ORIGINAL ARTICLE

The Antibiotic Resistant Determinant of Pathogenic Bacteria Isolated from Medical Equipment and Hospital Environment in Valiasr Hospital, Arak, 2013

Nona Taheri[1],
Hamid Abtahi[2],
Alireza Amozande-Nobaveh[2],
Nader Zarinfar[3],
Ehsanollah Ghaznavi-Rad[4]*

[1]MSc in Medical Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3]Asistant Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[4]Assistant Professor, Molecular and Medicine Research Center , Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received January 12 , 2013 ; Accepted Jun 14 , 2014)

Abstract

Background and purpose: Nosocomial infections are a major health problem worldwide. Hospital environment is a reservoir for nosocomial pathogens. This study aimed at determining the prevalence of antimicrobial resistance pattern of bacteria isolated from the environment and medical equipment in Valiasr Hospital in Arak.

Material and Methods: A total of 210 samples was collected from hospital and identified. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* was determined with D Zone and sensitivity to vancomycin was identified by using Mueller Hinton agar and E-test. The sensitivity of these strains to cefoxitin and oxacillin was determined by disk diffusion method. The resistance was confirmed by investigating the presence of mec A gene using PCR technique. To identify the ESBL producing gram-negative bacill standard method was used. Amp C beta lactamase resistance was assessed by Amp C disk test, and for carbapenemase resistant MHT was applied. E-test with imipenem and imipenem+EDTA were used to identify the resistance pattern of metalo beta lactamase.

Results: There were 240 isolates of which 185 (77%) were *Staphylococcus*. Among these isolates 136 (73.5%) were resistant to oxacillin and cefoxitin. Inducible clindamycin resistance was found in 46 (25%) isolates. Two samples of the *Staphylococcus epidermidis* were vancomycin resistant. The presence of Sa442 genes in *Staphylococcus aureus* and the mecA gene of MRSA was confirmed in all isolates expect in two. The frequency of gram-negative bacteria was 55(23%). ox51 gene was identified in *acinetobacter baumannii*. Fifteen nonfermenting gram-negative bacill and 40(65%) strains of *Enterobacteriaceae* were ESBL producers. Among the *Klebsiella pneumoniae* six (33.33%) were *AmpC* producers. MHT positive was found in nine (60%) nonfermenting bacills.

Conclusion: According to this study presence of microorganisms in Valiasr Hospital environment and high incidence of antibiotic resistance are considered as major health problems. By determining potential pathogens in hospital setting and the pattern of antibiotic resistance markers physicians can perform more successful treatments.

Keywords: Nosocomial infections, pathogen bacteria, antibiotic resistant determinants

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(114): 60-73 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۴ تیر سال ۱۳۹۳ (۷۳-۶۰)

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های پاتوژن جداشده از تجهیزات پزشکی و محیط بیمارستان در مرکز آموزشی درمانی ولیعصر اراک در سال ۱۳۹۲

نونا طاهری[۱]
حمید ابطحی[۲]
علیرضا آموزنده نوباوه[۲]
نادر زرین فر[۳]
احسان اله غزنوی راد[۴]

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های بیمارستانی یک مشکل عمده جهانی هستند. محیط بیمارستان مخزنی برای پاتوژن‌های بیمارستانی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع و تعیین شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جداشده از محیط و تجهیزات پزشکی در بیمارستان ولیعصر اراک می باشد.

مواد و روش ها: ۲۱۰ نمونه از بیمارستان جمع‌آوری و تعیین هویت گردید. Staphylococcus ها از نظر مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین با روش D_Zone و حساسیت به ونکومایسین با محیط مولر هینتون آگار و E_ test بررسی شدند. حساسیت این سویه ها نسبت به سفوکسیتین و اگزاسیلین با روش دیسک دیفیوژن و تأیید این مقاومت با بررسی ژن mecA با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. باسیل‌های گرم منفی از نظرتولید ESBL با روش استاندارد، مقاومت بتالاکتامازی AmpC با روش Amp C disk test، مقاومت کاربا‌پنمازی توسط MHT و متالوبتالاکتامازی توسط E-test حاوی ایمیپنم و ایمیپنم + EDTA بررسی شدند.

یافته ها: از ۲۱۰ نمونه گرفته شده، ۲۴۰ ایزوله به دست آمد که (۷۷ درصد) ۱۸۵ نمونه مربوط به staphylococcus ها می‌باشد (۷۳/۵ درصد) ۱۳۶ نمونه staphylococcus ها مقاوم به سفوکسیتین و اگزاسیلین بوده و مقاومت القایی به کلیندامایسین در آن ها (۲۵ درصد) ۴۶ گزارش شده است. ازطرفی دو نمونه Staphylococcus epidermidis مقاوم به ونکومایسین بودند. هم‌چنین ژن Sa442 در Staphylococcus aureus و ژن mecA در MRSA به جز دو مورد تأیید گردید. فراوانی باکتری‌های گرم منفی (۲۳ درصد) ۵۵ گزارش شد. ژن Ox۵۱ در Acinetobacter baumanni شناسایی گردید. ۱۵ باسیل گرم منفی ۱۰۰ درصد غیرتخمیری و ۶۵ درصد از ۴۰ ایزوله انتروباکتریاسه تولیدکننده ESBL بودند. تعداد (۳۳/۳۳ درصد) ۶ از نمونه Klebsiella pneumoniae تولیدکننده ژن AmpC بودند (۶۰ درصد) ۹ از باسیل‌های غیرتخمیری MHT مثبت گزارش شدند.

استنتاج: با توجه به این بررسی، حضور میکروارگانیسم‌ها در محیط بیمارستان ولیعصر اراک و بروز و افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در آن‌ها به عنوان یک مشکل عمده مطرح می‌باشد. می‌توان با تعیین پاتوژن‌های احتمالی در بیمارستان و تعیین الگوی شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پزشکان، در انجام درمان موفق بیماران کمک نمود.

واژه های کلیدی: عفونت‌های بیمارستانی، باکتری‌های پاتوژن، شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل عمده جهانی مطرح هستند. این عفونت‌ها به عنوان عفونت کسب شده در بیمارستان یا عفونت های مرتبط با بیمارستان نیز مطرح بوده که پس از پذیرش بیمار در

مولف مسئول: احسان الله غزنوی راد– اراک:میدان بسیج ، دانشگاه علوم پزشکی اراک گروه میکروب شناسی E-mail: ghaznavirad@arakmu.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی،دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی ،گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، اهران
۳. گروه بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی ، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی،دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۰/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۱۲/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۳/۲۶

بیمارستان(۴۸ یا ۷۲ ساعت) یا طی دوره ای مشخص (۱۰ تا ۳۰ روز) پس از ترخیص رخ می‌دهد و شامل عفونت هایی می باشد که در هنگام پذیرش بیمار در بیمارستان وجود ندارد بلکه در طول اقامت بیمار در بیمارستان به وجود می آیند(۱). (عفونت بیمارستانی از ۵/۲ تا ۱۰ درصد متغیر بوده و طی ۲۰ سال (تا سال ۱۹۹۵) ۳۶ درصدافزایش یافته است(۱). به گفته سازمان بهداشت جهانی، ۵ تا ۱۰ درصد بیماران بستری در بیمارستان‌های کشورهای توسعه یافته، به یک عفونت بیمارستانی مبتلا شده که این رقم در کشورهای در حال توسعه به ۲۵ درصد می‌رسد. طبق بررسی‌های انجام شده، عفونت ادراری شایع‌ترین و پنومونی کشنده‌ترین عفونت‌های بیمارستانی محسوب می شود،گر چه در بعضی از مراکز، عفونت بیمارستانی دستگاه گردش خون، علت اصلی مرگ بیماران می باشد.

این عفونت‌ها از جنبه‌های مختلف از جمله مرگ ومیر و بیماری زایی در بیماران و افزایش طول مدت بستری بیماران در بیمارستان و افزایش هزینه های ناشی از طولانی شدن اقامت بیماران ، اقدامات تشخیصی و درمانی حائز اهمیت می‌باشند. منابع عفونت ممکن است پرسنل، بیماران، ملاقات کنندگان و یا محیط بی جان مانند وسائل و تجهیزات پزشکی باشد و میکروارگانیسم های این منابع می توانند از طریق تماس مستقیم یا غیرمستقیم به یک میزبان جدید منتقل شوند(۲) مطالعات بسیاری سطوح و تجهیزات بیمارستان را به عنوان مخزنی برای پاتوژن های بیمارستانی برشمرده و بسیاری از عفونت های بیمارستانی از جمله عفونت های ایجاد شده توسط Staphylococcus, Klebsiella, Enterobacter, Acinetobacter را به علت توانایی باکتری در باقی ماندن در سطوح و تجهیزات بیمارستان می دانند(۵- ۳). شناسایی منابع احتمالی میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به عنوان منابع بالقوه ایجاد کننده عفونت به ویژه در شیوع ناگهانی عفونت‌ها در بیماران و تلاش در جهت از بین بردن این منابع در کنترل عفونت‌های بیمارستانی کمک کننده می‌باشد. کاهش باکتری ها در سطوح بیمارستان باعث اختلال در زنجیره عفونت و کنترل عفونت های بیمارستانی می گردد(۶). در هنگام مشاهده هر نوع عفونت بیمارستانی درمان ضروری بوده و چون دریافت نتایج کشت و آنتی بیوگرام از آزمایشگاه مدت زمانی به طول می‌انجامد، لذا در اکثر موارد شروع درمان به صورت تجربی می‌باشد؛ بنابراین داشتن الگویی از میکروارگانیسم‌های شایع در هر بیمارستان و شاخص‌های مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها می تواند در انتخاب نوع آنتی بیوتیک مخصوصاً در هنگام درمان امپریکال به پزشک کمک کننده باشد. از بین مقاومت‌های رایج در بین باکتری ها می توان به مقاومت نسبت به متی سیلین و اگزاسیلین و مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین در جنس Staphylococcus اشاره نمود. ونکومایسین اغلب برای تمامی عفونت‌های Staphylococcus aureus مقاوم به متی سیلین تجویز می‌شود. ظهور Staphylococcus های مقاوم نسبت به ونکومایسین از مشکلات عمده در درمان این باکتری ها می باشد که با آن روبرو خواهیم شد(۷). هم‌چنین مقاومت‌های شایع در بین انتروباکتریاسه ها و باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیری نیز شامل مقاومت بتالاکتامازی طیف وسیع ESBL، مقاومت AmpC و مقاومت کار باپنمازی می باشد(۱۰- ۷). با توجه به این که در حال حاضر میزان شیوع عفونت های بیمارستانی در مرکز آموزشی درمانی ولی عصر اراک بالا می باشد(۱۲- ۸)، هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع و تعیین شاخص‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جداشده از محیط و تجهیزات پزشکی در بخش‌های مختلف بیمارستان ولیعصر اراک می باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۱۰ نمونه طی یک سال از فروردین تا اسفند ۱۳۹۲، از تمام بخش‌های بیمارستان شامل (ICU، جراحی، اورژانس، عفونی، دیالیز، ارتوپدی،

سوختگی، اعصاب، اتاق عمل) جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری از سطوح و وسایل پزشکی انجام گرفت، به این صورت که سوآب استریل را با سرم فیزیولوژی استریل آغشته کرده و از سطح مورد نظر با حرکت چرخشی و یک طرفه سوآب، نمونه‌برداری صورت گرفت، سپس سوآب داخل ۱میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده شد. نمونه‌های جمع آوری شده تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند، سپس از سرم فیزیولوژی در محیط بلادآگار کشت انجام گرفت. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. پس از مشاهده رشد بر روی محیط، تمام کلنی های ایزوله رشد یافته، بر روی محیط های بلادآگار و مکانکی آگار کشت داده شدند و پس از رشد و به دست آوردن چندین کلنی از باکتری مجهول لام تهیه شد و رنگ آمیزی گرم انجام گرفت. باکتری های گرم مثبت با تست های کاتالاز،کوآگولاز، Dnase، تخمیر قند مانیتول و بررسی تولید اوره آز و استفاده از دیسک های تشخیصی باسیتراسین، فورازولیدون، نوبیوسین در حد جنس و گونه تعیین هویت شدند. باکتری های گرم منفی با تست های بیوشیمیایی نظیر TSI، DNase، IMVIC، اکسیداز، لایزین دکربوکسیلاز و فنیل آلانین دآمیناز در حد جنس و گونه تعیین هویت شدند. برای تعیین هویت باکتری‌های گرم منفی از سیستم (Biomeriux, France) API استفاده شد(۱۳) . باکتری های *Staphylococcus aureus* و Acinetobacter baumannii با استفاده از واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR)، ژن sa442 و ox51 تأیید گردیدند(۱۰، ۱۴)؛ سپس شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری های جداشده مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا Staphylococcus aureus و Staphylococcus های کوآگولاز منفی از نظر حساسیت به سفوکسیتین و اگزاسیلین توسط روش دیسک دیفیوژن (کربی ـ بائر) مطابق با معیارهای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین تعیین وتأیید مقاومت در این دسته از باکتری ها توسط بررسی حضور ژن mecA با روش PCR انجام گرفت. سپس این دسته از باکتری‌ها جهت بررسی مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین با روش D_Zone مورد ارزیابی قرار گرفتند. حساسیت باکتری های جنس Staphylococcus نسبت به ونکومایسین با استفاده از محیط مولر هینتون آگار حاوی (۳µg/ml) بررسی شد تا در صورت مقاوم بودن حداقل دوز مهارکنندگی آنتی بیوتیکی با استفاده از آزمون – E_ test بررسی شود(۱۵). باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از نظر تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) با روش استاندارد مطابق با معیارهای CLSI مورد بررسی قرارگرفتند. بدین منظور از دیسک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم همراه با مهارکننده‌های بتالاکتامازی سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید استفاده شد. ایزوله هایی که مقاومت آن‌ها با اثر کلاولانیک اسید مهار گردید به عنوان ESBL در نظر گرفته شدند. باکتری های مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم همراه با کلاولانیک اسید و هم چنین مقاوم به سفوکسیتین ازلحاظ حضور مقاومت بتالاکتامازی AmpC با روش فنوتیپی AmpC disk test مورد بررسی قرار گرفتند. نهایتاً سویه هایی که قطر هاله عدم رشد آن ها برای آنتی بیوتیک های خانواده کاربابنم به صورت مقاوم یا نزدیک به مقاوم مشاهده گردید. از نظر وجود مقاومت کاربابنمازی، توسط MHT(modified hodge test) و از نظر وجود مقاومت متالوبتالاکتامازی توسط نوار E-test حاوی ایمیپنم و ایمیپنم به اضافه EDTA مورد بررسی قرار گرفتند. test hodge یک روش فنوتیپی برای شناسایی فعالیت کاربابنماز می باشد. اساس این روش غیرفعال سازی کاربابنم توسط کاربابنماز است. در این روش روی یک پلیت یک سویه تولید کننده کاربابنماز را در کنار یک سویه حساس به کاربابنم و در حضور کاربابنم کشت می‌دهند، انتقال ژن‌های کاربابنماز باعث از بین رفتن

هاله عدم رشد در کنار سویه حساس شده که این امر بیان گر القای مقاومت از سویه مقاوم به سویه حساس می‌شود(۱۶، ۱۷).

استخراج DNA و PCR

استخراج DNA در ایزوله‌های Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii با استفاده از کیت io flux bioerB محصول کره جنوبی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. پس از تخلیص ژنوم باکتری از پرایمر ۱۰۸bpبرای شناسایی ژن Sa442، از پرایمرهای ۱۶۰bp برای شناسایی ژن mecA و برای شناسایی اسینتوباکتر بائومانی از پرایمرهای Ox51 به طول ۴۵۱bp استفاده گردید(۱۸).مقادیر به‌کار رفته برای تمامی نمونه ها در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲۵ میکرولیتر از 2XTaq Master mix (vivantis) و ۲۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر می باشد. بعد از اتمام واکنش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ شده با Safe dye، با ولتاژ ۸۵ به‌مدت یک ساعت الکتروفورز شد. سپس ژل با استفاده دستگاه UVI tec (Cambridge d5520N) و نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. از نشان گر وزن ladder 100bp برای تخمین اندازه قطعه ها استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه از مجموع ۲۱۰ نمونه گرفته شده که برخی مکان ها فاقد آلودگی بوده و برخی آلوده به چند نوع میکروارگانیسم بودند، در مجموع ۲۴۰ ایزوله به دست آمد که از این میان (۷۷/۰۸ درصد) مربوط به باکتری های جنس Staphylococcus می باشد و از بین باکتری‌های این جنس، (۸/۱۰ درصد) ۱۵ Staphylococcus aureus ، (۲۹/۱۸ درصد) ۵۴ Staphylococcus epidermidis ، (۳۵/۶۷ درصد) ۶۶ Staphylococcus haemolyticus و (۲۷/۲ درصد)، Staphylococcus saprophyticus را به خود اختصاص دادند (جدول شماره ۲ ,جدول شماره ۳). لازم به ذکر است که باکتری‌های ساپروفیت مانند میکروکوک ، دیفترویید و مخمرها از مطالعه خارج گردیدند.

جدول شماره ۱: پرایمر و برنامه دمایی PCR

Target gene	Primer/Sequence(5 to 3)	PCR condition	PCR fragment size	Reference
Sa442	F:AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG R:CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	40s 95°C, 40 s 55°C, 40 s 72°C	108	(21)
mecA	5′ F:TCCAGATTACAACTTCACCAGG 5′ R: CCACTTCATATCTTGTAACG	30s 94°C, 30 s 53°C, 60 s 72°C	160	(21)
Ox51	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	25s 94°C, 40 s 52°C, 50 s 72°C	451	(22)

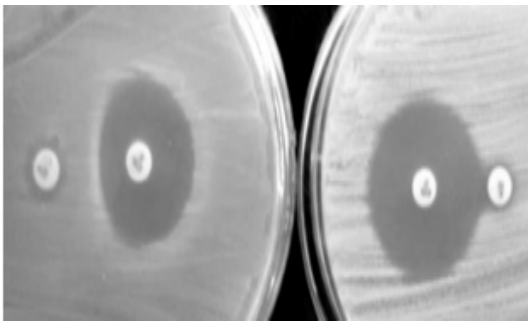
جدول شماره۲ : فراوانی انواع باسیل های گرم منفی به تفکیک محل نمونه گیری

Alcaligenes	A. Liflee	A. baumanni	Entero bacter.spp	K. oxytoca	K. pneumoina	Number of Isolat	Sample site
۲	–	۲	۲	–	–	۶	Suction
–	۱	۱	–	–	–	۲	Shock machine
–	–	۱	–	–	–	۱	Ventilator
–	–	–	–	–	۲	۲	Ambu bag
–	–	–	–	۱	۳	۴	Oxygen
۱	۱	۳	۴	–	۷	۱۶	Capsule patientsbed
–	–	–	–	–	۵	۵	Patients cabiner
–	–	–	–	۱	۱	۲	Food trolley
–	–	–	–	–	۲	۲	Tap & sink
–	–	–	۲	–	۶	۸	Refriegerator
۱	–	۲	–	–	۴	۷	Nurses station
۴ (۷/۳)	۲ (۳/۶)	۹ (۱۴/۵)	۸ (۱۴/۵)	۲ (۳/۶)	۳۰ (۵۴/۵)	۵۵	Total(%)

جدول شماره ۳: فراوانی انواع کوکسی های گرم مثبت به تفکیک محل نمونه گیری

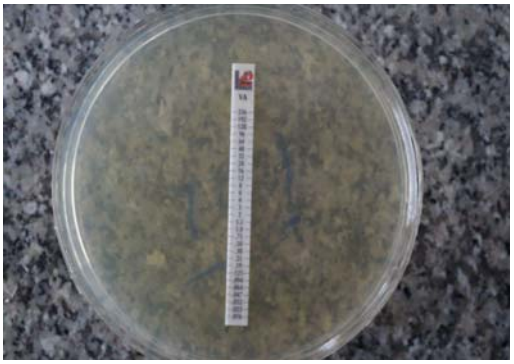
sample sit	Number of isolate	S. aureus	S.epidermidis	S. saprophyticus	S. haemolyticus
Suction	۷	۱	۲	۲	۲
Blood pressure cuff	۶	–	۲	۲	۲
Dialysis	۱	–	–	۱	۲
machine ECG machine	۸	–	۲	۴	۲
Shock machine	۷	۱	۲	۲	۲
Spirometry &Echo machine	۳	–	–	۱	۱
Laryngoscope	۲	–	۱	–	۱
ventilator	۷	–	۳	۳	۱
Ambu bag	۴	۱	۱	۱	۱
Respiratory tube	۳	۱	۱	–	۱
Ups	۱	–	–	–	۲
Oxygen capsule	۹	–	۵	۱	۱۸
Patients'bed	۴۶	۴	۱۲	۲	۳
Patients'cabiner	۱۲	۲	۳	۱۲	۱
Baseline serum	۲	۱	–	۴	۱
Weight cuff	۱	–	–	–	۲
Food trolley	۴	–	۱	–	۲
Drug trolley	۴	–	۱	۱	۱
Tap &Sink	۳	–	۱	۱	۱
Chair	۲	–	۱	۱	–
Radiator	۱۱	۱	۳	–	۷
Refrigerator	۴	۱	۲	۱	–
Wall plug	۲	–	–	۱	۱
Door handle	۲۳	۱	۷	۵	۱۰
Computer keyboard	۵	–	۲	۱	۲
Floor	۵	۱	۱	۳	–
total(%)	۱۸۴	۱۴ (۷/۶)	۵۴ (۳۴/۲۹)	۴۶ (۲۶/۶۳)	۶۶ (۳۵/۸۶)

باکتری های جنس Staphylococcus از لحاظ حساسیت به سفوکسیتین و اگزاسیلین به دو گروه حساس و مقاوم تفکیک شدند، به این ترتیب که ایزوله های (۴۶/۶۶ درصد) ۷ Staphylococcus aureus ، (۷۴/۲۴ درصد) ۴۹ Staphylococcus haemolyticus ، (۸۰ درصد) ۴۰ Staphylococcus saprophyticus و (۷۴/۰۷ درصد) ۴۰Staphylococcus epidermidis به سفوکسیتین و اگزاسیلین مقاوم بودند. هم چنین فراوانی مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین در بین این ۱۸۵ ایزوله به ترتیب شامل: (۲۰ درصد)۳ Staphylococcus aureus, (۲۲/۲ درصد) ۱۲ Staphylococcus epidermidis, (۳۵ درصد)۲۳ Staphylococcus haemolyticus و (۱۶ درصد)۸ Staphylococcus saprophyticus می باشد (تصویر شماره۱).



تصویر شماره ۱: تست-D_zone جهت شناسایی مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین

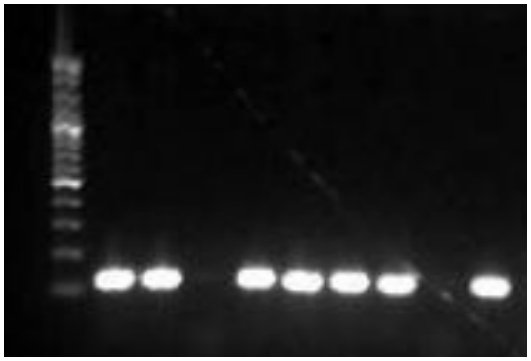
دو نمونه Staphylococcus epidermidis با روش غربالگری در محیط مولر هینتون آگار نسبت به ونکومایسین مقاوم تشخیص داده شدند که با استفاده از نوار MIC، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد برای این دو ایزوله بیش تر از ۲۵۶ µg/ml تشخیص داده شد(تصویر شماره ۲).



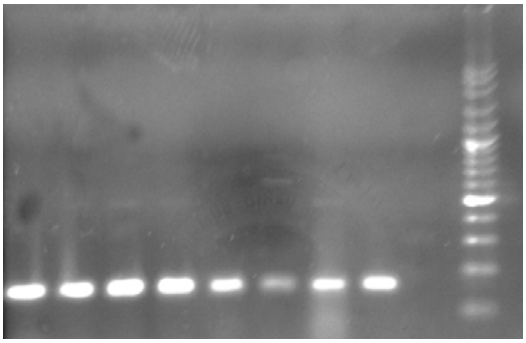
تصویر شماره ۲ : نوار E_ttes جهت اندازه گیری حداقل غلظت بازدارندگی نسبت به و نکومایسین

قابل ذکر است که ژن Sa442 در تمام سویه های Staphylococcus aureus شناسایی گردید و به این ترتیب تمام سویه‌هایی که با روش های فنوتیپی تشخیص داده شده بودند تأیید گردیدند (تصویر شماره ۳). وجود ژن mecA در تمام سویه های مقاوم به متی سیلین در جنس Staphylococcus به جز یک مورد Staphylococcus Saprophyticus و یک مورد Staphylococcus haemolyticus تأیید گردید. البته این دو ایزوله علی رغم داشتن خصوصیات فنوتیپی به عنوان نمونه‌های حساس تلقی گردیدند (تصویر شماره ۴).

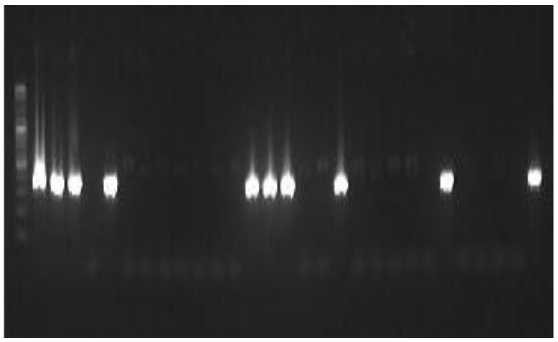
با توجه به روش‌های تشخیصی اعمال شده، باکتری‌های گرم منفی شامل خانواده آنتروباکتریاسه به میزان (۶۶/ ۱۶ درصد) ۴۰ و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری به میزان (۶/۲۵ درصد) ۱۵ می باشند که از بین باکتری‌های خانواده Enterobacteriaceae، (۷۵ درصد) ۳۰ Klebsiella pneumonia ، (۵ درصد) ۲ Klebsiella oxytoca و (۲۰ درصد) ۸ Enterobacter aerogenes می‌باشند و در بین باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری یافت شده نیز (۶۰ درصد) 9 Acinetobacter baumannii، (۱۳/۳۳ درصد) ۲ Acinetobacter lwoffii و (۲۶/۶۶ درصد) ۴ Alcaligenes faecalis یافت شدند. ژن Ox۵۱ در تمام سویه های Acinetobacter baumannii شناسایی گردید. بدین‌ترتیب تمام سویه‌های تشخیص داده شده با روش‌های فنوتیپی، با شناسایی این ژن تأیید شدند (تصویر شماره ۵).



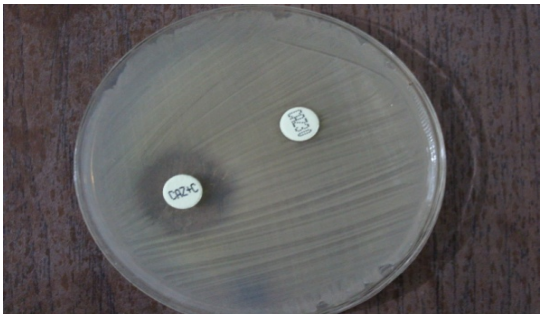
تصویر شماره۳: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن Sa442 (قطعه۱۰۸جفت بازی)به وسیله PCR



تصویر شماره٤: الکتروفورز ژل آگاروز ٪۱ برای محصول تکثیر یافته ژن mecA(قطعه۱۶۲جفت بازی) به وسیله PCR

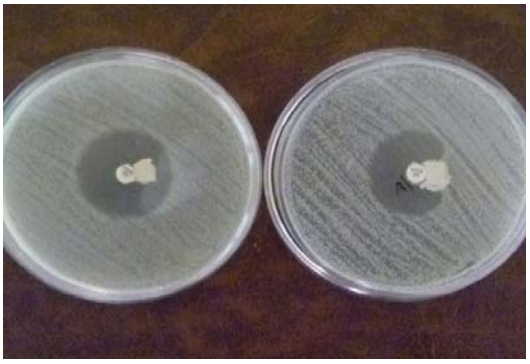


تصویر شماره ٥: الکتروفورز ژل آگاروز ٪۱ برای محصول تکثیریافته ژن Ox۵۱(قطعه۴۲۶جفت بازی)

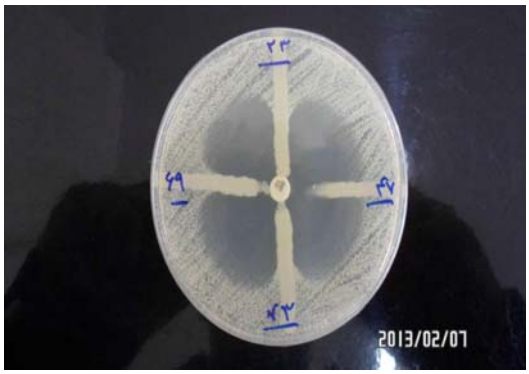


تصویر شماره ٦: باکتری تولیدکننده EBSL,دیسک سمت چپ **CAZ**، دیسک سمت راست CLV/**CAZ**

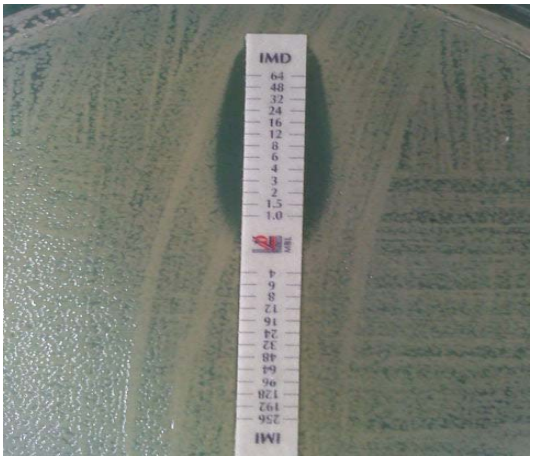
از لحاظ تولید بتا لاکتامازهای وسیع الطیف، از میان ۱۵ باسیل گرم منفی غیرتخمیری، (۱۰۰ درصد) ۹ Acinetobacter baumannii, (۱۰۰ درصد) ۲ Acinetobacter lwoffii, (۱۰۰ درصد) ۴ Alcaligenes faecalis و از بین ۴۰ ایزوله خانواده انتروباکتریاسه (۶۰ درصد) ۱۸، Klebsiella pneumonia (۱۰۰ درصد) ۲ Klebsiella oxytoca, (۷۵ درصد) ۶ Enterobacter aerogenes تولیدکننده ESBL بودند (تصویر شماره ۶). از لحاظ تولید AmpC, (۳۳/۳۳ درصد) ۶ ایزوله از بین ۱۸ ایزوله Klebsiella pneumonia مثبت بودند (تصویر شماره ۷). ۷عدد از ۹ ایزوله Acinetobacter baumannii تست MHT مثبت بودند که از بین آن ها ۳ عدد ایمی پنم +EDTA مثبت گزارش شد (تصاویر شماره ۸ و۹).



تصویر شماره ۷: تست *AmpC* stte disk جهت شناسایی مقاومت AmpC. تصویر سمت راست نشان دهنده ایزوله تولیدکننده AmpC و تصویر سمت چپ نشان دهنده ایزوله ای که به وسیله این روش از نظر تولید آنزیم AmpC منفی شده است



تصویر شماره۸: تست MHT جهت بررسی مقاومت کارباپنمازی



تصویر شماره ۹: نوار MLB E_test؛ IMD طرفی از نوار است که دارای ایمیپنم+EDTA می باشد و IMI طرفی از نوار است که فقط حاوی ایمیپنم می باشد

بحث

پیدایش عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک ها به یکی از مشکلات عمده در بیمارستان‌ها تبدیل شده است .سطوح و تجهیزات بیمارستانی از مکان های مناسب جهت کلونیزاسیون میکروارگانیسم ها به شمار می روند.در این مطالعه و سایر مطالعات انجام گرفته انواعی از باکتری ها از این مناطق جداسازی شده‌اند. فراوانی باکتری ها در این قسمت‌ها بیان گر توانایی آن ها در باقی ماندن در سطوح بی جان می باشد. به عنوان مثال Staphylococcus قادر است ۳ تا ۶ ماه در خون خشک شده و سطوح پارچه ای و۴ هفته روی سایر سطوح زنده بماند(۲، ۳). هم چنین Acinetobacter می‌تواند ۱۶هفته

در سطح خشک محیط باقی مانده و ۹ روز بعد از ترخیص بیمار مبتلا به این باکتری از تخت بیمار قابل جداسازی می‌باشد(۱۹). در این بررسی بیش ترین درصد گونه‌های مختلف باکتری‌ها از تخت بیماران جدا شد که می‌تواند به دلیل طولانی بودن زمان تماس بیماران با آن باشد.

در بررسی شاخص‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در این مطالعه، درصد بالای مقاومت به متی سیلین در باکتری های جنس Staphylococcus و مقاومت ESBL در باسیل های گرم منفی و درصد کم تری از مقاومت AmpC در Klebsiella pneumonia گزارش شد و مقاومت کاربانمازی در باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیری بیان گر افزایش روزافزون شاخص های مقاومت در این میکروارگانیسم ها می باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط اکرامی و همکاران در۷ بیمارستان اهواز انجام گرفت، ۵۰ درصد از باکتری‌های جداشده از محیط از جنس Staphylococcus و ۵۰ درصد شامل باسیل های گرم منفی بودند و از بین باکتری های جنس Staphylococcus، ۶۰ درصد از نوع مقاوم به متی سیلین (RMSA)بودند(۶). هم‌چنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط غزنوی و همکاران در مالزی انجام شد، از بین ایزوله‌های Staphylococcus aureus جداشده از محیط، ۱۰ درصد از نوع مقاوم به متی سیلین بودند(۲۰). در این بررسی انجام شده، ۴۷ درصد از نوع Staphylococcus aureus و ۷۵ درصد از نوع Staphylococcus های کوآگولاز منفی جدا شده از نوع مقاوم به متی سیلین بودند. در این بررسی Staphylococcus های کوآگولاز منفی به تعداد زیاد از محیط جدا شدند. این میکروارگانیسم ها عامل بسیاری از عفونت‌ها مانند سپسیس می باشد که به ویژه در افراد دارای نقص ایمنی، دخیل هستند. خصوصا بیمارانی که از کاتتر یا ایمپلنت استفاده می کنند در معرض با این عفونت ها هستند(۲۱). در مطالعه انجام شده توسط Battue و همکاران در سال ۲۰۰۷، بیش ترین ارگانیسم در عفونت های ناشی از کاتتر در ICU کوکسی‌های گرم مثبت بودند که نیمی از آن ها به Staphylococcus های کوآگولاز منفی اختصاص داشت(۲۲). شیوع بالای Staphylococcus های مقاوم به متی سیلین در محیط بیمارستان همراه با شیوع بالای عفونت های MRSA در این بیمارستان حاکی از این امر است که بیماران دارای ریزش باکتری (بیماران بخش جراحی ،بخش ارتوپدی) به خوبی محافظت نگردیده و با انتشار این دسته از میکروارگانیسم‌ها در محیط بیمارستان زمینه انتقال آن ها را توسط کارکنان سیستم های بهداشتی درمانی،همراهان بیمار و یا تماس خود بیماران فراهم می کنند. در سال ۱۹۹۲انتقال کانژیوگیشن ژن VanA از انتروکوک به استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاه به اثبات رسید و در سال ۱۹۹۷ (staphylococcus aureus VISA(Intermediate Vancomycin گزارش گردید و زمانی که در ژوئن و در سال ۲۰۰۲ اولین ایزوله کلینیکی staphylococcus aureus با میزان مقاومت بالا به ونکومایسین(MIC ≥ ۳۲ µg/ml) از بیماری در ایالت میشیگان جدا شد، پیش بینی مقاومت به ونکومایسین از طریق انتقال ژن VanA انتروکوک ها به Staphylococcus aureus به وقوع پیوست و سوش‌های (Vancomycin Staphylococcus aureus VRSA(Resistance به وجود آمدند(۲۳). تعداد ۲۰ ایزوله Staphylococcus aureus مقاوم به ونکومایسین در جهان شناخته شده که از این میان ۳ ایزوله مربوط به ایران است. این ایزوله ها توسط علی قلی در بیمارستان امام خمینی تهران در سال ۲۰۰۸،توسط دزفولیان در تهران در سال۲۰۱۲ و توسط عظیمیان و همکاران در سال ۲۰۱۲ در اصفهان شناسایی شدند(۲۴، ۲۵) در مطالعه‌ای از بین ۱۰۳۰ ایزوله کوکسی گرم مثبت جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های بزرگ تهران و چندین آزمایشگاه تمام باکتری های جنس Staphylococcus نسبت به ونکومایسین حساس بودند(۲۶).

در این مطالعه فقط دوایزوله Staphylococcus epidermidis نسبت به ونکومایسین مقاومت نشان دادند. حضور این ارگانیسم‌ها می‌تواند هشدار دهنده باشد چرا که احتمال انتقال ژن های عامل مقاومت به استافیلوکوکوس ارئوس وجود دارد. با توجه به این که درمان انتخابی امپریکال برای بیماران مبتلا به عفونت های بیمارستانی MRSA ونکومایسین می باشد و درمان‌های جایگزین مانند Linezolid بسیار گران قیمت می‌باشد، توصیه می‌شود که با رعایت اصول استاندارد مثل تجویز به موقع و کافی و هم چنین شستن دست ها از ظهور و انتشار سویه های مقاوم جلوگیری گردد. باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف نسبت به تعداد زیادی از آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۷ در آمریکا انجام شد از بین ۹۰۶ ایزوله خانواده انتروباکتریاسه ٪۹ و در بررسی دیگر که در سال ۲۰۰۱ انجام شد ٪۸۲ از سویه های Klebsiella مولد ESBL گزارش شدند(۱۶، ۲۷) در مطالعه ای انجام شده در سال ۲۰۰۵ در ترکیه، ۵۷/۱۰ درصد از باکتری های جنس Acinetobacter تولیدکننده ESBL بودند(۲۸). در بررسی انجام شده در سال ۲۰۰۶ در آمریکا، ۴۷/۶۱ درصد از سویه های Acinetobacter تولیدکننده ESBL بودند(۲۹).

در این مطالعه ۶۵ درصداز خانواده انتروباکتریاسه و ۷۳ درصد از باسیل های گرم منفی غیر تخمیری تولیدکننده ESBL بودند .مقایسه بین مطالعات گذشته و هم‌چنین این بررسی نشان دهنده افزایش روزافزون این مقاومت در طول زمان می باشد. استفاده از انواع کاتترها، جراحی‌ها، مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و طولانی شدن مدت زمان بستری در بیمارستان می‌توانند از عوامل افزایش سویه‌های تولیدکننده ESBL باشند(۳۰) پزشک باید در چنین شرایطی احتمال دخیل بودن باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازها را در ایجاد عفونت در نظر داشته باشد و احتیاط لازم را در زمینه اقدامات درمانی به ویژه در تجویز سفالوسپورین های نسل سوم رعایت نماید. در ایزوله هایی که اثر بتالاکتاماز به وسیله کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند و به سفامایسین‌ها نیز مقاوم هستند می‌توانند تولیدکننده بالقوه AmpC باشند .در مطالعه ای که در سال۲۰۰۵ در هند انجام شد از ۲۸۴ ایزوله باکتری های گرم منفی ۸/۱ درصد مولد AmpC بودند(۳۱). در بررسی انجام شده در چین در سال ۲۰۰۸ شیوع AmpC در Escherichia coli ۲ درصد گزارش شد(۳۲). در مطالعه منصوری و همکاران در ۳ بیمارستان تهران، از بین ۱۵۴ایزوله Escherichia coli، ٪۵/۷ دارای AmpC بودند(۱۷) و در مطالعه‌ای مشابه از میان ۱۰۰ایزوله Klebsiella pneumonia ۱۹ درصد دارای AmpC بودند(۹). در این بررسی ۳۳/۳۳ درصد از باکتری های جنس klebsiella pneumonia مولد AmpC بودند. این نتایج نشان دهنده افزایش نسبتا چشم گیری در بروز این نوع مقاومت نسبت به مطالعات گذشته می باشد. متاسفانه به تشخیص مقاومت AmpC در آزمایشگاه ها کم تر اهمیت داده می‌شود در حالی که بروز این نوع مقاومت سبب بروز مشکل در درمان عفونت می شود. ایمیپنم از کارباپنم ها می‌باشد که به اثر بتالاکتاماز مقاوم بوده و در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری های تولیدکننده ESBL وAmpC به کار می رود و ظهور آنزیم‌های کارباپنماز از جمله متالوبتالاکتامازها باعث مقاومت به این دسته از آنتی بیوتیک‌ها می شود(۳۳). در بررسی انجام شده در سال ۲۰۰۷ که توسط میهنی در بیمارستان طالقانی اهواز انجام شد از ۱۰۰ ایزوله باکتری غیرتخمیری ۴۲ ایزوله مقاوم به ایمیپنم بودند و از این میان۸ ایزوله دارای متالوبتالاکتاماز بودند(۳۴). در بررسی که در سال ۲۰۰۵ در فرانسه انجام شد ٪۴۲ ایزوله ها تولیدکننده متالوبتالاکتاماز گزارش شدند(۳۵).در این بررسی ۷۳/۳۳ درصد از باکتری‌های گرم منفی غیرتخمیری به ایمیپنم مقاوم بودند که از این میان ۲۷/۲۷ درصد دارای متالوبتالاکتاماز می باشند. تجویز نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً فلوروکینولون ها و کاربا‌پنم ها

سبب افزایش این نوع مقاومت می گردد(۳۶) و کنترل مصرف آنتی بیوتیک نقش مهمی در جلوگیری از ظهور سوش‌های مقاوم دارد. با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی حضور میکروارگانیسم‌ها در محیط بیمارستان و بروز و افزایش انواع مقاومت های آنتی‌بیوتیکی در آن ها که احتمال بقای آن ها در محیط را افزایش می‌دهد و جابه جایی و انتقال این میکروارگانیسم‌ها در میان پرسنل، ملاقات کنندگان و به ویژه بیماران به عنوان یک مشکل عمده مطرح می‌باشد. مصرف انواع آنتی‌بیوتیک ها از جمله آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف توسط بیماران بستری در بیمارستان می تواند از عوامل مؤثر در افزایش باکتری های مقاوم در محیط بیمارستان به شمار آید(۳۷). تجمع باکتری ها در محیط باعث انتقال پلاسمیدهای حامل ژن های مقاومت از باکتری‌های مقاوم به باکتری های حساس و در نتیجه گسترش مقاومت خواهد شد(۳۸). به کارگیری مواد ضدعفونی کننده مناسب و آگاهی از روش صحیح استفاده از آن‌ها می‌تواند باعث کاهش عفونت‌های بیمارستانی شود و هم‌چنین داشتن اطلاعات کافی از انواع باکتری‌های شیوع یافته در هر بیمارستان و شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن ها در درمان مناسب و به موقع بیماران مؤثر است و در کاهش مقاومت های آنتی بیوتیکی نقش به سزایی دارد(۳۹). بنابراین لازم است هر بیمارستان طبق برنامه مشخص هر چند وقت یک بار الگوی شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های شیوع یافته را پایش کند تا راهنمای مناسبی جهت درمان مناسب عفونت ها برای پزشکان باشد. نتایج این بررسی بیان گر حضور گسترده میکروارگانیسم های پاتوژن در محیط بیمارستان و درصد بالای شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی در آن‌ها می‌باشد. در این مطالعه سعی شده با تعیین پاتوژن‌های احتمالی در بیمارستان و تعیین الگوی شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی به پزشکان، درانجام درمان موفق بیماران کمک شود و هم چنین گامی مؤثر در جهت کاهش مقاومت های آنتی بیوتیکی و کنترل عفونت برداشته شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی پزشکی خانم نونا طاهری در دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از معاونت آموزشی این دانشگاه بابت پشتیبانی مالی این تحقیق اعلام می دارند.

References

1. Marc F, Force La. The Control of Infections in Hospitals, In: Richard P. Wenzel. Prevention and Control of Nosocomial Infections, 3rd edition, U.S.A. Williams & Wilkins, 1997. 3:17
2. http://www.cdc.gov/mmwr/preview.
3. Cataño JC[1], Echeverri LM Szela C. Bacterial contamination of clothes and environmental items in a third-level hospital in Colombia Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012; 2012: 507640. doi: 10.1155/2012/507640. Epub 2012 Mar 26
4. Meredith C Faires, David L Pearl, William A Ciccotelli, Karen Straus, Giovanna Zinken, Olaf Berke, Richard J Reid-Smith and J Scott Weese A prospective study to examine the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Clostridium difficile contamination in the general environment of three community hospitals in southern Ontario, Canada BMC Infectious Diseases 2012, 12: 290 doi:10.1186/1471-2334-12-290

5. Scheckler WE, Brimhall D, Buck AS, Farr BM, Friedman C, Garibaldi RA, Gross PA, Harris JA, Hierholzer WJ Jr, Martone WJ, McDonald LL, Solomon SL. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: A consensus panel report. Society for Healthcare Epidemiology of America. Am J Infect Control. 1998 Feb;26(1):47-60. Review.
6. Ekrami AR, Kayedani A, Jahangir M, Kalantar E, Jalali M. Isolation of common aerobic bacterial pathogens rom the environment of seven hospitals, Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011; 4(2): 75-82.
7. ospital antibiotic control measures in the UK. Working Party of the British Society forAntimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother. 1994 Jul; 34(1): 21-42.
8. Shlaes DM , Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S,McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention ofantimicrobial resistance in hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997 Apr;18(4):275.
9. Struelens MJ. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. BMJ. 1998 Sep 5;317(7159):652-4.
10. y World Health Organization W WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance Executive Summary World Health Organization
11. Mojde Safari,1 Hamid Abtahi, Mana Shojapoor, Majid Akbari, Ahamadali Poorbabayi1 Zahedan Journal of Research in Medical Sciences Journal homepage: www.zjrms.ir Determination of the Pattern of Antibiotic Resistance and Investigation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production of Enterobacteriaceae Isolates of Clinical Specimens Zahedan J Res Med Sci 2012 Oct; 14(8): 33-37
12. Alireza Japoni-Nejad, Nasim Fardmusavi, Mojdeh Safari, MSc3Hamid Kazemian, Mahsa Tabibnejad, Alireza Amuzandeh Nobaveh, Hamid Abtahie, Journal of Isfahan Medical School Received: 14.05.2013 Vol. 31, No. 249, 3rd Week, October 2013 Accepted: 18.08.2013 Prevalence of Plasmid-Mediated AmpC ß-Lactamase Genes in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae in Arak City, Iran
13. IranAlireza Japoni-Nejad, Masoomeh Sofian Alex van Belkum, Ehsanollah Ghaznavi-Rad. Jundishapur J Microbiol. 2013 October; 6(8): e9892.Nosocomial Outbreak of Extensively and Pan Drug-Resistant Acinetobacter baumannii in Tertiary Hospital in Central Part of Iran
14. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, 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 University of Medical Sciences Journal. 2013; 16 (2) :29-37
15. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M et al . Molecular Investigation of Integrons in Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae Isolated from Urinary Tract

Infections. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23 (105) :20-27

16. Favero MS,McDade J J,Robertsen JA, Hoffman RK, Edwards RW. Microbiological sampling of surfaces. J Appl Bacteriol. 1968 Sep;31(3):336
17. Maple PA, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. World- wide antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. 1989 Mar 11; 1 (8637): 537-40.
18. Burnham CA, Weber CJ, Dunne WM Jr. Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible Staphylococcus aureus J Clin Microbiol. 2010 Mar; 48(3): 949-51. doi: 10.1128/JCM.02295-09. Epub 2010 Jan 20.
19. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, William PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum - lactamase Detection Methods. J Clin Microbiol 2001; 39:2864-2872.
20. Niakan M, Chitsaz M, Metwaei A. Prevalence of AmpC type extended spectrum beta lactamases genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae Iranian J Med Microbiology 2008, 2(2): 1-8.
21. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, van Belkum A, Neela V. simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributedstaphylococcal cassette chromosome mec types in meticillin-resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. 2010 Oct; 59(Pt10): 1135-9. doi: 10.1099/ jmm. 0. 021956-0. Epub 2010 Jul 8.A
22. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. -Int J Antimicrob Agents. 2006 Apr; 27(4):351-3. Epub 2006 Mar 24.
23. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens:norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species. Am J Infect Control. 2010 Jun; 38(5Suppl1): S25-33. doi: 10.1016/ j.ajic. 2010.04.196.
24. Ghaznavi- Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Shamsudin MN, Hamat RA, Sekawi Z, Aziz MN, Tavakol M, van Belkum A, Neela V. Environmental contamination in the hospital as a possible source for nosocomial infection withmethicillin-resistant Staphylococcus aureus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010 Dec;31(12):1302-3. doi: 10. 1086/657587. Epub 2010 Oct 28.
25. Elward AM, Fraser VJ. Factors for nosocomial primary bloodstream infection in pediatric intensive care unitpatients: a 2-year prospective cohort study. nfect Control Hosp Epidemiol. 2006 Jun;27(6):553-60. Epub 2006 May 31. Risk
26. Bhutta A, Gilliam C, Honeycutt M, Schexnayder S, Green J, Moss M, Anand KJ. Reduction of bloodstream infections associated with catheters in paediatric intensive care unit: stepwise approach. BMJ. 2007 Feb 17; 334(7589): 362-5.
27. Noble WC, Virani Z, Cree RG . Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 1992 Jun 1;72(2):195-8.

28. Emran Askari, Ahmadreza Zarifian, Mohammad Reza Pourmand, Mahboobeh Naderi-Nasab. jmb.tums.ac.ir High-Level Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus(VRSA) in Iran: A Systematic Review J Med Bacteriol. Autumn 2012; 1 (2): pp. 53-61
29. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, Soleimani M, Peerayeh SN. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from therespiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. J Clin Microbiol. 2012 Nov; 50(11): 3581-5. doi: 10.1128/ JCM.01727- 12. Epub 2012 Aug 29.
30. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, et al. Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nursing homes. JAMA. 1999; 281(6): 517-23. Epub 1999/02/18.
31. Coudron PE[1], Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a veterans medical center: seek and you may find. J Clin Microbiol. 1997 Oct;35(10):2593-7.
32. Taşli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV- derived extended-spectrum beta-lactamases inhospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005 Jun;58 (3): 162-7.
33. Pasterán F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, Vázquez M, Procopio A, Tokumoto M, Cagnoni V. Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii Strains in the Americas**.** Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep; 50(9): 3222-4.
34. Wiener J, Quinn JP,Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, Weinstein RA. Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nursing homes. JAMA. 1999 Feb 10;281(6): 517-23.
35. Arora S, Bal M. AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. Indian J Med Res. 2005 Sep; 122(3): 224-233.
36. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Wang A, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli nd Klebsiella pneumoniae from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Oct; 27(10): 915-21. doi: 10.1007/s 10096-008-0532-4. Epub 2008 May 1.
37. Poole K. sistance to beta-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci. 2004 Sep;61(17):2200-23
38. Shlaes DM, Gerding DN, John JF, Jr., Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, et al. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997;18(4):275-91. Epub 1997/04/01.
39. Pitout JD , Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. tection of Pseudomonas aeruginosa producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7): 3129-35..