin Intermediate *S. aureus* می‌باشد. مقاومت کامل به وانکومايسين در اثر انتقال ژن van از انتروکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از طریق کونژوگاسیون صورت می‌گیرد (۱۳). ظهور سویه‌های VISA و hVISA به دلیل ضخیم شدن دیواره سلولی رخ داده و ژن van نقشی در ایجاد این سویه‌ها ندارد (۱۴). از آنجا که انتشار سویه‌های MRSA و VRSA استافیلوکوکوس اورئوس در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و الگوی حساسیت و مقاومت سویه‌های مذکور در مقابل سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز دائماً در حال تغییر است و با توجه به فراوانی عفونت‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌ها و پایداری این سویه‌ها در طبیعت و به علت مقاومت به طیف وسیعی از

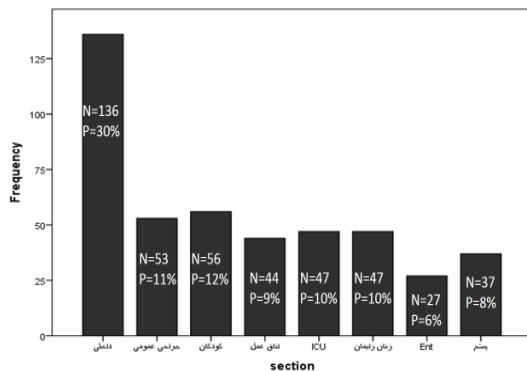
است (۲،۱) و عامل عفونت‌های تهدیدکننده حیات از جمله باکتری، پنومونی، استئومیلیت، عفونت پوست و بافت نرم (SSTIs)، سپتی‌سمی، اندوکاردیت و غیره می‌باشد (۴،۳). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، سویه خاصی از این باکتری است که از سال ۱۹۶۰ پدیدار شده و امروزه به عنوان یک مشکل درمانی جدی در جهان مطرح می‌باشد (۴،۱) و از جمله عفونت‌های مهم بیمارستانی محسوب می‌شود (Hospital-acquired = HA-MRSA) (۵،۳،۲). علت بروز این مقاومت، حضور ژن کروموزومی (mecA) در این سویه‌ها است که با جهش نقطه ایی در ناحیه ایی از ژن استافیلوکوک اورئوس ایجاد می‌شود. ژن مقاومت به متی‌سیلین (mecA)، یک پروتئین اختصاصی اتصالاتی به پنی‌سیلین به نام PBP2a را کد می‌کند. این پروتئین تمایل اتصالاتی بسیار ضعیف به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد و با کاست بزرگ ژن SCCmec (Staphylococcal cassette chromosome mec) متحرک است، حمل می‌شود (۷،۶). این کاست تشکیل شده از سه قسمت ccr complex، J.region و mec complex بوده که ژن mecA در ناحیه complex mec مسئول بیان پروتئین PBP2a است و در نتیجه باعث مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر متی‌سیلین، اکساسیلین و نفی‌سیلین می‌شود (۸). درصد جداسازی شده HA-MRSA در بیمارستان‌های کشورهای در حال توسعه از ۲ درصد در سال ۱۹۷۰ به ۳۰ درصد در سال ۱۹۹۰ رسیده است (۴). بنابر آمار ارائه شده، تقریباً ۲۵ درصد افراد کارمند بخش‌های مختلف درمانی، حامل این ارگانیزم در مجاری فوقانی بینی خود هستند و از طرفی بیماران بستری نیز با زخم‌های باز یا بینی کلونیزه شده، مهم‌ترین مخزن این باکتری هستند. سویه‌های MRSA معمولاً در قسمت‌های مختلف آناتومیکی پرسنل شاغل در بیمارستان‌ها جایگزین می‌شوند و به وسیله دست‌ها، از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شوند. بدین ترتیب سبب ایجاد اپیدمی در بیمارستان‌ها شده و به

نمونه گیری، همه پلیت‌ها در ظرف کم‌تر از ۲ ساعت به آزمایشگاه تحقیقات میکروب شناسی منتقل شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند (۵). سپس با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز به دو روش اسلایدی و لوله ای، مانیتول سالت آگار و دی‌ان‌آز، استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی و جداسازی قرار گرفت (۲).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی نمونه های جمع آوری شده از

بیماران بستری و پرسنل

فرد مورد مطالعه	تعداد (درصد)
بیمار بستری	۲۵۱ (۵۶/۱)
پزشک	۵۳ (۱۱/۹)
پرستار	۱۱۴ (۲۵/۵)
خدمه	۲۹ (۶/۵)
جمع	۴۴۷ (۱۰۰)



نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی نسبی نمونه های جمع آوری شده به تفکیک بخش (تعداد = N و درصد فراوانی = p)

تعیین حساسیت به مواد ضد میکروبی (آنتی بیوگرام) آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفوزن (Kirby-Bauer) مطابق با دستورالعمل ۲۰۱۵ CLSI انجام شد. به این منظور از ۱۲ آنتی بیوتیک (پادتن طب- ایران) مشتمل بر اکسالیلین (۱μg) (OX)، وانکومايسين (۳۰μg) (V)، کلیندامایسین (۲μg) (CC)، اریترومايسين (۱۵μg) (E15)، آمیکاسین (۳۰μg) (AN)، توبرامایسین (۱۰μg) (TOB)، جنتامایسین (۱۰μg) (GM)، ریفامپین (۵μg) (RA)، سیپروفلوکساسین (۵μg) (CP)،

مواد ضد میکروبی و گسترش روزافزون سویه‌های MRSA، و نیز تفاوت فاحش بین الگوی مقاومت دارویی سویه‌های MRSA و MSSA، شناخته نشدن حتی تعداد کم سویه‌های مقاوم می‌تواند مشکلات بسیار زیادی را در روند درمان ایجاد نماید (۱۶، ۱۵، ۹). از طرفی ظهور سویه‌های VISA در بیمارستان‌ها و گسترش مقاومت به وانکومايسين یک تهدید واقعی بهداشت عمومی تلقی می‌شود. لذا این مطالعه با هدف تعیین میزان فراوانی سویه‌های MRSA و VRSA استافیلوکوک اورئوس در بین پرسنل درمانی و افراد بستری در بخش‌های مختلف دو بیمارستان امام خمینی (ره) و بوعلی سینا ساری انجام گردید.

مواد و روش ها

نحوه نمونه گیری و جداسازی ایزوله ها

در این مطالعه مقطعی که بین مهر ماه سال ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ انجام شد، با در نظر گرفتن کم‌ترین درصد شیوع MRSA معادل ۳ درصد (۹) و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (CI) و میزان خطا ۵ درصد و با استفاده از فرمول $N = Z^2 P (1 - P) / d^2$ ، تعداد ۴۴۷ نمونه انتخاب گردید. نمونه‌ها از ۴۴۷ بیمار که بیش از ۴۸ ساعت در بیمارستان بستری بودند و پرسنل درمانی که از نظر شغل به ۳ گروه (الف) پزشک (پزشک، جراح، دستیار، رزیدنت و اینترن)، (ب) پرستار (کارشناس، تکنسین، سرپرستار، پرستار و ماما) و (ج) خدمه (بهبار، کمک بهیار، نگهبان و خدمه) تقسیم‌بندی شدند، انتخاب شدند (۱۷) که شامل ۲۵۱ بیمار بستری و ۱۹۶ پرسنل در بخش‌های مختلف دو بیمارستان بوعلی سینا (۱۳۱ بیمار بستری و ۹۲ پرسنل) و امام خمینی (ره) (۱۲۰ بیمار بستری و ۱۰۴ پرسنل) شهر ساری به صورت تصادفی نمونه گیری شد (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱).

با استفاده از سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی، از ناحیه قدامی بینی و از روی پوست دست و زیر ناخن هر فرد در شرایط استریل نمونه گرفته شد و بلافاصله در بلاد آگار (مرک آلمان) کشت شد. بعد از

زمان لازم، عدد MIC قرائت و نتایج بر اساس جدول داخل بروشور HIMEDIA گزارش گردید (۱۷،۵،۱).

تعیین مقاومت القایی اریترومایسین به کلیندامایسین به روش *D-TEST*

بررسی مقاومت القایی اریترومایسین و کلیندامایسین به روش *D-TEST* انجام شد؛ به این ترتیب که از تمامی ایزوله های استافیلوکوک اورئوس سوسپانسیونی برابر با غلظت نیم مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. سپس دو دیسک کلینداماسین (۲μg) و اریترومایسین (۱۵μg) (پادتن طب- ایران) به فاصله ۱۵-۲۶ به صورت مرکز به مرکز روی محیط قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. مسطح شدن ناحیه 'مهاری' در اطراف دیسک کلیندامایسین در مجاورت دیسک اریترومایسین (منطقه 'مهاری' به شکل D) به عنوان نتیجه 'مثبت تلقی' شد (۲).

بررسی فراوانی ژن *mecA* در ایزوله های *MRSA* استخراج ژنوم

در ابتدا DNA ایزوله های *MRSA* به روش دستی و با استفاده از 0/5 mol EDTA, SDS و Tris HCL (جهت تهیه Lysis buffer) و پروتیناز K، فنل کلروفرم و اتانول مطلق و اتانول ۷۰ درصد جداسازی شد و بعد از استخراج DNA برای اطمینان از انجام درست استخراج، OD و غلظت محلول حاوی DNA با دستگاه نانودراپ خوانده شد.

واکنش *PCR*

با روش *PCR* ساده حضور ژن *mecA* در نمونه های *MRSA* ردیابی شد (تصویر شماره ۱). حجم کل مخلوط *PCR* در این تحقیق ۲۰μl در نظر گرفته شد که شامل Master Mix (2x) 10μl ساخت شرکت سیناژن، 2μl DNA الگو، 1μl از پرایمرهای رقیق شده R و F (Prf = 0/5μl, PrR = 0/5μl) و 7μl آب دیونیزه استریل

کوتریموکسازول (۲۳/۷۵ μg، ۱/۲۵ μg) (SXT)، نیتروفوراتوئین (۳۰۰μg) (FM) و نورفلوکساسین (۱۰μg) (NOR) استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون میکروبی برای همه ایزوله های استافیلوکوک اورئوس در سرم فیزیولوژی برابر با غلظت نیم مک فارلند (۱۰^۸ × ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر) تهیه گردید. سپس روی محیط مولر هیتون آگار (HIMEDIA) به صورت سفره ایی کشت داده شد و بعد دیسک ها با پنس استریل با رعایت فاصله استاندارد روی محیط قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس قطر هاله 'عدم رشد اندازه گیری' و با مقایسه با جدول CLSI ۲۰۱۵ به ۳ صورت مقاوم، بینابینی و حساس گزارش شد (۵).

تعیین ایزوله های *MRSA* و *VRSA*

پس از تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و شناسایی ایزوله های *MRSA* و *VRSA* از نوارهای E-TEST ترکیبی اکساسیلین {VAN} و وانکومایسین {OXA} (0/064-8/0μg/ml) شرکت HIMEDIA استفاده گردید. جهت انجام آزمون E-TEST از محیط مولر هیتون آگار با ۲ درصد نمک NaCl (بر طبق توصیه جدول CLSI) استفاده شد (۱۸). مثل همان روش در انتشار دیسک، به وسیله سواپ استریل از سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل با نیم مک فارلند بر روی محیط مولر هیتون آگار، کشت چمنی داده شد و با استفاده از یک پنس استریل، نوارهای E-TEST از پوشش مخصوص خارج گردیدند و با رعایت شرایط استاندارد (فاصله از لبه پلیت ۱۵ mm) و با کمی فشار پنس بر روی نوارها به طوری که به سطح محیط کشت بچسبند، روی محیط قرار داده شدند. سپس پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از سپری شدن

و جهت مشاهده و عکس برداری در دستگاه Gel Duct (ترانس ایلومیتور) قرار داده شد. لازم به ذکر است که در این تحقیق به دلیل استفاده از Master Mix رنگی نیاز به اضافه کردن بافر لودکننده (Loading Buffer) به محصول PCR نبود (۱۹).

قابل به ذکر است در تمامی آزمایشات از سویه MRSA400 به عنوان کنترل حساس و سویه ATCC25923 به عنوان کنترل مقاوم به متی سیلین استفاده گردید (۲۰).

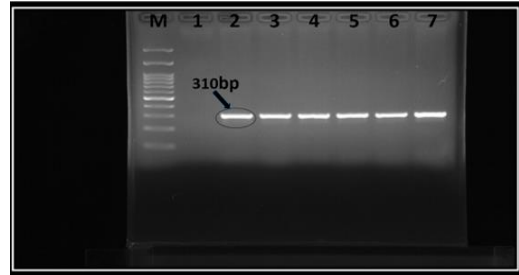
آنالیز داده‌ها

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) و تحلیل آمار به دست آمده با استفاده از Chi-Square و Student T-test انجام شد. قابل به ذکر است که با در نظر گرفتن CI=95% (درصد خطای ۵ درصد) $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه میانگین و انحراف معیار سن افراد مورد مطالعه $37/8 \pm 19/19$ سال می باشد (میانگین و انحراف معیار سن مردان $20/00 \pm 39/9$ سال و زنان $35/9 \pm 18/32$ سال بود). از ۴۴۷ نمونه جمع آوری شده، پس از انجام آزمایش‌های مربوطه، ۹۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد و پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و آنتی بیوگرام، ۳۱ ایزوله به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ۵۴ نفر (۵۴/۵۴ درصد) ناقل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی و ۱۱ نفر (۱۱/۱۲ درصد) در دست و ۳۴ مورد (۳۴/۳۴ درصد) در دست و بینی بودند که از لحاظ فتوتیپی تمام ایزوله های دست و بینی شبیه هم بودند. در مجموع درصد فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌های مورد بررسی ۲۲/۱ درصد و درصد فراوانی MRSA ۳۱/۳۱ درصد به دست آمد. هیچ سویه مقاوم به وانکومایسین (VRSA) مشاهده نشد. ۵ ایزوله با مقاومت نسبی به وانکومایسین

بود. سپس مخلوط‌های واکنش در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. توالی پرایمرهای استفاده شده و برنامه حرارتی و زمانی داده شده در دستگاه ترموسایکلر در جدول شماره ۲ و ۳ آورده شده است.



تصویر شماره ۱: نتیجه واکنش PCR برای ژن mecA به اندازه 310bp. مسیر M - لدر 1000bp، مسیر ۱- کنترل منفی، مسیر ۲- کنترل مثبت، مسیرهای ۳ تا ۷- ایزوله های دارای ژن مقاومت (mecA)

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای ژن مقاومت به متی سیلین (اکسالیلین)

ژن	پرایمر	منابع
mecA	5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A -3'(mecA.F)	(۳۵،۲۰)
	5' CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A -3'(mecA.R)	

جدول شماره ۳: شرایط انجام PCR برای دستگاه ترموسایکلر

فاکتور	دما (°C)	زمان
مرحله		
Primary denaturation	95°C	2min
Denaturation	94°C	30s
Annealing	62°C	30s
Extension	72°C	40 s
Go to Repeat	35 cycle	
Final Extension	72°C	7min
Holding	4°C	

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR با ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از بافر TBE (1X) الکتروفورز شدند؛ به طوری که مقدار 8μl از محصول PCR را برداشته و به آرامی در داخل چاهک ژل بارگذاری شد. در چاهک اول، مقدار 4μl مارکر (ladder 100pb) (جهت مقایسه و شناسایی باندها) بارگذاری گردید. در پایان، تانک به منبع تغذیه الکتریکی وصل شد و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. وقتی نمونه سه چهارم طول ژل را طی کرد، منبع تغذیه خاموش و ژل را از تانک خارج کرده

(VISA) بود (۱۶/۱ درصد از ایزوله های MRSA، مقاومت نسبی به وانکومايسين داشتند).

ارتباط معنی داری بین حالت ناقلی استافیلوکوکوس اورئوس و جنس افراد دیده نشد ($p_v = 0/41$, $df = 1$), $\chi^2 = 0/626$ ناقلی *S.a* و سن افراد ناقل وجود نداشت ($p_v = 0/06$), $t = 1/82$, $df = 445$).

ارتباط معنی داری بین بیماری زمینه ای و حالت ناقلی *S.a* در این مطالعه دیده نشد ($p_v = 0/94$, $df = 1$), $\chi^2 = 0/005$ در این مطالعه از نظر آماری بین شغل پرسنل و حالت ناقلی *S.a* ارتباط دیده شد ($p_v = 0/002$, $df = 2$), $\chi^2 = 12/95$).

کلاً از ۱۹۶ نفر پرسنل درمانی، ۳۸ نفر (۱۹/۴ درصد) ناقل *S.a* بودند که در این میان، درصد فراوانی *S.a* در پزشک ها از همه بیش تر بود (از ۵۳ پزشک، ۱۹ نفر معادل ۳۵/۸ درصد ناقل *S.a* بودند) و از ۲۹ نفر خدمه ۵ نفر (۱۷/۲ درصد) و از ۱۱۴ نفر پرستار، ۱۴ نفر (۱۲/۳ درصد) ناقل *S.a* بودند. بین مدت زمان بستری و حالت ناقلی *S.a* ارتباط معنی داری وجود داشت ($p_v = 0/00$, $df = 3$), $\chi^2 = 24$. به طوری که در بیمارانی که مدت زمان بیش تری در بیمارستان بستری بودند، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس بیش تر بود. در این تحقیق، بیش ترین درصد فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بخش کودکان (۳۲/۱ درصد) و سپس در اتاق عمل (۳۱/۸ درصد) و بیش ترین فراوانی MRSA در بخش ICU (۵۰ درصد) و سپس در بخش داخلی (۴۴/۱ درصد) و جراحی عمومی (۴۴/۴ درصد) دیده شد.

نتایج آنتی بیوگرام

درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ۹۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس به روش دیسک دیفیوژن به شرح ذیل بود: اکساسیلین ۳۱/۳۱ درصد، وانکومايسين صفر درصد، اریترومايسين ۴۱/۴ درصد، کلیندامایسین ۳۹/۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۳۴/۳ درصد، کوتریموکسازول ۲۶/۳ درصد، آمیکاسین ۱۴/۱ درصد، جنتامایسین ۴۵/۴ درصد، نیتروفورانتوئین ۲۰/۲ درصد، نورفلوکساسین ۴۰/۴ درصد، توبرامایسین ۲۶/۳ درصد و ریفامپین ۱۸/۲ درصد (جدول شماره ۴).

در ایزوله های MRSA، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به غیر از آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین، در بقیه آنتی بیوتیک ها به صورت محسوسی بالاتر از ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بود. در این ایزوله ها، درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در روش دیسک دیفیوژن به این قرار بود: اکساسیلین ۱۰۰ درصد، وانکومايسين صفر درصد، اریترومايسين ۹۰ درصد، کلیندامایسین ۸۰/۶ درصد، سیپروفلوکساسین ۷۴ درصد، کوتریموکسازول ۲۹ درصد، آمیکاسین ۲۲/۶ درصد، جنتامایسین ۷۷/۴ درصد، نیتروفورانتوئین ۹/۷ درصد، نورفلوکساسین ۶۷/۷ درصد، توبرامایسین ۳۵/۵ درصد و ریفامپین ۳۸/۷ درصد (جدول شماره ۵).

مقاومت چند دارویی در ایزوله های MRSA

در ایزوله های MRSA، مقاومت به چندین آنتی بیوتیک (MDR) به فراوانی مشاهده شد، به طوری

جدول شماره ۴: نتایج آنتی بیوگرام ۹۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس در آزمون دیسک دیفیوژن

الگوی حساسیت <i>S.a</i>	V	OX	RA	E	CC	CP	SXT	AN	GM	FM	NOR	TOB
حساس	99	68	81	58	60	60	72	77	37	75	52	48
بیابینی	-	-	-	-	-	5	1	8	17	4	7	25
مقاوم	-	31	18	41	39	34	26	14	45	20	40	26
درصد مقاومت	0	31.3	18.2	41.4	39.4	34.3	26.3	14.1	45.5	20.2	40.4	26.3

(V) وانکومايسين، (OX) اکساسیلین، (RA) ریفامپین، (E) اریترومايسين، (CC) کلیندامایسین، (CP) سیپروفلوکساسین، (SXT) کوتریموکسازول، (AN) آمیکاسین، (GM) جنتامایسین، (FM) نیتروفورانتوئین، (NOR) نورفلوکساسین، (TOB) توبرامایسین

جدول شماره ۵: نتایج آنتی بیوگرام ۳۱ ایزوله MRSA در آزمون دیسک دیفیوژن

الگوی حساسیت MRSA	V	OX	RA	E	CC	CP	SXT	AN	GM	FM	NOR	TOB
حساس	31	-	19	3	6	5	21	23	4	28	10	16
بینایی	-	-	-	-	-	3	1	3	1	-	-	4
مقاوم	-	31	12	28	25	23	9	7	24	3	21	11
درصد مقاومت	0	100	38.7	90	80.6	74	29	22.6	77.4	9.7	67.7	35.5

(V) وانکومايسين، (OX) اکساسيلين، (RA) ريفامپين، (Eis) اريترومايسين، (CC) کليندامايسين، (CP) سپروفلوکساسين، (SXT) کوتریموکسازول، (AN) آمیکاسین، (GM) جنتامایسین، (FM) نیتروفورانتوین، (NOR) نورفلوکساسین، (TOB) توبرامایسین

نتایج حاصل از D-TEST

در تمامی ایزوله‌های MRSA که مقاوم به اریترومايسين و حساس به کلیندامایسین بودند، در آزمون D-TEST، مقاومت القایی به شکل حرف D در اطراف دیسک کلیندامایسین مشاهده گردید. در این تحقیق از ۳۱ ایزوله MRSA، ۴ مورد دارای مقاومت القایی بودند. در واقع به بیان دیگر در این تحقیق در هر ایزوله MRSA که به اریترومايسين مقاوم و به کلیندامایسین حساس بود، هاله عدم رشد به شکل حرف D در اطراف دیسک کلیندامایسین به وضوح مشاهده شد (درصد مقاومت القایی معادل با ۱۲/۹ درصد).

نتایج حاصل از PCR بر روی ایزوله های MRSA

در واکنش PCR، از ۳۱ ایزوله MRSA، یک ایزوله فاقد ژن mecA بود، در حالی که در بررسی فنوتیپی هم در آزمون دیسک دیفیوژن (هاله عدم رشد برای دیسک OX = 0) و هم در آزمون E-TEST (MIC=8µg/ml) مقاومت به اکساسیلین را نشان داد. با این تفصیل، شیوع ژن مقاومت در ایزوله های مقاوم ۹۶/۸ درصد بود.

بحث

در این مطالعه، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌های مورد بررسی، ۲۲/۱ درصد و شیوع MRSA نیز ۳۱/۳۱ درصد تعیین گردید. ۵ مورد از ایزوله‌ها دارای مقاومت نسبی به وانکومايسين بودند و هیچ سویه VRSA مشاهده نشد. با توجه به مطالعات مشابه، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA در بیمارستان‌های

که ۳۵ درصد از ایزوله‌ها به غیر از اکساسیلین به ۵ و ۳۲ درصد به ۶ آنتی‌بیوتیک دیگر مقاومت داشتند و یک ایزوله نیز به ۸ آنتی‌بیوتیک مقاومت داشت (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۶: میزان مقاومت چندگانه دارویی در ایزوله های MRSA

MDR	Frequency	Percent
۳ آنتی بیوتیک	۲	۶/۰
۴ آنتی بیوتیک	۵	۱۶/۰
۵ آنتی بیوتیک	۱۱	۳۵/۰
۶ آنتی بیوتیک	۱۰	۳۲/۰
۷ آنتی بیوتیک	۲	۶/۰
۸ آنتی بیوتیک	۱	۳/۰
Total	۳۱	۱۰۰/۰

نتایج حاصل از E-TEST

نتایج حاصله از MIC به روش E-TEST نشان داد که ۳۱ ایزوله (۳۱/۳۱ درصد) مقاوم به اکساسیلین (MIC > 4µg/ml) بودند (MRSA) و ۵ ایزوله (۱۶/۱ درصد) دارای مقاومت نسبی به وانکومايسين (یعنی VISA) بودند (با MIC=4-8µg/ml). از این ۵ مورد، ۴ ایزوله با حداقل غلظت مهارى 4µg/ml و یک ایزوله با MIC= 6µg/ml بود که این یک ایزوله از یک خانم ۳۵ ساله از بخش ICU جداسازی گردید (جدول شماره ۷).

جدول شماره ۷: نتایج حاصل از تعیین MIC به روش E-TEST برای ۹۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس

آنتی بیوتیک	حساس	بینایی	مقاوم
اکساسیلین	68 MIC(µg/ml)≤4	0	31 MIC(µg/ml)≥4
وانکومايسين	94 MIC(µg/ml)≤2	5 MIC(µg/ml)=4-8	0 MIC(µg/ml)≥16

مورد بررسی در سطح متوسط و نسبتاً پایینی قرار دارد (۲۱،۹). در این تحقیق، بیشترین فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بخش کودکان و سپس در اتاق عمل و بیشترین فراوانی MRSA در بخش های داخلی و جراحی بود. در مطالعه ایی که خلیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در یزد انجام دادند، بیشترین فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در اتاق عمل گزارش شد (۲۲). در مطالعه ایی که توسط Zriouila و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در موراگو انجام شد، بیشترین شیوع در بخش سوختگی و بخش پوست دیده شده است (۱۶).

در روش مولکولی (PCR)، از ۳۱ ایزوله شناسایی شده در روش دیسک و E-TEST، یکی از ایزوله ها بدون ژن *mecA* بود. Cekovska و همکاران در مطالعه ای بر روی ۲۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به متی سیلین را با روش های فنوتیپی و PCR تعیین و سه ایزوله فاقد ژن *mecA* را با روش فنوتیپی مقاوم به متی سیلین گزارش نمودند (۲۳).

در مطالعه ای که توسط نادری نسب و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، ۸۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین به دو روش PCR و دیسک دیفیوژن مورد مقایسه قرار دادند که ۴۶ ایزوله در روش PCR و هم روش دیسک دیفیوژن به عنوان سویه های MRSA گزارش شدند، ولی از ۴۰ سوشی که *mecA* منفی بودند، ۲۶ مورد (۳۰/۲ درصد) مقاومت و ۳ مورد (۳/۵ درصد) مقاومت نسبی را در روش دیسک دیفیوژن نشان دادند (۲۴). به وجود آمدن سویه های MRSA گاهی به دلیل PBP دیگری به غیر از PBP2a که توسط ژنی غیر از ژن *mecA* کد می گردد، نسبت داده می شود (۲۵). García-Álvarez و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در یک مطالعه بیان کردند که مکانیسم های مقاومت اکسالیلین از طریق دیگری به غیر از کسب ژن *mecA* و توسط یک هومولوگ متفاوت *mecA* به نام *mecC* نیز ممکن است رخ دهد (۲۶). در نتیجه با روش های ژنوتیپی جداسازی ژن *mecA* نمیتوان انواع سویه های

مقاوم دارای ژن *mecC* را شناسایی کرد. از طرفی گاهی مکانیسم های دیگری غیر از مقاومت کروموزومی مانند مقاومت از طریق پلاسمیدی در بروز سویه های MRSA دخیل است (۲۷). بنابراین لازم است در شناسایی سویه های MRSA، طبق توصیه سازمان CLSI از روش فنوتیپی تعیین MIC که علاوه بر مشخص کردن مقاومت دارویی (اطلاعات کیفی)، اطلاعات کمی جهت تجویز دوز یا غلظت موثر دارو به دست می دهد، استفاده گردد (۱۸).

در این مطالعه، اگرچه نبود سویه های VRSA، یک یافته امیدوارکننده در درمان عفونت های ناشی از MRSA در بیمارستان های مورد مطالعه می باشد، اما از طرفی فراوانی سویه های VISA برابر با ۱۶/۱ درصد، زنگ خطر برای مواجهه با سویه های مقاوم در آینده نزدیک است. در مطالعه فرهادیان، مقاومت نسبی به وانکومایسین (VISA)، ۴ درصد گزارش شد (۶). در مطالعه ایی که توسط حدادی و همکارانش در تهران در سال ۱۳۹۰ انجام گرفت، از ۸۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، فقط یک مورد VISA گزارش گردید (۱). در مطالعه ایی که توسط مهاجری و همکارانش در کرمانشاه در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، ۴۵/۹ درصد از ایزوله های مورد بررسی به عنوان سویه های hVISA گزارش شدند (۲۸). ولی در هیچ کدام از مطالعات قید شده، مقاومت کامل به وانکومایسین گزارش نشده است. در ایران، اولین گزارش سویه های VISA توسط نادری نسب و همکارانش از مشهد، صورت گرفت (۲۹). تا سال ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۱، فقط ۱۴ مورد VRSA دارای ژن *van* در دنیا گزارش شده است (۳۰، ۳۱). در این میان، یک مورد مربوط به گزارشی از ایران (بیمارستان امام خمینی تهران) می باشد (۳۲). در یک مطالعه مروری نیز که توسط نادری نسب و همکارانش انجام شد و ۱۲۴۴ مقاله بازبینی شده با کلید واژه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتایج نشان داد که تاکنون ۲۹ مورد VRSA در دنیا گزارش شده است که ۱۲ مورد آن در ایالات متحده امریکا و

گرفته‌ایمی که نتایج آن‌ها مبتنی بر استانداردهای NCCLS می‌باشد، درصد درستی از مقاومت را اعلام نمی‌نمایند. از طرفی با توجه به سفارش سازمان CLSI و مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC)، تشخیص سویه‌های MRSA و VRSA باید با تعیین MIC صورت گیرد.

سیاسگزاری

در پایان نویسندگان مقاله از پرسنل بیمارستان‌های آموزشی امام خمینی (ره) و بوعلی سینا شهر ساری، که صبورانه در امر نمونه‌گیری مساعدت و یاری رساندند، بی‌نهایت سپاسگزاری نموده و هم‌چنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت تأمین هزینه‌های طرح صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایند. مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی با شماره ثبت ۱۸۵۸ در دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

References

1. Hadadi A, MoradiTabriz H, Mehdipour B, Aghabagher, Moslehi B, Esmailzadeh P. Determining the prevalence of methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* by MIC and E-Test. Tehran Univ Med J 2011; 69(6): 344-351.
2. SobhaniPoor MH, Mansouri S, Saeidadel N. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Antibiotic Resistance Patterns of the Isolates from the Nose of Training Soldiers in Kerman in 2012. Iran J Med Microbiol 2014; 8(3): 15-21.
3. Ghadiri K, Ebrahimi E, Akramipour R, Rezaei M, khazaei S, Afsharin M, et al. Nasal carriage rate of community and hospital-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in children, Kermanshah, Iran. Iranian Journal of Clinical Infection Diseases 2011; 6(3): 117-120.
4. Maina EK, Kiiyukia C, Wamaea CN, Waiyaki PG, Kariuki S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections in patients in Nairobi, Kenya. Int J of Infect Dis 2013; 17(2): 115-119.
5. Dibaj R, Shoaie P, Hashemi A, Naser AD, Shojaei H. Study of Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA Nasal Colonization in 2-5 Years Old Children in Isfahan. Iran J Med Microb 2014; 8(3): 22-30.
6. Farhadian A, Nejad QB, Peerayeh SN, Rahbar M, Vaziri F. Determination of Vancomycin and Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Iranian Hospitals. British Microbiology Research Journal 2014; 4(4): 454-461.
7. Elimam MAE, Rehan S, Elmekki MA, Elhassan MM. Emergence of Vancomycin

- Resistant and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Patients with Different Clinical Manifestations in Khartoum State, Sudan. *J Am Sci* 2014; 10(6): 106-110.
8. Rezazadeh M, Mashouf RY, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. *Arak Med Univ J* 2013; 16(2): 29-37.
 9. Rahimi-Alang S, Asmar M, Cheraghali F, Yazarlou S, Amini A, Shakeri F, et al. Frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers in Gorgan. *Zahedan J Res Med Sci* 2010; 13(1): 17-22.
 10. Fluit AC, Wielders CLC, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolated from 25 university hospitals participating in the european CENTRY study. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3727-3732.
 11. Rondolph T. *Harrisons Principles of Internal Medicine (Bacterial Infections)*. 14th ed. 1998. ج. 215-224.
 12. Onanuga A, Temedie TC. Nasal carriage of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* in healthy inhabitants of Amassoma in Niger delta region of Nigeria. *Afr Health Sci* 2011; 11(2): 176-181.
 13. Oprea SF, Zaidi N, Donabedian SM, Balasubramaniam M, Hershberger E, Zervos MJ. Molecular and clinical epidemiology of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004 53: 626-630.
 14. Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Bachi BB. Mechanisms of Heteroresistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(4): 724-728.
 15. Dinic M, Vukovic S, Kocic B, Stankovic D, Bogdanovic M. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Adults and in School Children. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Nissensis* 2013; 30(1): 31-36.
 16. Zriouila SB, Bekkalib M, Zeroualia K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(3): 279-283.
 17. Saadat S, Solhjoo K, Norouz-nejadfard MJ, Kazemi A, Rouhi R, Mardaneh J. The frequency of *Staphylococcus aureus* among Shiraz hospital personnel and determination of their antibiotic sensitivity pattern. *Iranian South Medical Journal (ISMJ)* 2014; 17(5): 916-926.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI M100-S25 2015; 35(3): 64-70.
 19. Darabi N, Habibollahi H, Shahbadian K. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from patients and personnel in Army hospital. *J Army Univ (JAU)* 2010; 8(3): 192-199.
 20. Mahdiyoun SM, Ahanjan M, Gudarzi M, Rezaee R. Prevalence of Antibiotic Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Determining Aminoglycoside Resistance Gene by PCR in Sari and Tehran Hospitals. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(128): 97-107.
 21. Soltani B, Ardakan AT, Moravveji A, Erami M, Rezaei MH, Moniri R, et al. Risk factors for Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization of healthy children.

- Jundishapur J Microbiol 2014; 7(9): e 20025.
22. Khalili MB, Moshref M, Sharifi M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* (Sa) and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) In Personnel of Operation Room of Shahid Sodoughi Hospital, Yazd, Iran. Journal of Payavard Salamat 2013; 6(5): 392-402.
 23. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility test methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. Bratisl Lek Listy 2005; 106(4): 163-167.
 24. Naderinasab M, Tavakol M, Afshari J, Nazem M, Fatehmanesh P, Faramarzi H, et al. Determination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by phenotypic method. Med J Mashhad Univ Med Sci 2006; 48(87): 7-16.
 25. Sabath LD. Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med 1982; 97(3): 339-344.
 26. García-Álvarez L, Holden M, Lindsay H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11(8): 595-603.
 27. Behzadiyannejad G, Anvari M. Antibiotic resistance patterns and plasmid profiles of 200 clinically isolated *staphylococcus aureus*. J Semnan Univ Med Sci 2001; 2(2): 67-71.
 28. Mohajeri P, Farahani A, Davoodabadi A, Oghaderi, Rahnama M, Heidarzadeh S. Prevalence of Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Kerman Univ Med Sci 2014; 21(5): 394-404.
 29. Naderinasab M, Fatehmanesh P, Shahnavazi B. *Staphylococcus aureus* resistant against Vancomycin. Arak Univ Med Sci (Rahavard-e Danesh) 2004; 6(4): 51-55.
 30. 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(1): 99-139.
 31. Mortality and Morbidity Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control and Prevention Notifiable Diseases and Mortality Tables. (MMWR) 2011; 60(15): e 482.
 32. Emaneini M, Aligholi M, Hashemi FB, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, et al. Isolation of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital in Tehran. J Hosp Infect 2007; 66(1): 92-103.
 33. Naderinasab M, Askari O, Tabatabai SM. The frequency of vancomycin-resistant *Staphylococcus gold* in the world: a systematic review. Tabriz University of Medical Sciences Congress Portal. (Persian).
 34. Rehm SJ. *Staphylococcus aureus*: The new adventures of a legendary pathogen. Cleve Clin J Med 2008; 75(3): 177-192.
 35. Mostafa S. Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by spa gene polymorphism. Afr J Microb Res 2013; 7(9): 755-759.