

Isolation and Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Based on *hla*, *lukED*, *sei*, and *hlg* Virulence Genes in Patients with Diabetic Foot Infection in Mazandaran Province

Hossein Rasouli, Esmail Ghorbanalinezhad

Department of Microbiology, School of Biology Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/07/26

Accepted: 2017/10/25

Available online: 2018/02/19

Article Subject:

Medical Microbiology

IJMM 2018; 11(6): 192-202

Corresponding author:

Esmail Ghorbanalinezhad
Department of Microbiology,
School of biology sciences,
Islamic azad university of
Tonekabon branch, Tonekabon,
Iran

Tel: 09111962098

Email: essmamir@yahoo.com



Abstract

Background and Aims: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is the most common bacterial agent of diabetic foot Infection (DFI). The Virulence factors of this bacterium increases the severity of the degree of wound infection, and if not treated promptly, results in lower limb amputation and death of the affected patients. The aim of this study was to isolate methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carries the *mecA* gene and to detect 4 Virulence genes *hla*, *lukED*, *sei* and *hlg* from patients with diabetic foot infection in order to evaluate their role in severity of infection.

Materials and Methods: 30 cases of diabetic foot infections in Mazandaran province were collected from pus drainage and *Staphylococcus aureus* was purified according to culture characteristics and biochemical tests. The molecular evaluation of the isolates after DNA extraction was performed with five pairs of specific primers of intended genes, by PCR method.

Results: Of the 30 patients, 14 isolates (46.6%) of *S. aureus* were isolated and identified. Each 14 samples contained *mecA* gene and the frequency of *hla*, *lukED*, *sei* and *hlg* genes in isolates was 100%, 100%, 71.4% and 64.2%, respectively.

Conclusions: Identification of these 4 genes with the *mecA* gene in *S. aureus* isolated from diabetic foot Infection can be an effective and reliable genetic marker for diagnosis of foot infection in diabetic patients. To prevent amputation, diagnosis of infection by PCR method and appropriate timely antibiotic therapy are required for Diabetic patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Methicillin Resistance, Virulence Genes, Diabetic Foot Infection

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Rasouli H, Ghorbanalinezhad E. Isolation and Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Based on *hla*, *lukED*, *sei*, and *hlg* Virulence Genes in Patients with Diabetic Foot Infection in Mazandaran Province. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) :192-202



جداسازی و تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بر پایه بیان ژن‌های بیماری‌زایی *hlg* و *sei lukED*، *hla* از عفونت پای بیماران دیابتی در استان مازندران

حسین رسولی، اسمعیل قربانعلی نژاد

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین شایع‌ترین عامل باکتریایی عفونت زخم پای بیماران دیابتی (DFI) است. فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری شدت درجه عفونت زخم را افزایش می‌دهد و در صورت درمان نشدن به‌موقع منجر به قطع عضو اندام‌های تحتانی و مرگ بیماران مبتلا می‌شود. هدف این پژوهش، جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن *mecA* و شناسایی ۴ ژن ویبرولانس *hla*، *sei lukED* و *hlg* از جدایه‌های عفونت پای بیماران دیابتی به‌منظور ارزیابی نقش آن‌ها در میزان شدت عفونت است.

مواد و روش کار: از ترشحات چرک ۳۰ بیمار مبتلا به عفونت پای دیابتی در استان مازندران نمونه‌گیری شد و استافیلوکوکوس اورئوس براساس ویژگی‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی خالص‌سازی شد. ارزیابی مولکولی جدایه‌ها پس از استخراج DNA، با ۵ جفت پرایمر اختصاصی ژن‌های مقصود به روش PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۳۰ بیمار ۱۴ ایزوله (۴۶/۶٪) استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی و شناسایی شد. هر ۱۴ نمونه حامل ژن *mecA* بودند و فراوانی ژن‌های *hla*، *sei lukED* و *hlg* در جدایه‌ها به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۷۱/۴٪ و ۶۴/۲٪ به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: شناسایی این ۴ ژن به همراه ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از زخم پای دیابتی می‌تواند مارکر ژنتیکی مؤثر و قابل اعتمادی در تشخیص درجه‌بندی عفونت پای بیماران دیابتی باشد. تشخیص عامل عفونت با روش PCR و درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و به‌موقع، در جلوگیری از قطع عضو بیماران دیابتی ضروری است.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به متی‌سیلین، ژن‌های بیماری‌زایی، عفونت پای دیابتی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

میکروبیولوژی پزشکی

IJMM1396;11(6): 192-202

نویسنده مسئول:

اسمعیل قربانعلی نژاد

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تلفن: ۰۹۱۱۹۶۲۰۹۸

پست الکترونیک:

essmamir@yahoo.com

مقدمه

بیماری غدد در جهان و مسئول ۴ میلیون مرگ در سال است. شیوع آن در سال ۱۹۸۵، ۳۰ میلیون نفر، در سال ۲۰۰۸، ۲۳۰ میلیون نفر، در سال ۲۰۱۰، ۲۸۵ میلیون نفر بوده و در سال ۲۰۳۰ میلادی این آمار به ۴۳۹ میلیون نفر افزایش خواهد یافت. با توجه به آمار و روند رو به تزاید بیماری دیابت در جهان، سازمان بهداشت جهانی (WHO) آن را به‌عنوان یک اپیدمی نهفته اعلام کرد. این بیماری پنجمین علت مرگ‌ومیر و اولین علت نارسایی مزمن کلیه، قطع پای غیر تروماتیک و نابینایی در بسیاری از جوامع است (۲). زخم پا عارضه‌ای شایع در بیماران دیابتی است

دیابت قندی نوعی اختلال متابولیک شایع است که با فنوتیپ هیپرگلیسمی بروز می‌کند. برحسب اتیولوژی دیابت، عوامل دخیل در بروز هیپرگلیسمی، قطع ترشح انسولین (دیابت نوع اول)، کاهش ترشح انسولین و یا غیر فعال شدن رسپتورهای سطح سلول در برابر انسولین موجود در خون (دیابت نوع دوم) است که متعاقباً منجر به کاهش جذب گلوکز از سوی سلول‌ها می‌شود. تغییرات پاتوفیزیولوژیک ثانویه در ارگان‌های متعدد بدن ناشی از این اختلال متابولیک، مشکلات فراوانی را برای فرد دیابتی و سیستم بهداشتی جامعه به همراه دارد (۱). دیابت شایع‌ترین

عضلات صاف عروق خونی را مختل می‌کند. این سم برای بسیاری از سلول‌ها از جمله گلبول‌های قرمز، لکوسیت‌ها، سلول‌های کبدی، پلاکت‌ها و سلول‌های کشت‌شده، سمی است و باعث ایجاد منافذی با قطر ۱ تا ۲ نانومتر در غشاء سلول می‌شود. آلفا توکسین یک سم منفذزا در لکوسیت‌ها است و به‌عنوان یکی از عوامل مهم ویرولانسی استافیلوکوکوس اورئوس محسوب می‌شود (۱۱). گاماهمولیزین از سوی ژن *hlg* کد می‌شود. این ژن از یک جایگاه واحد، واقع در قطعه کروموزومی ۴/۵ کیلوبازی (ScaI-digested chromosomal fragment) رونویسی می‌شود، قادر به تخریب گلبول‌های قرمز انسان، گوسفند، خرگوش و همچنین سلول‌های لنفوبلاستیک انسان است و همانند اجزاء خانواده لکوسیدین شامل دو پروتئین S و F است که به ترتیب HlgB و HlgA نام‌گذاری شده‌اند (۱۲). *sei* ژن کدکننده انترتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس است. این ویرولانسی فاکتورها را سوپر آنتی‌ژن می‌نامند. این سموم توانایی برای واکنش با مولکول MHC کلاس ۲ و پرولیفراسیون وسیع لنفوسیت‌های T و در نهایت آسیب ناشی از انتشار مقادیر بالایی از سایتوکاین‌ها را دارند. از طرفی توکسین‌های این خانواده همگی به‌طور افقی و از طریق عناصر جهنده ژنتیکی منتقل می‌شوند (۱۳). هدف از این مطالعه، جداسازی و تشخیص باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و شناسایی سویه‌های واجد ژن‌های کدکننده همولیزین آلفا (*hla*)، همولیزین گاما (*hlg*)، لکوسیدین E/D (*lukED*) و انترتوکسین سروتایپ i (*sei*) از عفونت زخم پای بیماران دیابتی (با درجه عفونی ۲ تا ۵ براساس سیستم طبقه‌بندی واگنر)، به کمک تکنیک‌های کشت، تست‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق آزمایشی و تجربی که از مهر ماه ۱۳۹۴ تا مرداد ماه ۱۳۹۵ انجام شد، با مراجعه به بخش جراحی بیمارستان امام خمینی شهر ساری و بخش عفونی بیمارستان رازی شهر قائمشهر (جامعه هدف)، از ۳۰ بیمار مبتلا به عفونت زخم دیابتی (DFI) با درجه ۲ تا ۵ واگنر (جامعه نمونه) نمونه‌گیری شد. افراد به روش غیر تصادفی و سهمیه‌ای و با در نظر گرفتن مهمترین ویژگی آنها یعنی ابتلا به عفونت پای دیابتی (DFI) انتخاب شدند. معیار ورود و خروج نمونه‌ها در مطالعه عفونت پای بیماران مبتلا به دیابت بوده است. به‌منظور رعایت اصول اخلاقی و امانت و صداقت در پژوهش، ضمن هماهنگی‌های لازم، از بیماران در نظر گرفته شده برای نمونه‌گیری کسب اجازه شد.

که شیوع آن بیش از ۲۵٪ است. سالانه بیش از ۱ میلیون نفر از افراد دیابتی، پای خود را به‌علت این بیماری از دست می‌دهند. یعنی هر ۳۰ ثانیه یک قطع پای ناشی از دیابت اتفاق می‌افتد (۳). اغلب زخم‌ها عفونی می‌شوند و پیشرفت عفونت به سمت بافت نرم و استخوان عمدتاً یک فاکتور مهم برای قطع اندام‌های تحتانی است (۴). زخم پای بیماران دیابتی می‌تواند خود را به شکل سلولیت، میوزیت، آبسه، فاشییت نکروزان، آرتریت عفونی، تندنیت و استئومیلیت نشان دهد و سرانجام منجر به آمپوتاسیون اندام تحتانی شود (۵).

استافیلوکوکوس اورئوس علت شایع عفونت زخم پای دیابتی است. این باکتری یکی از علل بسیار شایع عفونت‌های خون، عفونت‌های پوستی و زخم، استئومیلیت، اندوکاردیت، پنومونی و عفونت‌های عمل جراحی و از دلایل عمده عفونت‌های بیمارستانی است (۶). در دهه ۱۹۶۰ بلافاصله پس از معرفی متی‌سیلین، سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم نسبت به این دارو ظاهر شدند و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) نام گرفتند. علت بروز این نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حضور ژن کروموزومی *mecA* در این سویه‌ها است. این مقاومت از سوی ترادفی از ژن‌های موجود در ناحیه‌ای از کروموزوم استافیلوکوکوس اورئوس، به نام SCCmec کد می‌شود (۷). ۸ تایپ SCCmec (تایپ I تا VIII) شامل کلاس‌های مختلف *mec gene complex* و *ccr gene complex* شناسایی شده است. SCCmec تایپ‌های I، IV، V، VI و VII باعث مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود و تایپ‌های (II,III) مقاومت چندگانه را با اضافه شدن ژن‌های مقاومت برعلیه دارو ایجاد می‌کنند (۸، ۹). استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری بیماری‌زای ذاتی انسانی است و ژن‌های متعدد کدکننده فاکتورهای ویرولانسی دارد. این ژن‌ها بر روی کروموزوم یا عناصر جهنده ژنتیکی قرار گرفته‌اند. این فاکتورها موجب کلونیزاسیون باکتری در میزبان، فرار از مکانیسم‌های دفاعی میزبان، تهاجم به پوست آسیب‌دیده و موکوس و انتشار در بدن می‌شوند (۱۰). همولیزین‌ها نظیر آلفا همولیزین و گاما همولیزین و خانواده لکوسیدین بر غشاء سلول اثرات سایتولیتیک یا تخریب‌کننده دارند. آلفا همولیزین یک توکسین پلی‌پپتیدی است که از سوی ژن *hla* کد می‌شود. این توکسین خاصیت القاکنندگی لیز یا تخریب طیف وسیعی از سلول‌ها (به‌طور عمده پلاکت‌ها و منوسیت‌ها) را دارد، که از سوی بسیاری از گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود و آلفا همولیزین

استافیلوکوکوس اورئوس ساب کالچر کردیم و پس از طی دوره انکوباسیون، کلنی‌های تک و خالص این باکتری ظاهر شدند. به منظور تأیید جداسازی و خالص کردن باکتری از یک نمونه پلی میکروبیال در محیط کشت اختصاصی ایزوله‌های جدا شده با روش استاندارد میکروبیولوژی، نظیر رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی از قبیل تست همولیز، تست کاتالاز، تخمیر مانیتول، تست کواگولاز، تست DNase پس از ارزیابی، تأیید شدند. ارزیابی ژنوتیپی جدایه‌ها براساس ژن‌های ویروانس *hla*، *hlg sei*، *lukED* و ژن مقاومت به متی‌سیلین (*mecA*) با روش PCR و استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مذکور انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. جفت پرایمرهای استفاده شده در پژوهش حاضر. منابع: ۱ (۱۴)، ۲ (۱۵)، ۳ (۱۶)، ۴ (۱۷) و ۵ (۱۸)

Gene	primer	Nucleotid sequence	Size (pb)	Function
^۱ <i>Hlg</i>	F R	5'-CCA ATC CGT TAT TAG AAA ATG C-3' 5'-CCA TAG ACG TAG CAA CGG AT-3'	۹۳۷	δ-Hemolysin leukocidin
^۲ <i>Sei</i>	F R	5'-CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT AC-3' 5'-CAG GCA GTC CAT CTC CTG-3'	۴۶۶	Enterotoxin-i
^۳ <i>lukED</i>	F R	5'-TGA AAA AGG TTC AAA GTT GAT ACG AG-3' 5'-TGT ATT CGA CAA AAG CAG TGC A-3'	۲۶۹	Leukocidin
^۴ <i>Hla</i>	F R	5'-CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG-3' 5'-CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T-3'	۲۰۹	α-Hemolysin leukocidin
^۵ <i>mecA</i>	F R	5'-GTG GAA TTG GCC AAT ACA GG-3' 5'-TGG ATA GCA GTA CCT GAG CC-3'	۵۷۵	Methicillin Resistance (PBP2a)

حجم ۲۵ برای DNA هریک از ایزوله‌ها انجام گرفت. میکس اکنش PCR شامل مسترمیکس μL ۱۲/۵، پرایمر فوروارد و ریورس هرکدام μL ۱، نمونه DNA استخراج شده μL ۴/۵، آب مقطر دیونیزه μL ۶ بوده است.

برای انجام PCR از دستگاه Thermal cycler (اپندرف، آلمان) استفاده شد.

نمونه‌گیری در شرایط آسپتیک با برداشت یک سوآب از ترشحات چرک و عفونت قسمت زخم پا و تلقیح به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت پایه نوترینت براث انجام شد. نمونه‌ها برای بررسی به آزمایشگاه انتقال یافتند. به منظور غنی‌سازی از محیط کشت بلاد آگار (شرکت مرک، آلمان) و برای خالص‌سازی باکتری، از محیط کشت کروم آگار (شرکت مرک، آلمان) اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد.

با توجه به اینکه برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس در کروم آگار قادر به ایجاد کلنی‌های آبی یا سفید یا بی‌رنگ هستند، لذا به منظور خالص‌سازی نهایی ایزوله در نظر گرفته شده، کلنی‌های تک‌صورتی یا ارغوانی رنگ را مجدداً بر روی کروم آگار اختصاصی

استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از بافر استخراج DNA- IraiZol محصول کمپانی رنا (RNA) بیوتک زیست فناوران انجام شد. آنالیز کمی DNA استخراج شده با دستگاه Biophotometer صورت گرفت. آنالیز کیفی DNA استخراج شده به روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و ظهور باندها در دستگاه Transluminator ارزیابی شد. بعد از آماده‌سازی پرایمرهای اختصاصی و تهیه غلظت 10 pmol ، واکنش PCR در

جدول ۲. سیکل دمایی واکنش PCR ژن‌های مطالعه شده در این تحقیق

Monoplex Gene	Temperature(°C) / Time					Cycle No.
	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	Final extension	
<i>Hlg</i>	۹۵/۵min	۹۴/۴۰sec	۵۵/۳۵sec	۷۲/۶۰sec	۷۲/۱۰min	۳۵
<i>Sei</i>	۹۵/۵min	۹۴/۴۰sec	۵۸/۳۵sec	۷۲/۶۰sec	۷۲/۱۰min	۳۵
<i>Hla</i>	۹۵/۵min	۹۴/۳۰sec	۵۹/۳۰sec	۷۲/۶۰sec	۷۲/۱۰min	۳۵
<i>lukED</i>	۹۵/۵min	۹۵/۱۲۰sec	۵۸/۶۰sec	۷۲/۶۰sec	۷۲/۱۰min	۳۵
<i>mecA</i>	۹۵/۵min	۹۴/۴۰sec	۵۹/۳۰sec	۷۲/۶۰sec	۷۲/۱۰min	۳۵

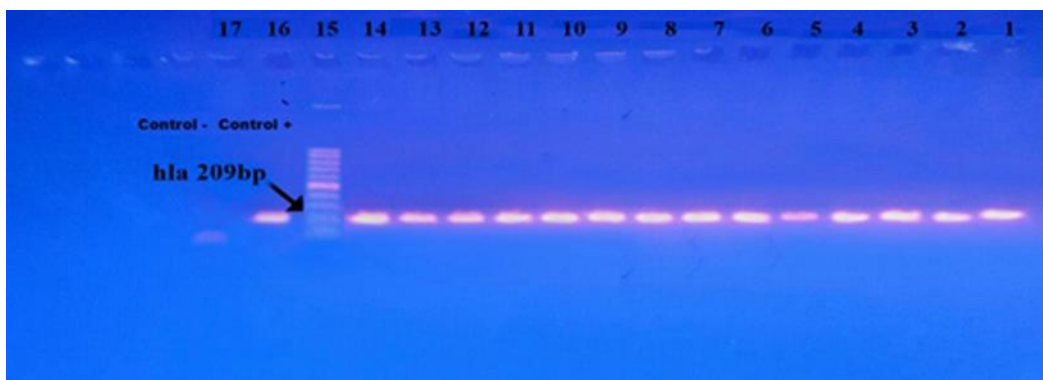
آنالیز کیفی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام گرفت و در نهایت باندهای اختصاصی با دستگاه Transluminator ارزیابی شد. محصولات PCR به منظور توالی‌یابی و تأیید قطعی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. پس از تعیین توالی و بلاست آن در سایت NCBI تطابق و هم‌پوشانی ژنی جدایه‌ها با سایر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، به میزان ۱۰۰٪ به دست آمد.

یافته‌ها

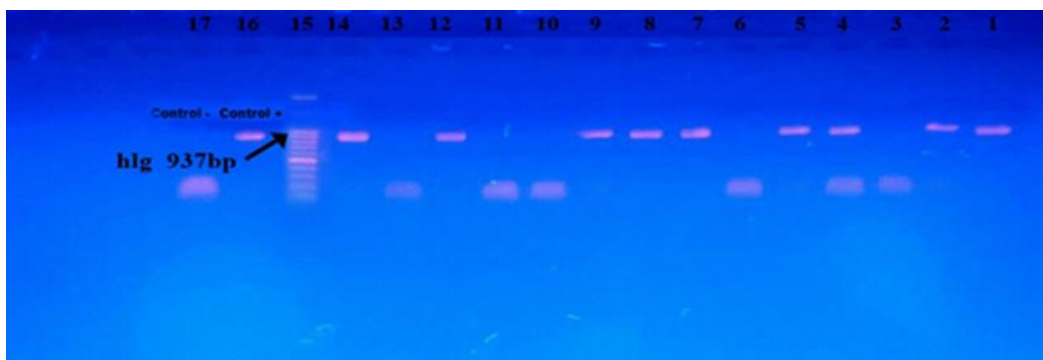
از ۳۰ نمونه جمع‌آوری شده از ترشحات چرک بیماران مبتلا به عفونت شدید زخم پای دیابتی، براساس نتایج تست‌های افتراقی میکروپشناسی ۱۴ نمونه (۴۶/۶٪) استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی و شناسایی شدند. هر ۱۴ نمونه در محیط بلادآگار کلنی‌های زرد طلایی رنگ داشتند. با خالص‌سازی ایزوله‌ها در محیط اختصاصی کروم آگار، کلنی‌های صورتی تا ارغوانی رنگ ظاهر شدند. جدایه‌ها کوکسی‌های خوشه‌ای گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، DNase مثبت، همولیز β در محیط بلادآگار داشته و قادر به تخمیر مانیتول بودند. نتایج حاصل از

نتایج حاصل از PCR ژن *hla*

ژنوم ۱۰۰٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش‌شده در این تحقیق حاوی ژن *hla* بودند. قطعه ژنی تکثیرشده با پرایمر اختصاصی باند ۲۰۹ bp را نشان داد.



شکل ۱. آنالیز الکتروفوریتیک محصول PCR برای ژن *hla* چاهک‌های ۱ تا ۱۴ نمونه‌های بیماران، چاهک ۱۵ لدر، چاهک ۱۶ کنترل مثبت (جدول ۳) و چاهک ۱۷ کنترل منفی



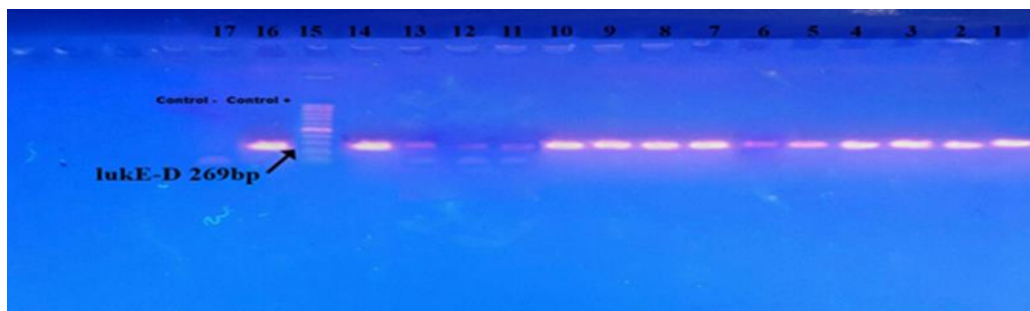
شکل ۲. آنالیز الکتروفوریتیک محصول PCR برای ژن *hlg* چاهک‌های ۱ تا ۱۴ نمونه‌های بیماران، چاهک ۱۵ لدر، چاهک ۱۶ کنترل مثبت (جدول ۳) و چاهک ۱۷ کنترل منفی

نتایج حاصل از PCR ژن *hlg*

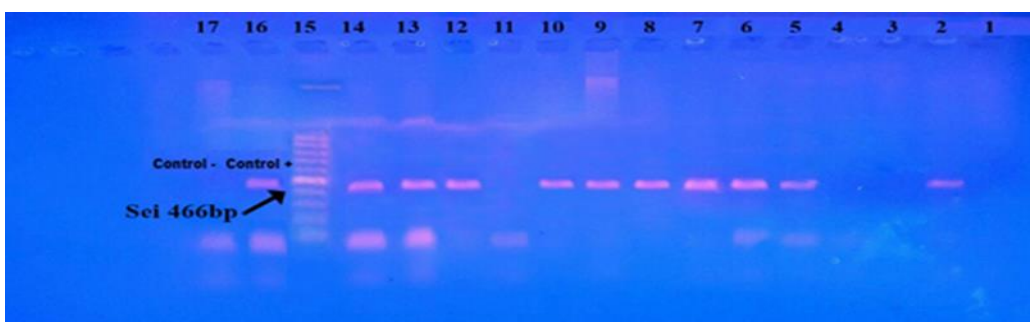
ژنوم ۹ نمونه (۶۴/۲٪) از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش شده در این تحقیق حاوی ژن *hlg* بودند. قطعه ژنی تکثیر شده با پرایمر اختصاصی باند ۹۳۷ bp را نشان داد.

نتایج حاصل از PCR ژن *lukED*

ژنوم ۱۰۰٪ از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش شده در این تحقیق حاوی ژن *lukED* بودند. قطعه ژنی تکثیر شده با پرایمر اختصاصی باند ۲۶۹ bp را نشان داد.



شکل ۳. آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن *lukED* چاهک های ۱ تا ۱۴ نمونه‌های بیماران، چاهک ۱۵ لدر، چاهک ۱۶ کنترل مثبت (جدول ۳) و چاهک ۱۷ کنترل منفی



شکل ۴. آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن *Sei* چاهک ۱ تا ۱۴ نمونه‌های بیماران، چاهک ۱۵ لدر، چاهک ۱۶ کنترل مثبت (جدول ۳) و چاهک ۱۷ کنترل منفی

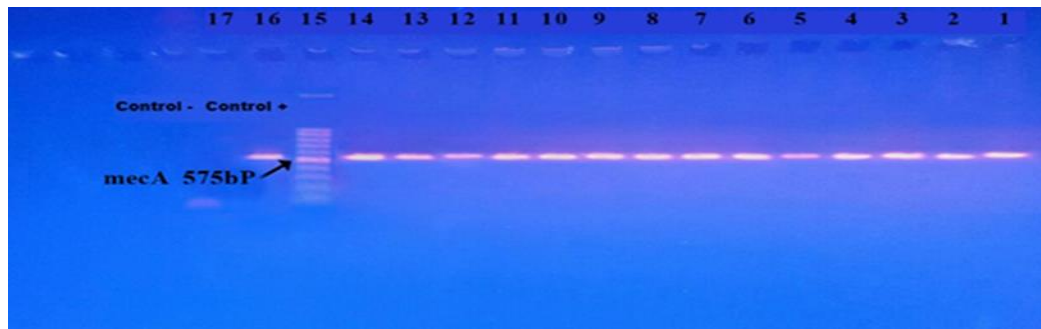
نتایج حاصل از PCR ژن *Sei*

ژنوم ۱۰ نمونه (۷۱/۴٪) از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش شده در این تحقیق حاوی ژن *Sei* بودند. یعنی (۷۱/۴٪) ژن *Sei* داشتند. قطعه ژنی تکثیر شده با پرایمر اختصاصی باند ۴۶۶ bp را نشان داد.

نتایج حاصل از PCR ژن *mecA*

ژنوم ۱۰۰٪ از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش شده در این تحقیق حاوی ژن *mecA* بودند.

قطعه ژنی تکثیر شده با پرایمر اختصاصی باند ۵۷۵ bp را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است نمونه‌های کنترل مثبت جدایه‌های مرحله اول مطالعه موردی در ابتدای پژوهش بوده که پس از تشخیص اولیه، با تعیین توالی (Sequencing) و تأیید نهایی به‌عنوان کنترل مثبت برای هر ژن استفاده شد (جدول ۳)



شکل ۵. آنالیز الکتروفوریتیک محصول PCR برای ژن *mecA* چاهک های ۱ تا ۱۴ نمونه های بیماران، چاهک ۱۵ لدر، چاهک ۱۶ کنترل مثبت (جدول ۳) و چاهک ۱۷ کنترل منفی

جدول ۳. نمونه های کنترل مثبت برای استفاده در شناسایی مولکولی جدایه ها

Sequences producing significant alignments:				
Select for downloading or viewing reports	Description	Query cover	Ident	Target Gene
Select seq gb CP017094.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain 2148.CO1, complete genome	% 100	% 100	<i>hla</i>
Select seq gb CP017094.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain 2148.CO1, complete genome	% 100	% 100	<i>hlg</i>
Select seq gb CP017094.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain 2148.CO1, complete genome	% 100	% 100	<i>LukED</i>
Select seq gb CP022291.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain 5464. CO1, complete genome	% 100	% 100	<i>Sei</i>
Select seq gb CP016863.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain 1625.CO1, complete genome	% 100	% 100	<i>mecA</i>

hlg بیشتر است. همچنین ژن های *hla* و *lukE/D* در تمام عفونت های با درجه بندی ۱ تا ۵ یافت شد (جدول ۴).

میزان فراوانی ژن های ویروالانس استافیلوکوکوس اورئوس در جدایه های عفونت پای دیابتی نشان داد که هرچه درجه عفونت بر معیار درجه بندی واگنر بالاتر باشد، میزان فراوانی ژن

جدول ۴. میزان فراوانی ژن های ویروالانس در عفونت زخم پای دیابتی با درجه واگنر (۲ تا ۵)

ژن های ویروالانس					درجه واگنر	کد بیمار
<i>hlg</i>	<i>Sei</i>	<i>lukED</i>	<i>hla</i>	<i>mecA</i>		
-	-	+	+	+	۲	۳
-	-	+	+	+	۲	۱۱
-	+	+	+	+	۳	۶
-	+	+	+	+	۳	۱۰
-	+	+	+	+	۳	۱۳
+	-	+	+	+	۴	۱
+	-	+	+	+	۴	۴
+	+	+	+	+	۴-۵	۲
+	+	+	+	+	۴-۵	۵
+	+	+	+	+	۴-۵	۷
+	+	+	+	+	۴-۵	۸
+	+	+	+	+	۴-۵	۹
+	+	+	+	+	۴-۵	۱۲
+	+	+	+	+	۴-۵	۱۴

اورئوس ۴۶/۶٪ از ایزوله‌های بالینی جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی را به خود اختصاص داد. واکنش PCR حضور ژن‌های ویروالانس *hla*، *lukED* و همچنین ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی *mecA* را به میزان ۱۰۰٪ و ژن‌های *Sei* و *hlg* هر کدام به ترتیب ۷۱/۴٪ و ۶۴/۲٪ نشان داد. میزان فراوانی کمتر ژن‌های *Sei* و *hlg* نسبت به سایر ژن‌های مطالعه شده در ایزوله‌های مقاوم به متی-سیلین، حاکی از آن است که بیان این دو ژن در ایزوله‌ها به همراه بیان سایر ژن‌های مطالعه شده منجر به وسعت و یا شدت عفونت با درجه‌های واگنر بالاتری در زخم پای بیماران دیابتی می‌شود و آن‌دسته از ایزوله‌هایی که فاقد این دو ژن هستند، ویروالانس کمتری نسبت به بقیه ایزوله‌ها دارند. در نتیجه عفونت‌های حاصل از آن نیز از شدت عفونت با درجات واگنر پایین‌تری برخوردار هستند. با توجه به نتایج این مطالعه، از نظر آماری رابطه معنی‌داری در ارتباط با ژن‌های ویروالانس / استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (خصوصاً به واسطه تولید عوامل ویروالانسی که اثرات سینرژیک *hlg*) دارند) و درجه شدت عفونت زخم پای بیماران دیابتی (براساس طبقه‌بندی واگنر) وجود دارد. نتایج حاصل از توالی‌یابی ضمن تأیید نتایج آزمون کشت و PCR، به واسطه هم‌پوشانی ژنی این ایزوله‌های بالینی با سایر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه را تأیید کرد. اختلالات ایمنولوژیکی مثل کاهش لکوسیت‌های چند هسته‌ای، نقص سیستم ایمنی سلولی و همورال، کاهش پاسخ‌های التهابی (سیستمیک و موضعی) به عفونت، نوروپاتی محیطی یا نارسایی شریانی، بیماران دیابتی که زخم پا دارند و یا مستعد زخم هستند را در معرض خطر قابل توجهی از کلونیزاسیون میکروارگانسیم‌ها و عفونت‌های پوست و بافت نرم، گانگرن، استئومیلیت و در نهایت قطع عضو و مرگ و میر قرار می‌دهد (۱۹).

عوامل ویروالانس متنوع، توانایی ایجاد گسترش مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، حضور در فضاهای بیمارستان و جامعه، آن‌را از نظر بالینی در میان بیشتر باکتری‌های مهم دیگر متمایز می‌کند (۲۰). در مطالعه‌ای Sotto و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور فرانسه پتانسیل بیماری‌زایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زخم پای دیابتی را به منظور تشخیص زخم‌های عفونی از غیر عفونی بررسی کردند. آنها نشان دادند که از میان ژن‌های ویروالانس، مناسب‌ترین ترکیب به دست آمده از رگرسیون لجستیک، ترکیب ۵ ژن *Sei*، *sea*، *lukED*، *hlgv* و *cap8* هستند. این نشانگرها برای تشخیص زخم‌های غیر

نتایج نشان می‌دهد حضور ژن‌های مطالعه شده در زخم‌های با درجه بالاتر از ۴، ۱۰۰٪، در زخم‌های با درجه ۴، بین ۸۰٪ تا ۱۰۰٪، در زخم‌های با درجه ۳، ۸۰٪ و در زخم‌های با درجه ۲، ۶۰٪ بوده است. لازم به ذکر است در زخم‌های با درجه واگنر پایین‌تر احتمال وجود یا بیان ژن‌های *Sei* و *hlg* در جدایه‌ها کمتر و در زخم‌های با درجه ۳ تا ۴ واگنر این دو ژن به تنهایی و با احتمال تقریباً یکسانی بیان می‌شوند. از طرف دیگر هرچه درجه واگنر زخم بالاتر بوده، بیان یا حضور این دو ژن، نمود بیشتری داشته است. ۳ ژن *hla*، *mecA* و *lukED* در جدایه‌های زخم‌های با درجات ۲ تا ۵ وجود داشته و یا بیان شده‌اند.

از سوی دیگر حضور همزمان ژن‌های هدف در ۵۰٪ جدایه‌ها از عفونت‌های با درجه ۴ و ۵ واگنر احراز شد. میزان فراوانی همزمان دست‌کم ۳ ژن ویروالانس (*hla*، *lukED*)، به همراه ژن *Sei* یا *hlg* در عفونت‌های با درجه ۳ تا ۴ واگنر، ۳۵/۷٪ و فراوانی دو ژن *hla* و *lukED* در ۱۴/۲۸٪ در عفونت‌های با درجه ۲ و ۳ واگنر به دست آمد. از طرف دیگر ۳ ژن *hla*، *mecA* و *lukED* در ۱۰۰٪ جدایه‌ها از عفونت‌های زخم با درجات مختلف واگنر تأیید شدند. در حالی که ژن *Sei* در ۲۱/۴٪ کل نمونه‌ها و ۱۰۰٪ نمونه‌های عفونت زخم با درجه ۳ واگنر یافت شد. این موضوع نشان می‌دهد که حضور ژن *Sei* شاخص مناسبی برای تشخیص زخم‌های درجه ۳ واگنر است. حضور یا بیان ژن‌های *hla*، *mecA*، *lukED*، *Sei*، *hlg* در نمونه‌ها در مقام مقایسه به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۷۱/۴٪ و ۶۴/۲٪ بوده است.

تحلیل آماری: داده‌های حاصل از تحلیل نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ (Chicago, IL; USA) و آزمون آماری کای مربع در سطح اطمینان ۹۵٪ ($P < 0.05$)، ارتباط آماری معنی‌داری بین ژن‌های ویروالانس / استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مطالعه شده با میزان شدت عفونت زخم پای بیماران دیابتی، نشان داد.

بحث

در این پژوهش ردیابی ژن *mecA* با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور جداسازی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) انجام شد. همچنین ژن‌های ویروالانس (*hla*، *hlg*)، *lukED*، *Sei*)، به منظور بررسی شدت عفونت زخم پای دیابتی که به واسطه سیستم طبقه‌بندی واگنر به عنوان زخم‌های عفونی درجه ۲ تا ۵ به شمار می‌رفت، ارزیابی شد. در بررسی انجام شده با استفاده از روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی، استافیلوکوکوس

MRSA داشتند. میزان فراوانی ژن *hla* در این ایزوله‌ها ۸۵٪ گزارش شد که این نتایج کمتر از یافته پژوهش حاضر است (۲۵). Sauer و همکاران در سال ۲۰۰۸ از بین ۴۶ سویه MRSA با بررسی مولکولی ژن‌های ویروالانس، فراوانی ژن *Sei* را ۷۹/۳٪ گزارش کردند و یافته پژوهش حاضر با نتایج بررسی آنها تقریباً مطابقت دارد (۲۶). Dibah و همکاران طی مطالعه‌ای مشابه با پژوهش حاضر بر روی نمونه‌های بالینی در ۲ بیمارستان شهر اردبیل، نشان دادند که ۴۶/۳٪ از ۴۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، MRSA هستند. همه سویه‌ها به ونکومایسین، موپیروسین و لینزولید حساس بودند (۲۷). در این مطالعه میزان حضور ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از عفونت زخم پای دیابتی ۱۰۰٪ بوده است. یافته این پژوهش با مطالعه Ahmadi و همکاران ۸۹٪ (۲۸) و مطالعه Zeinali و همکاران (۲۹). در تحقیق Al-Ruaily و همکاران فقط ۱۳٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ژن *mecA* داشتند (۳۰). نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر با نتایج پژوهش ما همخوانی ندارد. علت این تفاوت‌ها در نتایج، استفاده از روش‌های مختلف تشخیص ژن‌ها و همچنین تنوع جغرافیایی است.

نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با فراوانی ۴۶/۶٪ شایع‌ترین میکروارگانیسم گرم مثبت در ایجاد عفونت زخم پای بیماران دیابتی است. ارزیابی ۴ ژن ویروالانس مقصود در این تحقیق نشان داد که جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس که قادر به بیان این ۴ ژن، به‌ویژه ژن *hlg* هستند، نسبت به سایر سویه‌ها از بیماری‌زایی بیشتری برخوردار بوده و منجر به عفونت‌های شدید با درجات واکنش بالاتری می‌شوند. شناسایی این ۴ ژن در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، به‌عنوان مارکر ژنتیکی مناسب و قابل اعتماد در تشخیص درجه‌بندی مولکولی عفونت زخم پای بیماران دیابتی با اختصاصیت و ویژگی بالا است. امیدواریم یافته‌های این پژوهش راهکار مناسبی برای تشخیص زودهنگام نوع و درجه عفونت و کمک در اتخاذ تصمیم درمانی قطعی جامعه پزشکی و پیشگیری از قطع عضو اندام‌های تحتانی و مرگ تدریجی بیماران دیابتی باشد.

از نقاط قوت این پژوهش ارزیابی ژن‌های شاخص بیماری‌زایی به‌عنوان ژن‌های مارکر و بررسی ارتباط بین بیان این ژن‌ها با درجه زخم در بیماران مبتلا به عفونت پای دیابتی است. امید است

عفونی (درجه ۱) از زخم‌های عفونی (درجه ۲ تا ۴) مفید بوده و وضعیت زخم را در مراحل پیگیری پیش‌بینی می‌کردند. به‌طوری‌که از این ترکیب ۴ ژن *Sei*، *lukED*، *hlg* و *sea* در زخم‌های عفونی با درجه ۲ تا ۴ واکنش در سویه‌های MRSA، و ژن *cap8* در زخم‌های غیر عفونی با درجه ۱ در سویه‌های MSSA، شناسایی شدند (۲۱). این یافته با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر از لحاظ حضور ژن‌های *Sei*، *lukED*، *hlg* و *hla* در زخم‌های عفونی با درجه ۲ به بالا مطابقت دارد. در کشور مصر با جداسازی ۸۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۳۵ بیمار نشان دادند که در ایزوله‌های زخم پای دیابتی فراوانی ژن *hlg* ۱۸/۸۲٪ است که پس از ژن *hla* (۲۱/۱۷٪) نسبت به سایر ژن‌های کدکننده همولیزین بیشترین فراوانی را دارد. این یافته با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر از لحاظ فراوانی ژن‌های همولیزین متفاوت بود (۲۲). در مطالعه Abdel-Halem و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مصر، فراوانی ژن‌های کدکننده لکوسیدین‌ها و ژن *mecA* در ۷۵ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد که فراوانی ژن‌های کدکننده لکوسیدین‌ها به‌ترتیب (*lukS* ۳۴/۷٪) (*lukD* ۶۴٪) و (*lukE* ۷۳/۳٪) ارزیابی و در ۵۵ ایزوله ژن *mecA* شناسایی شد (۲۳). در مطالعه Havaei و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران با جداسازی ۱۴۹ سویه *S. aureus* از ۵ بیمارستان تهران، فراوانی ژن *lukED* را ۷۳/۸٪ نشان دادند که مطابقتی با یافته‌های پژوهشی حاضر نداشت.

در مطالعه دیگر، Ebrahimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ایران با مطالعه بر روی ۶۱ زخم عفونی و ۳۹ عفونت پوستی، از ۷۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، مشخص شد که ۴۹ ایزوله (۴۰/۸٪) استافیلوکوکوس اورئوس آلفا و بتا همولیتیک بودند و از این تعداد، ۱۲/۲۵٪ گاما همولیزین (*hlg*) تولید می‌کردند. یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه از لحاظ تعداد ایزوله‌ها تقریباً مشابه (۴۶/۶٪)، ولی از لحاظ میزان فراوانی ژن *hlg* بسیار متفاوت هستند. در مطالعه دیگر Hoseini Alfatemi و همکاران در سال ۲۰۱۴ با شناسایی ۱۴۸ ایزوله MRSA، میزان فراوانی ژن *hla* ۹۳/۱۵٪ گزارش شد (۲۴). در مطالعه دیگری در ایالات متحده فراوانی ژن *hla* به میزان ۱۰۰٪ گزارش شده که یافته پژوهش حاضر با نتایج آنها مطابقت دارد. Sumeet و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استرالیا با ۲۲۳ سوآپ‌پینگ از ۳۰ بیمار مبتلا به زخم پای دیابتی نشان دادند که ۴۴٪ از ایزوله‌ها *S. aureus* هستند و با انجام واکنش PCR ثابت کردند ۸۵٪ از این ایزوله‌ها ژن *mecA* و در نتیجه

درمانگاه حضرت ابوالفضل(ع) ساری، پرسنل و پرستاران بخش جراحی و عفونی بیمارستان‌های امام خمینی ساری و رازی قائمشهر بابت همکاری در نمونه‌گیری و نیز حوزه معاونت پژوهشی و همکاران آزمایشگاه تحقیقات میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن قدردانی و سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافی گزارش نشده است.

از نتایج این پژوهش به منظور شناسایی درجه زخم در بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی به صورت تست اسکرینینگ بهره‌گیری شود. از نقاط ضعف این پژوهش می‌توان به محدودیت‌های دسترسی به بیماران با عفونت پای دیابتی با درجات زخم مختلف و نیز وسعت دامنه میدانی اخذ نمونه اشاره کرد.

سپاسگزاری

ضمن تقدیر و سپاس از آقای دکتر شاهین رسولی به پاس پشتیبانی در تمامی مراحل پژوهش و تدوین مقاله و استادانی که راهنمایی‌های لازم را در انجام این کار مبدول داشته‌اند، از جناب آقای پرویز پناهی مدیرعامل محترم و پرسنل جمعی محترم

References

1. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci A.S. and L.M. Kasper, Harrison's Principles of Internal Medicine, , 17th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2008.
2. Shaw J.E, Sicree P.Z. and P.Z Zimmet, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1):4-14.
3. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, J. Apelqvist, The global burden of diabetic foot disease, 2005 Nov 12; 366(9498):1719-24.
4. Lipsky B, Peters E, Senneville E, Berendt A, Embil J, Lavery L, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(S1):163-78.
5. Alami Harandi B, Alami Harandi A, Siavashi B. Diabetic foot ulcer management (Review of Literature). *Iranian J of Surg*. 2007;16(4):1-7.
6. Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(4):597.
7. Katayama Y, Zhang H-Z, Hong D, Chambers HF. Jumping the barrier to β -lactam resistance in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol*. 2003;185(18):5465-72.
8. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):531-40.
9. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital-and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Curr Mol Med*. 2009;9(2):100-15.
10. Peck KR, Baek JY, Song J-H, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between Staphylococcus aureus isolates from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. *J Korean Med Sci*. 2009;24(4):585-91.
11. Schubert S, Schwertz H, Weyrich AS, Franks ZG, Lindemann S, Otto M, et al. Staphylococcus aureus α -toxin triggers the synthesis of B-cell lymphoma 3 by human platelets. *Toxins*. 2011;3(2):120-33.
12. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):16-34.
13. Fueyo J, Mendoza M, Rodicio M, Muniz J, Alvarez M, Martín M. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1278-84.
14. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, et al. Pantone-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from Staphylococcus aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*. 1995;63(10):4121-9.
15. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from Staphylococcus aureus. *Infect Immun*. 1998;66(7):3337-48.
16. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin—producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128-32.
17. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between

- Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70(2):631-41.
18. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH, et al. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene.* 1990;94(1):137-8.
 19. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26(2):510-3.
 20. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5(1):2.
 21. Sotto A, Lina G, Richard J-L, Combescure C, Bourg G, Vidal L, et al. Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot ulcers: a new paradigm. *Diabetes Care.* 2008;31(12):2318-24.
 22. El-baz R, Dina Eid Rizk D, Barwa R, Hassan R. Virulence factors profile of *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical sources in Egypt. *J Microbiol.* 2016;43:126-44
 23. Abdel-hamed A-HA, Abdel-Rhman SH, El-Sokkary MA. Studies on leukocidins toxins and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical sources. *Afr J Microbiol Res.* 2016;10(17):591-9.
 24. Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(6).
 25. Sumeet S, Irani U, Flavia R. Prevalence of methicillin resistance and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2014;3(6):978-82.
 26. Sauer P, Síla J, Štosová T, Večeřová R, Hejnar P, Vágnerová I, et al. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol.* 2008;57(4):403-10.
 27. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iran J Microbiol.* 2014;6(3):163-8.
 28. Ahmadi A, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. *J Microbial World.* 2014;6(4):299-311.
 29. Zeinali E, Moniri R, Safari M, Mousavi GA. Molecular characterization and SCCmec typing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Feyz J Kashan Uni Med Sci.* 2011;14(4):439-46.
 30. Al-Ruaily, Khalil OM. Detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A / Rhman, Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia . *J Med Genet Genomic.* 2011;3(3):41-5.