

The prevalence of *van* gene alleles in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

Akia A., MSc¹, Amini K., PhD²

1. Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. (Corresponding Author), Tel:+98-86-42241511, dr_kumarss_amini@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Aim: *Staphylococcus aureus* can cause a range of diseases including skin disorders, food poisoning and nosocomial infections. Resistance to antibiotics is a major problem and widespread use of antibiotics plays a major role in the emergence of resistant bacteria. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance and isolation of vancomycin resistance genes in *S. aureus* strains isolated from clinical samples by multiplex PCR.

Material and methods: 150 clinical samples were collected randomly from ulcers and nasal swabs from medical centers in Tehran from April to July 2015. Biochemical and microbiological tests were performed to identify strains of *S. aureus*. Antibiotic susceptibility test was conducted by disc diffusion (Kirby-Bauer) method.

Results: The highest resistance rate belonged to clindamycin (83.3 %). Vancomycin and linezolid had the highest sensitivity rate (96.6%). Using multiplex PCR, from 60 human samples only one (1.6%) had VanA and VanB genes, but we did not detect VanC gene in the samples.

Conclusion: The results showed a high prevalence rate of *S. aureus* with low resistance to vancomycin in the clinical samples.

Key words: *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance genes, Multiplex PCR.

Received: Jan 3, 2016 **Accepted:** Jul 13, 2016

بررسی فراوانی آلل های ژن van در میان سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

امین اکیا^۱، کیومرث امینی^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۸۶-۴۲۲۴۱۵۱۱،
dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس ها می توانند موجب طیفی وسیعی از بیماری ها شامل عفونت های پوستی و مسمومیت های غذایی شوند و نیز یکی از عوامل مهم عفونت های nosocomial (عفونت های بیمارستانی) می باشند. مقاومت به آنتی بیوتیک یکی از مشکلات عمده بوده و استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها نقش عمده ای در ظهور باکتری های بازی می کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان مقاومت های آنتی بیوتیکی و جداسازی ژن های مقاومت به ونکومايسين در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی با روش Multiplex PCR می - باشد.

روش بررسی: پس از جمع آوری ۱۵۰ نمونه بالینی (زخم، سوآپ بینی) از مراکز درمانی تهران طی ماههای فروردین تا تیر ماه ۱۳۹۴ به صورت تصادفی، تست های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی جهت شناسایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. آزمون های حساسیت آنتی بیوتیکی توسط روش دیسک دیفیوژن (کربی -بائر) بر روی آنتی بیوتیک هایی از گروه های مختلف انجام گرفت. به منظور شناسایی ژن مقاومت به ونکومايسين از پرابرهای اختصاصی van استفاده شد.

نتایج: بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک کلیندامایسین با ۸۳/۳٪ و بیشترین میزان حساسیت را آنتی بیوتیک های ونکومايسين و لینزولید با ۹۶/۶٪ مشاهده شد. همچنین در این مطالعه با استفاده از روش Multiplex PCR، از مجموع ۶۰ نمونه انسانی، تنها ۱ نمونه (۱/۶٪) دارای ژنهای VanA و VanB بودند و ژن VanC در هیچ نمونه ای مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که میزان شیوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های بیمارستانی بالا بوده و میزان مقاومت به ونکومايسين در سویه های این باکتری پایین بوده است.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن های مقاومت به ونکومايسين، Multiplex PCR

وصول مقاله: ۹۴/۱۰/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۴/۲۱ پذیرش: ۹۵/۴/۲۳

استافیلوکوکوس اورئوس در طبیعت انتشار وسیع داشته و غالباً به عنوان میکروفلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی در بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و حیوانات حضور دارد. باکتریها می توانند به صورت بیوفیلم در سطح کاترها و سوندهای ادراری رشد کنند و مقاومت فوق العاده‌ای نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند (۱). استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان دومین پاتوژن شایع عفونت های بیمارستانی و عامل عفونتهای چرکی پوست و بافت نظیر فولیکولیت، کورک، کفگیرک، زرد زخم و عفونت های غیر چرکی مانند مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، بیماری کاوازاکی، باکتری، سیتی سمی، پنومونی، اندوکاردیت، میوکاردیت، مننژیت، استئومیلیت و آبسه در نقاط مختلف می باشد. سالانه حدود پانصد هزار نفر بیمار در بیمارستانهای آمریکا به عفونت استافیلوکوکی مبتلا می شوند (۲). استافیلوکوکوس ها حساس به متی سیلین و ونکومايسين و سفالوسپورینهای نسل اول، کلیندامایسین، پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز و مقاوم به نافسیلین، اگزاسیلین، موپروسین می باشند و همچنین حامل پلاسمیدهای متعددی هستند که موجب مقاومت آنتی بیوتیکی آنها می شود. در حال حاضر مقاومت دارویی در بین باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوکوس باعث بروز مشکلات زیادی در درمان عفونتهای حاصله از این باکتری شده است. به منظور غلبه بر عفونت های ناشی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین، یک پنی سیلین نیمه مصنوعی با طیف محدود به نام متی سیلین معرفی گردید. از سال ۱۹۹۸ سوش های MRSA ، VRSA ، VISA گزارش شده است (۳) اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس با کاهش حساسیت به ونکومايسين (MIC = 8µg/ml) در سال ۱۹۹۷ در ژاپن گزارش شد، که این سویه ها را استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت حدواسط به ونکومايسين (VISA) می نامند (۴). طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶ بر روی ۶۰۰۰ نمونه هیچ سویه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين (VRSA) در ایالت کالیفرنیا آمریکا گزارش نشد (۵). اغلب سویه های VISA و VRSA در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) مشاهده می گردد (۶). ظهور سوش های مقاوم بر اهمیت پیشگیری از عفونت و خودداری از تجویز غیر ضروری آنتی بیوتیک ها و نیز جداسازی ارگانسیم و تعیین الگوی مقاومت میکروبی می افزاید (۷). محدودیت های درمانی در عفونت های ناشی از VRSA/ VISA وجود دارد در حال حاضر دسته جدیدی از آنتی بیوتیک ها شامل داپتومايسين، لینزولید - اگزازولیدنون جهت درمان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت چندگانه استفاده می (۸). مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومايسين در استافیلوکوکوس ها شامل vanA ، vanB ، vanC1 و vanC2/C3 می باشند. ژنهای vanA و vanB بعنوان مهمترین ژنهای مسئول مقاومت، بترتیب بر روی ترانسپوزون های Tn1546 و Tn1547 قرار دارند که می توانند روی پلاسمید یا کروموزوم یافت شود. ژنهای vanC1 و vanC2/C3 کروموزومی هستند. فنوتیپ vanA از طریق مقاومت اکتسابی سطح بالا هم به ونکومايسين و هم تیکوپلاتین مشخص می شود. فنوتیپ vanB از طریق مقاومت اکتسابی سطح متوسط به ونکومايسين (و نه تیکوپلاتین) مشخص می شود. فنوتیپ vanC از طریق مقاومت داخلی سطح پایین به ونکومايسين و حساسیت به تیکوپلاتین مشخص می شود (۹-۱۱). روش PCR جهت شناسایی ژنهای مقاومت به ونکومايسين و تعیین پراکندگی این دسته از ژنها در استافیلوکوکوس های مقاوم کاربرد فراوانی داشته است (۱۲-۱۴). در این مطالعه پس از جداسازی استافیلوکوکوس های مقاوم به ونکومايسين از نمونه های بالینی و تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی، با استفاده از روش PCR وجود مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومايسين در این سویه ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی - تحلیلی نمونه های بالینی مورد نیاز برای انجام این بررسی از بیماران مبتلا به عفونتهای مختلف که عامل آن استافیلوکوکوس اورئوس بود از جمله زخم، سوآپ بینی، ترشحات چرکی و مایع مغزی نخاعی به تعداد ۱۵۰ نمونه از مراکز درمانی جنوب تهران طی ماههای اردیبهشت تا تیرماه ۱۳۹۴ جمع آوری گردید. با انجام تست های تکمیلی بیوشیمیائی و تاییدی بر روی نمونه های جمع - آوری شده، در نهایت ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی قطعی گردید. نمونه ها برای تعیین هویت به محیط های کشت مانند بلاد آگار و محیط های انتخابی مانند محیط مانیتول سالت آگار انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و در روز بعد کلونی های مشکوک به استافیلوکوکوس جداسازی شدند. برای تأیید نهایی، تشخیص باکتری استافیلوکوکوس با روش های میکروب شناسی مانند رنگ آمیزی گرم و تست - های افتراقی مانند تست کاتالاز، کواگولاز و DNase مورد شناسایی قرار گرفتند.

تعیین حساسیت ضد میکروبی: تعیین حساسیت ضد میکروبی سویه ها به روش انتشار از دیسک و برای آنتی بیوتیک های کلیندامایسین (۲ μg)، ونکومایسین (۳۰ μg)، تیکوپلنن (۳۰ μg)، لیزولید (۳۰ μg)، افلوکساسین (۲ μg)، آزیترومایسین (۱۵ μg)، متی - سیلین (۱۰ μg) و سینرسید (۱۰ μg) بر طبق استانداردهای CLSI و بر روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد (۱۵). حساسیت سویه ها در برابر ونکومایسین به روش E-test (Bio-disk, AB سوئد) انجام شد. به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد. با توجه به اینکه دیسکهای

آنتی بیوتیک خریداری شده قبل از استفاده بایستی کیفیت آنها توسط سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ مورد تأیید قرار می گرفت (۱۵).

Multiplex-PCR: بعد از شناسایی باکتری با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی به منظور استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته در محیط LB agar بر اساس دستورالعمل کیت سیناژن (سیناژن، ایران) انجام شد. در نهایت با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، وجود ژنهای مقاومت به ونکومایسین شامل vanA, vanB, و vanC1/2 در سویه ها استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱- نشان داده شده است (۱۴). واکنش زنجیره ای پلیمرز در شرایط توصیه شده توسط سایر محققین در دستگاه ترموسایکلر BIORAD طبق جدول ۲ و در ۳۱ سیکل انجام گردید. ژن مذکور طی برنامه ای پیش انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، باز شدن دو رشته در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تکثیر یافت (۱۴). برای مشاهده نتیجه تکثیر ژن ژنهای Van، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر $\times 10$ TAE تجاری (Fermentase) انجام شد.

آزمون آماری: داده های آماری با نرم افزار SPSS نسخه (version 19) و با استفاده از آزمون های آمار توصیفی و آزمون t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده (۱۴)

پرایمر	توالی پرایمر (۵'→۳')	ژن	محصول PCR (bp)
EA1	F: GGGAAAACGA CAATTGC	vanA	732
EA2	R: GTACAATGCGGCCGTTA		
EB3	F: ACGGAATGGGAA GCCGA	vanB	647
EB4	R: TGCACCCGATTTTCGTTT		
EC5	F: ATGGATTGGTA YTKGTAT ^a	vanC1/2	827
EC8	R: TAGCGGGA GTGMCYMGTA ^a		

a= K = G or T; M = A or C; Y = C or T.

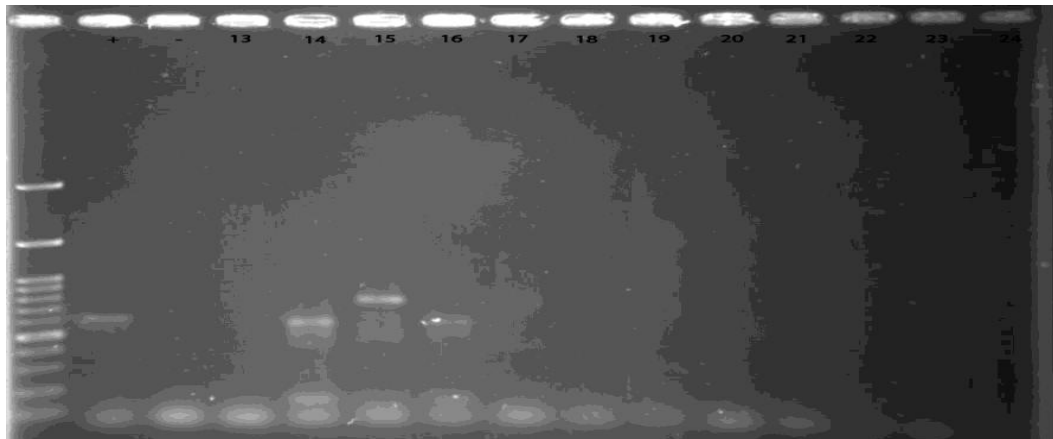
جدول ۲. نحوه تهیه مخلوط واکنش PCR

حجم (میکرولیتر)	غلظت	اجزای واکنش
۵	-	DNA Template
۱۲/۵	۲x	Master Mix & Taq DNA polymerase & dNTP & MgCl ₂
۰/۸	۱۰ (pmol)	Of each primers
۲/۷	-	DW
۲۵	-	Total Volume

نتایج

ونکومايسين و لیزولید با ۹۶/۶٪ از خود بروز داده‌اند. میانگین قطر هاله ایجاد شده در اطراف هر دیسک آنتی بیوگرام به عنوان معیار حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک در نظر گرفته شد که بین نتایج به دست آمده، قطر هاله آنتی بیوتیک‌ها و حساسیت آنها رابطه مستقیم و معنی داری داشت ($P < 0/001$). نتایج تعیین کمترین غلظت مهاري به روش E-test نشان داد که تنها یک سویه دارای مقاوم به ونکومايسين با $MIC \geq 32 \mu g/ml$ مورد شناسایی قرار گرفتند. با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، تعداد ۱ نمونه (۱/۶٪) کل سویه‌ها از نظر وجود ژنهای *VanA* و *VanB* مثبت بودند. و ژن *VanC* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید (شکل ۱).

از تعداد ۱۵۰ نمونه، ۶۰ نمونه با توجه به تست‌های افتراقی، استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. تمامی سویه - های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به DNase، کاتالاز، اکسیداز و مانیتول مثبت بودند. تمامی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (۶۰ ایزوله) از نمونه‌های مختلف بالینی با روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هیتتون آگار نسبت آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین، ونکومايسين، تیکوپلانیل، لیزولید، افلوکساسین، آزیترومایسین، متی - سیلین، سینرسید با روش NCCLS مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج مندرج در جدول ۳ حاصل شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان مقاومت را آنتی بیوتیک کلیندامایسین با ۸۳/۳٪ و بیشترین میزان حساسیت را آنتی بیوتیک‌های



شکل ۱. تعیین استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين به روش M-PCR با استفاده از ۳ جفت پرایمر از سمت چپ به ترتیب ستون M: مارکر bp۱۰۰ و ستون+: کنترل مثبت و ستون -: کنترل منفی و ستون ۱۳-۲۴ سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده. مشاهده باند در نمونه های شماره ۱۴-۱۵ و ۱۶

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن بر روی نمونه های بالینی جدا سازی شده

آنتی بیوتیک ها	مقاوم (%) تعداد	نیمه حساس (%) تعداد	حساس (%) تعداد
کلیندامایسین	۱۰ (۱۶/۷)	-	۵۰ (۸۳/۳)
ونکومايسين	۲ (۳/۴)	-	۵۸ (۹۶/۶)
تیکوپلانین	۳ (۵)	-	۵۷ (۹۵)
لینزولید	۲ (۳/۴)	-	۵۸ (۹۶/۶)
افلوکساسین	-	۷ (۱۱/۷)	۵۳ (۸۸/۳)
آزیترومایسین	۷ (۱۱/۷)	-	۵۳ (۸۸/۳)
متی سیلین	۷ (۱۱/۷)	-	۵۳ (۸۸/۳)
دالفوپریستین / کوینوپریستین	۶ (۱۰)	-	۵۴ (۹۰)

بحث

اورئوس، امروزه شیوع سویه های نیمه مقاوم و یا مقاوم به وانکومايسين افزایش یافته است. اخیراً بروز سویه های VRSA درمان عفونتهای MRSA را با مشکل مواجه نموده است. از ۶۰ نمونه بالینی مورد بررسی، تعداد ۱ نمونه (۱/۶٪) کل سویه ها از نظر وجود ژنهای VanA و VanB مثبت بودند و کل سویه ها از نظر بروز ژن VanC منفی بودند. بنابراین نتیجه بدست آمده حاکی از این است که در

مطالعات صورت گرفته در داخل و خارج کشور نشان دهنده افزایش شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومايسين بوده و مواردی از شیوع این باکتری ها در ایران، فرانسه، آمریکا، چین، کره، آلمان و ژاپن گزارش شده است. با پیدایش مقاومت انتروکوک ها نسبت به وانکومايسين و انتقال ژن مقاومت به استافیلوکوکوس

شده و به صورت موردی گزارش می شود که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه حاضر نیز از روش Multiplex-PCR جهت شناسایی ژن های مقاومت به ونکومایسین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردیده است. Multiplex-PCR می تواند یک تکنیک مناسب برای شناسایی همزمان ژن های مقاومت باشد که با این روش می توان به سرعت به حضور این ژن ها دست یافت.

نتیجه گیری

امروزه افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک در باکتری ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی رویه و روز افزون دارو هاست و کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. که تجویز زیاد دارو ها توسط پزشکان و استفاده ناصحیح آنتی بیوتیک ها توسط بیماران باعث شیوع سویه های مقاوم در جامعه ما نیز شده است. در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی راجع به ژن های استافیلوکوکوس اورئوس صورت گرفته است با کمک روش Multiplex-PCR می توان در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی پی برد و با درمان مناسب و به موقع از به وجود آمدن سویه های مقاوم و انتقال این ژن ها در جمعیت های انسانی جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت محترم و پرسنل گروه میکروبیولوژی پاسارگاد و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه که صمیمانه در انجام این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Laupland KB, Lyytikainen O, Sogaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, et al. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus blood stream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:465-71.
2. Hidayat LK, Hsu DI, Quist R, Shriner KA, Wong-Beringer A. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: efficacy and toxicity. *Archives of Internal Medicine* 2006;166:2138-44.

نمونه های مورد بررسی ، عدم وجود ژن های مذکور نشان دهنده این است که ژن های مقاومت در این بخشها هنوز فراگیر نشده است و پروسه درمانی با دقت و برنامه منظم پیگیری می شود (۱۷). Saha و Launay در تحقیقات خود گزارش نمودند که ژن مقاومت به Van توسط عناصر ژنتیکی Tn1546 با انتروکوک همولوژی دارند (۱۹ و ۱۸). در تحقیقات شریعتی و همکاران در سال ۱۳۹۰ مشخص شد که از میان ۲۸۴ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جداسازی شده، ۱۰۰٪ به پنی سیلین و ۴۶ سویه به متی سیلین مقاوم بوده و هیچ یک از نمونه ها دارای کاهش حساسیت به ونکومایسین نبوده و با روش PCR حامل هیچ کدام از ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومایسین نبوده اند که با تحقیق حاضر همخوانی دارد (۱۶). در این تحقیق ۶۰ نمونه بالینی مورد استفاده از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی نیز مورد بررسی قرار گرفتند و حساسیت ایزوله ها با استفاده از دیسک های کلیندامایسین (۳/۸۳٪)، ونکومایسین (۶/۹۶٪)، تیکوپلانیل (۹۵٪)، لینزولید (۶/۹۶٪)، افلوکساسین (۳/۸۸٪)، آزیترومایسین (۳/۸۸٪)، متی سیلین (۳/۸۸٪)، دالفوپریستین / کوینوپریستین (۹۰٪) شناسایی شده است. در این مطالعه کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها به آنتی بیوتیک ونکومایسین و لینزولید (بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی) به میزان ۹۶/۶٪ گزارش شد که با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا همخوانی دارد. مرادی و همکاران در سال ۱۳۹۰ گزارش نمودند ، در مجموع ۱۰۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین میزان حساسیت، نسبت به ونکومایسین ۹۶/۲٪، کلرامفنیکل ۸۸/۵٪ و ریفاپیمیسین ۸۱/۷٪ مشاهده شد (۲۱). مقاومت به ونکومایسین و بروز ژن مقاومت Van A در دنیا به میزان پایین گزارش

3. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Höök M, Etienne J, Vandenesch F. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007;315:1130-3.
4. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the United States, 2002–2006. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:668-74.
5. Wang G, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA. Increased vancomycin MICs for Staphylococcus aureus clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3883-6.
6. Gould FK, Brindle R, Chadwick PR, Fraise AP, Hill S, Nathwani D, and et al. Guidelines (2008) for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;63:849-61.
7. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiology* 2007;2:323-34.
8. Fowler Jr VG, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by Staphylococcus aureus. *New England Journal of Medicine* 2006;355:653-65.
9. Méndez-Álvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. *International Microbiology* 2010;3:71-80.
10. Muneeri SS, Mobaiyen H, Mirzaie H. Study on Vancomycin-resistant staphylococcus aureus and identification of VanA gene in these strains isolated from Tabriz Shuhada Hospital using e-test and PCR methods. *Life Science Journal* 2013;10:748-52.
11. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007;13:615-21.
12. Watanabe S, Kobayashi N, Quinones D, Hayakawa S, Nagashima S, Uehara N, et al. Genetic diversity of the low-level vancomycin resistance gene vanC-2/vanC-3 and identification of a novel vanC subtype (vanC-4) in Enterococcus casseliflavus. *Microbial Drug Resistance* 2009;15:1-9.
13. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal* 2007;11:161-7.
14. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:5857-60.
15. Watts JL, LS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*; 2008: 5-12.
16. Shariaty L, Shojapour M, Validi M, Farrokhi E, Tabatabaiefar MA, Karimi A, et al. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2009. *Iranian South Medical Journal* 2011; 14:165-72.
17. Nojoomi F, Behzadian-nejad Q, Sattari M, Najar-Pirayeh S. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of vancomycin in induction of Staphylococcus aureus L forms and

study of their stability in blood (in vitro). *Journal Aja University Medical Science* 2005;3:615-618.

18.Launay A, Ballard SA, Johnson PD, Grayson ML, Lambert T. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50:1054-62.

19.Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57:72-9.

20.Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:4114-23.

21.Moradi N, Javadpou S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *staphylococcus aureus* to vancomycin. *Hormozgan Medical Journal* 2011; 15:169-177