مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۵ صفحات ۵۷- ۵۳

ساب تایپینگ استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی به روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس

شبنم رضوی: کارشناس ارشد گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکترعبدالعزیز رستگار لاری: استاد گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران: نویسنده رابط
E-mail: lari@iums.ac.ir
دکتر فریده قاضی: استادیار گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۴/۶/۱۰، پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۸

چکیده

زمینه و اهداف: در خلال دهه گذشته استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی(Coagulase Negative Staphylococci, CNS) یکی از مهمترین عوامل عفونتهای بیمارستانی، باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت زخم، عفونت ادراری و سایر عفونتها بشمار آمده و همچنین در سالهای اخیر، بروز اپیدمی استافیلوکوکی از چندین بیمارستان در دنیا گزارش گردیده است. در همین راستا.به علت نبود اطلاعات کافی مربوط به این موضوع در ایران، این مطالعه برای ارزیابی بروز اپیدمی توسط CNS دربیمارستانها توسط پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE) طراحی گردید .

روش بررسی: از بیمارانی که حداقل ۴۸ ساعت در بیمارستان حضرت رسول اکرم در تهران بستری بودند، ۲۱۱ نمونه کلینیکی استافیلوکوک جمع آوری گردید که بعد از تعیین هویت سویه‌های CNS، آزمایشهای تعیین حساسیت به روش انتشار دیسک در آگار (کربی بایر) بر اساس استانداردهای NCCLS انجام گرفت، سپس برای تمام آنها روش مولکولی پالس فیلد ژل الکتروفورزیس اجرا شد و الگوی PFGE کروموزومی سویه های CNS به کمک آنزیم محدودالاثر SmaI تعیین و درصد قرابت ژنتیکی مشخص شد.

یافته ها: از ۲۱۱ نمونه کلینیکی، ۶۳ نمونه بعنوان استافیلوکوک کوآگولاز منفی شناسایی گردید که حدود ۴۹/۸٪ موارد بعنوان استافیلوکوک همولیتیکوس، ۲۵/۷٪ استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۳/۶٪ استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و بقیه موارد سایر سویه های استافیلوکوک کوآگولاز منفی بودند. آزمایشهای تعیین حساسیت سویه‌های CNS به روش انتشار دیسک در آگار (کربی بایر) بر اساس استانداردهای NCCLS انجام گرفت با توجه به نتایج، درصد مقاومت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین ، اریترومایسین، افلوکساسین، سفالوتین، کلوگزاسیلین، جنتامایسین، SXT، تتراسایکلین و عبارت بود از: ۹۱٪، ۸۷/۵٪، ۲۲/۳٪، ۲۲/۲٪، ۱۷/۵٪، ۱۷/۵٪، ۱۶/۷٪، ۱۲٪.نسبت به وانکومایسین هیچ مقاومتی دیده نشد. در میان سویه های استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۲ سویه اپیدمیک مشاهده گردید.

بحث و نتیجه گیری: با استفاده از روش PFGE تنوع چشمگیری در میان سویه های استافیلوکوک همولیتیکوس مشاهده گردید و هیچ سویه اپیدمیکی در میان آنها دیده نشد.بنظر میرسد که استقرار استافیلوکوک همولیتیکوس نقش پیشگیری از بروز اپیدمی توسط استافیلوکوک اپیدرمیدیس بعهده دارد.اگرچه استافیلوکوک همولیتیکوس خود میتواند به سویه اپیدمیک تبدیل گردد.

کلید واژه ها: پالس فیلد ژل الکتروفورزیس ، استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی، ساب تایپینگ

مقدمه

در خلال دهه گذشته استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی(CNS) بعنوان عامل عفونتهای بیمارستانی شدیدی مطرح شد(۱،۲). بسیاری از اوقاتCNS ، بعنوان سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از متداولترین عوامل عفونت خون مطرح گردیده است(٤و۳). همچنین از باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت زخم و عفونت مجاری ادراری به دفعات جدا شده است(۹-۵) و عامل سایر عفونتهای مهم نظیر پنومونی و عفونت پوست و بافت نرم نیز بوده است(۱۰).

CNS قسمتی از میکروفلور طبیعی پوست است که قادر به استقرار در مخاط بینی و مجاری تنفسی و همچنین استقرار در تجهیزات پزشکی می باشد (۱۳-۱۱). چسبیدن میکروارگانیسم به سطح کاترها و سایر تجهیزات مصرفی در بیماران ، نظیر دریچه های قلب و ایمپلنتهای ارتوپدیک و توانایی بقای آن بر روی مواد بیولوژیک بعنوان اولین قدم در عفونتهای جریان خون که در اثر کاترها بوجود می آید، مطرح می گردند(۱٤،۱۵).

محققین تاکنون عقیده داشته اند که بیشتر عفونتهای حاصل از CNS عامل اندوژن دارد(۱٤) اما با توجه به مطالعات اخیر بنظر می رسد که بیشتر این عفونتها به دلیل سویه هایی است که در خلال بستری شدن بیمار در بیمارستان به او منتقل شده و این عفونتها منشاء بیمارستانی دارند (۱٦).

با توجه به گزارشهای متعدد بنظر می رسد که عفونتهای بیمارستانی در اثر بعضی سویه ها نظیر استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، استافیلوکوک همولیتیکوس و گاهی

استافیلوکوک لوگدونسیس و استافیلوکوک شلایفری در حال افزایش می باشند(۲۰-۱۷).
با توجه به مطالعات اخیر بنظر می رسد که بین افزایش سویه های CNS به عنوان عامل باکتریمیای بیمارستانی و مقاومت این پاتوژنها به داروهای ضد میکروبی ارتباطی وجود دارد. همچنین سویه های CNS چند مقاومتی عموما در پوست بیماران بستری در بیمارستان و پرسنل بیمارستانی کلونیزه می شوند(۲۱،۲۲). استقرار وسیع این میکروارگانیسمها در پوست می تواند بعنوان منبع مهمی برای سویه های چند مقاومتی گردد که خصوصا می تواند سبب عفونتهای مرتبط با تجهیزات پزشکی داخل وریدی گردند.بعلاوه سویه های کلونیزه شده منبعی برای ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک هستند که می توانند در بین سویه های CNS انتقال یابند که احتمالا منشا این ژن ها استافیلوکوک اورئوس می باشد(۲۵-۲۳). مطالعاتی که در نقاط مختلف اروپا که از نقطه نظر جغرافیایی پراکندگی وسیعی دارند انجام شده، نشان می دهند که مقاومت سویه های CNS به اگزاسیلین بین ۷۰-۸۰ ٪متغیر است و در ضمن گزارشهای مقاومت مشابهی از ایالات متحده امریکا، امریکای لاتین و کانادا در دست می باشد(۲۸-۲۶).

هم اکنون با فاصله ی کمی از ظهور (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) بنظر می رسد که مقاومت به متی سیلین در CNS نیز به معضلی تبدیل شده است(۲۹). روشهای دسته بندی سویه های میکروبی بر اساس تایپینگهایی که بر پایه DNA صورت می گیرند، ابزار قدرتمندی هستند که به دانش بشری در مورد اپیدمیها ، عفونتهای جدید و انتشار کلونهای باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک کمک می کنند(۳۰). ساب تایپینگ میکروارگانیسم های جدا شده از بیماران در سطح سویه ، برای تشخیص اینکه آیا این سویه ها در اپیدمی های عفونت بیمارستانی مشارکت دارند یابرای تعیین منشاء مشترک این سویه ها بسیار مهم و مناسب می باشد. تاکنون روشهای متعدد تایپینگ مولکولی برای تشخیص سویه‌های باکتریایی استفاده شده است که هر کدام ارزش و اهمیت خود را دارند(۳۱).در این میان به PFGE بعنوان قابل قبولترین روش مولکولی برای تعیین هویت کلونهای باکتریایی خصوصا در موارد مقایسه‌ای سویه ها اشاره شده است(۳۲). PFGE روش انگشت نگاری DNA مفیدی است که برای تجزیه و تحلیل گسترده و مقایسه تشابهات اپیدمیولوژی بین باکتریهای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان استفاده می شود(۳۳). امروزه یک پیشرفت مهم که بکمک PFGE در دسترس است، توانایی مطالعه قطعات بزرگ DNA که حتی طولی معادل ۱/ ۰۰/۰۰bp دارند امکان پذیر شده است. چنین قابلیتی در روشهای متداول الکتروفورز وجود ندارد. بنابر این تمام کروموزوم باکتری موضوع این بررسی است و PFGE در حد بالایی تمایز واضحی بین سویه هایی که از نظر ژنتیکی بهم مربوط اند را بوجود می آورد(۳۴). در سالهای اخیر، اپیدمی حاصل از استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی از بسیاری از بیمارستانهای سراسر جهان گزارش گردیده است. از آنجایی که این امر در ایران بررسی نشده بود، این مطالعه برای ارزیابی اپیدمی CNS در بیمارستانهای ایران با تکنیک PFGE طراحی شد که اولین مطالعه مولکولی اپیدمیولوژی CNS به روش PFGE در ایران میباشد.

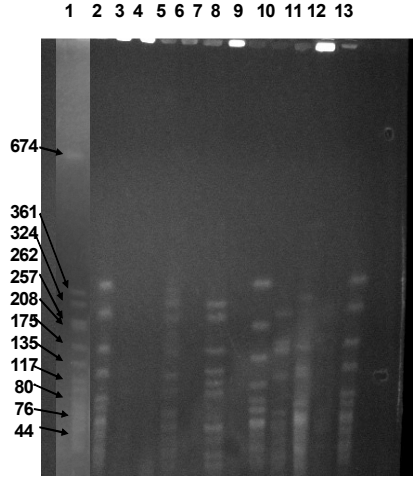
مواد و روش ها

در فاصله زمانی یک سال از اردیبهشت ۱۳۸۱تا اردیبهشت ۱۳۸۲ تعداد ۲۱۱ نمونه کلینیکی استافیلوکوک از منابع و نمونه های مختلف بیمارانی که حداقل ٤٨ ساعت در بخشهای مختلف بیمارستان حضرت رسول(ص) تهران بستری بودند، جمع آوری و پس از انتقال نمونه ها به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، کشت داده شد و توسط آزمایشهایی نظیر مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرام، تست کاتالاز، تست DNase و تست کوآگولاز تشخیص داده شد. گونه های CNS توسط آزمایشهای اوره آز، تست VP تست حساسیت به نوبیوسین و باسیتراسین و تست های تخمیر قندها تعیین هویت گردید. یک کلنی از هر سویه خالص CNS جدا شده در محیط کشت حاوی گلیسیرین در دمای ۷۰C°- برای مطالعات بعدی ذخیره گردید. حساسیت سویه های جدا شده از بیماران و سویه های استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC ۵۱۱۵۳ و ATCC ۹۱۲۳ با بهره گیری از راهنمای NCCLS (٣٤) به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. آنتی بیوتیکهای مصرفی عبارت بودند از: کلوگزاسیلین ۱µg، وانکومایسین ۳۰µg، آمپی‌سیلین ۲۵ µg، افلوکساسین ۵ µg، تتراسایکلین ۳۰µg، اریترومایسین ۱۵ µg، تریمتوپریم سولفومتاکسازول، جنتامایسین ۱۰ µg، سفالوتین ۳۰ µg. سپس زیر گونه ی ٦٣ سویه CNS جدا شده توسط PFGE تعیین گردیدند.ابتدا باکتری با رشد ٢٤ ساعته را با محلول بافر TEN (تریس کلراید ۰/۱ مولار، NaCl ۰/۰۱۵ مولار و EDTA ۰/۱ مولار) و سپس با بافر EC (تریس کلراید ۹ میلی مولار، NaCl ۱ مولار، EDTA۰/۱ مولار، ۵۸ Brige ۰/۵٪ دزاکسی کولات ۰/۲٪ و سارکوزیل ۰/۵٪) شستشو داده و در نهایت۲ µl آنزیم لیزوستافین(Sigma) بر روی نمونه ریخته شده و سپس در ۳۰۰ µl از آگارز LMP ۲٪ (Fermentas) قالب گرفته شد. قالبهای آگارز حاوی DNA تحت تاثیر آنزیم محدودالاثر SmaI قرار گرفته و سپس این قالبها در چاهکهایی از ژل آگارز ۱٪ ثابت گردید و در بافر TBE (۵۰ mM تریس بیس، ۵۰mM اسید بوریک و EDTA mM۱، PH=۸) الکتروفورز گردید. قطعات شکسته شده DNA با استفاده از دستگاه Gene Navigator (فارماسیا، آپسالا، سوئد) از یکدیگر جدا شدند. الگوی این قطعات توسط رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید قابل رویت گردید. ضریب شباهت باندها با روش دسته بندی الگوریتمیک، با استفاده از گروههای دوتایی غیر هم وزن و الگوریتم میانگین حسابی تشابه

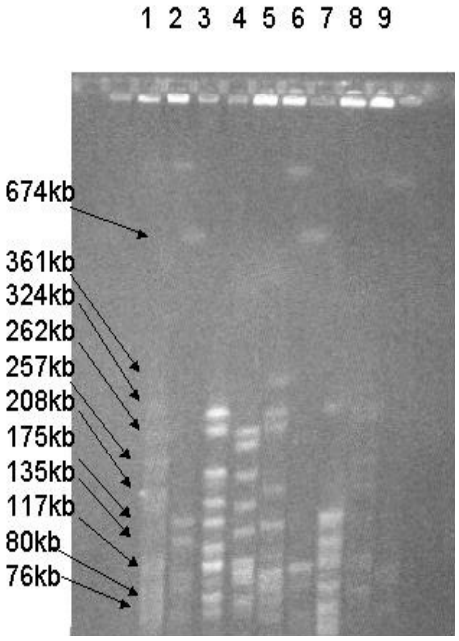
باندها در هر دو سویه (۲ x تعداد باندهای مشابه / کل تعداد باندها در هر دو سویه) تعیین گردید. سویه استافیلوکوک اورئوس ۸۳۲۵ NCTC بعنوان کنترل استاندارد شرایط الکتروفورز، همزمان بهمراه سایر نمونه‌ها در هر ژل وجود داشت. با توجه به پیشنهادات Tenover و همکارانش(۳۵) سویه هایی که حداکثر سه باند با یکدیگر اختلاف دارند از نظر ژنتیکی بسیار شبیهند، سویه هایی که ٤ یا ٦ باند تفاوت دارند ممکن است با هم از نظر قرابت ژنتیکی مرتبط باشند و سویه هایی در یک دسته قرار می گیرند که ضریب شباهت آنها ۸۰٪ باشد.

یافته ها

٦۸٪ از بیماران مورد مطالعه مرد و ۳۲٪ زن بودند. ۸٪ کودک و ۹۲٪ بالغ بودند. از ۲۱۱ سویه جدا شده، ٦۳ سویه بعنوان CNS تعیین گردید. از میان نمونه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی (CNS)، ۴۹/۸٪ استافیلوکوک همولیتیکوس، ۲۵/۷٪ استافیلوکوک اپیدرمیدیس، ۳/٦٪ استافیلوکوک ساپروفیتیکووس و ۲۰/۷٪ سایر سویه های استاف کوآگلاز منفی بودند. نتایج مقاومت ٦۳ سویه استافیلوکوک کوآگولاز منفی به آنتی‌بیوتیکها عبارت بود از: ۹۱٪ به آمپی‌سیلین، ۸۲/۵٪ به اریترومایسین، ۲۲/۳٪ به افلوکساسین، ۲۲/۲٪ به سفالوتین، ۱۷/۵٪ به کلوگزاسیلین، ۱۷/۵٪ به جنتامایسین، ۱٦/۷٪ به SXT ، ۱۲٪ به تتراسایکلین مقاوم بودند و مقاومت به وانکومایسین در هیچکدام از سویه ها مشاهده نشد. نتایج PFGE تفاوت قابل توجهی را در میان سویه های استافیلوکوک همولتیکوس نشان می داد چنانکه هیچ سویه اپیدمیکی در این باکتری مشاهده نگردید. دو سویه اپیدمیک در میان سویه های استافیلوکوک اپیدرمیدیس مشاهده شد که بصورت Aو B نامگذاری شد. تعدادی از الگوهای حاصل از تاثیر آنزیم SmaI در شکل ۱ نشان داده شده و نتایج در شکلهای ۳و۲ خلاصه گردیده است که دندروگرام الگوی PFGE میباشند

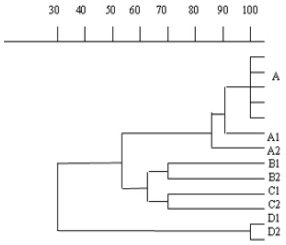


الف: ردیف ۱:سویه استافیلوکوک اورئوس شماره۸۳۲۵NCTC، ردیف ۲ و۵و۷و۹و۱۰و۱۱و۱۳ استافیلوکوک همولیتیکوس

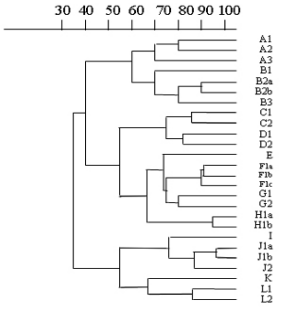


ب: ردیف ۲:سویه استافیلوکوک اورئوس شماره ۸۳۲۵ NCTC، ردیف ۳و۷: استافیلوکوک اپیدرمیدیس، ردیف ۴و۵و۶و۷: استافیلوکوک همولیتیکوس

شکل ۱: الگوی برش کروموزومی استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی به روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس



شکل ۲: دندروگرام سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس



شکل ۳: دندروگرام سویه های استافیلوکوکوس همولیتیکوس

بحث

امروزه اهمیت سویه های CNS بدلیل عفونتهای بیمارستانی، خصوصا در موارد استفاده از تجهیزات بیمارستانی در بیمارانی که دچار نقص ایمنی یا بیماریهای وخیم هستند، افزایش یافته است(۳٦)در خلال دهه اخیر استافیلوکوک اپیدرمیدیس را بعنوان شایعترین گونهی CNS در موارد عفونت بیمارستانی خصوصا" در باکتریمی ناشی از استفاده ی کاتترهای داخل رگی و سایر تجهیزات ایمپلنت شناختهاند (۳۱و ٤۰-۳۷). البته گزارشاتی هم مبنی بر دخالت سایر اعضای گروه CNS منجمله استافیلوکوک همولیتیکوس در ایجاد عفونتهایی نظیر اندوکاردیت مشاهده میشود(٤۱). از مشکلات عمده مربوط به CNS می توان به بروز مقاومتهای چندگانه اشاره کرد.با استفاده از روش PFGE توانستیم تنوع قابل توجهی در میان سویه های CNS به دست آوریم. در میان سویه های استافیلوکوک اپیدرمیدیس به ٤ دسته الگوی ژنوتیپیک دست یافتیم ، که هر کدام از این دستهها دارای دو زیر گروه میباشد. با توجه به شباهتهای الگوی کروموزومی این سویه ها بنظر میرسد که سویه های استافیلوکوک اپیدرمیدیس از سویه های اپیدمیک و مقیم در این بیمارستان باشند که می توانند توسط کادر درمانی یا بیماران به سایر افراد منتقل گردند. تعداد الگوهای کروموزومی در مورد سویههای استافیلوکوک همولیتیکوس دارای تنوع چشمگیری است. به طوری که در میان سویه های جدا شده ۱۲ دسته شناسایی شد. با توجه به نتایج بدست آمده بنظر میرسد آنچه که از بروز اپیدمی گسترده توسط سویههای استافیلوکوک اپیدرمیدیس در بیمارستان ممانعت بعمل آورده است، توانایی بالای استافیلوکوک همولیتیکوس در استقرار در بیماران بیمارستانی میباشد. به این ترتیب احتمالا استافیلوکوک همولیتیکوس از بروز اپیدمی گسترده توسط سویههای استافیلوکوک اپیدرمیدیس جلوگیری میکند. اما بنظر میرسد اگر همولیتیکوس خود به سویه اپیدمیک تبدیل گردد میتواند منجر به مشکلاتی همپایهٔ استافیلوکوک اورئوس در عفونتهای بیمارستانی مبدل گردد.

نتیجه گیری

بنظر می رسد که انتشار مقاومت در میان CNSهایی که میتوانند عامل عفونت های بیمارستانی باشند بر مشکلات درمانی بیماران بستری در بیمارستان میافزاید .بنابر این لزوم اتخاذ استراتژی درمان صحیح برای موارد عفونت و کنترل انتشار احساس می شود.

References

1. Kloos WE, Bannermann T L. Update on clinical significance of CNS. *Clin microbial Rev* 1994; **7**: 117-140.
2. Pfaller M A, Herwaldt L A. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of CNS. *Clin microbial Rev* 1998; **1**:281-299.
3. Pittet D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial blood steam infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1994; **271**: 1598-1601.
4. Spencer RC. Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *Eur j ClinInfect Dis* 1996; **15**: 281-285.
5. Lallem S, Thouverez MK. Bacteraemia caused by coagulase negative staphylococci exhibiting decreased susceptibility to teicoplanin. *J Hosp Infect* 2002; **1**(3): 207-14.
6. Orrett FA. Nosocomial infections in a private hospital. West India Med J 2002; **51**(1): 21-4.
7. Hoen B. Special issue in the management of infectiv endocarditis caused by gram positive cocci. *Infect Dis Clin North Am* 2002; **16**(2): 437-52.
8. Lu CH, Huang CR, Chang WN. Community – acquired in adults: The epidemiology timing of appropriate antimicrobial factor. *Clin Neurol Neurosurg* 2002; **104**(4): 352-8.
9. Soriano F. Microbial etiologies of acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* 1997; **3**: 523-25.
10. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J. Frequency of isolation of pathogens from blood stream, nosocomial pneumonia, skin, & soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; **20**(3): 188-191.
11. Agvald – ohman C, Wernerman J, Nord C E, Edlund C. Anaerobic bacteria commonly colonize the lower airways of intubated ICU patients. *Clin. Microbiol Infect* 2003; **9**: 397-405.
12. Ronveaux O, Jans B, Suetens C,carsauw H. Epidemiology of nosocomial blood stream infections in Belgium, 1992-1996. *Eur-J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**: 695-700.
13. Frebourg NB, Caulize B, Lemeland JF. Evidence for nasal carriage of methicillin – resistant staphylococci colonizing intravascular dvices. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1182-1185.
14. Agvald-Ohman C, Lund B, Edlund C. Multiresistant coagulase – negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplingary intensive care unit. *Crit Care* 2004; **8**(1): R42-R47.
15. Konig C, Schwank S, Blaser J. Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *S.sepidermidis Eur J Clin Microbial Infect Dis* 2001; **20**(1): 20-26.
16. Mckenny D, Hubner J, Muller E, Wang Y, Goldmann D. A, Pier G. B. The ica locous of Staphylococcus epidermidis encodes production of the capsular polysaccharide/ adhesion. *Infect Immun* 1998; **66**: 4711-4720.
17. Hernandez J. L, Calvo J, Sota R, Aguero S, Garcia- Palomo J. D, Farinas M. C. Clinical and

microbiologyical characteristids of 28 patients with *S.schleiferi infection Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; **20** (3): 153-158.
18. Herchline TE, Ayers LW. Occurrence of S. Lugdunensis in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 419-421.
19. Vandenesh F, Etienne J, Reveerdy M E, Eykyn J. Endocarditis due to S.lugdunensis: report of 11 cases & review. *Clin Infect Dis* 1993; **17**: 871-876.
20. Freneu J, Brun Y, Bes M, Mengnier H, Grimont f, Grimont PAD, et al. S.lugdunensis sp. nov. And S.schleiferi sp. Nov, two species from human clinical speciments. *International J of systematic bacteriology* 1988; **38**: 168-172.
21. Archer GL, Climo MW. Antimicrobial susceptibility of CNS. Antimicrobial. *Agents. Chemother* 1994; **38**: 2231-2237.
22. Archer GL.Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophilaxis. *Rev Infect Dis* 1991; **13**(10): 5805-5809.
23. Archer GL Johnstone JL. Self-transmissible plamsid in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. Antimicrob. *Agents Chemother*. 1983; **24**: 70-77.
24. Forbes BA, Schaberg DR. Transfer of resistance plasmids from Staphylococcus aureus: evidences for conjugative exchange of resistance. *J bacterial*. 1983; **153**: 627-643.
25. McDonnel RN, Sweeney HM, Cohen S. Conjugative transfer of gentamicin resistance plasmids intra-& inter-specifically in Staphylococcus aureus & Staphylococcus epidermidis. *Antimicrob Agents Chemother*.1983. **23**: 151-160.
26. Hanberger H, Diekema D, Fluit A, Jones R, Struelents M, Spencer R, et al. Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. *J Hosp Infect* 2001; **48**: 161-176.
27. Vincent J-L. Microial resistance: lessons from the EPIC study. *Intensive Care Med* 2000; **26**: S3-S8.
28. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN et al. Survey of infections due to susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe & the Western pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect* 2001; Dis. **32**:S114-S132.
29. Schaberg DR, Culver DH, Gaines RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; **91**: 725-735.
30. Sedar HS, Pfaller MA & Hollis RJ, The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious disease. *Clin Lab Med*.1995; **15**, 407-431.
31. Mattosa EM, Teixeirab LA, Alvesa VMM. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of Staphylococcus epidermidis. Diagnos Microbiol and Infect 2003; **45**: 13–22
32. Calderwood SB, Baker MA, Carroll PA, Michel JL, Arbeit RD, Ausubel FM. Use of cleaved amplified polymorphic sequences to distinguish strains of Staphylococcus epidermidis. *J Clin Microbiol* 1996; **34**, 2860–2865.
33. Woodford N. Johonson AP. *Methods in molecular medicine*. Vol 15: Molecular Bacteriology: protocols & clinical application. 1998.
34. National Committee for clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically- Second Edition: Approved standard M7-A2. NCCLS, Villanova, PA, USA, 1990.
35. Ten over FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophpresis: criteria for bacterial strain typing. *J clin microbial*. **33**: 2233-2239.
36. Tefani S, Varaldo E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europ. *Clin Micobiol & Infect* 2003; **9**(12): 1179.
37. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of Phenotypic and Genotypic Methods to Determine the Clinical Relevance of Serial Blood Isolates of Staphylococcus epidermidis in Patients with Septicemia. J. Clin. Microbiol. 2000; **38**(7): 2488-2493.
38. Mickelsen PA, Plorde JJ, Gordon KP. Instability of antibiotic resistance in a strain of Staphylococcus epidermidis isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J Infect Dis* 1985, **152**; 50–58.
39. Tuazon CU, Miller H. Clinical and microbiological aspects of serious infections caused by Staphylococcus epidermidis. *Scand J Infect Dis*, 1983. **15**; 347–360.
40. Raad II, Bodey GP. Infectious complications of indewelling vascular catheters. *Clin Infect Dis* 1992, **15**, 197–210.
41. Senining RC, Ahmad H, Shahzad R, Stahl-avicolli A, Lamoste TJ, Soto NE, et al. Late prosthetic valve endocarditis caused by Staphylococcus hemolyticus. *Clin Infect Dis* 2001; **32**(6): E100-1.