مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷ صفحات ۲۳-۱۷

مطالعه حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از نمونه های بالینی دربرابروانکومایسین با استفاده از روش E-test درتبریز

شیوا احمدی شعار: کارشناس ارشد میکروب شناسی
دکترمحمدرضا نهایی: استاد میکروب شناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: nahaeim@yahoo.com
دکتر نور امیر مظفری: استادیار میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۵/۱۰/۲، **پذیرش**: ۸۶/۵/۱۷

چکیده

زمینه و اهداف: وانکومایسین در درمان عفونتهای ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بطور وسیعی استفاده می شود که این امر موجب افزایش مقاومت به وانکومایسین وگسترش سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین، استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت حدواسط به وانکومایسین و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین در قسمتهای مختلف دنیا شده ونگرانی بزرگی را در مورد نمونه های بالینی بوجود آورده است. این مطالعه جهت ارزیابی احتمال حضور این سویه ها و میزان آن در بیمارستانهای شهر تبریز انجام شد.

روش بررسی: تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری در بیمارستانهای شهر تبریز در مدت ۱۱ ماه ایزوله شد. تمامی سویه ها به کمک تستهای میکروسکوپی، کوآگولاز، کاتالاز، DNase تعیین هویت شد و سپس حساسیت سویه ها در برابر وانکومایسین به روش دیسک آگار دیفیوژن و(Minimum inhibitory concentration) MIC آنها با روش E-test تعیین شد و نتایج با هم مقایسه گردید. همچنین برای شناسایی سویه های دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین از روش آنالیز جمعیتی استفاده شد.

یافته ها: از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده، ۹۸٪ آنها به وانکومایسین حساس و دامنه MIC سویه های آزمایش شده بین ۱/۵ $\mu g/ml$ تا ۳ $\mu g/ml$ بود . فقط دو مورد ایزوله با MIC = ٤ $\mu g/ml$ بدست آمد که مطالعات بعدی با روش آنالیز جمعیتی مؤید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین در این ایزوله ها با MIC ≥ ۸ $\mu g/ml$ بود . در تست حساسیت به ۱۱ نوع آنتی بیوتیک با روش دیسک آگار دیفیوژن نیزحساسیت سویه ها به ترتیب زیر بود: وانکومایسین (۱۰۰٪)، ریفامپین (۱۰۰٪)، سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪)، کوتریموکسازول (۱۰۰٪)، سفالوتین(۷٤٪)، متی سیلین (۶۲٪)، کلرامفنیکل(٤٤٪)، کلیندامایسین (٤۳٪)، جنتامیسین (۳٦ ٪)، اریترومایسین (۳۱٪) و پنی سیلین G (۱٪).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که از وانکومایسین هنوز می توان در درمان استافیلوکوکوس اورئوس استفاده کرد ولی با توجه به اینکه در میان فقط ۱۰۰ سویه بالینی بررسی شده مواجه با دو سویه دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین (۲٪) بودیم و نیز ظهور سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت حدواسط و مقاومت کامل در برخی از کشورهای جهان، انجام تستهای حساسیت به روش و تعیین MIC قبل از شروع درمان، جهت مشخص شدن حساسیت سویه های مورد آزمایش در مقابل وانکومایسین، در ردیابی سویه های مقاوم احتمالی و کاهش بروز مقاومتهای بیمارستانی و جلوگیری از شیوع سویه های مقاوم اهمیت زیادی دارد.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت به آنتی بیوتیک، وانکومایسین، E-test

مقدمه

اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس با کاهش حساسیت به وانکومایسین (MIC= ۸ $\mu g/ml$) در سال ۱۹۹۷ ازژاپن گزارش شد (۱) که این سویه ها را استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت حدواسط به وانکومایسین[1] می نامند. در جولای سال ۲۰۰۲ یک سویه از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین[2] از آمریکا گزارش گردید (۲). اغلب سویه های VISAو VRSA در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین[3] مشاهده می گردد (۳).

1. Vancomycin-Intermediate *S.aureus*, VISA
2. Vancomycin-Resistant *S.aureus* , VRSA
3. Methicilin-Resistant *S.aureus* , MRSA

تمامی ایزوله های VRSA تا به امروز دارای ژن مقاومت به وانکومایسین (*VanA*) بوده اند که بر اساس شواهد موجود سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم، این ژنهای *VanA* را از گونه های انتروکوکوس دریافت می کنند(٤). مقاومت به وانکومایسین در استافیلوکوکوس اورئوس بدلیل تغییراتی در دیواره سلولی باکتری می باشد. البته مکانیسم کاهش حساسیت به وانکومایسین در سویه های VISA بطور کامل شناخته نشده است. سویه های VISA دیواره سلولی ضخیمی دارند که وانکومایسین به گیرنده های دیواره سلولی در قسمت بیرونی متصل و عملکرد آن مهار می شود (٥). نقش پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین[1] در مقاومت به وانکومایسین مشخص نشده ولی حضور آن جهت ایجاد مقاومت ضروریست(٦).

محدودیتهای درمانی در عفونتهای ناشی از VRSA / VISA وجود دارد و لیست بعضی از مواد ضد میکروبی مفید شامل ریفامپین، جنتامیسین، ایمی پنم، کلرامفنیکل، تری متو پریم – سولفامتوکسازول و تتراسایکلین است (٧). در حال حاضر دسته جدیدی از آنتی بیوتیکها شامل داپتومایسین، لینزولید – اگزازولیدینون جهت درمان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت چندگانه استفاده می شود (٨).

با توجه به اینکه اخیراً سویه هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که بصورت حدواسط مقاوم شده یا سویه هایی که مقاومت کامل در برابر وانکومایسین دارند، شناسایی شده اند، لذا تعیین وضعیت سویه های کشور ما از اهمیت خاصی برخوردار است. این مطالعه جهت بررسی حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از نمونه های بالینی نسبت به وانکومایسین وارزیابی حضور VRSA، VISA و hVISA در تبریز انجام شد.

مواد وروش ها

تعداد۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس در طول ۱۱ ماه از اول مهر ماه ۱۳۸۴ تا ۳۰ مرداد ۱۳۸۵ از نمونه های بالینی بیمارستانهای مهم شهر تبریز (امام خمینی، مدنی، سینا، کودکان و محلاتی) ایزوله شد. منابع و تعداد سویه های ایزوله شده استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه در نمودار ۱ نمایش داده شده است. بعد از جمع آوری سویه ها، بر روی محیط های کشت بلاد آگار و مانیتول سالت آگار کشت شده و مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید(۹و۱۰)، سپس کلنی ها ازنظر رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کوآگولاز و DNase مورد تأیید قرار گرفته و تستهای حساسیت آنتی بیوتیکی انجام شد (۱۱و۱۲). لازم به ذکر است که کلیه سویه ها از بیمارانی جدا شده بود که در آنها استافیلوکوکوس اورئوس عامل اصلی بیماری بود. حساسیت کلیه سویه های آزمایشی و سویه استاندارد(*S.aureus* ATCC 29213) در برابر وانکومایسین به روش E-test (AB . Bio disk سوئد) و دیسک آگار دیفیوژن انجام شد. روش تعیین MIC بوسیله E.test ترکیبی از روشهای دیسک دیفیوژن و تعیین MIC می باشد. در این روش آنتی بیوتیک بر اساس گرادیان غلظت روی نوار کاغذی قرار گرفته است. بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت ۰/۵ مک فارلند بر روی آن کشت داده شده، نوار E-test بر روی محیط کشت قرار گرفته و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون محل شروع هاله عدم رشد بعنوان MIC در نظر گرفته می شود(۱۳).

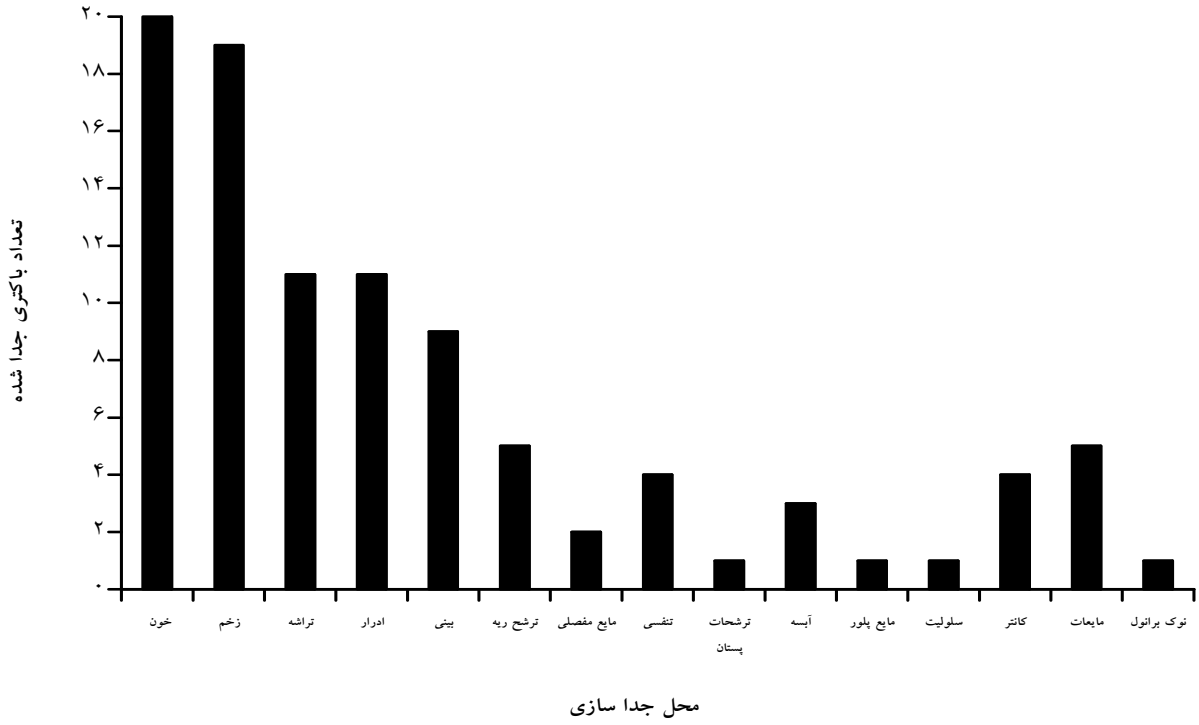
دو سویه که دارای MIC=۴ *µg/ml* بودند (hVISA) به روش آنالیز جمعیتی مورد شناسایی قرار گرفتند که در این روش ۱۰µl از سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط کشت[2] BHI agar محتوی ٤ *µg/ml* وانکومایسین کشت شده و بعد از ٤٨ ساعت انکوباسیون در ۳۷C°، تولید کلون های فرعی با MIC≥۸ *µg/ml* در محیط کشت BHIA [2] جستجو شد. باکتری های حاصل باید مقاومت ثابتی را در مقابل وانکومایسین بعد از ۹ روز در محیط فاقد آنتی بیوتیک نشان دهند(۱۴).

همچنین باکتریهای آزمایشی در برابر ۱۰ نوع آنتی بیوتیک اریترومایسین، پنی سیلین، جنتامیسین، ریفامپین، سیپروفلوکساسین، سفالوتین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، کوتریموکسازول، متی سیلین (ایران دارو) و وانکومایسین (Mast) به روش دیسک آگار دیفیوژن آنتی بیوگرام شدند و قطر هاله های عدم رشد بر اساس جدول CLSI[3] اندازه گیری شدند.

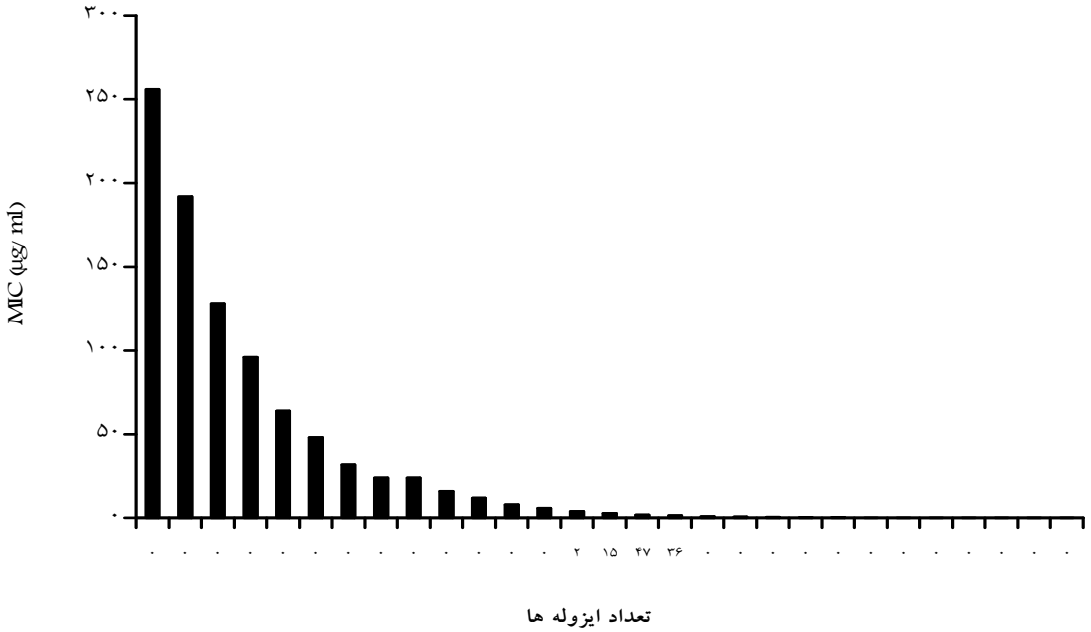
یافته ها

بر اساس رهنمود های CLSI، سویه های آزمایشی بر اساس مقادیر MIC به ۳ گروه تقسیم می شوند: سویه های حساس به وانکومایسین با MIC <۴ *µg/ml* که در این مطالعه ۹۸٪ سویه های آزمایشی را شامل می شد. سویه های با مقاومت حدواسط با ۸ *µg/ml* <MIC≤ ۱۶ *µg/ml* که در سویه های آزمایشی مورد شناسایی قرار نگرفت، فقط دو مورد از ایزوله ها با MIC =۴ *µg/ ml* بدست آمد که در مطالعات بعدی با آنالیز جمعیتی سویه ها بیشتر از *µg/ml* ۸ بعنوان hVISA به اثبات رسید. سویه های مقاوم (VRSA) با MIC ≥ ۳۲ *µg/ ml* در این مطالعه شناسایی نشد. دامنه اندازه گیری MIC با روش E-test در محدوده بین *µg/ml* ۲۵۶– ۰/۰۱۶ بود. در این مطالعه بیشترین مقدار MIC برابر با ۴ *µg/ml* بدست آمد. نمودار ۲ فراوانی مقادیر MIC در ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش را نشان می دهد. در تست حساسیت به ۱۰ نوع آنتی بیوتیک با روش دیسک آگار دیفیوژن نیز، حساسیت ایزوله ها به ترتیب زیر بود: وانکومایسین(۱۰۰٪)، ریفامپین (۱۰۰٪)، سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪)، کوتریموکسازول (۱۰۰٪)، سفالوتین(۷٤٪)، متی سیلین (٦۲٪)، کلرامفنیکل (٤٤٪)، کلیندامایسین (٤۳٪)، جنتامیسین (۳٦ ٪)، اریترومایسین (۳۱٪) و پنی سیلین G(۱٪).

1. Penicillin binding proteins, PBPs
2. Brain heart infusion agar, BHI agar
3. Clinical and Laboratory standards Institute, CLSI



نمودار ۱، منابع و تعداد ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه



نمودار ۲، MIC ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شده در برابر وانکومایسین

جدول۱: سویه های VISA و VRSA و GISA به تفکیک کشورها (۲۶-۲۲)

کشور و یا ایالت	نوع مقاومت	MIC	سال جداسازی
ژاپن	GISA	۸gm /l	۱۹۹۶
ژاپن	VISA	> ۳۲gm /l	۱۹۹۷
میشیگان آمریکا	GISA	۸gm /l	۱۹۹۷
نیوجرسی آمریکا	GISA	۸gm /l	۱۹۹۷
نیویورک آمریکا	GISA	۸gm /l	۱۹۹۷
فرانسه	GISA	۸gm /l	۱۹۹۸
عمان	GISA	۸gm /l	۱۹۹۸
بلژیک	۳ مورد GISA	۸gm /l	۱۹۹۹
کره	GISA	۸gm /l	۱۹۹۹
هنگ کنگ	GISA	۸gm /l	۱۹۹۹
ایلینویز آمریکا	VISA	۸gm /l	۱۹۹۹
مینوسوتا آمریکا	GISA	۸gm /l	۲۰۰۰
نوادا آمریکا	GISA	۸gm /l	۲۰۰۰
مریلند آمریکا	VISA	۸gm /l	۲۰۰۰
اوهایو آمریکا	VISA	۸gm /l	۲۰۰۱
پنسیلوانیا آمریکا	VISA	۶۴gμ /lm	۲۰۰۲
میشیگان آمریکا	VISA	۶۴gμ /lm	۲۰۰۲
تایلند	h-ISA	۴gm /l	۲۰۰۴
نیویورک	VISA	>۲۵۶gμ /lm	۲۰۰۴
برزیل	h-ISA	۴gm /l	۲۰۰۵

جدول۲ : شیوع سویه هایhVISA [a] در ایزوله های MRSA [b] به روش غربالگری در کشورهای آسیایی(۲۷)

کشور	تعداد ایزوله های MRSA مطالعه شده	تعداد (درصد) سویه های مثبت در وانکومایسین آگار اسکرینینگ پلیت [c]	تعداد ودرصد ایزوله های hVISA [d]
چین	۸۴	۱۲ (۱۴/۳)	۰
هند	۸۰	۱۶ (۲۰)	۵ (۶/۳)
اندونزی	۱۱۴	۱۴ (۱۲/۳)	۰
ژاپن	۲۳۱	۶۹ (۲۹/۹)	۱۹ (۸/۲)
کره جنوبی	۴۵۷	۱۹۲ (۴۲)	۲۸ (۶/۱)
فیلیپین	۲۸	۶ (۲۱/۴)	۱ (۳/۶)
عربستان سعودی	۳۴	۳ (۸/۸)	۰
سنگاپور	۸۷	۲ (۲/۳)	۲ (۲/۳)
سریلانکا	۵۵	۴ (۷/۳)	۰
تایوان	۵۰	۷ (۱۴)	۰
تایلند	۹۶	۱۷ (۱۷/۷)	۲(۲/۱)
ویتنام	۴۱	۵ (۱۲/۲)	۱(۲/۴)
جمع	**۱۳۵۷**	**۳۴۷ (۲۵/۶)**	**۵۸ (۴/۳)**

(a) سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین
(b) سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین
(c)سویه ها ی تست شده در BHIA حاوی ۴ mg/l وانکومایسین
(d) تشخیص بوسیله آنالیز جمعیت

بحث

بعد از گزارش اولین مورد VRSA در ژاپن در سال ۱۹۹۷، گرچه انتشار سویه های VRSAو VISAدر سطح پایینی باقیمانده است، اما در بسیاری از کشورها سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بصورت hVISA در حال افزایش است (۱۵). گزارشهایی وجود دارد که نشان می دهند عدم موفقیت در درمان با وانکومایسین باعث بوجود آمدن سویه های hVISA است (۱۶ و ۱۷). البته تستهای مورد استفاده جهت بررسی حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به وانکومایسین شامل روشهای تعیین MIC غیراتوماتیک (reference broth microdilution, agar gradiant diffusion E-test)با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند

و انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت بوده (۱۸) و روش دیسک آگار دیفیوژن یک تست غیر قابل قبول در شناسایی مقاومت به وانکومایسین می باشد، بنابراین آزمایشگاههایی که از روش اتوماتیک یا دیسک دیفیوژن استفاده می کنند باید یک تست وانکومایسین آگار پلیت غربالی (جهت افزایش توان شناسایی VRSA/VISA) به آزمایشهای خود اضافه نمایند (۱۹). تستهای مورد تأیید CDC جهت شناسایی ایزوله های VRSA/VISA در شامل رفرانس براث ماکرودایلوشن، تست غربالگری در محیط کشت BHI محتوی $\mu g/ml$ ٦ وانکومایسین و E-test میباشد(۲۰) و برای شناسایی سویه های hVISA از روش Population analysis استفاده می شود.

تا سال ۲۰۰۱ فقط ۸ مورد عفونت با GISA (Glycopeptide - intermediate *S.aureus*) در جهان گزارش شده بود. مهمترین آنها بیمارانی بودند که قبلاً مبتلا به عفونت MRSA مربوط به کاتتر و همودیالیز مزمن بوده و به مدت طولانی تحت درمان با وانکومایسین قرار داشتند (۲۱). نتایج موارد گزارش شده در جهان تا سال ۲۰۰۵ در جدول۱ آورده شده است (۲۶-۲۲).

بر اساس مطالعات انجام شده در ۱۲ کشور آسیایی در سال ۲۰۰۴، ایزوله های hVISA جمع آوری شدند که میزان آنها در هر کشوری مختلف بوده، همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود از ۱۳۵۷ ایزوله بالینی جمع آوری شده MRSA که تست BHIVA(Brain Heart Infusion Vancomycin agar) در مورد آنها انجام گرفت، حدود۳۴۷ ایزوله MRSA (۲۵/۶٪) در این پلیتها رشد کردند که سویه های مثبت جمع آوری شده از کشورهای کره جنوبی (۴۲٪) و ژاپن (۲۹/۹٪) بیشتر از محل های دیگر بود. در حالیکه در مورد سویه های جمع آوری شده از سنگاپور، سریلانکا و عربستان سعودی کمتر از ۱۰ ٪ بود. از ۳۴۷ سویه مثبت، ۵۸ سویه (۴/۳ ٪ از کل سویه های MRSA) بعنوان hVISA تأیید شدند که درصد آن در کشورهای مختلف به شرح زیر است:

ژاپن (۸/۲ ٪)، هند (۶/۳ ٪)، کره جنوبی (۶/۱ ٪)، تایلند (۲/۱ ٪)، فیلیپین (۳/۶ ٪)، ویتنام (۲/۴ ٪) و سنگاپور (۲/۳ ٪). اما هیچ سویه ای در چین، اندونزی، عربستان سعودی، سریلانکا و تایوان یافت نشد (۲۶). بر اساس این گزارشها ، سرعت شیوع hVISA از صفر درصد تا ۷۳/۷ ٪ متغیر بوده است (۱۰و۲۱). در میان ایزوله های MRSA در کره جنوبی، hVISA با فراوانی پایینی (صفر تا ۰/۵ ٪) یافت شده است (۲۸). با این وجود، داده ها نشان می دهند که ۶/۱ ٪ از ایزوله های MRSA بصورت hVISA بودند. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق مشخص می شود که در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از بیمارستانهای شهر تبریز مقاومت کامل در برابر وانکومایسین وجود ندارد وفقط دو مورد hVISA شناسایی شد که یکی از آنهامربوط به تراشه در بخش ICU و دیگری مربوط به زخم در بخش توراکس بود، اما با توجه به افزایش ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به وانکومایسین در جهان، باید استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از بیماران بویژه بیماران بستری و نیز کادر درمانی بصورت دقیق از لحاظ مقاوم و حساس بودن به وانکومایسین کنترل شوند. روشهای دقیق تعیین مقاومت به وانکومایسین مثل E-test باید در آزمایشگاههای بالینی امکانپذیر ورایج گردد و کادر آزمایشگاهها باید آموزشهای لازم را در این مورد طی کرده و با اهمیت موضوع آشنا شوند.

لازم است پزشکان و متخصصین عفونی اهمیت شناسایی VSSA , hVISA , VISA و VRSA را در عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته و سعی کنند بیماران را از این نظر مورد بررسی قرار دهند و با انجام تست حساسیت دقیق بر روی باکتریهای جدا شده از بیماران، اقدام به درمانهای مؤثر نمایند. همچنین لازم است با استفاده از روشهای جدید ضدعفونی محیط بویژه در بیمارستانها، انتقال موارد VISA و VRSAرا در بین کادر درمانی و بیماران بستری به حداقل رسانید.

نتیجه گیری

گرچه در این مطالعه سویه های VISAوVRSA در تبریز مورد شناسایی قرار نگرفت و این امر یک یافته امیدوارکننده در درمان عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بالینی در جامعه ما می باشد، ولی با توجه به اینکه در این تحقیق فقط تعداد محدودی از سویه های جدا شده از نمونه های بالینی مورد مطالعه قرار گرفته و در میان این تعداد محدود مواجه با دو ایزوله‌ی hVISA بودیم (۲٪) و با عنایت به گزارش های موجود از سایر کشورها و بویژه از کشورهای آسیایی در جهت شناسایی سویه-های VISA و VRSA و انجام مطالعات بیشتر بویژه با تعداد ایزوله‌های بیشتر توصیه می گردد.

تقدیر و تشکر

از کمکهای تکنیکی خانم طاهره پیرزاده کارشناس ارشد میکروب شناسی و دانشجوی PhD باکتریولوژی پزشکی در روند آزمایشها تشکر می شود.

References

1. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; **11:** 813 – 849.
2. Centers for Disease Control and Prevention . Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*_ Pensilvania 2002. *MMWR* Morb Mortal Wkly Rep 2002; **51**: 902.
3. Walsh TR, Howe RA .The prevalence and mechanism of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* . *Annu Rev Microbiol* . 2002; **56**: 657-75.
4. Noble WC, Virani Z, and Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol*. Lett. 1992.**72**: 195-198.
5. Sieradzki K, and Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1997; **179**: 2557-2566.
6. Schetag JJ, Hyatt JM, Carr JUR, Paladino JA, Birmingham MC, Zimmer GS and et al: Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* , how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Entrococcus faecium*. And the importance of antibiotic management and infection control. *Clin Infect Dis*, 1998; **26**: 1204 - 14.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated susceptibility to vancomycin. *MMWR* 1997; **46**(27): 626 - 635 .
8. Fowler VG. Current and future antibiotics for treatment of resistant gram-positive infections. *Clin updates Infect Dis*, 2004; **7**(1), 1-6 .
9. Timothy F. *Staphylococcus aureus*. 2005 [On Line]. Available from http://gsbs.utmb.edu/ microbook/cho012.htm.
10. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical Micribiology, 23 rd ed. McGraw-hill, New York, 2004. 223 - 229.
11. Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP . Staphylococcus: Cluster – Forming Gram-Positive Cocci. In: Collee JG: *Practical Medical Microbiology*, 13 th ed. Churchill Livingstone, New York, 1989; 303 - 316.
12. Bannerman Tammy. *Staphylococcus, Micrococcus*, and Other catalase-positive Cocci that grow aerobically. In: Murray PA, Baron EJ, Jorgeson JH, Pfaller MA, Yolken RH: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, 2003; 384 - 402 .
13. Brown, DFJ: Evaluation of the E. test, a novel metod of quantifying antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,1991; **27**:185-190.
14. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al . Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol*, 2001; **39**: 2439-44.
15. Ariza J, Pujol M, Cabo J. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet*; 1999; **353**: 1587-8.
16. Moore MR, Perdreau- Remington F, and Chambers H. F. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. Antimicrob. Agent Chemother. 2003; **47**: 1262 - 1266.
17. Bert F, Clarissou J, Durannd F, Delefosse D, Chauvet C, Lefebvre P, et al. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipient. *J. Clin. Micribiol*. 2003; **41**: 5147 - 5152.
18. CDC. Labrotary capacity to detect antimicrobial resistance,1998. *MMWR* 2000; **48**(51):1167-71.
19. Schmitz F, Krey A, Geisel R, Verhoef H, Heinz A, Flui C, and the sentery Participants Group. Susceptibility of 302 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds. *Eur.J.Clin .Microbial .Infect*. 1999; **18**:528-530.
20. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR. Emergence of vancomycin resistance *Staphylococcus aureus. N Engl J Med*. 1999; **340**: 493 - 501.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, Wayne, PA: *National Committee for Laboratory Standards*. 2003, **6**: M7-A6.
22. Centers for Disease Control and Prevention . *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin_ United States 1997. *MMWR* 1997; **46**:765-6.
23. Centers for Disease Control and Prevention . *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin_ United States 1997. *MMWR* 1997; **46**: 813-5.
24. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility

to vancomycin-Japan 1997. *MMWR* 1997; **46**: 624-6.
25. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin _Illinois, 1999. *MMWR* 2000; **48**: 1165-7.
26. Palazzo V, Araujo M, and Darini A**.** First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from Healthy Carriers in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, January 2005; **43**: 179-185.
27. Diekema DJ, Pfaller MA,Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell G, Gones RN et al. Survey of infections due to Staphylococcus spesies: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*; 2001; 32 Suppl **2**: S114-32.
28. Walsh TRA. Bolmstrom A. Qwarnstrom PHoM. WoottonRA Howe detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol*. 2002; **39**: 2439-24444.