

ORIGINAL ARTICLE

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 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 VRSA و MRSA استافیلولوکوک اورئوس در میان پرسنل درمانی و بیماران بستری

فاطمه فیروزی^۱

جواد اختنی^۲

محترم نصرالهی^۳

چکیده

سابقه و هدف: سویه استافیلولوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)، یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. و انکومایسین اولین داروی انتخابی جهت درمان (عفونت های ایجاد شده توسط MRSA می باشد. اگرچه مقاومت در نمونه های استافیلولوکوکوس اورئوس مقاوم به انکومایسین (VRSA) نیز گزارش شده است. بر این اساس هدف از این مطالعه بررسی فراوانی سویه های MRSA و VRSA استافیلولوکوکوس 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 استافیلولوکوکوس 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 ۹۶/۸ درصد ایزوله های MRSA دارای مقاومت نسبی به انکومایسین بوده اند. شیوع ژن meCA در ایزوله های مقاوم ۱۶/۱ درصد بود. بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک جنتامایسین (۴۵/۵ درصد) و کمترین مقاومت به انکومایسین (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 اریترومایسین، کلیندامایسین، جنتامایسین و سپروفلوكسازین 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 انکومایسین، این آنتی بیوتیک کما کان داروی با ارزشی در درمان MRSA می باشد.

واژه های کلیدی: عفونت بیمارستانی، واکنش زنجیره ای پلیمراز، مازندران، استافیلولوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استافیلولوکوکوس اورئوس مقاوم به انکومایسین

مقدمه

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

مؤلف مسئول: محترم نصرالهی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پامبر اعظم، دانشکده پزشکی دانشجویی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۱. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات رئیسی اینستیتو، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات رئیسی اینستیتو، 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)، ناقلين سویه MRSA را ایزوله کرده و با درمان این افراد به وسیله سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز با استفاده از ضد عفونی کننده‌های 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، وانکومایسین به عنوان اولین خط درمان عفونت‌های ناشی از MRSA مطرح شد(۱۲). ولی از سال ۱۹۹۷، اولین گزارش مقاومت نسبی به وانکومایسین از ژاپن گزارش شد. در سال ۲۰۰۲ نیز اولین سویه مقاوم به وانکومایسین (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).

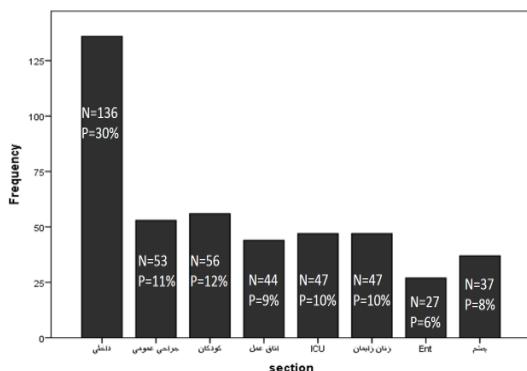
مقاومت به وانکومایسین در استافیلکوکوس اورئوس به شکل VISA=Vancomycin Intermediate *S.aureus*) hVISA=hetero Vancomycin intermediate *S.aureus* (VISA=Vancomycin Intermediate *S. aureus* و می‌باشد. مقاومت کامل به وانکومایسین در اثر انتقال ژن از انتروکوک به استافیلکوکوس اورئوس از طریق کوژنوگاسیون صورت می‌گیرد(۱۳). 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 VRSA و MRSA استافیلکوکوس اورئوس در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و الگوی حساسیت و مقاومت سویه‌های مذکور در مقابل سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز دائمًا در حال تغییر است و با توجه به فراوانی عفونت‌های حاصل از استافیلکوکوس اورئوس در بیمارستان‌ها و پایداری این سویه‌ها در طبیعت و به علت مقاومت به طیف وسیعی از

است(۲،۱) و عامل) عفونت‌های تهدیدکنندهٔ حیات از جمله باکتریمی، پنومونی، استئومیلیت، عفونت پوست و بافت نرم (SSTLs)، سپتیسمی، اندوکاردیت و غیره می‌باشد(۴،۳). استافیلکوکوس 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) و از جمله) عفونت‌های مهم بیمارستانی محسوب می‌شود (Hospital-acquired = HA-MRSA) این مقاومت، حضور ژن کروموزومی (mecA) در این سویه‌ها است که با جهش نقطه ایی در ناحیه ایی از ژن استافیلکوک اورئوس ایجاد می‌شود. ژن مقاومت به متی‌سیلین (mecA)، یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام PBP2a را کد می‌کند. این پروتئین تمایل اتصالی بسیار ضعیف به آنتی‌بیوتیک‌های SCCmec بتالاکتام دارد و با کاست بزرگ ژن (Staphylococcal cassette chromosome mec) متحرک است، حمل می‌شود(۶). این کاست تشکیل شده از سه قسمت ccr complex و J.region و mec complex مسؤول بیان بوده که ژن mecA در ناحیه complex mec در ناحیه PBP2a است و در نتیجه باعث مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاكتام نظری متنی سیلین، اکسازیلین 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 ارگانیسم در مجاری فوکانی بینی خود هستند و از طرفی بیماران بستری نیز با زخم‌های باز یا بینی کلونیزه شده، مهم ترین مخزن این باکتری هستند. سویه‌های 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 سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند(۵). سپس با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز به دو روش اسلامی و لوله ایی، مانیتول سالت آگار و دی‌ان آز، استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی و جداسازی قرار گرفت(۶).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی نمونه‌های جمع آوری شده از بیماران بستری و پرسنل

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



نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی نسبی نمونه‌های 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 دفیوژن (Kirby-Bauer) مطابق با دستورالعمل CLSI ۲۰۱۵ (۷) انجام شد. به این منظور از ۱۲ آنتی بیوتیک (پادتن طب- ایران) مشتمل بر اکسازیلین (OX) (۱µg)، وانکومایسین (۳۰ µg)، کلیندامایسین (V) (۳۰ µg)، CC (۲ µg)، آمیکاکسین (AN) (۳۰ µg)، اریتروماکسین (E₁₅) (۱۵ µg)، توبراماکسین (TOB) (۱۰ µg)، جنتاماکسین (GM) (۱۰ µg)، ریفارماکسین (CP) (۵ µg)، RA (۵ µg)، سپروفلوكسازین (۵ µg)،

مواد ضد میکروبی و گسترش روزافزون سویه‌های MRSA، و نیز تفاوت فاحش بین الگوی مقاومت دارویی سویه‌های MSSA و MRSA، شناخته نشدن حتی تعداد کم سویه‌های مقاوم می‌تواند مشکلات بسیار زیادی را در روند درمان ایجاد نماید(۸،۹). از طرفی ظهور سویه‌های VISA در بیمارستان‌ها و گسترش مقاومت به وانکومایسین یک تهدید واقعی بهداشت عمومی تلقی می‌شود. لذا این مطالعه با هدف تعیین میزان فراوانی سویه‌های VRSA و MRSA استافیلوکوک اورئوس در بین پرسنل درمانی و افراد بستری در بخش‌های مختلف دو بیمارستان امام خمینی (ره) و بوعالی سینا ساری انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نحوه نمونه گیری و جداسازی ایزوله‌ها

در این مطالعه مقتضی که بین مهر ماه سال ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ انجام شد، با درنظر گرفتن کمترین درصد شیوع MRSA معادل ۳ درصد(۹) و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (CI) و میزان خطأ ۵ درصد و با استفاده از فرمول $Z^2P / d^2 = N = (1-P)^{1/d^2}$ 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 اینtern)، (ب) پرستار (کارشناس، تکنسین، سرپرستار، پرستار و ماما) و (ج) خدمه (بهیار، کمک بهیار، نگهدارن و خدمه) تقسیم‌بندی شدند، انتخاب شدند(۱۰) که شامل ۲۵۱ بیمار بستری و ۱۹۶ پرسنل در بخش‌های مختلف دو بیمارستان بوعالی 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 سوپ 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 بلا فاصله 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 استافیلوبکوک اورئوس سوسپانسیونی برابر با غلظت نیم مک فارلندر تهیه و بر روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح گردید. سپس دو دیسک کلیندامایسین (۲۰ μ g) و اریترومایسین (۱۵ μ g) (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 Tris HCL ۰/۵ mol EDTA ۰/۵ mol SDS و (جهت تهیه Lysis buffer) و پروتئیناز K، فل 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 نانودرایپ 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 ۱۰ μ l ۲۰ در نظر گرفته شد که شامل ۱۰ μ l Master Mix(2x)، ۲ μ l DNA الگو، ۱ μ l از پرایمر های رقیق شده R و F، ۰/۵ μ l Prf و ۰/۵ μ l PrR بود.

کوتیریموکسازول (SXT) (۱/۲۵ μ g، ۲۳/۷۵ μ g) و نورفلوکسازین (FM) (۳۰۰ μ g) و NOR استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون میکروبی برای همه، ایزوله های استافیلوبکوک اورئوس در سرم فیزیولوژی برابر با غلظت نیم درصد مک فارلندر (۱۰ \times 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 قطره هاله عدم رشد اندازه گیری و با مقایسه با جدول CLSI ۲۰۱۵ به ۳ صورت مقاوم، بینایی و حساس گزارش شد(۵).

تعیین ایزوله های VRSA و MRSA

پس از تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوبکوکوس اورئوس با استفاده از روش دیسک دفیوژن، به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و شناسایی ایزوله های MRSA و VRSA از نوارهای E-TEST ترکیی اکساسیلین {VAN} {OXA} {0/064-8/0 μ g/ml} و وانکومایسین {0/19-16/0 μ g/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 سوپر استریل از سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل با نیم مک فارلندر 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 بجسبند، روی محیط قرار داده شدند. سپس پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از سپری شدن

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

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

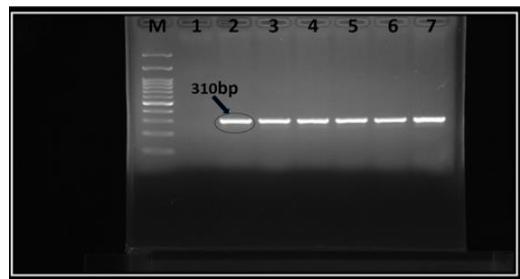
آنالیز داده ها

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) و تحلیل آماری به دست آمده با استفاده از Student T-test و Chi-Square است که با در نظر گرفتن CI=95% (درصد خطای ۵ درصد) $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه میانگین و انحراف معیار سن افراد مورد مطالعه $19/19 \pm 37/8$ سال می باشد (میانگین و انحراف معیار سن مردان $39/9 \pm 20/00$ سال و زنان $35/9 \pm 18/32$ سال بود). از ۴۴۷ نمونه جمع آوری شده، پس از انجام آزمایش های مربوطه، ۹۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد و پس از انجام تست های 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 فنوتیپی تمام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در مجموع درصد فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان های مورد بررسی ۳۱/۳۱ MRS A درصد و درصد فراوانی ۲۲/۱ درست آمد. هیچ سویه مقاوم به وانکومایسین (VRSA) مشاهده نشد. ۵ ایزوله با مقاومت نسبی به وانکومایسین

بود. سپس مخلوط های واکنش در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. توالی پرایمر های 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 ۳۱۰bp مسیر M - لدر ۱۰۰۰bp، مسیر ۱- کنترل منفی، مسیر ۲- کنترل مثبت، مسیر های ۳ تا ۷- ایزوله های دارای ژن مقاومت (mecA)

جدول شماره ۲: توالی پرایمر های ژن مقاومت به متی سیلین (اکساسیلین)

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

جدول شماره ۳: شرایط انجام PCR برای دستگاه ترموسایکلر

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

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR با ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از بافر TBE (1X) الکتروفورز شدند؛ به طوری که مقدار ۱ml از محصول PCR را برداشته و به آرامی در داخل چاهک ژل بارگذاری شد. در چاهک اول، مقدار ۱μl مارکر (ladder100pb) (جهت مقایسه و شناسایی باندها) بارگذاری گردید. در پایان، تانک به منبع تغذیه الکتریکی وصل شد و در ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵-۲۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. وقتی نمونه سه چهارم طول ژل را طی کرد، منع تغذیه خاموش و ژل را از تانک خارج کرده

نتایج آنتی بیوگرام

در صد مقاومت آنتی بیوتیکی ۹۹ ایزوله استافیلکوکوس اورئوس به روش دیسک دیفیوژن به شرح ذیل بود: اکساسیلین ۳۱/۳۱ درصد، وانکومایسین صفر درصد، اریترومایسین ۴۱/۴ درصد، کلیندامایسین ۳۹/۴ درصد، سپروفلوکساسین ۳۴/۳ درصد، کوتیریموکسازول 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 استافیلکوکوس اورئوس بود. در این ایزوله ها، درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در روش دیسک دیفیوژن به این قرار بود: اکساسیلین ۱۰۰ درصد، وانکومایسین صفر درصد، اریترومایسین ۹۰ درصد، کلیندامایسین ۸۰/۶ درصد، سپروفلوکساسین ۷۴ درصد، کوتیریموکسازول ۷۷/۴ درصد، آمیکاسین ۲۲/۶ درصد، جنتامایسین ۶۷/۷ درصد، نیتروفورانتوئین ۹/۷ درصد، نورفلوکساسین ۳۵/۵ درصد و ریفامپین ۳۸/۷ درصد (جدول شماره ۵).

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

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

ارتباط معنی داری بین حالت ناقلی استافیلکوکوس اورئوس و جنس افراد دیده نشد ($\chi^2 = 0/41$, $p_{v} = 0/41$, $df = 1$)، $\chi^2 = 0/626$ از نظر آماری ارتباط معنی داری بین حالت 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 دراین مطالعه دیده نشد ($\chi^2 = 0/005$, $p_{v} = 0/94$, $df = 1$)، در این مطالعه از نظر آماری بین شغل پرسنل و حالت ناقلی S.a ارتباط دیده شد ($\chi^2 = 12/95$, $p_{v} = 0/002$, $df = 2$)، $\chi^2 = 19/4$ از ۱۹۶ نفر پرسنل درمانی، ۳۸ نفر (۱۹/۴) درصد (S.a) بودند که در این میان، درصد فراوانی در پزشک ها از همه بیشتر 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 (S.a) بودند. بین مدت زمان بستری و حالت ناقلی S.a ارتباط معنی داری وجود داشت ($\chi^2 = 24$, $p_{v} = 0/00$, $df = 3$). به طوری که در بیمارانی که مدت زمان بیشتری در بیمارستان بستری بودند، شیوع استافیلکوکوس اورئوس بیشتر بود. در این تحقیق، بیشترین درصد فراوانی استافیلکوکوس اورئوس در بخش کودکان (۳۲/۱ درصد) و سپس در اتاق عمل (۳۱/۸ درصد) و بیشترین فراوانی MRSA در بخش ICU (۵۰ درصد) و سپس در بخش داخلی (۴۴/۱ درصد) و جراحی عمومی (۴۴/۴ درصد) دیده شد.

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

| الگوی حساسیت S.a | 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 |
| بیتانی | - | - | - | - | - | - | 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) وانکومایسین، (OX) اکساسیلین، (RA) (E₁₅) ریفامپین، (CC) اریترومایسین، (CP) سپروفلوکساسین (SXT) کوتیریموکسازول، (AN) آمیکاسین، (GM) جنتامایسین، (FM) نیتروفورانتوئین، (NOR) نورفلوکساسین، (TOB) توبرامایسین

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

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

(V) وانکومایسین، (OX) اکسازیلین، (RA) ریفارامپین، (E) اریترومایسین، (CC) کلیندامایسین، (SXT) سپروفلوکسازین، (AN) آمیکاسین، (TOB) توبرامایسین (GM) جنتامایسین، (FM) نیتروفورانتوئین، (NOR) نورفلوکسازین، (TOB) توبرامایسین

نتایج حاصل از D-TEST

در تمامی ایزوله‌های MRSA که مقاوم به اریترومایسین 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 ایزوله ۱۲/۹ درصد ایزوله‌ها به غیر از اکسازیلین به واقع بیان دیگر در این تحقیق در هر ایزوله MRSA که به اریترومایسین 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).

که ۳۵ درصد از ایزوله‌ها به غیر از اکسازیلین به و ۳۲ درصد به ۶ آنتی بیوتیک دیگر مقاومت داشتند و یک ایزوله نیز به ۸ آنتی بیوتیک مقاومت داشت (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۶: میزان مقاومت چندگانه دارویی در ایزوله‌های MRSA

| Percent | Frequency | MDR |
|---------|-----------|---------------|
| ۶۰. | ۲ | ۳ آنتی بیوتیک |
| ۱۶. | ۵ | ۴ آنتی بیوتیک |
| ۳۵. | ۱۱ | ۵ آنتی بیوتیک |
| ۳۷. | ۱۰ | ۶ آنتی بیوتیک |
| ۶۰. | ۲ | ۷ آنتی بیوتیک |
| ۳۰. | ۱ | ۸ آنتی بیوتیک |
| ۱۰۰. | ۳۱ | Total |

نتایج حاصل از E-TEST

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

بحث

در این مطالعه، شیوع استافیلوكوکوس اورئوس در

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

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

| آنتی بیوتیک | حساس | بینایی | مقاوم |
|-------------|------|--------|----------------|
| اکسازیلین | 68 | 0 | MIC(µg/ml) ≤ 2 |
| وانکومایسین | 94 | 5 | MIC(µg/ml) ≥ 4 |

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 امیدوار کننده 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 خطری 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 ای که توسط حدادی و همکارانش در تهران در سال ۱۳۹۰ انجام گرفت، از ۸۵ ایزووله استافیلکوکوس اورئوس، فقط یک مورد VISA گزارش گردید(۱). در مطالعه ای که توسط مهاجری و همکارانش در کرمانشاه در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، ۴۵/۹ درصد از ایزووله 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 van ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۱، فقط ۱۴ مورد VRSA دارای ژن van در دنیا گزارش شده است(۳۰). 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 بازیابی شده با کلید واژه استافیلکوکوس 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

مورد بررسی در سطح متوسط و نسبتاً پایینی قرار دارد(۲۱،۹). در این تحقیق، بیشترین فراوانی استافیلکوکوس اورئوس در بخش کودکان و سپس در اتاق عمل و بیشترین فراوانی MRSA در بخش های داخلی و جراحی بود. در مطالعه ایسی که خلیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در یزد انجام دادند، بیشترین فراوانی استافیلکوکوس اورئوس در اتاق عمل گزارش شد(۲۲). در مطالعه ای که توسط Zriouila و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در موراکو انجام شد، بیشترین شیوع در بخش سوختگی و بخش پوست دیده شده است(۱۶). در روش مولکولی (PCR)، از ۳۱ ایزووله شناسایی شده در روش دیسک و E-TEST، یکی از ایزووله ها بدون ژن mecA بود. Cekovska و همکاران در مطالعه ای بر روی ۲۱۰ ایزووله استافیلکوکوس اورئوس، مقاومت به متی سیلین را با روش های فنوتیپی و PCR تعیین و سه ایزووله 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 ایزووله استافیلکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین به دو روش PCR و دیسک دیفیوژن مورد مقایسه قرار دادند که ۴۶ ایزووله در روش PCR و هم روش دیسک دیفیوژن به عنوان سویه های MRSA گزارش شدند، ولی از ۴۰ سوشی که ۳۰/۲ مورد (درصد) مقاومت نسبی را در روش دیسک دیفیوژن نشان دادند(۲۴). به وجود آمدن سویه های MRSA گاهی به دلیل PBP2a به غیر از PBP2a که توسط ژنی غیر از ژن mecA کد می گردد، نسبت داده می شود(۲۵). Garcia-Álvarez و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در یک مطالعه بیان کردند که مکانیسم های مقاومت اکسازیلین از طریق دیگری به غیر از کسب ژن mecA و توسط یک هومولوگ متفاوت به نام mecC نیز ممکن است رخدهد(۲۶). در نتیجه با روش های ژنوتیپی جداسازی ژن mecA، نمیتوان انواع سویه های

گرفته ای که نتایج آنها مبتنی بر استانداردهای NCCLS می باشد، درصد درستی از مقاومت را اعلام نمی نمایند. از طرفی با توجه به سفارش سازمان CLSI و مرکز کنترل بیماری ها (CDC)، تشخیص سویه های MRSA و VRSA باید با تعیین MIC صورت گیرد.

سپاسگزاری

در پایان نویسنده گان مقاله از پرسنل بیمارستان های آموزشی امام خمینی (ره) و بولعی سینا شهر ساری، که صبورانه در امر نمونه گیری مساعدت و یاری رساندند، بی نهایت سپاسگزاری نموده و هم چنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت تأمین هزینه های طرح صمیمانه قدردانی و تشکر می نمایند. مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی با شماره ثبت ۱۸۵۸ در دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

۱۶ مورد در هند بوده است و فقط همان یک مورد ثبت شده در ایران مورد تأیید می باشد(۳۳). تا پیش از سال ۲۰۰۶ بر اساس معیارهای NCCLS، سویه هایی با $MIC \leq 4\mu\text{g}/\text{ml}$ گرفته می شدند و به همین ترتیب سویه های با $MIC = 8-16\mu\text{g}/\text{ml}$ و سویه های با $MIC \geq 32\mu\text{g}/\text{ml}$ VRSA محسوب می شدند. در سال ۲۰۰۶، حدود یک سال پس از این که NCCLS نام خود را به سازمان استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تغییر داد، استانداردهای جدیدی برای دسته بندی مقاومت به وانکومایسین از طرف این سازمان تعریف شد؛ سویه های با $MIC \leq 2\mu\text{g}/\text{ml}$ حساس، با $MIC = 4-8\mu\text{g}/\text{ml}$ مقاومت متوسط و سویه هایی با $MIC \geq 16\mu\text{g}/\text{ml}$ مقاوم به وانکومایسین در نظر گرفته شدند(۳۴). فلندا باید توجه داشت مطالعات انجام

References

- 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.
- SobhaniPoor MH, Mansouri S, Saeidadeli 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.
- 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.
- 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.
- Dibaj R, Shoaei P, Hashemi A, Naser AD, Shoaei 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.
- 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.
- 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 CENTREY study. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3727-3732.
 11. Rondolph T. Harrisons Principles of Internal Medicine (Bacterial Infections). 14th ed . 1998. چ. 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, Bachmann 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 Nišsensis 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-nejadfar 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, Shahbabian 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, Rahnema 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, Shahsavani 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.