

بررسی ژنتیکی عوامل حدت، قابلیت تشکیل بیوفیلم و تنوع کلونال در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه جدا شده از بیماران در تهران

فاتح رحیمی^{۱*}، ساناز خاشعی^۲

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

*نویسنده مسئول: دکتر فاتح رحیمی

پذیرش برای چاپ: تابستان ۱۴۰۴

دریافت مقاله: بهار ۱۴۰۴

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) عامل طیف وسیعی از عفونتهای پوستی تا بیماریهای شدید سیستمیک است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و الگوی ژنی عوامل حدت در سویه های CA-MRSA در تهران انجام شد.

روش کار: طی سالهای ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۳، ۲۷۹ ایزوله مشکوک به MRSA از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در تهران جمع آوری شد. شناسایی سویه ها توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی ژنهای *nucA* و *mecA* و آزمون انتشار دیسک سفوکسی تین انجام شد. عوامل حدت با پرایمرهای اختصاصی شناسایی شدند و توانایی تشکیل بیوفیلم با روشهای ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت ارزیابی شد. تعیین SCCmec تایپ، پروفاز تایپ و *agr* تایپ با multiplex-PCR انجام و تنوع کلونالیتی با PHP typing بررسی شد. یافته ها: در مجموع ۴۷ سویه (۱۷ درصد) واجد SCCmec تایپهای IV و V و همچنین پروفاز تایپ SGA به عنوان CA-MRSA شناسایی شدند که واجد ۲ الگوی پروفازی و ۳ *agr* تایپ بودند. تمامی سویه ها واجد ژنهای *sea*, *sek*, *seq*, *sak*, *hly*, *pvl* بودند. همچنین، ۲۹ سویه اسلایم مثبت و اسلایم متغیر و در مجموع ۷۶ درصد سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. بر اساس نتایج PHP تایپینگ، ۱۱ الگوی متفاوت شامل ۷ تایپ منفرد و ۴ تایپ مشترک شناسایی شدند و CT2 فراوانترین تایپ (۴۳ درصد) بود.

نتیجه گیری: وجود تنوع پایین در میان سویه های CA-MRSA واجد عوامل بیماریزایی مختلف، نشانگر گردش چند کلون شاخص با قدرت بیماریزایی بالا بین جامعه و بیمارستان بوده و نیاز به پایش مستمر برای پیشگیری از گسترش آنها می باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، عوامل حدت، بیوفیلم، اپیدمیولوژی مولکولی، پروفاز تایپ، *agr* تایپ

مقدمه

که این باکتری پتانسیل قابل توجهی در تشکیل بیوفیلم چندلایه و بسیار چسبنده دارد، این استراتژی به عنوان یکی از ارکان اصلی مقاومت در برابر درمانهای ضد میکروبی و سیستم دفاع میزبان محسوب می شود (۲).

مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید بسیاری از عوامل حدت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از حضور عناصر ژنتیکی متحرک از جمله باکتریوفاژها، پلاسمیدها، اینتگرونها، جزایر بیماریزایی و ترانسپوزونها می باشد که در این میان

شیوع روزافزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین^۱ در محیطهای درمانی و جامعه موجب افزایش خط ابتلا به بیماری و مرگ و میر و ایجاد نگرانیهای فراوانی در بحث بهداشت و سلامت جامعه شده است (۱). سویه های استافیلوکوکوس اورئوس از توانایی بالایی جهت کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی برخوردار می باشند. از آنجایی

^۱Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

درک بهتر همه گیرشناسی و انتشار این سویه ها به انجام رسیده است.

مواد و روشها

جمع آوری و شناسایی ایزوله ها

در بازه زمانی سالهای ۱۴۰۳-۱۴۰۱ مجموعاً ۲۷۹ ایزوله غیرتکراری (یک ایزوله از هر بیمار) مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از نمونه های بیماران مراجعه کننده و بستری در یک بیمارستان مرجع دانشگاهی در شهر تهران از طریق آزمایشگاه بیمارستان جمع آوری شد. پس از اطمینان از خالص بودن ایزوله ها، بررسی مقاومت به اگزاسیلین با آزمون انتشار دیسک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) (Mast Diagnostics, Merseyside, UK) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Darmstadt, Germany) بر اساس دستورالعملهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام شد (۸). شناسایی و تأیید ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای *nucA*، *mecA* و *mecC* انجام گرفت (۹). برای استخراج DNA از کشت خالص هر ایزوله باکتریایی، از روش جوشاندن استفاده شد. به این منظور یک لوپ پر از باکتری در ویال واجد ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به خوبی حل و ورتکس گردید. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دستگاه ترموبلاک (پدیده نوژن پارس NP-1000)، ویالها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰× g سانتریفیوژ شده و در نهایت از مایع رویی به عنوان DNA الگوی جهت انجام PCR استفاده شد (۱۰).

پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ و agr تایپینگ
سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

به منظور بررسی وجود پروفاژ تایپهای SGA، SGB، SGF، SGFa، SGFb، SGD و SGL در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آزمون multiplex-PCR منفرد و پرایمر اختصاصی هر پروفاژ تایپ استفاده شد (۱۱). همچنین، پس از شناسایی ژن *mecA* در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی (تایپهای I-V) جهت SCCmec تایپینگ، مورد استفاده قرار

باکتریوفاژها نقش بسیار مهمی در تولید طیف وسیعی از عوامل بیماریزایی از قبیل انتروتوکسینهای A، E، G، K، P و Q، همولیزین بتا، استافیلوکیناز، لیپاز، توکسین سندرم شوک سمی^۲، توکسین اکسفولیاتیو^۳ و لوکوسیدین پنتون-ولنتاین ایفا می کنند (۳، ۴). در میان عوامل بیماریزای مختلف تولید شده توسط سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، لوکوسیدین پنتون-ولنتاین^۴ (کد شده توسط ژن *pvl*) به دلیل نقش آن در ایجاد بیماریهایی مانند ذات الریه نکروزه کننده شدید و عفونتهای پوست و بافت نرم که اغلب نیازمند اقدامات جراحی هستند، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد (۵). وجود ژن *pvl* معمولاً باعث افزایش حدت و تظاهرات بالینی شدیدتر، به ویژه در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه^۵ می شود (۶). علاوه بر ایجاد ذات الریه نکروزه کننده، اخیراً مشخص شده است که ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه باعث ایجاد عفونت در محلها و نقاطی از بدن می شوند که ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان^۶ نمی توانند باعث ایجاد بیماری در آن نقاط شوند. از آن دسته بیماریها می توان به پیومیوزیت، سندرم شوک سمی و سندرم واثرهاوس-فریدریچسن^۷ اشاره نمود (۷).

پیامدهای بالقوه خطرناک عفونتهای ناشی از این سویه ها در بیماران بزرگسال و کودکان، بررسی ویژگیهای مولکولی و تعیین پروفاژهای ژنی مربوط به عوامل حدت در این سویه ها را به منظور اتخاذ تصمیمات کنترل عفونت و پیشگیرانه مؤثر و کارآمد بر علیه ابتلا و گسترش آنها در بیمارستانها و جوامع را ضروری می سازد. علیرغم شیوع روزافزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه در ایران، همچنان اطلاعات جامعی در مورد این سویه ها در اختیار نمی باشد. بر این اساس، هدف از انجام این مطالعه بررسی الگوی ژنتیکی عوامل حدت، توانایی تشکیل بیوفیلم و تنوع کلونال در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به یک بیمارستان مرجع در شهر تهران به منظور

^۲Toxic shock syndrome toxin (TSST)

^۳Exfoliative toxin (ET)

^۴Panton-Valentine leukocidin (PVL)

^۵Community acquired MRSA (CA-MRSA)

^۶Hospital acquired MRSA (HA-MRSA)

^۷Waterhouse-Friderichsen syndrome

Awareness Technologies, USA) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری چاهکها اندازه گیری شد. سرانجام، سویه ها به عنوان بیوفیلیم منفی ($570 \leq ODc$)، بیوفیلیم قوی ($570 \geq 1$)، بیوفیلیم ضعیف ($570 < 0.2$) و بیوفیلیم متوسط ($0.2 \leq OD570 < 1.0$) تقسیم بندی شدند.

PhP تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم به متی سیلین

جهت انگشت نگاری بیوشیمیایی سویه ها از آزمون PhP تایپینگ با استفاده از پلیتهای ۹۶ خانه واجد ۴ ست از ۲۴ سوبسترای مشخص و افتراقی جهت تمایز سویه های مورد بررسی (PhP-CS, Sweden) استفاده گردید (۲). پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل نیم مک فارلند در محیط برومو تیمول بلو، ۱۵۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد و پلیتها به مدت ۶۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس، هر پلیت در بازه های زمانی ۱۶، ۴۰ و ۶۴ ساعت بر اساس دستورالعمل شرکت با استفاده از اسکنر (HP Scanjet 4890, USA) بررسی شد. تصاویر حاصل از اسکن با نرم افزار PhPWin آنالیز و دندروگرام مورد نظر ترسیم گردید و سویه ها به عنوان تایپ منفرد^۸ و تایپ مشترک^۹ طبقه بندی شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

تحلیل آماری داده ها عمدتاً به صورت توصیفی و با هدف بررسی توزیع ویژگی های مولکولی و فنوتیپی سویه ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8 انجام شد. در موارد مقتضی، آزمون Chi-square برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

شناسایی و تأیید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم به متی سیلین

با انجام آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن nuca در تمامی ۲۷۹ ایزوله جمع آوری شده شناسایی گردید. همه این سویه ها مقاوم به سفوکسی تین و واجد ژن mecA بودند و به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین، تمامی سویه های مورد بررسی فاقد ژن mecC بودند.

گرفت (۱۰). علاوه بر این، جهت تعیین حضور agr تایپهای مختلف (I-IV) در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی، استفاده شد (۱۲).

تعیین وجود عوامل حدت در میان سویه های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه به منظور بررسی حضور ژنهای رمزکننده انتروتوکسینهای sea-seq با استفاده از دو آزمون multiplex-PCR جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳). همچنین، وجود ژنهای eta، tsst، sak، hlb و pvl نیز در این سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آزمونهای PCR منفرد مورد بررسی قرار گرفت (۳).

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم

پس از تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه و واجد ژن pvl، جهت غربالگری اولیه تشکیل بیوفیلیم از روش ژلوز قرمز کنگو استفاده شد. به این منظور، پس از کشت تمامی سویه ها بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو و ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۲۴ ساعت نگهداری در دمای اتاق، سویه های مولد کلنیهای سیاه رنگ، قرمز روشن و قرمز تیره به ترتیب به عنوان سویه های اسلایم مثبت، اسلایم منفی و سویه های مشکوک طبقه بندی شدند. سپس، سویه های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک انتخاب و توانایی تولید بیوفیلیم در این سویه ها به روش کمی میکروتیر پلیت، تعیین گردید (۱۲).

به این منظور، غلظتی معادل 10^6 CFU/ml از کشت شبانه هر سویه باکتریایی در محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد ۲۵٪ سوکروز تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به صورت سه تایی در پلیتهای ۹۶ خانه تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از تخلیه محتویات چاهکها، شست و شو با استفاده از سرم فیزیولوژی انجام گرفت و سپس هر چاهک با کریستال ویوله ۰/۳۶٪ (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) رنگ آمیزی شد. پس از تخلیه چاهکها و شست و شو با آب مقطر، رنگبری با استفاده از ترکیب اتانول-استن (۲۰-۸۰) انجام و در انتها با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2000،

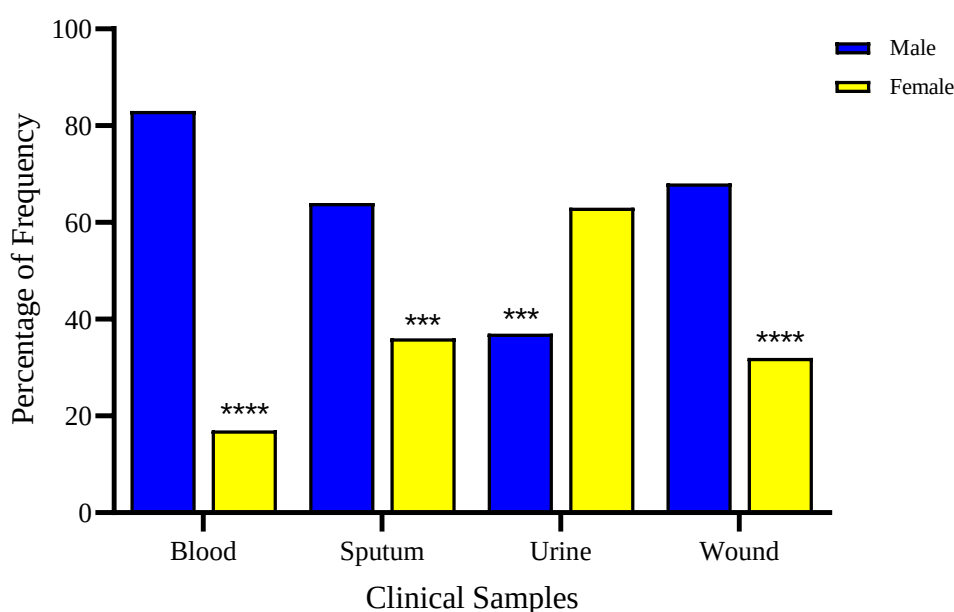
پروفاژ تایپینگ، SCCmec و agr تایپینگ سویه ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون SCCmec تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مشخص شد که در مجموع تمامی پنج SCCmec تایپ مختلف مورد بررسی در این سویه ها شناسایی شدند (جدول ۱) که در این میان ۴۷ سویه (۱۷ درصد) واجد SCCmec تایپهای IV (a, c & d) (۱۲ درصد) و V (۵ درصد) بودند که به عنوان

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه مورد شناسایی قرار گرفتند. از مجموع سویه های منتخب ۴۷ درصد (۲۲ سویه)، ۲۳ درصد (۱۱ سویه)، ۱۷ درصد (۸ سویه) و ۱۳ درصد (۶ سویه) به ترتیب از نمونه های زخم، خلط، ادرار و خون جداسازی شدند (شکل ۱)، که به استثناء نمونه های ادراری فراوانی سویه ها در سایر نمونه های جمع آوری شده در میان آقایان به شکل معنی داری بیشتر از خانمها بود.

جدول ۱- فراوانی (درصد) SCCmec تایپهای مختلف در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین.

SCCmec تایپ	تعداد	درصد	نوع سویه
I	۶۱	۲۲	اکتسابی از بیمارستان
II	۲۳	۸	اکتسابی از بیمارستان
III	۱۴۸	۵۳	اکتسابی از بیمارستان
IVa	۱۸	۶	اکتسابی از جامعه
IVc	۷	۳	اکتسابی از جامعه
IVd	۹	۳	اکتسابی از جامعه
V	۱۳	۵	اکتسابی از جامعه
جمع	۲۷۹	۱۰۰	



شکل ۱- درصد فراوانی سویه های CA-MRSA در میان نمونه های بالینی بر اساس جنسیت.

سویه ها شناسایی گردید (جدول ۳) که ۱۱ درصد سویه ها حامل تمامی پروفاز تایپهای شناسایی شده بودند و ۱۳ درصد سویه ها نیز تنها از نظر حضور پروفاز تایپهای SGFa, SGF و SGFb مثبت بودند. از طرف دیگر، تمامی سویه ها واجد لوکوس ژنی *agr* بودند و سه *agr* تایپ I (۵۷ درصد، ۲۷ سویه)، II (۱۵ درصد، ۷ سویه) و III (۲۸ درصد، ۱۳ سویه) در این مطالعه شناسایی شد و هیچکدام از سویه ها واجد *agr* تایپ IV نبودند.

همچنین، سویه های مورد بررسی واجد تمامی پروفاز تایپهای مورد بررسی به استثناء پروفاز تایپ SGD بودند (جدول ۲). بر این اساس مشخص شد که ۱۷ درصد سویه ها (۴۷ سویه) حامل پروفاز تایپهای SGA و SGL بودند که این سویه ها پیشتر به عنوان سویه های واجد SCCmec تایپهای IV و V شناسایی شده بودند. علاوه بر این، ۱۰۰ درصد سویه ها نیز از نظر وجود پروفاز تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb مثبت بودند و در مجموع ۴ الگوی پروفازی نیز در این

جدول ۲- فراوانی (درصد) پروفاز تایپها و الگوهای پروفازی مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

<i>pvl</i>	نوع سویه	تعداد (درصد)	پروفاز تایپ						الگوی پروفازی
			SGL	SGFb	SGFa	SGF	SGB	SGA	
+	اکتسابی از جامعه	۳۱ (۱۱)	+	+	+	+	+	+	۱
+	اکتسابی از جامعه	۱۶ (۶)	+	+	+	+	-	+	۲
-	اکتسابی از بیمارستان	۱۹۶ (۷۱)	-	+	+	+	+	-	۳
-	اکتسابی از بیمارستان	۳۶ (۱۳)	-	+	+	+	-	-	۴

غالب معرفی شدند. همچنین، تنها ۱ سویه (۲ درصد) واجد ۱۴ ژن مربوط به عوامل حدت بود (الگوی شماره ۱۲) و در ۲ درصد سویه ها نیز ۱۳ ژن بیماریزایی شناسایی گردید (الگوی شماره ۹). به علاوه، ۱۸ درصد و ۱۰ درصد سویه ها نیز به ترتیب متشکل از ۱۰ و ۱۱ ژن بیماریزایی مختلف بودند.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

به دنبال انجام آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص گردید که از مجموع ۴۷ سویه مورد مطالعه ۶ سویه (۱۳ درصد) واجد کلنیهای مشکی بودند که به عنوان سویه های اسلایم مثبت انتخاب شدند (جدول ۴). همچنین، ۱۸ (۳۸ درصد) و ۲۳ (۴۹ درصد) سویه نیز به ترتیب اسلایم منفی (با تشکیل کلنیهای قرمز روشن) و اسلایم مشکوک (واجد کلنیهای قرمز تیره) بودند. در مجموع از ۲۹ سویه اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک ۴ (۱۴ درصد)، ۱۳ (۴۵ درصد)، ۵ (۱۷ درصد) و ۷ (۲۴ درصد) سویه به ترتیب به عنوان سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط، ضعیف و بیوفیلم منفی، شناسایی شدند.

تعیین وجود عوامل حدت در میان سویه های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

از مجموع ۱۶ ژن مربوط به انتروتوکسینهای مختلف در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی در این مطالعه، ۱۳ ژن در میان سویه ها شناسایی شد که تمامی سویه ها حامل ژنهای *sea*, *sek* و *seq* بودند و ژنهای *sed*, *seh* و *sej* در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد (شکل ۲). همچنین، فراوانی ژنهای *seg* و *sei* نیز محدود به ۴۳ درصد سویه ها بود و کمترین فراوانی نیز مربوط به ژنهای *sel* (۴ درصد)، *seo* (۶ درصد) و *sem* (۹ درصد) بود. علاوه بر این، ژنهای *sak* (۱۰۰ درصد)، *hlb* (۱۰۰ درصد)، *pvl* (۱۰۰ درصد)، *eta* (۵۷ درصد) و *tsst* (۳۴ درصد) نیز در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه شناسایی شدند. از طرف دیگر، بر اساس نتایج حاصل از بررسی ژنهای مربوط به عوامل حدت در میان ۴۷ سویه مورد بررسی در مجموع ۲۹ الگو شناسایی گردید که این الگوها شامل ۱۴-۶ ژن مورد بررسی بودند (جدول ۳) که در این میان الگوهای شماره ۲ (۱۷ درصد) و شماره ۴ (۱۳ درصد) که به ترتیب واجد ۷ و ۸ عامل حدت بودند به عنوان الگوهای

جدول ۳- فراوانی (درصد) الگوهای مربوط به ژنهای عوامل حدت در سویه های CA-MRSA.

الگو	ژنهای بیماریزایی	تعداد	درصد
۱	<i>sea, sek, seq, sak, hlb, pvl</i>	۴	۹
۲	<i>sea, sek, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۸	۱۷
۳	<i>sea, sek, seq, sak, hlb, tst, pvl</i>	۱	۲
۴	<i>sea, sek, seq, sak, hlb, eta, tst, pvl</i>	۶	۱۳
۵	<i>sea, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, eta, tst, pvl</i>	۲	۴
۶	<i>sea, see, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, eta, tst, pvl</i>	۱	۲
۷	<i>sea, seg, sei, sek, sem, sen, seo, seq, sak, hlb, pvl</i>	۲	۴
۸	<i>sea, sek, sel, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۹	<i>sea, see, seg, sei, sek, sel, sen, sep, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۱	۲
۱۰	<i>sea, see, seg, sei, sek, sel, sep, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۱	۲
۱۱	<i>sea, see, seg, sei, sek, sel, sep, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۱۲	<i>sea, see, seg, sei, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۱۳	<i>sea, see, seg, sei, sek, sel, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۱۴	<i>sea, seb, sek, seq, sak, hlb, tst, pvl</i>	۱	۲
۱۵	<i>sea, seb, sek, seq, sak, hlb, tst, eta, pvl</i>	۱	۲
۱۶	<i>sea, seb, sek, sem, sen, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۱۷	<i>sea, seb, seg, sei, sek, sak, hlb, tst, eta, pvl</i>	۱	۲
۱۸	<i>sea, seb, seg, sei, sek, sep, seq, sak, hlb, tst, pvl</i>	۱	۲
۱۹	<i>sea, seb, seg, sei, sek, sep, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۲۰	<i>sea, seb, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۲۱	<i>sea, seb, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۱	۲
۲۲	<i>sea, seb, sec, sek, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۲۳	<i>sea, seb, sec, see, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, tst, pvl</i>	۱	۲
۲۴	<i>sea, seb, see, seg, sei, sek, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۲۵	<i>sea, sec, seg, sek, sel, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۱	۲
۲۶	<i>sea, sec, seg, sek, sep, seq, sak, hlb, pvl</i>	۱	۲
۲۷	<i>sea, sec, seg, sek, sep, seq, sak, hlb, eta, pvl</i>	۱	۲
۲۸	<i>sea, sec, sek, sak, hlb, tst, eta, pvl</i>	۱	۲
۲۹	<i>sea, sec, sek, sak, hlb, eta, pvl</i>	۲	۴

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

نتایج حاصل از آزمون PhP تایپینگ نشان دهنده وجود یازده PhP تایپ متشکل از ۴ تایپ مشترک (CT) و ۷ تایپ منفرد (ST) در میان تمامی ۴۷ سویه مورد بررسی بود (جدول ۴)، که در این میان

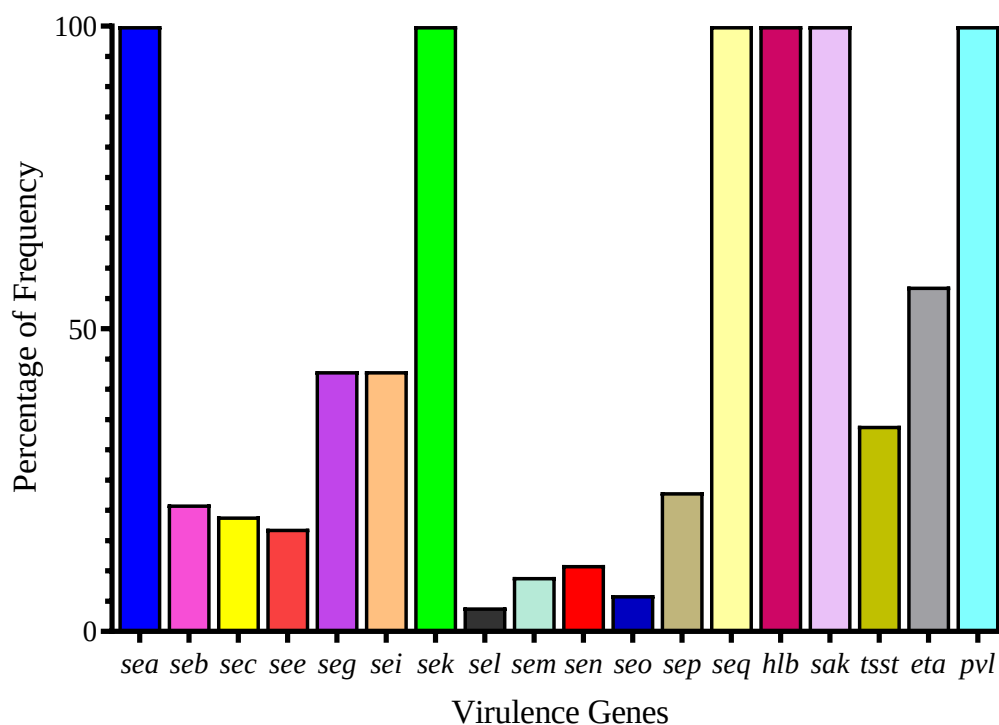
CT2 متشکل از ۲۰ سویه (۴۳ درصد) به عنوان تایپ غالب معرفی گردید و پس از آن فراوانی CT3، CT1 و CT2 به ترتیب محدود به ۳۰ درصد (۱۴ سویه)، ۹ درصد (۴ سویه) و ۴ درصد (۲ سویه) سویه ها بود.

جدول ۴- ویژگیهای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه.

No	Source	Gender	Age	PhP Type	Prophage pattern	Virulence Pattern	SCCmec type	agr type	CR	MTP
1	Wound	Male	36	CT1	1	4	IVa	I	-	Negative
2	Urine	Male	41	CT1	1	25	V	III	+	Strong
3	Sputum	Female	69	CT1	1	14	IVa	I	±	Moderate
4	Wound	Female	31	CT1	1	4	IVa	I	-	Negative
5	Blood	Male	26	ST1	1	9	IVd	I	±	Moderate
6	Wound	Male	44	CT2	1	28	IVa	II	-	Negative
7	Urine	Female	31	CT3	2	24	V	III	+	Strong
8	Wound	Male	30	ST2	2	7	IVd	I	±	Negative
9	Urine	Male	84	CT2	1	10	IVa	III	±	Moderate
10	Wound	Female	38	CT3	1	2	IVc	I	-	Negative
11	Wound	Female	46	CT2	1	2	V	I	-	Negative
12	Urine	Female	22	CT2	1	29	IVa	III	±	Moderate
13	Wound	Male	25	CT3	1	4	IVa	II	+	Negative
14	Sputum	Male	73	CT2	1	21	IVa	III	±	Negative
15	Wound	Male	51	CT2	2	11	V	I	±	Moderate
16	Wound	Female	49	CT2	2	1	IVa	III	-	Negative
17	Sputum	Male	60	CT3	1	29	IVd	I	-	Negative
18	Blood	Female	32	CT3	1	15	IVc	II	±	Moderate
19	Wound	Male	28	CT3	1	18	IVa	I	±	Negative
20	Wound	Male	52	CT3	1	2	IVa	I	±	Moderate
21	Wound	Female	24	ST3	2	7	IVd	I	+	Moderate
22	Wound	Male	36	CT2	2	2	IVc	I	±	Weak
23	Wound	Male	29	CT3	1	5	IVa	I	-	Negative
24	Wound	Male	40	CT2	1	4	V	III	±	Moderate
25	Sputum	Male	70	ST4	2	22	V	III	-	Negative
26	Urine	Male	44	ST5	1	25	IVd	I	±	Moderate
27	Urine	Female	34	ST6	2	12	V	I	-	Negative
28	Sputum	Female	85	CT2	2	2	IVc	III	+	Strong
29	Sputum	Female	39	CT3	1	3	IVa	I	±	Moderate
30	Blood	Male	78	CT2	2	19	V	I	-	Negative
31	Urine	Female	65	CT2	1	2	IVd	II	-	Negative

ادامه جدول ۴. ویژگیهای سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه.

No	Source	Gender	Age	PhP Type	Prophage pattern	Virulence Pattern	SCCmec type	agr type	CR	MTP
32	Blood	Male	32	CT2	2	1	V	III	±	Weak
33	Urine	Female	20	CT3	1	26	IVa	II	±	Weak
34	Sputum	Female	63	CT2	2	20	IVd	II	-	Negative
35	Sputum	Male	80	CT2	2	13	IVc	III	±	Negative
36	Blood	Male	82	CT2	2	1	IVc	I	±	Weak
37	Wound	Female	31	CT2	1	4	V	I	+	Strong
38	Wound	Male	48	CT3	1	27	IVa	I	±	Moderate
39	Wound	Male	30	CT3	1	2	IVa	I	-	Negative
40	Wound	Male	52	ST7	1	5	IVd	I	-	Negative
41	Sputum	Male	41	CT2	1	16	IVc	III	±	Moderate
42	Wound	Female	65	CT3	1	6	IVa	I	-	Negative
43	Wound	Male	28	CT4	1	4	IVd	III	±	Negative
44	Sputum	Male	20	CT4	2	1	V	I	-	Negative
45	Wound	Male	59	CT3	1	2	IVa	I	±	Weak
46	Sputum	Male	73	CT2	1	23	V	I	-	Negative
47	Blood	Male	49	CT2	2	8	V	II	±	Negative



شکل ۲- درصد فراوانی ژنهای مربوط به عوامل حدت در سویه های CA-MRSA.

بحث

در مطالعات مختلف افزایش عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه از ۳/۲ درصد در سال ۲۰۰۸ به ۲۰/۲ درصد در سال ۲۰۱۹، گزارش شده است (۱۴). در این مطالعه فراوانی سویه های اکتسابی از جامعه ۱۷ درصد تعیین گردید که تمامی این سویه ها واجد ژن *pvl* و همچنین حامل پروفاز تایپ *SGA* بودند که در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته در شهر تهران افزایش داشته است (۲، ۴، ۱۳-۹). احتمالاً این افزایش می تواند نشان دهنده حضور کلون تایپهای مشخصی در این بیمارستان باشد که در حال گردش در بخشهای مختلف بیمارستان هستند. این سویه ها اغلب (۴۷ درصد) از نمونه های زخم جداسازی شده بودند که نشان دهنده اهمیت سویه های *PVL* مثبت در ایجاد عفونتهای پوست و بافتهای نرم است که می توانند باعث تخریب نوتروفیلها و همچنین نکروز بافتی شوند. شیوع ۱۰۰ درصدی این ژن در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه نشان دهنده سمیت قوی و خطر بالای بیماریزایی این سویه های مهاجم است (۶).

در این مطالعه، *SCCmec* تایپ III به عنوان فراوانترین تایپ در میان تمامی سویه ها و به عنوان شاخص سویه های اکتسابی از بیمارستان معرفی شد که پیشتر نیز این تایپ به عنوان غالبترین تایپ در سویه های ایرانی معرفی شده بود. همچنین، در هیچکدام از آن مطالعات، در سویه های اکتسابی از بیمارستان (واجد *SCCmec* تایپهای I-III) ژن *pvl* شناسایی نشده است. این در حالی است که در برخی از مطالعات صورت گرفته در جهان اطلاعات متناقضی منتشر شده است. به عنوان مثال، در مطالعه ای در چین در سال ۲۰۲۱ ژن *pvl* در ۴۰/۹ درصد سویه های اکتسابی از بیمارستان و ۵۱/۲ درصد سویه های اکتسابی از جامعه شناسایی گردید (۱۵). علاوه بر این، در گزارشی در سال ۲۰۲۰ مشابه مطالعه حاضر هیچکدام از سویه های اکتسابی از بیمارستان حامل ژن *pvl* نبودند اما تنها ۹۷ درصد از سویه های اکتسابی از جامعه *pvl* مثبت بودند (۱۶). از آنجایی که هر دو دسته سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد ژن *pvl* هستند و بعضاً این فراوانی بسیار نزدیک و مشابه است، لذا ممکن است از این پس استفاده از لوکوسیدین پنتون-ولنتاین به عنوان یک شاخص قابل اعتماد برای شناسایی و تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه چندان منطقی و اصولی نباشد و نیازمند بازنگری این شاخص در آینده می باشد.

در این تحقیق تمامی سویه های اکتسابی از جامعه *pvl* مثبت که تنها واجد *SCCmec* تایپهای IV و V بودند، حامل پروفاز تایپهای *SGA* و *SGL* بوده و این پروفاز تایپ در هیچکدام از سویه های اکتسابی از بیمارستان شناسایی نشد. همانگونه که رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۴ پیشنهاد کردند، با توجه به اینکه لوکوسیدین پنتون-ولنتاین از طریق پروفاز تایپ *SGA* حمل می شود، بنابراین پروفاز تایپ *SGA* در کنار ژن *pvl* می تواند شاخص جدیدی برای سویه های اکتسابی از جامعه باشد (۲). در این مطالعه، فراوانی بالای پروفاز تایپهای مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه مؤید حضور عوامل حدت مختلفی در این سویه ها بود که پس از بررسی مولکولی این عوامل در مجموع ۱۸ ژن بیماریزایی (مشمول بر ۱۳ ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس* و ۵ ژن بیماریزایی) در این سویه ها شناسایی گردید که در مجموع ۱۱ ژن منشأ پروفازی داشتند. تمامی سویه های مورد بررسی اکتسابی از جامعه حامل ژنهای *sea*، *sek*، *seq*، *pvl*، *hly* و *sak* بودند. همچنین، فراوانی ژنهای *seg* و *sei* نیز ۴۳ درصد تعیین شد که حضور همزمان این دو ژن با یکدیگر ناشی از حضور آن ها بر روی یک کلاستر ژنتیکی است (۱۳). با توجه به نقش توکسینهای *Seg* و *Sei* در ایجاد تهوع و استفراغ شدید در بیماران، حضور همزمان و شیوع بالای ژنهای *seg* و *sei* در این مطالعه، امری نگران کننده است (۱۷). از طرف دیگر، علیرغم اینکه در این مطالعه ژنهای *sea*، *sek*، *seq*، *seg*، *sei* و *seb* فراوانترین ژنهای انتروتوکسینی مورد شناسایی بودند اما این نتایج مغایر با سایر مطالعات انجام گرفته در جهان و ایران است که در آنها هیچکدام از ژنها به طور ۱۰۰ درصد در سویه ها شناسایی نشده و بعضاً فراوانی ژنهای *seb* و *sed* بالاتر از سایر ژنهای مورد بررسی بوده است (۲۱-۱۸).

در این مطالعه به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه از ترکیبی از روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد. بر این اساس مشخص شد که ۱۳ درصد سویه ها اسلایم مثبت و ۴۹ درصد نیز

سویه هایی که به عنوان ST1-ST7 طبقه بندی شدند هیچکدام قادر به تولید بیوفیلم قوی نبودند و نکته قابل توجه این بود که سویه شماره ۲۵ (ST4) علیرغم اینکه از نظر تمامی خصوصیات مشابه سویه شماره ۷ (در CT3) بود اما بیوفیلم منفی بود، بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که احتمالاً نوع پروفاز تایپ، تایپهای *SCCmec* و *agr* تأثیری در قدرت تشکیل بیوفیلم سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ندارد.

نتیجه گیری

براساس یافته های حاصل از این مطالعه، سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه از تنوع ژنتیکی قابل توجهی از نظر عوامل حدت و توانایی تشکیل بیوفیلم برخوردار بودند. حضور همزمان چندین ژن مرتبط با حدت در این سویه ها می تواند بیانگر پتانسیل بیماری زایی آن ها باشد، هرچند تفسیر این نتایج باید با در نظر گرفتن محدودیت های مطالعه انجام گیرد. به طور کلی، نتایج حاصل می تواند بر ضرورت پایش مستمر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه و اتخاذ راهبرد های کنترلی مناسب در سطح جامعه و مراکز درمانی تأکید داشته باشد.

محدودیت های مطالعه

با وجود اینکه نتایج حاصل از این مطالعه اطلاعات کاملی در ارتباط با پروفایل ژنی مرتبط با عوامل بیماری زایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه ارائه نموده است اما چند نکته نیز باید مورد توجه قرار گیرد. اولاً تعداد سویه های مورد بررسی در این مطالعه بسیار محدود (۴۷ سویه) است و برای نتیجه گیری دقیقتر نیاز به بررسی تعداد بیشتری از بیمارستانها در شهر تهران و در سراسر کشور است. دوماً، حضور یک ژن بیماری زایی الزاماً به معنای بیان آن و در نهایت ایجاد بیماری نیست، بنابراین جهت اطلاع دقیق از قدرت بیماری زایی این سویه ها بررسی بیان این ژنها با استفاده از آزمون Real-Time PCR کاملاً ضروری به نظر می رسد. سوماً، علیرغم دقت بالای تکنیک *PHP typing* جهت افتراق سویه های مختلف، به دلیل استوار بودن این تکنیک بر دسته بندی بر اساس خصوصیت های فنوتایپی سویه ها، جهت تعیین دقیق کلونالیتی

اسلایم مشکوک بودند. همچنین، در نهایت از مجموع ۲۹ سویه منتخب ۷۶ درصد قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. گزارشات متفاوتی از فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در ایران در اختیار است که در آن مطالعات این فراوانی در بازه ۶۷-۹۴ درصد متفاوت بوده است (۲۷-۲۲). علاوه بر این، با توجه به اینکه نتایج حاصل از آزمونهای کمی و کیفی در این مطالعه و سایر مطالعات متفاوت بوده اند، بنابراین می توان پیشنهاد کرد که جهت تعیین قطعی سویه های مولد بیوفیلم می توان از روش کمی میکروتیتر پلیت که روشی اختصاصی و با حساسیت بالا است می توان استفاده کرد و روش کیفی نیز با توجه به حساسیت و اختصاصیت پایینتر می تواند جهت غربالگری اولیه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد اسلایم و بیوفیلم مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج آزمون *PHP* تایپینگ نشان داد که تمامی ۴۷ سویه مورد بررسی محدود به یازده *PHP* تایپ متشکل از چهار *CT* و هفت *ST* بودند که نشان دهنده تنوع نسبتاً پایین *PHP* تایپها در مطالعه حاضر در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته است (۲، ۱۰، ۱۳، ۲۲، ۲۹). بر این اساس مشخص گردید که سویه های حاضر در هر *CT* از نظر وجود الگوهای پروفازی، الگوهای بیماری زایی، تشکیل بیوفیلم، *SCCmec* تایپها و *agr* تایپها کاملاً متفاوت بودند و هیچگونه ارتباط و انطباقی بین سویه های حاضر در یک تایپ مشترک از این نظر وجود نداشت و تنها دو سویه حاضر در *CT4* علیرغم تفاوت در تمامی خصوصیتها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. همچنین، سویه های حاضر در *CT1* و *CT4* تنها حامل *agr* تایپهای I و III بودند اما *CT1* تنها واجد الگوی پروفازی ۱ بود در حالیکه هر دو الگوی پروفازی ۱ و ۲ در *CT4* مشاهده شد. علاوه بر این، از مجموع ۱۴ سویه حاضر در *CT3*، ۱ سویه (شماره ۷) ویژگیهای متفاوتی را نسبت به سایر سویه ها داشت و واجد *agr* تایپ III، *SCCmec* تایپ V و الگوی پروفازی ۲ بود و تنها سویه مولد بیوفیلم قوی در این *CT* بود که کاملاً نسبت به سایر سویه های این تایپ متمایز بود، در حالیکه تنوع بسیار بالایی در سویه های حاضر در *CT2* مشاهده شد. از طرف دیگر، سویه های متعلق به *CT2* و *CT3* به ترتیب از نمونه های زخم، خلط، ادرار و خون جداسازی شدند، در حالیکه هیچکدام از سویه های *CT1* و *CT4* از نمونه های خون جداسازی نشده و نمونه های زخم و خلط بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. به علاوه،

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه اصفهان است که با کد اخلاق شماره IR.UI.REC.1403.110 به انجام رسیده است.

تداخل منافع

هیچگونه تعارض منافی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

سویه ها استفاده از تکنیکهای مولکولی استاندارد مانند rep-Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)، PCR و Multilocus sequence typing (MLST) نیز توصیه می شود.

REFERENCE

1. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*. 2017;21(1):211.
2. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(6):796–804.
3. Rahimi F, Khashei S. Characteristics of prophage patterns and virulence gene profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus 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. 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.
5. Zhao R, Wang X, Wang X, Du B, Xu K, Zhang F, et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bloodstream infections in southern China. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:1008052.
6. Jiang J-H, Cameron DR, Nethercott C, Aires-de-Sousa M, Peleg AY. Virulence attributes of successful methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Clinical Microbiology Reviews*. 2023;36(4):e00148–22.
7. Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, et al. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse–Friderichsen syndrome in children. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(12):1245–51.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2023.
9. Rahimi F, Qasemi A. Frequency of biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran during 2020-2022. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2023;28(100):43-56.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. Galper E, Bdolah-Abram T, Megged O. Assessment of infections rate due to community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and evaluation of risk factors in the paediatric population. *Acta Paediatrica*. 2021;110(5):1579–84.
15. Bai Z, Chen M, Lin Q, Ye Y, Fan H, Wen K, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and molecular characterization in Quanzhou, China. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:629681.
16. Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, Khan S. Understanding the fight against resistance: hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vs. community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cureus*. 2020;12(6):e8867.
17. Denayer S, Delbrassinne L, Nia Y, Botteldoorn N. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins*. 2017;9(12):407.
18. Ler SG, Lee FK, Gopalakrishnakone P. Trends in detection of warfare agents: detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. *Journal of Chromatography A*. 2006;1133(1-2):1–12.
19. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*. 2010;2(8):2177–97.
20. Song Z, Gu F-F, Guo X-K, Ni Y-X, He P, Han L-Z. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* causing childhood pneumonia in Shanghai. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:455.
21. El-Baz R, Rizk DE, Barwa R, Hassan R. Virulence characteristics and molecular relatedness of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* harboring different staphylococcal cassette chromosome *mec*. *Microbial Pathogenesis*. 2017;113:385–95.
22. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized children. *Iranian Journal of Pathology*. 2015;10(4):258–64.
23. Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Kodori M, Houri H, Maleki DT, et al. Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020;23(5):691.
24. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016 *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2019;24(86):26–35.
25. Mostafavi NS, Mohaghegh F, Rahimi F. Phenotypic comparison of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Tehran and Isfahan. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2020;25(91):15–21.
26. Mostafavi NS, Rahimi F. Frequency of agr types and resistance to aminoglycosides among biofilm producing *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary infection in Isfahan during 2017. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2022;27(97):17-26.
27. Rahimi F. Frequency of methicillin resistant *S. aureus* strains isolated from patients with diabetic foot infection in Isfahan during 2021. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2022;27(99):1–12.
28. 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.
29. Rahimi F, Khashei S, Katouli M. Prevalence, diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2024;19(3):e142081.