

Investigating the Prevalence of the Vancomycin Resistance Gene in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens in Medical Centers in Mazandaran

Fatemeh Nooraei¹,

Mojtaba Mohseni²

¹ MSc in Microbiology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

² Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(Received April 8, 2025; Accepted July 8, 2025)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is one of the most important causative agents of infections. The excessive use of antibiotics has led to a rise in antibiotic-resistant strains, including vancomycin-resistant isolates. The aim of this study was to investigate the prevalence of the *vanA* gene** in *S. aureus* strains isolated from clinical specimens.

Materials and methods: A total of 115 *S. aureus* isolates were collected from medical diagnostic laboratories and hospitals. The isolates were identified using standard phenotypic methods. The antibiotic resistance profiles of the isolates to commonly used antibiotics were assessed using the disc diffusion method. Vancomycin susceptibility was evaluated using the vancomycin agar screening method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin was determined by the agar dilution method. The presence of the *vanA* gene was detected using polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was performed using SPSS software, employing Fisher's exact test and the Mann–Whitney U test.

Results: A total of 100 isolates were confirmed as *S. aureus*. The resistance rates to penicillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, ciprofloxacin, ceftiofur, gentamicin, and rifampin were 90%, 66%, 56%, 54%, 54%, 38%, 4%, and 0%, respectively. The results of vancomycin susceptibility testing, using both phenotypic and genotypic methods, showed that 2% of the isolates were resistant, and 4% exhibited intermediate resistance to vancomycin.

Conclusion: The results indicate that the prevalence of resistance genes and the emergence of vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) have not changed significantly compared to previous studies. However, given the multidrug resistance of VRSA isolates to many commonly used antibiotics, it is essential to accurately identify and effectively manage infections caused by these strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, vancomycin-resistant strains

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (247): 49-60 (Persian).

Corresponding Author: Mojtaba Mohseni - Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
(E-mail: M.Mohseni@umz.ac.ir)

بررسی شیوع ژن مقاومت به ونکومايسين در *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی در برخی مراکز درمانی مازندران

فاطمه نورایی^۱مجتبی محسنی^۲

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های موضعی و سیستمی است. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ونکومايسين شده است. این مطالعه با هدف بررسی شیوع ژن *vanA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی تعداد ۱۱۵ جدایه مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی و برخی بیمارستان‌ها جمع‌آوری و با آزمون‌های فنوتیپی استاندارد تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به روش انتشار از دیسک بررسی شد. برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين، از روش فنوتیپی غربالگری ونکومايسين آگار استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين به روش رقیق‌سازی در آگار تعیین شد. همچنین حضور ژن *vanA* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بررسی شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های دقیق فیشر و Mann-Whitney U انجام شد.

یافته‌ها: تعداد ۱۰۰ جدایه بعنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین هویت شدند. مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومايسين، کلیندامايسين، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین، جنتامیسین و ریفامپین به ترتیب ۹۰، ۶۶، ۵۶، ۵۴، ۳۸، ۴ و ۰ درصد بود. نتایج بررسی مقاومت جدایه‌ها به هر دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی نشان داد ۲ درصد جدایه‌ها به ونکومايسين مقاوم بودند. هم‌چنین ۴ درصد جدایه‌ها مقاومت حد واسط به ونکومايسين داشتند.

استنتاج: شیوع ژن مقاومت و روند شکل‌گیری مقاومت به ونکومايسين نسبت به پژوهش‌های گذشته تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است، اما به دلیل مقاومت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های متداول، شناسایی و مدیریت درمان عفونت‌های ناشی از این جدایه‌ها اهمیت دارد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های مقاوم به ونکومايسين

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) باکتری بیماری‌زای فرصت طلب بوده و به عنوان میکروبیوتا طبیعی در بینی ۲۰ درصد از افراد جامعه وجود دارد. این باکتری سبب ایجاد عفونت‌های ساده تا پیش‌رونده و خطرناک، موضعی و یا سیستمیک در سطح مراکز درمانی و جامعه می‌باشد (۱، ۲).

Email: M.Mohseni@umz.ac.ir

مؤلف مسئول: مجتبی محسنی- بابلسر: دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲. دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۱/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۴/۱۷

این باکتری دارای عوامل ویروالانس مختلفی می باشد که در بیماری زایی آن نقش اساسی دارند (۳). با توجه به سهم عمده این باکتری در شیوع عفونت های مختلف در بیمارستان و جامعه و همچنین بیماری زایی شدید آن، درمان به موقع و کارآمد عفونت های ناشی از آن اهمیت ویژه ای دارد. در پی استفاده از آنتی بیوتیک های بتالاکتامی نظیر پنی سیلین برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری، مقاومت مربوط به پنی سیلیناز ایجاد شد. بنابراین در سال ۱۹۶۱ آنتی بیوتیک نیمه صناعی متی سیلین معرفی شد. اما به سرعت و پس از چند ماه سویه های اس. اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) شناسایی شد (۴). پس از آن طی دهه ی ۱۹۶۰ از آنتی بیوتیک های گلیکوپتیدی نظیر ونکوماکسین برای درمان استفاده شد (۵). به تدریج سویه هایی با مقاومت بینایی و کامل نسبت به ونکوماکسین شناسایی شد (۶). اگر چه امروزه مقاومت کامل نسبت به ونکوماکسین به ندرت روی می دهد، اما به دلیل محدود بودن درمان های موثر علیه عفونت های ناشی از MRSA، شناسایی و بررسی سویه هایی با مقاومت بینایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. برای ایجاد مقاومت نسبت به ونکوماکسین در اس. اورئوس، حضور ژن های مقاومت ضروری است (۷، ۸). انتقال ژن مقاومت به ونکوماکسین (ژن *vanA*) از طریق هم یوگی از انتروکوک ها به اس. اورئوس و بیان آن سبب تغییر ساختار پپتیدو گلیکان می شود به طوری که آنتی بیوتیک نمی توان به آن متصل شود. تغییر ساختار پپتیدو گلیکان از طریق جایگزین کردن لاکتات یا سرین به جای یکی از آلانین های انتهایی پپتیدو گلیکان انجام می شود که در این صورت ونکوماکسین تمایل پایینی برای اتصال به لاکتات دارد. از دیگر مکانیسم های ایجاد مقاومت می توان به ضخیم شدن دیواره باکتری اشاره کرد که سبب کاهش دسترسی ونکوماکسین به محل اثرش می شود. علاوه بر این برخی سویه های MRSA آنزیمی تولید می کنند که می تواند ونکوماکسین را تجزیه کند (۹). در هر حال مقاومت به ونکوماکسین در استافیلوکوک ها

چند عاملی بوده ولی ساز و کار دقیق آن هنوز مشخص نشده است. همچنین برخی سویه های اس. اورئوس دارای مقاومت بینایی به ونکوماکسین (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*; VRSA) نیز در میشیگان آمریکا گزارش شد (۱۰). برای درمان سویه های مقاوم به ونکوماکسین از سفالوسپورین های نسل پنجم مثل سفتازولین استفاده می شود (۱۱، ۱۲). از مهم ترین علل افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اس. اورئوس می توان به مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها اشاره کرد (۱۳، ۱۴). به دلیل مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها و همچنین افزایش روزافزون شیوع این سویه ها، بررسی میزان شیوع و مقاومت اس. اورئوس در جامعه از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک ها در اس. اورئوس، مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز بررسی شیوع اس. اورئوس مقاوم به ونکوماکسین در باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی جمع آوری شده از آزمایشگاه های تشخیص پزشکی و بیمارستان های شهرهای آمل، بابل و قائمشهر انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه های بالینی و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، با کد اخلاق IR.UMZ.REC.1403.124، تعداد ۱۱۵ جدایه مشکوک به اس. اورئوس از آزمایشگاه های تشخیص پزشکی و برخی بیمارستان های و در شهرهای آمل، بابل و قائمشهر در یک دوره یک ساله از بهمن ۱۴۰۱ تا بهمن ۱۴۰۲ از نمونه های مختلف بالینی از زخم، خلط، خون، ترشحات دستگاه تنفسی و ادرار جمع آوری شد. نمونه گیری توسط کارشناسان آموزش دیده

آزمایشگاه‌های مراکز درمانی نامبرده و به روش استاندارد انجام شد. نمونه‌ها روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. جدایه‌های اس. اورئوس به کمک روش‌های فنوتیپی استاندارد شامل آزمون‌های واکنش گرم، کاتالاز، کواگولاز، تخمیر مانیتول روی محیط کشت مانیتول سالت آگار، تجزیه نوکلئیک اسید به کمک محیط کشت DNase آگار و تعیین حساسیت به نوویوسین و پلی میکسین B تعیین هویت شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

برای سنجش حساسیت باکتری‌ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از روش انتشار از دیسک و مطابق استاندارد CLSI استفاده شد. برای تعیین الگوی مقاومت از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)، سپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم) و ریفامپین (۵ میکروگرم) استفاده شد (۱۵). هم‌چنین به منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها نسبت به متی‌سیلین، طبق توصیه CLSI از دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) استفاده شد. از کشت تازه جدایه‌ها، سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه شد و به کمک سوآپ استریل روی محیط کشت مولر-هیتون آگار به صورت کشت چمنی تلقیح شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در فواصل مناسب روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ونکومايسين

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum inhibitory concentration; MIC) با هدف بررسی سویه‌هایی با مقاومت بینابینی به ونکومايسين، به روش رقیق‌سازی در آگار (Agar dilution) انجام شد.

پلیت‌های محیط کشت BHI آگار حاوی ۳، ۴ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر ونکومايسين استریل تهیه شد. کشت تازه از جدایه‌ها با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه گردید و به کمک سوآپ استریل، بر سطح پلیت‌های BHI آگار حاوی ونکومايسين تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. عدم رشد جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی هر سه غلظت ونکومايسين، نشانه حساسیت به ونکومايسين (*Staphylococcus Vancomycin-susceptible aureus*; VSSA) می‌باشد. جدایه‌هایی که فقط در پلیت حاوی ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونکومايسين رشد کردند سویه‌هایی با مقاومت هتروژن (*Heterogeneous Staphylococcus vancomycin-intermediate aureus*; hVISA) هستند. جدایه‌هایی که در پلیت‌های حاوی ۳ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونکومايسين رشد کردند، مقاومت بینابینی به ونکومايسين (VISA) دارند. هم‌چنین جدایه‌هایی که در پلیت حاوی غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ونکومايسين رشد داشتند سویه‌های مقاوم به ونکومايسين (VRSA) می‌باشند (۱۷-۱۵).

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين

برای بررسی فنوتیپی مقاومت جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين طبق دستورالعمل CLSI، از روش غربالگری ونکومايسين آگار استفاده شد. پلیت غربالگری ونکومايسين شامل محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر ونکومايسين استریل بود. سوسپانسیونی با کدورت نیم مک‌فارلند از کشت تازه جدایه‌ها تهیه شد و به کمک سوآپ استریل، بر سطح پلیت ونکومايسين آگار تلقیح شد. رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، بیانگر وجود مقاومت به ونکومايسين است (۱۸).

کشت تازه‌ای از جدایه‌ها در محیط کشت مایع نوترین براث تهیه شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای

یافته‌ها

بر اساس نتایج بررسی ویژگی‌های فنوتیپی شامل صفات مرفولوژی و فیزیولوژی، از مجموع ۱۱۵ *استافیلوکوکوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی، تعداد ۱۰۰ جدایه *اس. اورئوس* بود. همچنین تعداد ۵۸ جدایه از بیماران مرد و ۴۲ جدایه از بیماران زن جداسازی شد. بیش‌ترین تعداد *اس. اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی زخم و کم‌ترین تعداد از نمونه‌های بالینی ادرار و تنفسی به ترتیب ۷۶ و ۲ جدایه بود. هم‌چنین به ترتیب ۴ و ۱۶ درصد جدایه‌ها از خون و خلط جداسازی شد. حداقل و حداکثر سن بیماران به ترتیب ۸ و ۷۸ سال بود. بیش‌ترین فراوانی جدایه‌های شناسایی شده به ترتیب گروه‌های سنی ۳۱ تا ۴۰ سال (۳۰ درصد) و ۵۱ تا ۶۰ سال (۲۶ درصد) بودند. هم‌چنین فراوانی جدایه‌های شناسایی شده در هر کدام از گروه‌های سنی ۴۱ تا ۵۰ سال و ۱۱ تا ۲۱ سال، ۴ درصد بود. توزیع مقاومت به نکو مایسین و متی‌سیلین و ارتباط آن‌ها با عوامل دموگرافیک شامل سن، جنس، نوع نمونه و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز مشخص شد (جدول شماره ۲، جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲: توزیع جدایه‌های اس. اورئوس مقاوم به نوکوماکسین و ارتباط آن با عوامل دموگرافیک (سن، جنس و نوع نمونه) و مقاومت به متی‌سیلین

شماره	نوع مقاومت به	حضور ژن	سن	جنسیت	نمونه ب	نوع مقاومت
جایگاه	وکتورهای	vanA	(سال)		الیتی	به متی سیلین
۱۰	hVISA	-	۷۰	زن	خون	MRSA
۲۸	hVISA	-	۶۵	مرد	زخم	MSSA
۴۴	VISA	-	۲۵	زن	ادرار	MRSA
۷۸	VISA	-	۳۰	زن	خلط	MRSA
۱۴	VRSA	بله	۳۸	مرد	زخم	MRSA
۳	VRSA	بله	۵۷	مرد	زخم	MRSA

جدول شماره ۳: توزیع جدایی‌های اس. اورتوس مقام به متی سیلین و ارتباط آن با عوامل دموگرافیک شامل: سن (الف)، جنس (ب)، نوع نمونه (ب) و مقاومت به ونکو ماینسین (ت)

الف- سن افراد

جدا ٻاهي	گهرو پري سٽي										ٽيڪل
سٽس	ٻي-١١	ٻي-١٢	ٻي-١٣	ٻي-١٤	ٻي-١٥	ٻي-١٦	ٻي-١٧	ٻي-١٨	ٻي-١٩	ٻي-٢٠	ٻي-٢١
ٽورنٽس	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)
MRSA	١ (٥٠)	٠ (٠)	١ (١٠)	١٦ (٦٠)	٤ (١٠٠)	٧ (٢٤)	٥ (٢٧)	٤ (٢٣)	٤ (٢٣)	٣٨ (٣٨)	٣٨ (٣٨)
MSSA	١ (٥٠)	٤ (١٠٠)	٩ (٩٠)	١٢ (٩٠)	٠ (٠)	١٣ (٢٣)	١٣ (٢٣)	١٣ (٢٣)	١٣ (٢٣)	٤٦ (٤٦)	٤٦ (٤٦)

۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. استخراج نوکلئیک اسید جدایه ها به روش استاندارد فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل انجام شد (۱۹). جهت تأیید استخراج نوکلئیک اسید، از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. هم چنین سویه استاندارد/تروکوکوس فکالیس ATCC 51299 به عنوان باکتری کنترل مثبت استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن *vanA* به کمک پرایمرهای اختصاصی رفت *vanA-F* و برگشت *vanA-R* انجام شد (جدول شماره ۱) (۱۸). هر لوله ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط آماده واکنش زنجیره ای پلیمراز، یک میکرولیتر از هر دو پرایمر رفت و برگشت، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز و یک میکرولیتر DNA الگو بود. واکنش زنجیره ای پلیمراز به کمک ترموسایکلر PTC-1148 (BIO RAD، آمریکا) انجام شد. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن *vanA* شامل دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه دمای ۵۲ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. در نهایت برای تکمیل سنتز DNA، دمای واکنش به مدت ۶ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۰).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای اختصاصی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *vanA* (F، پرایمر رفت، R، پرایمر برگشت)

برایمر	توالی (3'→5')	دروصد	دمای اتصال برایمر (درجه سانتیگراد)	محصول (جفت نوکلئوتید)
<i>vanA</i> -F	ATG AAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA C	۲۴	۵۲	۱۰۲۲
<i>vanA</i> -R	CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT	۴۲/۸		

در مطالعه حاضر آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای بررسی ارتباط بین حضور ژن *vanA* با سن و جنس و نوع نمونه‌های بالینی از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. سطح معنی دار در این آزمون کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین از آزمون-Mann Whitney U با سطح معنی داری ۱ استفاده شد.

ب- جنس

جدایه‌های اس. اورئوس	جنسیت		کل (n=100)
	مرد (n=58)	زن (n=42)	
MRSA	۲۵ (۴۳)	۱۳ (۳۰)	۳۸ (۳۸)
MSSA	۳۳ (۵۶)	۲۹ (۷۰)	۶۲ (۶۲)

پ- نوع نمونه

جدایه‌های اس. اورئوس	نوع نمونه بالینی				کل (n=100)
	زخم (n=۷۶)	خلط (n=۱۶)	خون (n=۴)	ادرار (n=۲)	
MRSA	۳۲ (۴۲)	۵ (۳۱)	۱ (۲۵)	۰ (۰)	۳۸ (۳۸)
MSSA	۴۴ (۵۸)	۱۱ (۶۹)	۳ (۷۵)	۲ (۱۰۰)	۶۲ (۶۲)

ت- مقاومت به ونکومايسين

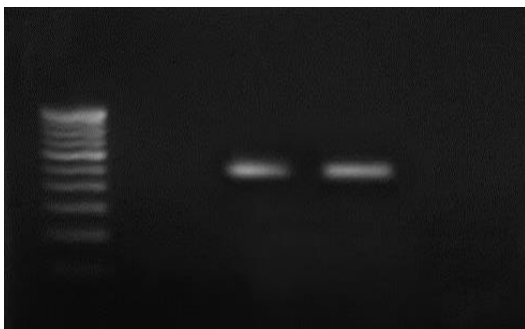
جدایه‌های اس. اورئوس	مقاومت به ونکومايسين				کل (n=100)
	hVISA (n=۶)	VISA (n=۴)	VRSA (n=۲)	vanA gene (n=۱۰۰)	
MRSA	۵ (۸۳)	۴ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۵ (۵)
MSSA	۱ (۱۶)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۱)

برای بررسی تعیین الگوی مقاومت جدایه‌های اس.

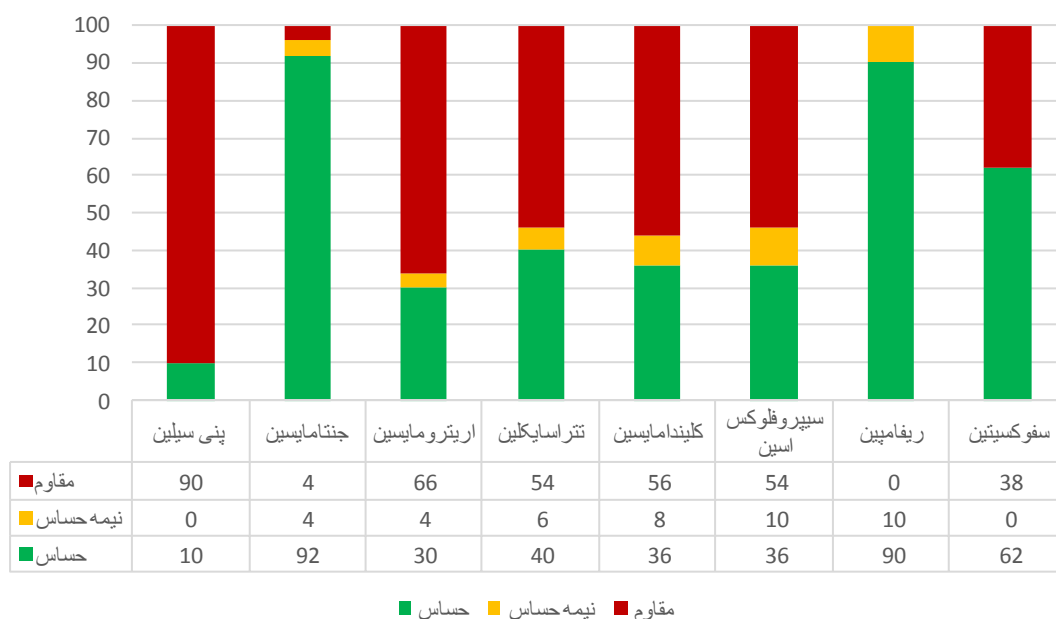
اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، از آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک استفاده شد. نتایج نشان داد باکتری‌های جدا شده بیش‌ترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۰ درصد) و کم‌ترین مقاومت نسبت به ریفامپین (صفر درصد) داشتند (نمودار شماره ۱). همچنین مقاومت جدایه‌های اس. اورئوس نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک مختلف شامل جنتامایسین، اریترومايسين، سپروفلوکساسین، تتراسایکلین، پنی‌سیلین و کلیندامایسین به ترتیب ۴، ۶۶، ۵۴، ۵۴، ۹۰ و ۵۶ درصد بود. هم‌چنین ۳۸ درصد جدایه‌ها مقاوم به سفوکسیتین و MRSA بودند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در نمودار شماره ۲ نشان داده شد. تمام جدایه‌های MRSA نسبت به پنی‌سیلین مقاوم و نسبت به ریفامپین حساس بودند. بررسی فنوتیپی مقاومت جدایه‌های اس. اورئوس نسبت به ونکومايسين به روش غربالگری در محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر ونکومايسين انجام شد. نتایج نشان داد ۹۸ درصد جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين حساس بودند. هم‌چنین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد جدایه‌ها نسبت به ونکومايسين به روش

رقیق‌سازی در محیط کشت آگار دار حاوی ۳، ۴ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر ونکومايسين تعیین شد. نتایج نشان داد تعداد ۶ جدایه در محیط کشت حاوی ۳ میکروگرم ونکومايسين رشد کردند که بیانگر مقاومت هتروژن (hVISA) بود. هم‌چنین تعداد ۴ جدایه در محیط کشت حاوی ۴ میکروگرم ونکومايسين رشد کردند که نشان‌دهنده مقاومت بینابینی (VISA) بود. تعداد ۲ جدایه با رشد در محیط کشت حاوی ۶ میکروگرم ونکومايسين، مقاومت کامل به ونکومايسين (VRSA) داشتند. لازم به ذکر است جدایه‌هایی که روی محیط کشت حاوی ۴ میکروگرم ونکومايسين رشد کردند در محیط کشت حاوی ۳ میکروگرم ونکومايسين هم رشد داشتند. هم‌چنین جدایه‌هایی که روی محیط کشت حاوی ۶ میکروگرم ونکومايسين رشد کردند در هر دو محیط کشت حاوی ۳ و ۴ میکروگرم ونکومايسين هم رشد داشتند.

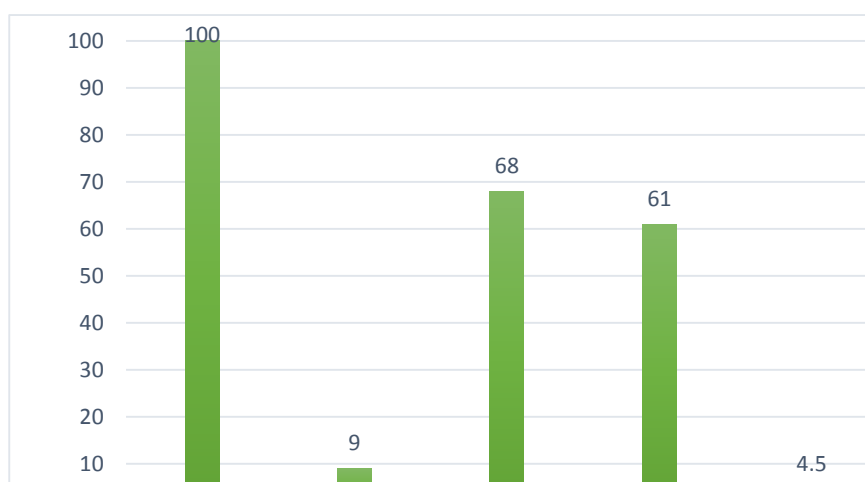
نتایج غربالگری حضور ژن *vanA* در جدایه‌ها نشان داد تعداد ۲ جدایه از مجموع ۱۰۰ جدایه اس. اورئوس واجد ژن مقاومت به ونکومايسين بودند (تصویر شماره ۱). هر دو جدایه واجد ژن *vanA* که به روش فنوتیپی مقاوم به ونکومايسين (VRSA) بودند از نمونه زخم جدا شدند. هم‌چنین این دو جدایه نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به جز ریفامپین، مقاوم بودند.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژل آگارز ژن *vanA*. ردیف ۱: خط‌کش ژنی ۱۰۰ جفت باز؛ ردیف ۲: شاهد منفی؛ ردیف ۳: شاهد مثبت؛ ردیف ۴: جدایه ۳۲ (مقاوم به ونکومايسين)؛ ردیف ۵: جدایه ۲۰ (حساس به ونکومايسين)



نمودار شماره ۱: نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اس. اورئوس به روش انتشار از دیسک مطابق استاندارد CLSI



نمودار شماره ۲: درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در جدایه‌های MRSA

مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های دارای ژن *vanA* به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P < 0/05$)، در حالی که عوامل دموگرافیک مانند سن و جنس ارتباط واضحی با مقاومت به متی‌سیلین نداشتند ($P > 0/05$). هم‌چنین، نمونه‌های بالینی مانند ادرار و ترشحات تنفسی تمایل به حساسیت بیش‌تر (MSSA) نشان دادند، اگرچه این ارتباط از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بررسی ارتباط بین حضور ژن *vanA* با متغیرهای دموگرافیک نشان داد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین جنسیت ($P = 0/428$)، آزمون فیشر) یا سن ($P = 1/000$)، آزمون Mann-Whitney U) با حضور این ژن وجود ندارد. اگرچه تمامی موارد *vanA* مثبت در مردان مشاهده شد، اما حجم کم نمونه امکان نتیجه‌گیری قطعی را محدود می‌کند. هم‌چنین، میانه سنی در هر دو گروه یکسان بود (۴۷/۵ سال). تحلیل داده‌ها نشان داد که

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس از شایع ترین و مهاجم ترین باکتری های بیماری زا محسوب می شود. امروزه افزایش افسار گسیخته شیوع سویه های MRSA، که معمولا علاوه بر متی سیلین به چندین آنتی بیوتیک دیگر نیز مقاوم اند، سبب نگرانی جدی در حوزه کنترل و پیشگیری بیمارهای عفونی شده است. در مراکز درمانی، این سویه ها سبب شکست درمان آنتی بیوتیکی به کمک آنتی بیوتیک های رایج می گردند. این معضل علاوه بر تاثیر منفی در روند بهبود بیمار، سبب گسترش شیوع سویه های مقاوم در سطح جامعه می شود. سویه های مقاوم به دلیل عوامل ویروالانس ویژه سبب عفونت های جدی می شوند. معمولا درمان این سویه های مقاوم به متی سیلین به کمک ونکومایسین صورت می گیرد. از طرفی سویه هایی از انتروکوک ها با انتقال ژن *vanA* از طریق مکانیسم هم یوگی به *اس. اورئوس* سبب ایجاد سویه های VRSA می گردند. برخی مطالعات نشان داد درصد کشندگی سویه های VRSA حدود ۶۰ درصد است (۲۱). اگر چه امروزه شیوع این سویه ها بسیار کم است اما کنترل دقیق شیوع آن ها به دلیل مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها، بسیار ضروری است. در این مطالعه ۳۸ درصد جدایه ها MRSA بودند. همه جدایه های VRSA، MRSA نیز بودند. این موضوع هشدار جدی در بحث سلامت عمومی می باشد. البته در این مطالعه ارتباط بین حضور ژن *vanA* و مقاومت به متی سیلین، به کمک آزمون دقیق فیشر بررسی شد، هم چنین به دلیل نادر بودن شیوع سویه ها با مقاومت کامل به ونکومایسین (VRSA)، شناسایی و بررسی سویه هایی با مقاومت بینابینی نسبت به ونکومایسین (VISA) به منظور آگاهی از روند پیشرفت مقاومت بین سویه ها ضروری است. زیرا در سال های اخیر افزایش چشمگیری در مقدار MIC ونکومایسین بین سویه های *اس. اورئوس* مشاهده گردید. افزایش در مقدار MIC پارامتر مهمی در بررسی روند افزایش مقاومت

آنتی بیوتیکی می باشد. همچون بسیاری از مطالعات مشابه، نظیر مطالعه Kandel و همکاران، در این مطالعه نیز نرخ بالای سویه های جدا شده از نمونه زخم (۷۶ درصد) نسبت به سویه های جدا شده از سایر نمونه های بالینی، بدلیل ورود باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که فلور طبیعی پوست است، از طریق خراشیدگی، برش، سوختگی و کاتتر داخل وریدی، به بدن می باشد (۲۲). در مطالعه بهلولی و همکاران در سال ۱۳۹۵ روی ۶۰۸ جدایه *اس. اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی، هیچ موردی از VRSA به روش آنالیز مولکولی شناسایی نشد (۲۳). هم چنین در مطالعه مشابهی که توسط مرادی و همکاران در سال ۱۳۹۰ انجام شد مقاومت جدایه های *اس. اورئوس* نسبت به پنی سیلین ۱۰۰ درصد، اگزاسیلین ۴۴/۷ درصد، جنتامیسین ۲۵/۳۷ و تتراسایکلین ۳۷/۳۲ درصد بود در حالی که در پژوهش حاضر مقاومت جدایه ها نسبت به این آنتی بیوتیک ها به ترتیب ۹۰، ۳۸، ۴ و ۵۴ درصد بود. از دلایل تفاوت مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک ها می توان به تفاوت در ناحیه جغرافیایی مورد مطالعه، زمان مطالعه، نوع بیمارستان و بخش مورد بررسی، نوع بافت حامل عفونت در بیمار و نیز میزان مصرف آنتی بیوتیک اشاره کرد. همچنین بررسی فنوتیپی مقاومت به ونکومایسین به روش تعیین MIC در مطالعه مرادی و همکاران نشان داد ۲۲/۴ درصد جدایه ها مقاوم به ونکومایسین بودند در حالی که بررسی مولکولی نشان داد هیچ یک از جدایه ها دارای ژن *vanA* نبودند (۲۴). از علل مغایرت نتایج بررسی فنوتیپی و مولکولی در این نوع پژوهش ها می توان به وابستگی نتایج بررسی های فنوتیپی به عوامل محیطی هم چون دما، pH، غلظت نمک، بیان ناهمگن مقاومت و یا وابستگی مقاومت به ونکومایسین به سایر ژن های مقاومت نظیر *vanB* و *vanC* اشاره کرد (۲۵). در مطالعه حاضر نتایج بررسی فنوتیپی و مولکولی مقاومت به ونکومایسین یکسان بود و هر دو جدایه مقاوم به ونکومایسین، دارای ژن *vanA* نیز بودند. در مطالعه

مشابهی که در سال ۱۳۹۵ توسط ایزانلو و همکاران انجام شد هیچ جدایه‌ای با مقاومت حدواسط و یا کامل به ونکومایسین شناسایی نشد، در صورتی که نتایج پژوهش حاضر نشان داد ۴ درصد جدایه‌ها دارای مقاومت حد واسط و ۲ درصد جدایه‌ها دارای مقاومت کامل به ونکومایسین بودند (۲۶). در مطالعه مشابهی که توسط موقرنژاد و همکاران در سال ۱۳۹۴ انجام شد ۲ درصد جدایه‌های *اس. اورئوس* واجد ژن *vana* بودند (۲۰). هم‌چنین در مطالعه مشابهی که در سال ۱۴۰۳ توسط شهابی‌نژاد انجام گرفت ۱/۵ درصد جدایه‌های *اس. اورئوس* واجد ژن *vana* بودند که تا حد زیادی مشابه نتیجه مطالعه اخیر می‌باشد (۲۷). در سال ۱۴۰۳ کرم‌الهی و همکاران مطالعه‌ای برای شناسایی مولکولی *اس. اورئوس* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در ایلام انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد ۶/۷ درصد جدایه‌ها واجد ژن *vana* بودند. درصد بالای سویه‌های *VRSA* شناسایی شده در مطالعه کرم‌الهی ممکن است با نوع جامعه مورد مطالعه (بیماران بستری در بخش جراحی و بخش مراقبت‌های ویژه) در ارتباط باشد (۲۸). نتیجه مطالعه Palazzo و همکاران (۲۰۰۵) در برزیل نشان داد جدایه‌هایی که از نظر فنوتیپی نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند فاقد ژن *vana* بودند. بررسی مرفولوژی این جدایه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده ضخیم شدن دیواره سلولی این جدایه‌ها بود (۲۹). هم‌چنین در پژوهش مشابه دیگری که توسط Soleha و همکاران (۲۰۲۴) در اندونزی انجام گرفت ۸/۳ درصد جدایه‌ها دارای ژن *vana* بودند که بالاتر از درصد اندازه‌گیری شده در مطالعه حاضر می‌باشد (۳۰). مطالعه Maharjan و همکاران در نپال در سال ۲۰۲۱ نیز نشان داد ۱/۳ درصد جدایه‌ها واجد ژن *vana* بودند (۹). همان گونه که اشاره شد تفاوت میزان شیوع ژن *vana* در مطالعات مختلف ممکن است ناشی از زمان، نوع نمونه‌ها و شرایط جغرافیایی، فصلی و اقلیمی باشد. از مزایای عمده‌ای که مطالعه اخیر نسبت به سایر مطالعات

مشابه داخل کشور دارد می‌توان به طول زمان مطالعه اشاره کرد. به‌طوری که این مطالعه در طول دوره زمانی یک ساله انجام شد، در حالی که اکثر مطالعات داخلی مشابه در دوره ۳ الی ۶ ماه انجام پذیرفتند. هم‌چنین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی، موجب افزایش درصد اطمینان شد. نتایج سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در پژوهش حاضر نشان داد موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه جدایه‌های *اس. اورئوس* شامل ونکومایسین (۹۸ درصد)، جنتامیسین (۹۲ درصد) و ریفامپین (۹۰ درصد) بود. هم‌چنین ناکارآمدترین آنتی‌بیوتیک‌ها پنی‌سیلین (۱۰ درصد)، اریترومایسین (۳۰ درصد) و اگزاسیلین (۳۶ درصد) بود. هم‌چنین نتایج تعیین MIC ونکومایسین در جدایه‌ها به روش رقیق‌سازی در آگار نشان داد ۴ درصد جدایه‌ها به‌عنوان VISA شناخته شدند. بررسی مشابهی که توسط Nicoletti و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد نشان داد ۷ درصد جدایه‌های *اس. اورئوس* دارای مقاومت حدواسط نسبت به ونکومایسین (VISA) بودند (۳۱).

هدف از مطالعه حاضر تعیین شیوع ژن مقاومت به ونکومایسین در جدایه‌های *اس. اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی، بررسی مقاومت حد واسط به ونکومایسین و روند شکل‌گیری مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جامعه بود. به دلیل امکان تغییر الگو مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بیماری‌زا و لزوم تغییر در رویکردهای درمانی، پایش مداوم وضعیت انتشار ژن‌های مقاومت بین جدایه‌های بیماری‌زا اهمیت دو چندان دارد. آگاهی از الگو مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین جدایه‌ها و به دنبال آن اتخاذ رویکردهای درمانی مناسب و هدفمند در مراکز درمانی، خود مانع از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد. براساس نتایج مطالعه حاضر، شیوع ژن مقاومت و هم‌چنین روند شکل‌گیری مقاومت به ونکومایسین نسبت به اغلب پژوهش‌های سال‌های اخیر در ایران، تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است که این موضوع امیدوار کننده است. اما شناسایی ۲

سپاسگزاری

در مطالعه حاضر هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است. از زحمات آقای اکبری (بیمارستان امام رضا آمل) برای اعطای سویه شاهد مثبت ژن *vanA* و آقای طالبی (بیمارستان رازی قائمشهر) برای جمع آوری نمونه‌های بالینی تشکر و قدردانی می‌شود.

جدایه مقاوم به ونکومايسين به عنوان زنگ خطری در مدیریت عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. در عین حال همانند پژوهش‌های مشابه، در این پژوهش نیز درصد بالای شیوع جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص متی‌سیلین، هشدار جدی در مبحث سلامت جامعه به شمار می‌رود که کنترل آن نیز مستلزم اتخاذ رویکردهای پیشگیرانه و کنترلی مناسب می‌باشد.

References

- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339(8): 520-532 PMID: 9709046.
- 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. Iran South Med J 2014; 17(5): 916-926. (persian).
- Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. Infect Immun 2006; 74(8): 4950-4953 PMID: 16861688.
- Johnston BL, Bryce E. Hospital infection control strategies for vancomycin-resistant *Enterococcus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile*. Can Med Assoc J 2009; 180(6): 627-631 PMID: 19289807.
- Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3581-3585 PMID: 22933598.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997; 40(1): 135-136 PMID: 9249217.
- Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2000; 16 Suppl 1: S3-S10 PMID: 11137402.
- Tiwari K B. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* may occur faster than expected. Int J Life Sci 2009; 3(7): 6-13.
- Maharjan M, Sah AK, Pyakurel S, Thapa S, Maharjan S, Adhikari N, et al. Molecular confirmation of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* with *vanA* gene from a hospital in Kathmandu. Int J Microbiol 2021; 2021(1): 3847347 PMID: 34899917.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 2003; 348(14): 1342-1347 PMID: 12672861.
- Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2006; 193(11): 1495-1503 PMID: 16652276.
12. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Updates 2000; 3(5): 303-311 PMID: 11498398.
 13. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek 1999; 76(1): 115-137 PMID: 10532375.
 14. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC Infect Dis 2006; 6(1): 156 PMID: 17067393.
 15. Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd^{ed}. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. CLSI document M100, 2021.
 16. Carey-Ann BD, Weber CJ, Dunne WM. Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2010; 48(3): 949-951 PMID: 20089765.
 17. Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: comparison of E-test and agar screening methods. J Clin Microbiol 2011; 49(6): 2147-2150 PMID: 21490190.
 18. Dutka-Malen S, Mohnas C, Arthur M, Courvalin P. The *vanA* glycopeptide resistance protein is related to d-alanyl-d-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. Mol Gen Genet 1990; 224(3): 364-372 PMID: 2266943.
 19. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. CSH Protoc 2006(1):pdb. prot4455 PMID: 22485786.
 20. Movagharneshad M, Khataminezhad MR. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* methicillin and vancomycin resistance from patients in Sari and Ghaemshahr Injuries and Burn Hospitals in 2015. Iran J Med Microbiol 2018; 12(3): 160-168. (persian)
 21. Crossley KB, John J. Treatment of Staphylococcal Infections. In: Staphylococci in Human Disease 2009: 570-593. <https://doi.org/10.1002/9781444308464.ch31>.
 22. Kandel SN, Adhikari N, Dhungel B, Shrestha UT, Angbuhang KB, Karki G, et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. Microbiol Insights 2020; 13: 1178636120972695 PMID: 33239886.
 23. Bohlouli P, Nahaei MR, Farajnia S, Varshochi M, Ghojzadeh M, Akbari Dibavar M, et al. Vancomycin sensitivity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates collected from clinical specimens of Tabriz Imam Reza and Sina hospitals by E-test method, agar screening plate and PCR. Iran J Med Microbiol 2016; 10(1): 66-75. (persian).
 24. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *Staphylococcus aureus* to vancomycin. Hormozgan Med J 2011; 15(3): 155-163. (persian).
 25. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T, et al. Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(4): 600-604 PMID: 2344167.

26. Izanloo A, Bahreini M, Sharifmoghadam MR, Safamanesh S, Azimian A. Evaluation of vancomycin resistance by Phenotypic and genotypic methods among *S. aureus* strains isolated from patients. *J North Khorasan Univ Med Sci* 2016; 8(2): 215-224. (persian).
27. Shahabinejad F, Salajegheh Tazerji S, Gharieb R, Duarte PM. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from human clinical samples in Kerman hospitals, Iran. *Ger J Microbiol* 2024; 4(2): 29-38.
28. Karamolahi S, Kaviar VH, Haddadi MH, Hashemian M, Feizi J, Sadeghifard N, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from hospital-acquired infections in Ilam, Iran. *Mol Biol Rep* 2024; 51(1): 686 PMID: 38796602.
29. Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 179-185 PMID: 15634969.
30. Soleha TU, Sutyarso S, Sukohar A, Sumardi S, Hadi S. Identification of *vanA* gene on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic ulcer isolate at Lampung province. *Biomed Pharmacol J* 2024; 17(1): 409-416.
31. Nicoletti G, Schito G, Fadda G, Boros S, Nicolosi D, Marchese A, et al. Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. *J Chemother* 2006; 18(6): 589-602 PMID: 17267336.