

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۱ صفحات ۹۸-۱۰۶

شناسایی ژنهای کد کننده پروتئین های متصل شونده به فاکتورهای ویروالانس

کلاژن (Cna) و فیبرونکتین (FnB) در ایزوله های *Staphylococcus aureus*

جمع آوری شده از نمونه های بالینی و بینی با روش Multiplex – PCR

عاطفه کیاوری: گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
 آلکا حسینی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه میکروبیشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران،
 نویسنده رابط:

E-mail: hasanialka@tbzmed.ac.ir

هائده مبین: گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
 محمد آقازاده: گروه میکروبیشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 اکبر حسینی: گروه بیوشیمی و آزمایشگاههای بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 مجتبی ورشوچی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 محمد آهنگر زاده رضایی: گروه میکروبیشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 لیلا دهقانی: آزمایشگاه میکروب شناسی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۰/۸/۹ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۷

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن های کد کننده فاکتورهای ویروالانس متعددی می باشد که به طور مجزا یا بصورت توأم، عفونت های متعددی را ایجاد می کنند. هدف از این تحقیق، بررسی ژنهای مربوط به فاکتورهای ویروالانس شامل پروتئین های متصل شونده به کلاژن (Cna) و فیبرونکتین (FnB) در سویه های *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه های بالینی مختلف و بینی بیماران بیمارستان های علوم پزشکی تبریز می باشد.

مواد و روش ها: در محدوده زمانی مرداد تا بهمن ماه سال ۱۳۸۸، تعداد ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف و ۵۰۴ نمونه بینی بیماران قلبی اخذ شد. ایزوله های *S. aureus* به وسیله روش های فنوتیپی شناسایی و با ردیابی ژن های *nuc* و *femB* با روش PCR مورد تأیید واقع شدند. ایزوله های MRSA با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار شناسایی و جهت ردیابی ژن *mecA* از روش PCR استفاده شد. ژن های *nuc*، *femB* و *mecA* با استفاده از روش Multiplex PCR و ژنهای *cna* و *fnb* با استفاده از روش های PCR و Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: از ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف و ۵۰۴ نمونه بینی به ترتیب ۱۲۱ و ۲۱۴ ایزوله غیر تکراری *S. aureus* جداسازی شد. در ۸۰/۹۹٪ ایزوله های بالینی و ۱۷/۲۹٪ ایزوله های جدا شده از بینی، ژن *cna* شناسایی شد. ژن *cna* به ترتیب در ایزوله های جدا شده از آترتیت عفونی، استئومیلیت و آندوکاردیت شیوع بالاتری داشت. ژن *fnb* در ۶۵/۲۹٪ ایزوله های بالینی و ۵۴/۶۷٪ ایزوله های بینی شناسایی شد و به ترتیب در بیماری های آندوکاردیت، استئومیلیت و زخم های مربوط به سوختگی فراوانی بالاتری داشت. هم در ایزوله های بالینی و هم در ایزوله های بینی، شیوع فاکتورهای ویروالانس در سویه های MRSA بیشتر از MSSA بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که مطالعه ژن های *nuc*، *femB* و *mecA* در یک تست همزمان، نه تنها به شناسایی ایزوله های *S. aureus* کمک می کند، بلکه در ردیابی اختصاصی و سریع ایزوله های MRSA مفید می باشد. تحقیق حاضر نشان داد که شیوع فاکتورهای ویروالانس در ایزوله های بالینی بیشتر از بینی و در ایزوله های MRSA بیش از MSSA بوده که نشاندهنده نقش حضور همزمان این فاکتورها در تهاجم و بیمارزایی این ایزوله ها می باشد.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، فاکتورهای ویروالانس، کلاژن، فیبرونکتین

مقدمه

Staphylococcus aureus یک باکتری بیماری‌زای مهم انسانی است. این باکتری دارای ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس متعدد می‌باشد که بر روی کروموزوم یا ژنهای متحرک قرار گرفته اند. این فاکتورها موجب کلونیزاسیون میزبان، تهاجم به پوست آسیب دیده و موکوس، انتشار در بدن و فرار از مکانیسم های دفاع میزبان می‌شوند. ۵۰-۳۰٪ جمعیت انسانی در بینی خود، این ارگانیسم را حمل می‌کنند. بیماری‌زایی *S.aureus* به طور مرحله به مرحله ایجاد می‌شود و محققین پی برده اند که در هر مرحله یک یا چند فاکتور ویروالانس به خصوص، دارای نقش می‌باشد. امروزه علیرغم درمان های مناسب، عفونت های شدید مرتبط با *S.aureus* و به خصوص سویه های مقاوم به متی سیلین موجب میزان بالای مرگ و میر می‌شود (۱). *S.aureus* دارای یکسری پروتئین های سطح سلولی می‌باشد که به عنوان ادهزین عمل می‌کنند و قادرند به پروتئین های ماتریکس خارج سلولی سطح اپیتلیال و اندوتلیال (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) متصل شوند (۲). این اتصال میکروارگانیسم ها به پروتئین های ماتریکس قدم اول در فرآیند بیماری‌زایی است و منجر به کلونیزاسیون و تهاجم بعدی باکتری به سلول میزبان می‌شود. ادهزین ها به عنوان مهمترین فاکتورهای ویروالانس در فاز ابتدایی عفونت *S.aureus* به شمار می آیند. رایجترین پروتئین های مرتبط با ویروالانس مستقر در دیواره سلولی *S.aureus* عبارتند از: پروتئین های دارای تمایل به فیبرینوژن (ClfA, B)، فیبرونکتین (FnBA)، کلاژن (Cna)، سیالوپروتئین (BbP) و الاستین (EbPS) (۳). پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) ادهزین اصلی *S.aureus* می باشد که مسئول تمایل بالای اتصال به کلاژن بوده و احتمال داده می شود که یک فاکتور ویروالانس اصلی در عفونت و بیماری باشد. در مدل های آرتریت عفونی، استئومیلیت، کراتینیت، و آندوکاردیت، موتانت های فاقد ژن *cna* کمتر از ایزوله والد بیماریزا هستند. اخیراً در مطالعه ای نشان داده شده است که در مقایسه با سویه های کلونیزه کننده، ژن *cna* به ندرت در سویه های مهاجم مشاهده شده است (۴). فیبرونکتین، پروتئین دیگری در بین سایر پروتئین های سطح سلولی است که به طور اختصاصی به پروتئین های خارج سلولی ماتریکس و پلاسمای میزبان متصل می شود. دو پروتئین بسیار همولوگ متصل شونده به فیبرونکتین، (FnBPA و FnBPB)، کد شونده به وسیله ژنهای *fnbA* و *fnbB* شناسایی شده اند و نشان داده شده که این پروتئین ها در چسبیدن به دریچه های آسیب دیده قلب دخالت داشته و ورود داخل سلولی *S.aureus* را به واسطه سلول های اپیتلیال بیشتر می کنند (۵). تحقیقات دانشمندان بر روی مدل های آزمایشگاهی نشان داده است که بیان رسپتورها برای فیبرونکتین با آندوکاردیت مرتبط بوده در حالی که حضور

ادهزین ها برای کلاژن، با آرتریت و استئومیلیت ارتباط دارد (۶). به دلیل اهمیت بیماری های ایجاد شده به وسیله سویه های *S.aureus* حساس و مقاوم به متی سیلین، این تحقیق در نظر داشت ژنهای فاکتورهای ویروالانس *Cna* و *FnB* را در سویه های *S.aureus* جدا شده از نمونه های بالینی و بینی بیماران بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی تبریز بررسی نماید تا ارتباط بین فاکتورهای ویروالانس مذکور و بیماری های به وجود آمده مشخص گردد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی مختلف بیماران مراجعه کننده و بستری در بیمارستان و نمونه های اخذ شده از بینی بیماران بستری در مراکز آموزشی- درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (امام رضا، شهید مدنی، سینا) بود. به این صورت که در فاصله زمانی مرداد تا بهمن ماه ۱۳۸۸، از تعداد ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف شامل: خون، ادرار، زخم، مایع مغزی- نخاعی، مایعات بدن، لوله تراشه، آبرسه و نازوفارنکس از بیماران مورد مطالعه جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. در همین محدوده زمانی از ۵۰۴ بیمار قلبی بستری شده در بیمارستان نمونه بینی تهیه شد. در تهیه نمونه از بینی بیماران از هر بیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پذیرش، با استفاده از سواب از سوراخ های قدامی بینی نمونه برداری به عمل آمد. اطلاعات بیماران اعم از جنس، سن، تاریخ پذیرش، بخش بستری، مدت زمان بستری، سابقه بیماری قلبی، تاریخ نمونه برداری، علت بستری ثبت گردیده و مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیسم های جدا شده با استفاده از روش های متداول فوتوتیک شامل مورفولوژی کلنی روی بلاد آگار و مانیتول سالت آگار، نوع همولیز، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، آزمایش کوآگولاز اسلایدی و لوله ای و تست DNase شناسایی شدند (۷). جهت تأیید قطعی ایزوله های *S.aureus* ردیابی ژن های نوکلئاز پایدار در برابر حرارت (*nuc*) و فاکتور ضروری غشاء (*femB*) با روش PCR انجام شد. ابتدا جهت شناسایی سویه های *S.aureus* مقاوم به متی سیلین (MRSA)، از روش دیسک دیفیوژن آگار (Kirby-Bauer) با بکار بردن دیسک های آگراسیلین (۱ μg) و سفوکسی تین (۳۰ μg)، (Mast Diagnostics, UK) استفاده شد. در تأیید MRSA ردیابی ژن *mecA* به وسیله PCR به عنوان روش مرجع بکار گرفته شد. در این مطالعه سویه استاندارد *S.aureus* ATCC29213 به عنوان ایزوله حساس به متی سیلین بکار گرفته شده و نتایج با مقادیر استاندارد مقایسه شد (۸).

جهت ردیابی ژنهای *nuc*، *femB*، *mecA*، *cna* و *fnb* در روش مولکولی PCR و multiplex-PCR ابتدا DNA ایزوله

یافته ها

از تعداد ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف مورد مطالعه، تعداد ۱۲۱ (۶/۲۵٪) ایزوله *S.aureus* شامل ۶۳ ایزوله از زخم، ۲۴ ایزوله از خون، ۱۲ ایزوله از ادرار و ۲۲ ایزوله از سایر نمونه ها و از ۵۰۴ نمونه اخذ شده از بینی بیماران بستری، ۲۱۴ (۴۲/۴۶٪) ایزوله *S.aureus* جداسازی شد.

پس از جداسازی و شناسایی ایزوله ها با روش های متداول فنوتیپی، جهت تأیید ایزوله های *S.aureus* با استفاده از روش PCR ژن *nuc* و ژن *femB* استفاده شد و همه سویه های بالینی و نمونه های اخذ شده از بینی باندی واضح با اندازه مورد نظر را تولید کردند (شکل ۱).

در شناسایی سویه های MRSA با استفاده از روش های فنوتیپی با بکار بردن آنتی بیوتیک های اگراسیلین و سفوکسیتین، سویه های بالینی و بینی به ترتیب ۶۴/۶۳٪ و ۲۳/۲۵٪ نسبت به اگراسیلین و ۲۴/۵۱٪ و ۵۶/۷۰٪ نسبت به سفوکسیتین مقاومت نشان دادند و در ردیابی ژن *mecA* به عنوان روش "استاندارد طلایی" با روش PCR، در کل ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی و بینی، تعداد ۵۵ سویه (۴۵/۴۵٪) بالینی و ۴۹ سویه (۲۲/۹٪) بینی محصول ژن فوق را تولید نموده و به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

نتایج Multiplex PCR ژن های *nuc* *mecA* و *femB* در تمام ایزوله ها عیناً مشابه با روش PCR بود (شکل ۱).

در ردیابی ژنهای *cna* و *fnb* با روش PCR در سویه های جدا شده از نمونه های بالینی به ترتیب تعداد ۹۸ (۸۰/۹۹٪) و ۷۹ (۶۵/۲۹٪) و در سویه های جدا شده از بینی به ترتیب تعداد ۳۷ (۱۷/۲۹٪) و ۱۱۷ (۵۴/۶۷٪) باند مورد نظر ژنهای فوق مشاهده شد (شکل ۲).

نتایج Multiplex PCR ژن های *cna* و *fnb* در تمام ایزوله ها عیناً مشابه با روش PCR بود (شکل ۲). در بین ۱۲۱ سویه بالینی و ۲۱۴ سویه بینی به ترتیب ۱۱۴ سویه (۹۴/۲۱٪) و ۱۹۹ سویه (۹۲/۹۹٪) حداقل یکی از ژن های *cna* یا *fnb* را داشتند. ۷ سویه بالینی و ۱۵ سویه بینی فاقد هر دو ژن فاکتورهای ویروالانس مورد مطالعه بودند.

حضور ژن *cna* و *fnb* در نمونه های بالینی اخذ شده از بیماران با سابقه بیماریهای مختلف نیز مورد بررسی واقع شد. بیشترین حضور ژن *cna* در ایزوله های جدا شده از آرتريت عفونی (۴۳ مورد)، استئومیلیت (۳۱ مورد) و آندوکاردیت (۲۴ مورد)، گزارش شد ($p > 0.05$). در هیچ یک از ایزوله های جدا شده از زخم های مربوط به سوختگی، عفونت های پوست و بافت نرم، آبسه های پوستی، پنومونی، باکتری می و سپتی سمی، این ژن یافت نشد. بیشترین شیوع ژن *fnb* در آندوکاردیت (۳۹ مورد)، و سپس استئومیلیت (۲۳ مورد) بوده است ($p > 0.01$). کمترین شیوع این ژن به ترتیب در عفونت های پوست و بافت نرم (۲ مورد)، پنومونی (۳ مورد)، آرتريت عفونی (۵ مورد) و زخم های مربوط

های مورد مطالعه با استفاده از روش SDS-Proteinase K استخراج شد. محصول استخراج در ۱۰۰ μ l محلول بافر TE حل و در 20°C تا زمان استفاده، نگهداری شد (۸ و ۹). توالی پرایمر های اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژن های *nuc* *femB* *mecA* *cna* *fnb* با روش PCR در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۴-۱۰). این پرایمرها از کارخانه Eurofins آلمان خریداری شدند.

ابتدا هر یک از ژن های مورد مطالعه به طور جداگانه با روش PCR مورد بررسی واقع شدند و قطعات مورد نظر با اندازه ذکر شده در جدول ۱ شناسایی شدند. در مرحله بعد مجدداً با روش Multiplex PCR سه ژن *nuc* *mecA* *femB* و دو ژن فاکتورهای ویروالانس *cna* و *fnb* در ایزوله های مورد مطالعه مورد بررسی واقع شدند.

واکنش PCR با استفاده از ۲۵ μ l مخلوط واکنش انجام شد. ترکیب مواد مورد استفاده برای واکنش به طور جداگانه برای هر کدام از ژن های *nuc* *femB* *mecA* *cna* حاوی ۱۰/۷ μ l آب دیونیزه، ۲/۵ μ l (10X) PCR بافر، ۰/۸ μ l MgCl_2 (50mM)، ۰/۵ μ l dNTPmix (10mM)، ۱ μ l از هر یک از پرایمر Forward و Reverse، ۰/۵ μ l TaqDNA پلیمرز و ۲۰۰ Pmol DNA باکتریایی بود. فقط برای ژن *nuc* مقادیر ۱۰/۹ μ l آب دیونیزه و ۰/۶ μ l MgCl_2 (50mM) مورد استفاده قرار گرفت.

مقادیر مواد مورد استفاده جهت واکنش Multiplex-PCR ژن های *nuc* *femB* *mecA* و Multiplex-PCR ژنهای *cna* و *fnb* عیناً مشابه مقادیر بکار گرفته شده در روش PCR بود؛ با این تفاوت که در گروه اول ۶/۷ μ l و در گروه دوم ۴/۷ μ l آب دیونیزه به کار برده شد.

ترکیب اجزاء مورد استفاده جهت واکنش Multiplex-PCR ژن های *nuc* *femB* *mecA* و همچنین *cna* و *fnb* نیز از همان مقادیر استفاده شد با این تفاوت که در گروه اول ۶/۷ μ l و در گروه دوم ۴/۷ μ l آب دیونیزه به کار برده شد.

برنامه دستگاه ترموسایکلر در آزمایشات PCR و Multiplex برای تمام ژنها ۳۰ سیکل و برای Multiplex ژنهای *nuc* *femB* *mecA* ۳۵ سیکل انتخاب شد. دناتوراسیون اولیه برای تمام ژنهای مورد مطالعه به جز *nuc* 94°C به مدت ۴ دقیقه و در ژن *nuc 95°C به مدت ۲ دقیقه بوده است. مراحل تکثیر ژن های مورد مطالعه در روشهای PCR و Multiplex-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. تکثیر نهایی برای انجام PCR ژنهای *mecA* *cna* و *fnb* بطور جداگانه و برای انجام Multiplex PCR ژن های *nuc* *mecA* *femB* در دمای 72°C به مدت ۴ دقیقه و برای ژن های *nuc* و *femB* Multiplex PCR ژن های *cna* و *fnb* دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انتخاب شد. برای ارزیابی محصول PCR، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (۱۵).*

۸۷/۵۰، ۹۱/۶۷، ۵۰، ۱۰۰، ۰ درصد بود. فراوانی ژنهای *cna* و *fmb* به ترتیب در سویه‌های MRSA بالینی ۸۵/۴٪ و ۹۲/۷٪ و در سویه های MSSA بالینی ۷۷/۲٪ و ۴۲/۴٪ بود. همچنین فراوانی این ژنها به ترتیب در سویه‌های MRSA بینی ۳۲/۶٪ و ۹۱/۱٪ و در سویه های MSSA بینی ۱۲/۷٪ و ۴۶/۶٪ بود.

به سوختگی (۷مورد) مشاهده شد. ژن *fmb* در هیچیک از ایزوله های جدا شده از آبسه های پوستی، باکتری می و سپتی سمی یافت نشد.

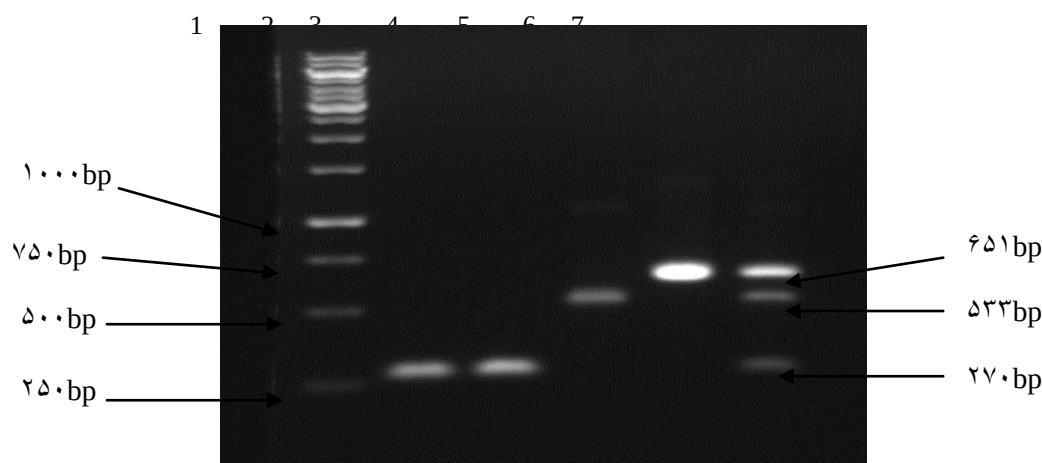
فراوانی ژن *fmb* در نمونه های زخم، خون، ادرار، مایعات بدن، لوله تراشه، نازوفارنکس و آبسه به ترتیب ۷۳/۰۲، ۷۹/۱۷، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۸/۵۷، ۴۰ درصد و ژن *cna* به ترتیب ۹۰/۴۸،

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمایش PCR در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی و بینی

ژن	توالی اختصاصی	اندازه باند بر حسب bp	منابع
<i>cna</i>	forward: 5'-AGT GGT TAC TAA TAC TG-3 reverse: 5'-CAG GAT AGA TTG GTT T	۷۴۴	۱۱
<i>fmb</i>	forward: 5'-CAC AAC CAG CAA ATA TAG-3 reverse: 5'-CTG TGT GGT AAT CAA TGTC-3	۱۲۷۹	۱۰
<i>nuc</i>	<i>nuc</i> -1: 5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3 <i>nuc</i> -2: 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3	۲۷۰	۱۴
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -1: 5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3 <i>mecA</i> -2: 5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3	۵۳۳	۱۳
<i>femB</i>	<i>femB</i> -1: 5' TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC-3 <i>femB</i> -2: 5' ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT-3	۶۵۱	۱۲ و ۱۱

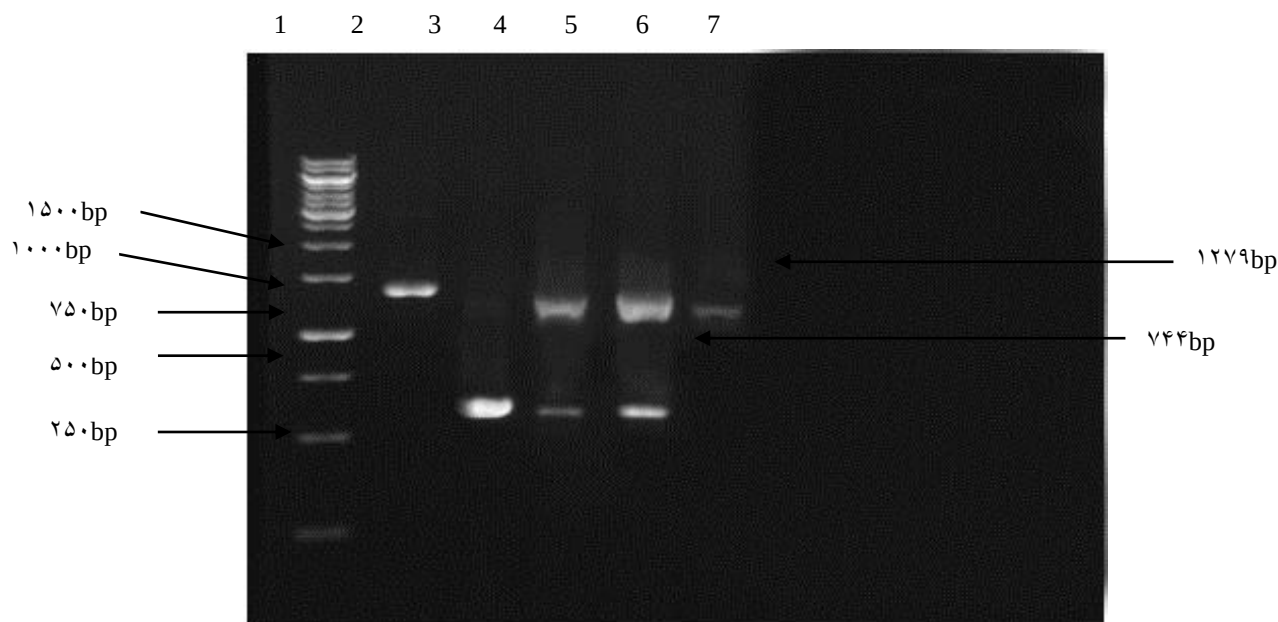
جدول ۲: مراحل تکثیر ژن های مورد مطالعه در روش های PCR و Multiplex-PCR در ایزوله های *S. aureus* جدا شده از نمونه های بالینی و بینی

مرحله	دما بر حسب °C و زمان بر حسب ثانیه بکار رفته	دما بر حسب °C و زمان بر حسب ثانیه بکار رفته	در ژنهای PCR	در ژنهای Multiplex-PCR
			<i>cna</i> ، <i>mecA</i> ، <i>femB</i> ، <i>nuc</i>	<i>cna</i> و <i>fmb</i>
دنا تورا سیون	۹۴ ۳۰	۹۴ ۳۰	زمان	زمان
آنبلینگ	۵۸ ۳۰	۵۴ ۳۰	دما	دما
تکثیر نهایی	۷۲ ۴۵	۷۲ ۶۰	دما	دما



شکل ۱: نتایج شناسایی ژن های *nuc*، *mecA*، *femB* بوسیله PCR و Multiplex PCR در سویه های بالینی مختلف و بینی بیمار

- ستون ۱: سایز مارکر (kb Ladder)
- ستون ۲: باند مربوط به کنترل مثبت ژن *nuc* سویه *S. aureus* ATCC ۲۹۲۱۳
- ستون ۳: باند مربوط به ژن *nuc*
- ستون ۴: باند مربوط به ژن *mecA*
- ستون ۵: باند مربوط به ژن *femB*
- ستون ۶: باند مربوط به ژنهای *nuc* و *mecA* (Multiplex PCR)
- ستون ۷: کنترل منفی (آب دیونیزه)



شکل ۲: نتایج شناسایی ژن های *fnb*, *cna* در سویه های بالینی و بینی

ستون ۱: سایز مارکر (kb Ladder)
ستون ۲: باند مربوط به ژن *fnb*
ستون ۳: باند مربوط به ژن *cna*
ستون ۴: باند مربوط به ژن های *fnb*, *cna* (Multiplex PCR)
ستون ۵: باند مربوط به ژن های *fnb*, *cna* (Multiplex PCR)
ستون ۶: باند مربوط به ژن *fnb* (Multiplex PCR)
ستون ۷: کنترل منفی (آب دیونیزه)

بحث

عمل متی سیلین مقاوم است. سنتز PBP2a تنظیمی بوده و به طور معمول در سطح پایین نگه داشته می شود، اما در صورتی که در ژن های تنظیمی، موتاسیون رخ دهد، سطح سنتز می تواند افزایش یابد. ردیابی ژن *mecA* و یا محصول آن PBP2a، به عنوان استاندارد طلایی در شناخت ایزوله های مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته شد. CLSI نشان داده است که دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین از اکثر آزمایشات فنوتیپی قبلی بهتر می باشد (۱۷).

در این تحقیق با استفاده از دیسک اگزاسیلین در نمونه های بالینی و بینی به ترتیب ۶۳/۶۴٪ و ۲۵/۲۳٪ و با استفاده از دیسک سفوکسی تین، به ترتیب ۵۱/۲۴٪ و ۷۰/۵۶٪ مقاومت به متی-سیلین شناسایی شد. این نتایج با روش PCR به ۴۵/۴۵٪ و ۲۲/۹٪ تقلیل یافت. مغایرتی که بین نتایج حاصل از دیسک اگزاسیلین (۱μg) و سفوکسی تین (۳۰μg) و PCR مشاهده شد ممکن است به خاطر کیفیت دیسک های خریداری شده از خارج از کشور یا به خاطر شرایط مختلف کشت بوده باشد. مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق، در مطالعه Pereira و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در پرتغال بر روی ۱۴۸ سویه

مطالعات بسیاری در دسترس است که اهمیت حمل *S. aureus* در بینی را به عنوان یک ریسک فاکتور برای ایجاد عفونت زخم پس از جراحی ارزیابی کرده اند. در این تحقیق، بیماران بخش جراحی قلب قبل از مصرف هر گونه آنتی بیوتیک، از نظر حامل بودن بررسی شدند. ۴۲/۴۶٪ از این بیماران به عنوان حامل *S. aureus* شناسایی شدند که در مقایسه با گزارش Kluytmans و همکارانش یعنی ۲/۰۲٪ فراوانی بسیار بالایی را نشان داده است (۱۶).

از اواخر دهه ۱۹۵۰ سویه های *S. aureus* مقاوم به بنزیل پنی سیلین باعث افزایش نگرانی ها شد. این سویه ها به طور تیبیک آنزیمی به نام بتالاکتاماز تولید می کنند. تلاش هایی جهت سنتز مشتقات پنی سیلین که به هیدرولیز بتالاکتاماز مقاوم باشند صورت گرفت. در سال ۱۹۵۹ با سنتز متی سیلین به این هدف دست یافتند. متأسفانه، به محض استفاده بالینی متی سیلین، ایزوله های *S. aureus* مقاوم به متی سیلین (MRSA) ظاهر شدند که مقاومت آنها به خاطر تولید بتالاکتاماز نبوده بلکه به دلیل بیان یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP2a) اکتسابی از سایر گونه ها بود. مکانیسم اصلی مقاومت به متی سیلین در *S. aureus* به واسطه بیان یک PBP بیگانه، (PBP2a) می باشد که به

S.aureus ۳۸٪ سویه ها مقاوم به اگراسیلین بودند در حالی که تنها ۶۸٪/۰ سویه ها حضور ژن *mecA* را نشان دادند (۱۸).

امروزه تنها وسیله استاندارد شناسایی مقاومت به متی‌سیلین در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی، تست‌های حساسیت مانند دیسک دیفیوژن آگار یا روش‌های تعیین رقت و غربالگری آگار است. انجام این تست‌ها اشکالات زیادی دارد زیرا فاکتورهای مانند مقدار تلقیح، PH محیط کشت و غلظت نمک محیط کشت و قرارگیری در معرض آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، بیان فنوتیپی مقاومت را تحت تأثیر قرار می‌دهند. شناسایی صحیح و سریع *S.aureus* و الگوی حساسیت به متی‌سیلین آن، پیچیدگی‌های قابل توجهی برای معالجه و مدیریت بیماران کلونیزه شده و عفونی دارد. سایر فاکتورهای بارز کروموزومی مانند اپرون FemA-FemB، که همانند ژن‌های تنظیم کننده عمل می‌کنند، برای بیان مقاومت به متی‌سیلین در *S.aureus* ضروری هستند. به نظر می‌رسد همکاری *femA* و *femB* و *mecA* لازم می‌باشد، اما مکانیسم آن به خوبی شناخته شده نیست. به نظر می‌رسد به طور جالب توجهی *femA* و *femB* یک فاکتور بی‌نظیر برای *S.aureus* باشند که در سایر گونه‌های استافیلوکوکوس یافت نمی‌شوند (۱۹). بنابراین ردیابی همزمان ژن‌های *femA* و *femB* در یک میکروتیوپ PCR مزیت شناسایی همزمان سویه و مقاومت فنوتیپی آن را دارد. لذا، در این تحقیق ایزوله‌ها از نظر حضور ژن‌های *nuc* همچنین *femB* و *mecA* با استفاده از روش PCR و Multiplex PCR بعنوان یک استراتژی مناسب برای تشخیص افتراقی سریع و اختصاصی MRSA و MSSA مورد مطالعه واقع شدند و ارتباط کامل بین بیان ژن *femB* در سویه‌های نوکلئاز مثبت یافت شد. این اطلاعات تأیید می‌کنند که بیان *femB* یک خصوصیت بی‌نظیر *S.aureus* است که اجازه ردیابی اختصاصی آن را می‌دهد. Murakami، Geha، Vannuffel نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (۲۱و۲۰و۱۴). بر اساس نتایج به دست آمده، استراتژی Multiplex PCR می‌تواند اطلاعات سریع و منطقی را نه تنها برای شناسایی باکتری‌های بیمارزها بلکه برای مدیریت درمان به پزشکان بدهد. در مطالعه حاضر، فراوانی سویه‌های MRSA در نمونه‌های زخم، خون و لوله تراشه بیشتر از سویه‌های MSSA بود. مطالعات متعددی جهت ارزیابی بیمارزایی سویه‌های MRSA نسبت به MSSA صورت گرفته است و نتایج متفاوتی گزارش شده است. برخی محققین قائل بر بیمارزاتر بودن سویه‌های MRSA هستند در حالی که سایرین معتقدند که این سویه‌ها از نظر حمل ژن‌های فاکتورهای ویروالانس و از نظر بیمارزایی تفاوتی با یکدیگر ندارند (۲۲و۱). در سال ۲۰۰۹، Kyong Ran Peck و همکارانش، ۷۰ ایزوله جدا شده از خون را با ۹۵ ایزوله جدا شده از سواب بینی حاملین را از نظر شیوع برخی فاکتورهای ویروالانس با هم مقایسه کردند و نشان دادند

که شیوع فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های MRSA و MSSA جدا شده از خون با یکدیگر متفاوت بوده و شیوع این فاکتورها در MSSA به طور قابل توجهی بیشتر از MRSA می‌باشد (۰/۴۱ P=). در حالی که این شیوع در سویه‌های MRSA و MSSA جدا شده از بینی، یکسان می‌باشد (۱).

فاکتورهای ویروالانس در ایجاد عفونت و بیماری، همچنین در پایداری و انتشار باکتری نقش به سزایی را دارند (۲۲). دو خصوصیت قابل توجه *S.aureus* آن است که فاکتورهای ویروالانس آن ممکن است اعمال مختلفی را در بیمارزایی انجام دهند و دوم اینکه ممکن است چندین فاکتور ویروالانس یک عمل مشابه را انجام دهند (۲۶). در این تحقیق حضور فاکتورهای ویروالانس *Cna*، *FnB* و ژن‌های مربوط به آن‌ها در سویه‌های *S.aureus* در ارتباط با عفونت‌های خاص و کلونیزاسیون باکتری در ارگانیسم میزبان به منظور پیش‌بینی سویه‌های خطرناک بالقوه بررسی شد. همچنین این فاکتورها را در سویه‌های MRSA و MSSA بالینی و بینی بررسی و مقایسه شد.

بر اساس مطالعات انجام شده به وسیله محققین نشان داده شده که ژن فاکتورهای ویروالانس انتخاب شده، در سویه‌های مهاجم بیشتر یافت می‌شوند و دارای اهمیت بیشتری می‌باشند (۲۳). همچنین حمل *S.aureus* در بینی به عنوان ریسک فاکتور برای ایجاد عفونت زخم پس از جراحی ارزیابی شده است (۱۶). لذا در این تحقیق حضور فاکتورهای ویروالانس *Cna* و *FnB* در سویه‌های بالینی و بینی بررسی شد.

مدل‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که بیان رسپتورها برای فیبرونکتین با آندوکاردیت مرتبط است در حالی که حضور ادهزین‌ها برای کلاژن، با آرتريت و استئومیلیت ارتباط دارد (۱۱و۶). Roseline Therrien و همکارانش در سال ۲۰۰۷، اثبات کردند پروتئین متصل شونده به کلاژن (*Cna*) اصلی‌ترین و مهمترین ادهزین *S.aureus* است که مسئول اتصال محکم به کلاژن می‌باشد و عمده‌ترین فاکتور ویروالانس در عفونت و بیماری می‌باشد. آنها شیوع ژن *cna* را بین ۵۶-٪ در ایزوله‌ها بیان کردند (۲۴). در مطالعه حاضر در بیش از ۸۰٪ سویه‌های بالینی ژن *cna* شناسایی شد در حالی که تنها در ۱۷/۲۹٪ سویه‌های بینی این ژن وجود داشت. ژن *cna* به ترتیب در سویه‌های جدا شده از آرتريت عفونی، استئومیلیت و اندوکاردیت شیوع بالاتری داشت. به ترتیب نمونه‌های نازوفارنکس، ادرار، زخم، خون و لوله تراشه بیشترین فراوانی ژن *cna* را داشتند. Van Leeuwen و همکارانش در هلند نشان دادند که در مقایسه با ایزوله‌های کلونیزه کننده، ژن *cna* به ندرت در ایزوله‌های مهاجم مشاهده می‌شود. این در حالی است که Peacock و همکارانش نشان دادند ژن *cna* در بین ایزوله‌های مهاجم بیشتر یافت می‌شود (۲۵). در سال ۲۰۰۹، Ruud H Deurenberg و همکارانش در ۴۲٪ ایزوله‌های

نشان دادند پروتئین متصل شونده به فیرونکتین (FnBA) در ایزوله های جدا شده از آندوکاردیت عفونی، پنومونی حاصل از مکانیسم تهدید و شوک سپتیک حضور دارد. آن ها اثبات کردند CIFA و FnBP دو فاکتور ویروالانس مهم در آندوکاردیت عفونی هستند (۲۹).

Michael W. Ellis و همکارانش بر روی نمونه های بینی سربازان مطالعه نموده و نشان دادند در ۳/۹٪ نمونه ها، ایزوله های *S. aureus* کلونیزه شده اند (۳۰). همچنین Wertheim و همکارانش نشان دادند افرادی که *S. aureus* در بینی آنها کلونیزه می شود؛ در معرض خطر افزایش یافته ای برای گسترش عفونت های *S. aureus* هستند (۲۶). در سال ۲۰۰۸، Rachel J Gordon و همکارانش در مورد بیماریزایی سویه های *S. aureus* مقاوم به متی سیلین مطالعه ای انجام و نشان دادند که تقریباً ۲۰٪ افراد به طور دائمی و ۳۰٪ به طور متناوب *S. aureus* در بینی شان کلونیزه شده است (۲۲).

با مقایسه فاکتورهای ویروالانس در ایزوله های MRSA و MSSA بالینی و بینی در تحقیق حاضر نشان داد که هم در سویه های بالینی و هم در سویه های بینی، شیوع فاکتورهای ویروالانس در سویه های MRSA بیشتر از MSSA می باشد. در سال ۲۰۰۹، Kyong Ran Peck و همکارانش، در مطالعه روی ارگانسم های جدا شده از خون و سواب بینی نشان دادند که شیوع فاکتورهای ویروالانس در ایزوله های MRSA و MSSA جدا شده از خون با یکدیگر متفاوت بوده و شیوع این فاکتورها در MSSA به طور قابل توجهی بیشتر از MRSA می باشد (P=۰/۰۴۱) در حالی که این شیوع در سویه های MRSA و MSSA جدا شده از بینی، یکسان می باشد (۱). توجه به این نکته که شیوع بالاتر هر دو فاکتور ویروالانس مورد بررسی در این مطالعه در ایزوله های MRSA که دارای مقاومت و پایداری بیشتر

می باشند حائز اهمیت می باشد. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه Van Leeuwen و همکارانش در هلند متفاوت می باشد؛ ایشان اعلام کردند هیچ تفاوت مهمی بین میزان ایزوله های MRSA و MSSA از انواع مختلف عفونت های پوست و بافت نرم وجود ندارد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهند که جهت ردیابی سویه های MRSA با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار و آنتی بیوتیک های اگراسیلین و سفوکسی تین حدود ۲۲٪ نتایج مثبت کاذب وجود دارد که نیاز به ردیابی مولکولی ژن *mecA* را روشن می نماید. بکار بردن ژن های *femB* *nuc* و *mecA* در یک تست همزمان با روش Multiplex PCR نه تنها به شناسایی سویه های *S. aureus* کمک می کند بلکه در ردیابی اختصاصی و سریع سویه های MRSA نیز مفید می باشد. به جز ۷ سویه

MSSA و ۲۲٪ ایزوله های MRSA ژن *cna* را شناسایی کردند (۲۶). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر حاکی از آن است که حضور ژن *cna* در ایزوله های MRSA بیشتر از MSSA می باشد (هم در سویه های بالینی و هم بینی) که این مسئله ممکن است از نظر مقاومت باکتری و ایجاد عفونت حائز اهمیت باشد. در بررسی ژن *fnb* به عنوان یک فاکتور ویروالانس دیگر در این مطالعه، این ژن در ۶۵/۲۹٪ سویه های بالینی و ۵۴/۶۷٪ سویه های بینی شناسایی شد که این نتایج با تحقیق Peacock و Mongodin (۲۵ و ۲۷) همخوانی داشته ولی در تضاد با Nozohoor و Nashev (۲۸) می باشد. آن ها بیان کردند سویه های بینی و سویه های عفونت پوستی *S. aureus* ژن *fnbA* را با فراوانی بالایی تولید می کنند. در حالی که این ژن در سویه های بالینی این مطالعه بیشتر از سویه های بینی بوده و به ترتیب در بیماری های آندوکاردیت، استئومیلیت و زخم های مربوط به سوختگی شیوع بالاتری داشت. به ترتیب لوله تراشه، خون، زخم، مایعات بدن، آبسه، نازوفارنکس و ادرار بیشترین فراوانی ژن *fnbA* را داشتند. همچنین نتایج این مطالعه با مطالعه John A wright سازگار می باشد. مطالعه فوق در سال ۲۰۰۹ نشان داد ژن *fnbA* نقش اصلی را در ایجاد عفونت در استخوان دارد (۱۰). Peacock و Mongodin نشان دادند *fnbA* و *fnbB* به طور قابل توجهی در بیماری های تهاجمی مثل آندوکاردیت، استئومیلیت، آرتریت عفونی و پنومونی بیمارستانی دخالت دارند (۲۷). در سال ۲۰۰۵، Arciola و همکارانش حضور ژن *FnBA* را در ۹۸٪ ایزوله ها و ژن *cna* کدکننده پروتئین متصل شونده به کلاژن را در ۴۶٪ ایزوله های بالینی مرتبط با عفونت های ارتوپدی گزارش کردند. در سال ۲۰۰۶، Mouna Ben Nejma و همکارانش ۷۲ ایزوله MRSA را مطالعه کردند و ژن *fnbA* را در موارد عفونت های پوستی (فورنکل ها و عفونت های زخم) و در موارد عفونت های تهاجمی (اوتیت و استئومیلیت) شناسایی کردند.

در سال ۲۰۰۸، Lowy و Gordon نشان دادند که ژن های *cna* و *fnb* با آندوکاردیت، استئومیلیت و آرتریت عفونی در ارتباط می باشند (۲۲). Tristan Ferry و همکارانش، ارتباط فاکتورهای ویروالانس *S. aureus* با بیماری های بالینی مانند بیماری های مرتبط با توکسین، شوک سپتیک و عفونت های موضعی شدید مانند آرتریت، آندوکاردیت عفونی و پنومونی نکروزه کننده را مورد مطالعه قرار دادند. آن ها نشان دادند که بیماریزایی *S. aureus* در برخی از بیماریها مانند سندرم شوک توکسیک و پنومونی نکروزه کننده گاهی اوقات عمدتاً به واسطه یک فاکتور ویروالانس ساده می باشد. در مقابل، در سایر بیماری های مربوط به *S. aureus* مانند شوک سپتیک فاکتورهای ویروالانس متعددی نقش دارند. آن ها همچنین پروتئین متصل شونده به کلاژن (*Cna*) را در ایزوله های جدا شده از آرتریت و استئومیلیت، آندوکاردیت عفونی، پنومونی نکروزه کننده شناسایی نموده و

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه ریاست مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، جناب آقای دکتر نقیلی و نیز از تمام پرسنل محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان سینا و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی در انجام این تحقیق و همچنین جناب آقای دکتر محمدرضا نهایی جهت راهنمایی های علمی ایشان، تشکر و قدردانی می شود.

بالینی و ۱۵ سویه بینی، همه سویه های MRSA و MSSA جدا شده از نمونه های مختلف اعم از بالینی و بینی، دارای حداقل ۱ ژن فاکتورهای ویروالانس مورد بررسی بودند. به دلیل اینکه شیوع ترکیبات فاکتورهای ویروالانس در سویه های بالینی بیشتر از بینی بود می توان نتیجه گرفت که ممکن است حضور همزمان این فاکتورهای ویروالانس در تهاجم و بیماریزایی این سویه ها نقش داشته باشند و همچنین شیوع بیشتر فاکتورهای ویروالانس در سویه های MRSA نسبت به MSSA میتواند نشاندهنده نقش فاکتورهای ویروالانس مذکور در تهاجم و بیماریزایی این سویه ها باشد.

References

1. Kyong RP, Jin Yang B. Comparison of Genotypes and Enterotoxins Genes between *Staphylococcus aureus* Isolates from Blood and nasal Colonizers in a Korean Hospital. *J Korean Med Sci* 2009; **24**: 585-591.
2. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 585-617.
3. Tung H. A bone Sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J* 2000; **345**: 611-619.
4. Rivas JM, Brown EL, Liang X, Hook M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CAN in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. *J Infect Dis* 2004; **189**(12): 2323-2333.
5. Jonsson KC, Signas H, Muller P, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*: The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 1991; **202**: 1041-1048.
6. Johansson A. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orthop Relate Res* 2001; **382**: 241-246.
7. Mac Faddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore/London, Williams and Wilkins; 2002, PP: 51.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Document M100-S16, CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.
9. Mannuse Luis G. Mahun. *Text book of diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia, Saunders Company, 2000; PP: 329-341.
10. Wright JA, Nair SP. Interaction of Staphylococci with bone. *J Med Microbiol* 2009; **10**: 1003-1016.
11. Sauer P. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *S. aureus* isolates from the university Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 403-410.
12. Kobayashi N. Detection of *mecA*, *femA* and *femB* genes in clinical strains of Staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol infect* 1994; **113**: 259-266.
13. Taweeporn S, Chariya Ch, Kunyaluk Ch, Temduang L, Chaisiri W. Evaluation of different primers for detecting *mecA* gene by PCR in comparison with phenotypic Methods for discrimination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; **33**(4): 758-769.
14. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Traoka H. Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerise chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 2240-2244.
15. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory press, 2001; PP: 84-85.
16. Kluytmans JA, Moutpn JW, Ijzerman EP. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* as a Major Risk Factor for Wound Infections after Cardiac Surgery. *The Journal of Infection Diseases* 1995; **171**: 216-219.
17. Felten A, Grandry B, lagrange PH. Evaluation of three techniques for detection of low- level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2766-2771.
18. Pereira V, Lopes C, Castra A, Siliva J, Gibbs P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* 2009; **26**(3): 278-282.
19. Berger-Bachi BL, Barberis-Maino A, Strassle, Kayser FH. *femA*, a host- mediated factor essential for Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*:

- molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989; **219**: 263-269.
20. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic Versus genotypic methods in detection of methicillin – resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Med Res* 2008; **127**: 78-84.
21. Geha D, Uhl C, Gustaferrero L, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin – resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1764-1772.
22. Gordon Rachel J, lowy franklin D. Pathogenesis of Methicillin- Resistant *staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 5350-5359.
23. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M.O. Involvement of Panton–Valentine leukocidin–producing *S.aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1128–1132.
24. Roseline T, lacasse P. Lack of protectin of mice against *S.aureus* despite a significant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen- binding protein. *Vaccine* 2007; **55**: 5053-5061.
25. Peacock SJ, Moore CF, Day NP. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2002; **70**: 4987-4996.
26. Deurenberg R. The *staphylococcus aureus* Lineage-specific markers collagen adhesion and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence Typing clonal complexes within spa clonal complexes. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 2009; **65**: 116-122.
27. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J. Fibronectin–binding proteins of *staphylococcus aureus* is involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002; **70**: 620-630.
28. Nashev D, Toshkora K. Distribution of virulence genes of *staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol let* 2004; **233**: 450-520.
29. Tristan F. Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* and Their Involvement in Clinical Syndromes. *Current Infectious Disease Reports* 2005; **7**: 420-428.
30. Ellis MW, Griffith ME, Jorgensen JH. Presence and Molecular Epidemiology of Virulence Factors in Methicillin – Resistant *staphylococcus aureus* strains colonizing and infecting soldiers. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(4): 940-945.