فراوانی ژنهای رمزکننده عوامل حدت وابسته به پروفاژها در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در تهران در سالهای ۱۴۰۰-۱۴۰۱

فاتح رحیمی[1]*، ساناز خاشعی[2]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *زخم پا به عنوان یک عارضه شایع در افراد دیابتی محسوب می شود و عفونت این زخمها باعث افزایش میزان عوارض و مرگ و میر بیماران می شود. علیرغم اینکه میکروارگانیسمهای مختلفی در ایجاد عفونت زخم پای دیابتی نقش دارند، اما استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیماریزای مهم بیمارستانی و مرتبط با جامعه، به عنوان مهمترین عامل شناخته می شود. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژنهای رمزکننده عوامل حدت مختلف در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در شهر تهران به انجام رسیده است.*

روش کار: *در این مطالعه در طی سالهای ۱۴۰۰-۱۴۰۱، ۱۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت پای دیابتی از آزمایشگاه یک بیمارستان در تهران جمع آوری گردید و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nucA مورد تأیید قرار گرفتند. برای تعیین مقاومت سویه ها به متی سیلین از پرایمرهای اختصاصی ژنهای mecA و mecC استفاده گردید و جهت تایپینگ سویه های مقاوم به متی سیلین از روشهای SCCmec تایپینگ و پروفاژ تایپینگ با آزمونهای multiplex-PCR جداگانه استفاده گردید. حضور ژنهای مربوط به ۶ انتروتوکسین (A، E، G، K، P و Q) و ۵ عامل بیماریزایی (همولیزین، استافیلوکیناز، tsst-1، اکسفولیاتیو توکسین A و PVL) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردید.*

یافته ها: *در مجموع ۵۸ سویه (۳۸ درصد) واجد ژن mecA به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند و ۳ SCCmec تایپ II (۱۲ درصد)، III (۶۹ درصد) و V (۱۹ درصد) در میان سویه ها شناسایی گردید. همچنین، سویه ها واجد ۶ تایپ پروفاژ (SGA، SGB، SGF، SGFa، SGFb و SGL) بودند که تایپهای پروفاژی SGF، SGFa و SGFb غالبترین تایپها بودند و ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه ها تعیین گردید که الگوی پروفاژی شماره ۳ (مشتمل بر SGB، SGF، SGFa، SGFb) فراوانترین الگو بود. تمامی سویه ها واجد ژنهای انتروتوکسینی sea، sek و seq و همچنین ژنهای بیماریزایی hlb و sak بودند و فراوانی ژنهای see، seg، sep، eta، tsst-1 و pvl به ترتیب محدود به ۲۴، ۲۹، ۳۶، ۲۶، ۱۴ و ۱۱ درصد سویه ها بود. از طرف دیگر، سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه واجد SCCmec تایپ V و تایپ پروفاژ SGA بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج این مطالعه مؤید وجود عوامل حدت مختلف مرتبط با پروفاژها در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در تهران است، که آنها را قادر به تولید طیف وسیعی از بیماریها می سازد.*

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، عفونت پای دیابتی، عوامل بیماریزایی، انتروتوکسین، پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ

مقدمه

زخم پا یک عارضه شایع در بیماران مبتلا به دیابت است که به دلیل بسیاری از عوامل خطر زمینه ای از جمله نوروپاتی و نارسایی عروقی ایجاد می شود. این زخمهای باز به میکروارگانیسمها این امکان را می دهند که در موضع کلنیزه شده و تکثیر پیدا کنند و به بافتهای عمقیتر گسترش یافته و در نتیجه به طور قابل توجهی خطر بستری شدن در بیمارستان و قطع عضو اندام تحتانی را افزایش می‌دهد (۱). معمولا باکتریهای هوازی، باکتریهای بی هوازی و قارچها در زخم پای دیابتی[۱] کلنیزه می شوند که بعضا منجر به ظهور عفونتهای چندمیکروبی نیز می شوند . *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله مهمترین عوامل ایجاد عفونت زخم پای دیابتی شناخته می شود که به دلیل توانایی تشکیل بیوفیلم روند بهبودی زخم را مختل کرده و باعث تشدید عفونت می شود (۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیلی توانایی تولید طیف وسیعی از عوامل بیماریزایی از قبیل آنزیمهای پروتئاز، لیپازها، هیالورونیدازها، همولیزینها (آلفا، بتا، گاما و دلتا) و کلاژناز از قابلیت بالایی برای دوام و بقاء در زخم و در نتیجه ایجاد عفونت برخوردار هستند؛ بنابراین تشخیص دقیق و سریع و همچنین مدیریت صحیح زخم از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد و هرگونه احتمال در شناسایی و درمان منجر به عواقب جبران ناپذیری از جمله قطع عضو و مرگ بیمار خواهد شد (۳).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از جمله باکتریهای بیماریزایی است که از زخم پای بیماران دیابتی جداسازی شده که با توجه به انتشار گسترده، مقاومت آنتی بیوتیکی سطح بالا و حضور عوامل بیماریزایی مختلف به یک نگرانی عمده و رو به رشد بهداشت عمومی در دهه های اخیر مبدل شده است (۴). این سویه ها به طور گسترده ای در بیمارستانها و در جامعه در کشور پراکنده هستند و از توانایی بالایی جهت کسب مقاومت نسبت به انواع مختلفی از آنتی بیوتیکها برخوردار هستند و به همین دلیل کلنیزه شدن این عوامل بالقوه بیماریزا و مقاوم به درمان در زخمها، منجر به مزمن شدن عونتها شده و درمان را بسیار پیچیده و گاها غیرممکن می کند (۱, ۳). تولید تعداد زیادی از عوامل بیماریزایی توسط سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شرایط بافتهای میزبان را برای رشد و تکثیر باکتریها مناسب می نماید و گسترش بیشتر باکتری به لایه های زیرین پوست را تسهیل می کند (۵). تولید بسیاری از عوامل بیماریزایی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ناشی از حضور پروفاژها است که سویه های غیربیماریزا را از طریق

پدیده تبدیل فاژی لایزوژنیک[۲] مبدل به سویه های بیماریزا می نماید (۶). سویه های مولد توکسینها عموما باعث ایجاد عفونتهای شدیدتر و سیستمیک می شوند، در حالیکه سویه های که توکسین تولید نمی کنند منجر به عفونتهای عمقیتر شده و در استئومیلیت پای دیابتی نقش دارند (۲). بنابراین، به نظر می رسد تعیین ویژگیهای بیماریزایی این سویه ها در زخمها روشی قابل اعتماد برای پیش بینی رفتار این باکتریها در میزبان باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژنهای رمزکننده عوامل حدت مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در شهر تهران در بازه زمانی سالهای ۱۴۰۱-۱۴۰۰ به انجام رسیده است

مواد و روش‌ها

جمع آوری ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه در بازه زمانی تیر ماه ۱۴۰۰ لغایت دی ماه ۱۴۰۱ (مجموعا ۱۸ ماه) در مجموع ۱۵۲ ایزوله مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از زخم پای بیماران دیابتی در آزمایشگاه یک کلینیک تخصصی در شهر تهران جمع آوری شدند و به صورت هفتگی و با رعایت زنجیره سرد به به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا کشت خالص از تمامی ایزوله ها بر روی محیط کلمبیا آگار (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) تهیه شد و سپس یک کلنی از هر ایزوله خالص جهت بررسیهای بیشتر در ادامه کار در محیط مغذی واجد ۵۰ درصد گلیسرول در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند (۷).

استخراج DNA

برای استخراج DNA جهت انجام آزمونهای مولکولی در این مطالعه از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۸). یک لوپ پر از کشت تازه و خالص هر ایزوله باکتریایی در یک میکروتیوب واجد ۱۰۰ میکرولیتر

[۱] Diabetic foot ulcers (DFUs)

[۲] Lysogenic phage conversion

آب مقطر استریل حل شد و به خوبی ورتکس گردید. سپس، هر میکروتیوب واجد سوسپانسوین هموژن تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (HPN-24، پدیده نوژن پارس) در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد و پس از سانتریفیوژ در g × ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچالدار (ARM-500، ارمغان طب ایرانیان) از مایع رویی حاصل به عنوان الگوی DNA استفاده گردید.

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

تمامی ایزوله های جمع آوری شده در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند، اما به منظور شناسایی دقیق و تأیید هر سویه از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A بر اساس برنامه حرارتی معرفی شده استفاده گردید (جدول ۱) (۹). پس از تأیید هر سویه، جهت تعیین مقاومت به متی سیلین، پرایمرهای اختصاصی ژنهای *mec*A و *mec*C بر اساس دستورالعمل ارائه شده مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱) (۹, ۱۰).

SCC*mec* تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

جهت تعیین تایپهای مختلف SCC*mec* (تایپهای I، II، III، IVa، IVb، IVc، IVd و V) در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد ژنهای *mec*A و *mec*C از آزمون multiplex-PCR با استفاده از

پرایمرهای اختصاصی و برنامه حرارتی معرفی شده (جدول ۱) اقدام گردید (۱۱).

پروفاژ تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

بررسی وجود تایپهای پروفاژی مختلف و همچنین تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آزمون multiplex-PCR با پرایمرهای اختصاصی (SGA، SGB، SGFa، SGFb، SGD و SGL، جدول ۱) بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران انجام گرفت (۶).

تعیین ژنهای عوامل بیماریزایی

برای تعیین وجود ژنهای مربوط به انتروتوکسینهای A، E، G، K، P و Q و همچنین همولیزین، استافیلوکیناز، اکسفولیاتیو توکسین A و PVL در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آزمون PCR با پرایمرها (جدول ۱) و برنامه حرارتی معرفی شده استفاده گردید (۳).

جدول ۱- توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمونهای PCR.

برنامه حرارتی	رفرنس	طول قطعه (جفت باز)	توالی پرایمر	نام پرایمر
94°C: 5 min, 30 cycles (94°C: 45 S, 62°C: 45 S, 72°C: 30 S), 72°C: 7 min	9	400	F: 5′-AGTTCAGCAAATGCATCACA R: 5′-TAGCCAAGCCTTGACGAACT	*nuc*A
94°C: 10 min, 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 105 S), 72°C: 8 min	9	310	F: 5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: 5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA)	*mec*A
95°C: 5 min, 35 cycles (95°C: 45 S, 50°C: 45 S, 72°C: 1 min), 72°C: 2 min	10	238	F: 5′-TGAACGAAGCAACAGTACACC R: 5′- AGATCTTTTCCGTTTTCAGCCT	*mec*C
94°C: 5 min, 10 cycles (94°C: 45 S, 65°C: 45 S, 72°C: 90 S), 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 90 S), 72°C: 10 min	11	613	F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTCTCTCATAGTATGACGTCC	SCC*mec* Type I
		398	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	SCC*mec* Type II
		280	F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	SCC*mec* Type III
		776	F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	SCC*mec* Type IVa
		493	F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	SCC*mec* Type IVb
		200	F: ACATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	SCC*mec* Type IVc
		881	F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	SCC*mec* Type IVd
		325	F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	SCC*mec* Type V
94°C: 10 min, 30 cycles (94°C: 1 min, 55°C: 90 S, 70°C: 90 S), 70°C: 10 min	6	744	F: 5′-TATCAGGCGAGAATTAAGGG R: 5′-CTTTGACATGACATCCGCTTGAC	SGA
		405	F: 5′-ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG R: 5′-TGTATTTAATTTCGCCGTTAGTG	SGB
		155	F: 5′-CGATGGACGGCTACACAGA R: 5′-TTGTTCAGAAACTTCCCAACCTG	SGF
		548	F: 5′-TACGGGAAAATATTCGGAAG R: 5′-ATAATCCGCACCTCATTCCT	SGFa
		147	F: 5′-AGACACATTAAGTCGCACGATAG R: 5′-TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT	SGFb
		331	F: 5′-TGGGCTTCATTCTACGGTGA R: 5′-GTAATTTAATGAATCCACGAGAT	SGD
		748	F: 5′-GCTTAAAACAGTAACGGTGACAGTG R: 5′-TGCTACATCATCAAGAACACCTGG	SGL
94°C: 5 min, 30 cycles (94°C: 45 S, 62°C: 45 S, 72°C: 105 S), 72°C: 10 min	3	180	F: 5′-TAAGGAGGTGGTGCCTATGG R: 5′-CATCGAAACCAGCCAAAGTT	*sea*
		170	F: 5′-TACCAATTAACTTGTGGATAGAC R: 5′-CTCTTTGCACCTTACCGC	*see*
		432	F: 5′-CCACCTGTTGAAGGAAGAGG R: 5′-TGCAGAACCATCAAACTCGT	*seg*
95°C: 15 S, 40 cycles (94°C: 30 S, 55°C: 45 S, 72°C: 1 min), 72°C: 10 min	3	545	F: 5′-ATGAATCTTATGATTTAATTTCAGAATCAA R: 5′-ATTTATATCGTTTCTTTATAAGAAATATCG	*sek*
		618	F: 5′-TTAGACAAACCTATTATCATAATGGAAGT R: 5′-TATATAAATATATATCAATATGCATATTTTTAGACT	*sep*
		539	F: 5′-GGAAAATACACTTTATATTCACAGTTTCA R: 5′-ATTTATTCAGTTTTCTCATATGAAATCTC	*seq*
94°C: 4 min, 35 cycles (94°C: 30 S, 55°C: 2 min, 72°C: 1 min), 72°C: 7 min	3	525	F: 5′-AGCTTCAAACTTAAATGTCA R: 5′- CCGAGTACAGGTGTTTGGTA	*hlb*
		383	F: 5′- GTGCATCAAGTTCATTCGAC R: 5′- TAAGTTGAATCCAGGGTTTT	*sak*
94°C: 5 min, 35 cycles (94°C: 1 min, 55°C: 1 min, 72°C: 1 min), 72°C: 7 min	3	119	F: 5′-CTAGTGCATTTGTTATTCAA R: 5′-TGCATTGACACCATAGTACT	*eta*
94°C: 4 min, 30 cycles (94°C: 30 S, 52°C: 2 min, 72°C: 1 min), 72°C: 7 min	3	350	F: 5′-ATGGCAGCATCAGCTTGATA R: 5′-TTTCCAATAACCACCCGTTT	*tsst*-1
94°C: 10 min, 10 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 75 s), 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 75 s), 72°C: 10 min	3	433	F: 5′-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: 5′-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC	*pvl*

نتایج

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

نتایج حاصل از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A نشان داد که تمامی ۱۵۲ ایزوله جمع آوری شده واجد ژن نوکلئاز A بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین، ۵۸ سویه (۳۸ درصد) نیز واجد ژن *mec*A بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. ضمنا، هیچکدام از سویه ها واجد ژن *mec*C نبودند. علاوه بر این، در این مطالعه از مجموع ۵۸ سویه مقاوم به متی سیلین، ۳۷ سویه (۶۴ درصد) از آقایان و ۲۱ سویه نیز از خانمها جداسازی شدند (۳۶ درصد).

SCC*mec* تایپینگ سویه ها

در میان ۵۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در مجموع ۳ تایپ SCC*mec* شناسایی شدند که تایپ III به عنوان غالبترین تایپ انتخاب گردید (۴۰ سویه، ۶۹ درصد) (جدول ۲). همچنین تایپهای V و II نیز به ترتیب در ۱۹ درصد (۱۱ سویه) و ۱۲ درصد (۷ سویه) سویه ها شناسایی شدند. بر این اساس، ۱۹ درصد سویه ها به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه تعیین گردند و ۸۱ درصد سویه ها نیز متعلق به سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از بیمارستان بودند.

پروفاژ تایپینگ سویه ها

بر اساس نتایج آزمون multiplex-PCR جهت شناسایی تایپهای پروفاژی مختلف مشخص گردید که در مجموع ۴ تایپ پروفاژ SGA (۱۹ درصد)، SGB (۷۴ درصد)، SGF (۱۰۰ درصد) و SGL (۱۹ درصد) و دو ساب تایپ SGFa و SGFb (۱۰۰ درصد) در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین حاضر بودند. همچنین، ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه ها شناسایی شدند (جدول ۲). بنابراین، تایپهای پروفاژی SGA و SGL که در ۱۹ درصد سویه ها شناسایی شدند و واجد SCC*mec* تایپ V بودند، مربوط به سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از جامعه بودند. همچنین، تایپ پروفاژ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb در تمامی سویه ها شناسایی شدند و به عنوان تایپهای پروفاژی غالب در این مطالعه معرفی شدند. الگوی پروفاژی شماره ۳ که متشکل از تایپهای پروفاژی SGB، SGF، SGFa و SGFb بود فراوانترین الگوی شناسایی شده در این مطالعه بود. علاوه بر این، الگوهای پروفاژی شماره ۳ و ۴ نیز تنها در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از بیمارستان حاضر بوده و واجد SCC*mec* تایپهای II و III بودند.

جدول ۲- فراوانی تایپهای پروفاژی و الگوهای پروفاژی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

الگوی پروفاژی	پروفاژ تایپ						تایپ SCC*mec*	ژن *pvl*	تعداد (درصد)
	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb	SGL			
۱	+	+	+	+	+	+	V	+	۳ (۵)
۲	+	−	+	+	+	+	V	+	۸ (۱۴)
۳	−	+	+	+	+	−	III	−	۴۰ (۶۹)
۴	−	−	+	+	+	−	II	−	۷ (۱۲)

شناسایی ژنهای انتروتوکسینی

از میان ۶ ژن رمزکننده انتروتوکسینهای مختلف با منشأ پروفاژها، تمامی ۶ ژن در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شدند. بر این اساس مشخص شد که ژنهای *sea*، *sek* و *seq* در تمامی سویه های (۵۸ سویه، ۱۰۰ درصد) حاضر بودند (جدول ۳). همچنین، ۳۶، ۲۹ و ۲۴ درصد سویه ها نیز به ترتیب واجد ژنهای *sep*، *seg* و *see* بودند. علاوه بر این، در مجموع ۶ الگوی انتروتوکسینی نیز در میان سویه ها شناسایی شدند که ۶۲ درصد سویه ها واجد الگوی شماره ۱ متشکل از ژنهای *sea*، *sek* و *seq* بودند و به عنوان الگوی غالب تعیین گردید. از طرف دیگر، الگوی شماره ۶ (واجد تمامی ۶ ژن انتروتوکسینی) در ۲۰ درصد سویه ها شناسایی گردید.

جدول ۳- فراوانی و الگوی ژنهای رمزکننده انتروتوکسینها در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

الگوی انتروتوکسینی	ژنهای رمزکننده انتروتوکسینها						تعداد (درصد)
	sea	*see*	*seg*	*sek*	*sep*	*seq*	
۱	+	−	−	+	−	+	۳۶ (۶۲)
۲	+	+	−	+	−	+	۱ (۲)
۳	+	−	−	+	+	+	۳ (۵)
۴	+	+	−	+	+	+	۱ (۲)
۵	+	−	+	+	+	+	۵ (۹)
۶	+	+	+	+	+	+	۱۲ (۲۰)
جمع (درصد)	۵۸ (۱۰۰)	۱۴ (۲۴)	۱۷ (۲۹)	۵۸ (۱۰۰)	۲۱ (۳۶)	۵۸ (۱۰۰)	

شناسایی ژنهای مربوط به عوامل بیماریزایی

بر اساس نتایج آزمونهای PCR مشخص شد که تمامی ۵ ژن رمزکننده عوامل بیماریزایی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شدند و تمامی سویه ها واجد ژنهای *hlb* (رمزکننده همولایزین بتا) و *sak* (رمزکننده استافیلوکیناز) بودند (جدول ۴). همچنین فراوانی ژنهای *eta* (رمزکننده اکسفولیاتیو توکسین A)، *pvl* (رمزکننده پنتون-ولنتاین لوکوسیدین) و *tsst-1* (رمزکننده توکسین سندرم شوک سمی-۱) نیز به ترتیب محدود به ۲۶، ۱۹ و ۱۴ درصد سویه ها بود. علاوه بر این، در مجموع ۵ الگوی بیماریزایی نیز در این سویه ها شناسایی شدند که الگوی شماره ۱ (واجد ژنهای *hlb* و *sak*) فراوانترین الگو بود و در ۷۴ درصد سویه ها شناسایی شد. همچنین، ۱۲ درصد سویه ها نیز واجد الگوی شماره ۵ (تمامی ژنهای عوامل بیماریزایی) بودند.

جدول ۴- فراوانی و الگوی ژنهای رمزکننده عوامل بیماریزایی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

الگوی بیماریزایی	ژنهای رمزکننده انتروتوکسینها					تعداد (درصد)
	hlb	*sak*	*pvl*	*eta*	*tsst-1*	
۱	+	+	−	−	−	۴۳ (۷۴)
۲	+	+	−	+	−	۳ (۵)
۳	+	+	−	+	+	۱ (۲)
۴	+	+	+	+	−	۴ (۷)
۵	+	+	+	+	+	۷ (۱۲)

بحث

سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* از اعضای فلور نرمال بدن انسان محسوب می شوند که معمولا در انتهای قدامی بینی، دستگاه گوارش، روی پوست و در مناطقی مانند زیر بغل، کشاله ران و بین انگشتان پا کلنیزه می شود. با توجه به شیوع بالای مقاومت به متی سیلین در ایران، کلنیزه شدن سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین در افراد سالم و بیمار پیشتر گزارش شده است (۱۲, ۱۳). با توجه به زیستگاه اکولوژیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در روی پوست و در میان انگشتان پا، این سویه ها از اهمیت فراوانی در ایجاد عفونت زخم پا در بیماران مبتلا به دیابت ایفا می کنند (۱). در این مطالعه، ۳۸ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از زخم پای بیماران دیابتی مقاوم به متی سیلین بودند که در مقایسه با مطالعه پیشین انجام گرفته در شهر تهران (۳) ۷ درصد افزایش پیدا کرده است. بر اساس اطلاعات موجود در ارتباط با همه گیرشناسی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به نظر می رسد که تنوع در پراکندگی این سویه ها عمدتا ناشی از وجود عناصر ژنتیکی متحرک از قبیل پروفاژها، پلاسمیدها و جزایر بیماریزایی ژنومی می باشد (۱۴). به طور کلی، بیماریزایی سویه های های *استافیلوکوکوس اورئوس* (حساس و مقاوم به متی سیلین) نیز ناشی از حضور این عوامل ژنتیکی متحرک به ویژه پروفاژها می باشد (۶) و سویه های واجد تایپهای پروفاژی مختلف از قدرت بیماریزایی بالاتری نسبت به سایر سویه ها برخوردار بوده و با سرعت و قدرت بیشتری در بیمارستانها و سپس در جامعه منتشر می شوند. با توجه به تفاوت در فراوانی تایپهای پروفاژی مختلف در میان سویه ها، بنابراین شناسایی صحیح سویه ها و تعیین وجود تایپهای پروفاژی مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که تمامی پروفاژ تایپها به استثناء SGD در میان سویه ها حاضر بودند. در سایر مطالعات انجام گرفته در کشور نیز این تایپ پروفاژ شناسایی نشده است (۳, ۶-۹, ۱۵-۱۷). به طور کلی تایپ پروفاژ SGD بر خلاف سایر پروفاژ تایپها، یک پروفاژ تایپ لایتیک است و فاقد اطلاعات ضروری برای میزبان می باشد (۱۸). همانند سایر مطالعات انجام گرفته در کشور بر روی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از منابع مختلف بالینی، دامی، محیطی و غذایی، تایپ پروفاژ SGF به عنوان تایپ غالب در این مطالعه نیز معرفی گردید و در تمامی سویه ها شناسایی گردید (۳, ۶-۹, ۱۵-۱۷, ۱۹). تایپ پروفاژ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb به عنوان مسئول رمزگذاری انتروتوکسینهای A، G، K، P و Q، استافیلوکیناز و همولایزین بتا شناخته می شوند (۲۰). علاوه بر این، ۱۹ درصد سویه ها نیز واجد تایپ پروفاژ SGA بودند که رمزکننده پنتون-ولنتاین لوکوسیدین می باشند. در مطالعه حاضر، در مجموع ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید. در مطالعات مختلف الگوهای پروفاژی متفاوتی در ایران گزارش شده است که می تواند ناشی از تفاوت در منشأ سویه ها و محلهای جداسازی آنها باشد. سویه های واجد الگوی پروفاژی شماره ۱ که متشکل از

تمامی تایپهای پروفاژی شناسایی شده بودند قادر به تولید تمامی عوامل بیماریزایی رمزشده از طریق پروفاژها می باشند. بنابراین، با توجه به حضور این تایپهای پروفاژی در میان تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به نظر می رسد این سویه ها به عنوان مخازن بالقوه تولید طیف وسیعی از عوامل حدت در بیمارستانها و جامعه در شهر تهران در حال گردش و انتشار می باشند.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون SCC*mec* تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مشخص گردید که در مجموع ۳ تایپ II (۱۲ درصد)، III (۶۹ درصد) و V (۱۹ درصد) در میان سویه ها شناسایی شدند. بنابراین، ۸۱ درصد سویه ها اکتسابی از بیمارستان بودند و ۱۹ درصد نیز به عنوان سویه های اکتسابی از جامعه طبقه بندی شدند. در مطالعات صورت گرفته پیشین نیز همواره SCC*mec* تایپ III فراوانترین و غالبترین تایپ در تمامی سویه ها در کشور بوده است (۳, ۷-۹, ۱۶, ۱۹, ۲۱). بنابراین، به نظر می رسد که تمامی این سویه ها متعلق به چند کلون عالب هستند که در سراسر کشور پراکنده شده اند و دائما در بیمارستان و جامعه در حال گردش می باشند. همچنین، در آن مطالعات بیشتر تایپ IV در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه شناسایی شده است، اما در این مطالعه تمامی سویه های اکتسابی از جامعه واجد SCC*mec* تایپ V بودند و تایپ IV اصلا در سویه ها شناسایی نشد. به طور کلی این تفاوت می تواند نشان دهنده انتشار کلونهای مختلفی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در شهر تهران و در مراکز درمانی باشد. همچنین، با توجه به عدم شناسایی سویه هایی با خصوصیتهای پیشین در این مطالعه، به نظر می رسد که کلونهای جدید در مراکز درمانی جایگزین کلونهای پیشین شده اند. بنابراین تعیین انتشار کلونال این سویه ها با استفاده از روشهای تایپینگ مولکولی با قدرت افتراق دهی بالا مانند الکتروفورز ژل در میدان ضربانی[۳]، ریبوتایپنگ، تایپینگ توالی چند جایگاهی[۴] و یا روش انگشت نگاری بیوشیمایی (PhP تایپینگ)[۵] کاملا ضروری به نظر می رسد (۹). علاوه بر این، با توجه به اینکه سویه های اکتسابی از بیمارستان تحت فشارهای انتخابی محیط بیمارستان مبدل به سویه هایی با قدرت بیماریزایی بالا و واجد مقاومتهای آنتی بیوتیکی چندگانه شده اند، لذا انتشار این سویه ها در منابع مختلف در ایران یک معضل بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشد.

توانایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین برای ایجاد عفونت زخم در بیماران دیابتی ناشی از توانایی آنها در تولید عوامل بیماریزایی مختلف از جمله سموم ایجاد کننده منفذ[۶]، اکسفولیاتیو توکسین و اگزوتوکسینهای سوپرآنتی ژنیک است (۱, ۲). بنابراین، آگاهی از ویژگیهای بیماریزایی باکتریها می تواند اطلاعات کاملی از ایجاد و پیشرفت عفونتها در اختیار قرار دهد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی حضور ژنهای مربوط به عوامل بیماریزایی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مشخص گردید که تمامی ۱۱ ژن مربوط به انتروتوکسینها و عوامل بیماریزایی مورد نظر در میان سویه ها شناسایی شدند. ژنهای مربوط به انتروتوکسینهای *sea*، *sek* و *seq* و همچنین *hlb* و *sak* در تمامی سویه ها حاضر بودند که منطبق بر سایر مطالعات انجام گرفته پیشین می باشد (۳, ۸, ۱۷, ۲۲, ۲۳). همچنین، ژنهای انتروتوکسینهای E، G و P نیز به ترتیب در۲۴، ۲۹ و ۳۶ درصد سویه ها شناسایی شدند که این آمار بالاتر از گزارش رحیمی و همکاران در سال ۲۰۲۳ می باشد (۳). به طور کلی ژن مربوط به انتروتوکسین E در هیچکدام از مطالعات انجام گرفته در کشور تاکنون گزارش نشده است و این نخستین گزارش از فراوانی این ژن می باشد (۸, ۱۷). در این مطالعه در مجموع ۶ الگوی انتروتوکسینی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که الگوی شماره ۱ متشکل از ژنهای انتروتوکسینهای A، K و Q فراوانترین تایپ بود (۶۲ درصد) که در تمامی مطالعات صورت گرفته نیز همواره این الگو به عنوان الگوی غالب معرفی شده است (۳, ۸, ۱۷). به طور کلی علیرغم اینکه سازوکارهای عملکرد انتروتوکسینهای استافیلوکوکی به خوبی شناخته نشده اند، اما به نظر می رسد که عملکرد آنها به عنوان ساختارهای سوپرآنتی ژنیک می تواند ناشی از تشدید آزادسازی سایتوکینها باشد که در نهایت منجر به مرگ سلولی از طریق آپاپتوز می‌شوند (۲). همچنین، انتروتوکسین A می تواند به عنوان یک شاخص مهم جهت افتراق کلونیزاسیون از عفونت و همچنین برای تعیین درجه زخم پا استفاده شود (۱)؛ معمولا این توکسین در سویه های جداسازی شده از بیماران مبتلا به زخم درجات ۲-۴ از شیوع بالایی برخوردار است. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که در بیماران واجد زخمهای عمیقتر این توکسین از اهیت بالایی برخوردار است و می تواند بیماران را

[۳] Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)
[۴] Multilocus sequence typing (MLST)
[۵] Biochemical fingerprinting system (PhP typing)
[۶] Pore forming toxins (PFT)

مستعد ابتلا به قانقاریای گازی و استئومیلیت و در نهایت قطع کند (۳).

تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه واجد ژن *pvl* بودند (۱۹ درصد) که این سویه ها همگی برای تایپ پروفاژ SGA نیز مثبت بودند. بنابراین با توجه به اینکه پنتون-ولنتاین لوکوسیدین که به عنوان شاخص سویه های اکتسابی از جامعه شناخته می شود منشأ تایپ پروفاژ SGA دارد، بنابراین چنانچه در سایر مطالعات نیز اعلام شده است، از هر دو شاخص ژن *pvl* و تایپ پروفاژ SGA جهت تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه می توان استفاده کرد. معمولا، در تحقیقات مختلف سویه های واجد ژن *pvl* ندرتا از بیماران مبتلا به عفونت زخم

پای دیابتی جداسازی شده اند و فراوانی آن در فرانسه (۳ درصد) (۲)، الجزایر و هلند (۱۴ درصد) (۲۴, ۲۵) بوده است که نشان دهنده شیوع پایین سویه های اکتسابی از جامعه در کشورهای مختلف می باشد. همچنین، ۵ الگوی بیماریزایی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که الگوی شماره ۱ (شامل ژنهای *sak* و *hlb*) فراوانترین الگو (۷۴ درصد) در این مطالعه بود و در سایر مطالعات نیز همواره فراوانی ژن *hlb* منطبق بر این تحقیق بوده است (۳, ۱۷, ۲۳). از طرف دیگر فراوانی ژنهای *eta* و *tsst-1* به ترتیب ۲۶ و ۱۴ درصد بود که بالاتر از گزارش رحیمی و همکاران در سال ۲۰۲۳ می باشد (۳). توکسین اکسفولیاتیو از دسته سرین پروتئازهای وابسته به روی است که به عنوان عامل ایجاد بیماری سندرم فلسی شدن پوست شناخته می شود شامل ۴ ژن *eta*، *etb*، *etd* و *ete* می باشد که ژن *eta* به عنوان مهمترین ژن دخیل در ایجاد بیماری شناخته می شود و منشأ پروفاژی دارد (۲, ۲۰). این توکسین به عنوان یک قیچی عمل می کند که به انتشار باکتری در بافتها کمک می کند. علیرغم اینکه سویه های واجد توکسین اکسفولیاتیو از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در هر ۴ درجه بیماری جداسازی شده اند، اما معمولا این فراوانی در بیماران در درجه ۴ و فرم شدیدتر بیماری بسیار بیشتر از عفونتهای ضعیفتر می باشد (۱). توکسین TSST-1 که باعث ایجاد سندرم شوک سمی می شود از دسته سوپرآنتی ژنهای بسیار مهم است که معمولا باعث ایجاد عفونتهای نکروزان و مرگبار می شوند (۲) و اهمیت آنها در ایجاد بیماری در بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی نیز نشان داده شده است (۱). در مطالعات انجام گرفته پیشین در ایران و خارج از ایران فراوانی این ژن به ترتیب ۴ و ۸ درصد گزارش شده است (۲, ۳). با وجود اینکه فراوانی این ژن در مطالعات مختلف پایین است، اما بیشتر سویه ها از بیماران مبتلا به درجه ۴ بیماری جداسازی شده اند (۲۶).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم پای دیابتی در کلینیک مورد نظر در تهران از فراوانی بالایی برخوردار می باشند. این سویه ها که واجد طیف وسیعی از ژنهای مربوط به عوامل بیماریزایی هستند از عوامل بالقوه ایجاد بیماریهای مختلف محسوب می شوند که در جامعه و بیمارستان در شهر تهران پراکنده شده اند. بنابراین شناسایی این عوامل بیماریزایی نقش مهمی در ارزیابی بیماریزایی و میزان انتقال این باکتریها و در نتیجه یافتن راهکارهای مؤثر و قابل اعتماد برای مدیریت، کنترل و درمان عفونتهای *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین ایفا می کند. با توجه به منشأ پروفاژی این عوامل بیماریزایی، مشخص شده است که سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در گذشت زمان و در طی فرآیند تبدیل فاژی مبدل به چنین سویه هایی با قدرت بیماریزایی بالا مبدل شده اند. روش پروفاژ تایپینگ یک روش کارآمد، اختصاصی، حساس و سریع جهت پیش بینی و ارزیابی شیوع بیماریزایی سویه های *استافیلوکوکوس اروئوس* مقاوم به متی سیلین محسوب می شود. آگاهی از توانایی بالقوه بیماریزایی، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین انتشار کلونال سویه ها با استفاده از روشهای مناسب و سریع جهت کنترل عفونت و ممانعت از گسترش عفونت در بیمارستانها، و انتخاب راهکار درمانی مناسب بسیار حائز اهمیت می باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان (گرنت اختصاصی اعضای هیأت علمی دانشگاه اصفهان) به انجام رسیده است.

REFERENCE

1- Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2020;39(12):2235-46.
2- Dunyach-Remy C, Ngba Essebe C, Sotto A, Lavigne J-P. *Staphylococcus aureus* toxins and diabetic foot ulcers: role in pathogenesis and interest in diagnosis. Toxins. 2016;8(7):209.
3- Rahimi F, Khashei S. Characteristics of prophage patterns and virulence gene profiles among methicillin-resistant S*taphylococcus aureus* isolates from patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. Infection Epidemiology and Microbiology. 2023;9(1):15-23.
4- Eleftheriadou I, Tentolouris N, Argiana V, Jude E, Boulton AJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections. Drugs. 2010;70(14):1785-97.
5- Mottola C, Semedo-Lemsaddek T, Mendes JJ, Melo-Cristino J, Tavares L, Cavaco-Silva P, Oliveira M. Molecular typing, virulence traits and antimicrobial resistance of diabetic foot staphylococci. Journal of Biomedical Science. 2016;23(1):1-10.
6- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-11.
7- Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.
8- Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. Journal of Water and Health. 2021;19(2):216-28.
9- Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.
10- Ciesielczuk H, Xenophontos M, Lambourne J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mec*C still eludes us in East London, United Kingdom. Journal of Clinical Microbiology. 2019;57(6):10.1128/jcm. 00020-19.
11- Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(10):5026-33.
12- Danesh M, Rahimi F. Characterization of biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and healthy people. Infection Epidemiology and Microbiology. 2021;7(1):1-15.
13- Rahimi F. Biofilm production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy people Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015;20(68):21-9.
14- Xia G, Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. Infection, Genetics and Evolution. 2014;21:593-601.
15- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):80-5.
16- Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4):389–98.

17- Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(5):e59385.
18- Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, Rosypal S. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. Archives of Virology. 2004;149(9):1689-703.
19- Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains producing enterotoxins A, K and Q From chicken meat in Isfahan, Iran, 2014. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(4).
20- Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Young Investigators. 2006;15:1-8.
21- Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.
22- Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains producing enterotoxins A, K and Q From chicken meat in Isfahan, Iran, 2014. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(4):e35601.
23- Mohaghegh F, Rahimi F. Frequency of prophage types and genes encoding β-lysin and staphylokinase among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Tehran during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(97):37-47.
24- Djahmi N, Messad N, Nedjai S, Moussaoui A, Mazouz D, Richard J-L, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. Clinical Microbiology and Infection. 2013;19(9):398-404.
25- Stappers MH, Hagen F, Reimnitz P, Mouton JW, Meis JF, Gyssens IC. Direct molecular versus culture-based assessment of Gram-positive cocci in biopsies of patients with major abscesses and diabetic foot infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2015;34:1885-92.
26- Messad N, Landraud L, Canivet B, Lina G, Richard JL, Sotto A, et al. Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. Clinical Microbiology and Infection. 2013;19(9):875-80.