

ارزیابی هم زمان ژن کواگولاز و انترو توکسین های A و B در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های بیماران مراجعه کننده به بیمارستان نفت اهواز

اکرم مولایی^۱، رضاعلی عطایی^۲، منصور بیات^۳

^۱ کارشناس ارشد گروه بیولوژی، واحد مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران- ایران

^۲ استاد گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، و کمیته توسعه تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران - ایران

^۳ استادیار گروه بیولوژی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران

چکیده

بسیاری از بیماری ها ناشی از سوپرآنتی ژن های باکتری است. از آنجا که استافیلوکوکوس آرتوس یک باکتری گرم مثبت هوازی و تولید کننده سوپرآنتی ژن های کلاسیک می باشد از طرفی بسیاری از سویه های این باکتری آنزیم کواگولاز را تولید می نمایند که به عنوان یک مارکر شناسایی باکتری و یک فاکتور مهم ویروانس می باشد لذا هدف این تحقیق بررسی الگوهای ژنتیکی آنزیم کواگولاز و انتروتوکسین های A و B استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های بالینی مراجعه کننده به بیمارستان شرکت نفت اهواز و همچنین بررسی رابطه بین الگوی ژنتیکی آنزیم کواگولاز و نوع عفونت بالینی ناشی از این باکتری می باشد. ابتدا نمونه برداری، شناسایی و جداسازی با استفاده از آزمون های شیمیایی انجام شد، سپس با استفاده از تکنیک RFLP-PCR به شناسایی و جداسازی آن اقدام شد. PCR مربوط به دو انتروتوکسین نشان دهنده درصد فراوانی متفاوتی از انتروتوکسین آلفا در ضایعه های مختلف بود که بیشترین درصد فراوانی مربوط به نمونه های ادراری و کمترین مربوط به مایعات مفصلی و خون بود؛ اما در مورد انتروتوکسین بتا بیشترین درصد فراوانی مربوط به زخم و کمترین مربوط به نمونه های ادرار بود. علاوه بر این تست آنتی بیوگرام بر روی تمامی ایزوله های مورد نظر از استافیلوکوک آرتوس ها انجام پذیرفت که نتایج درصد مقاومت هر یک از ایزوله های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه گزارش شد. این نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین (۷۵٪) بود. همچنین درصد مقاومت هر یک از الگوهای PCR و RFLP نسبت به متی سیلین بررسی شد که در بین الگوهای PCR الگوی ۶۸۰bp که در ۱۹ ایزوله مشاهده شده بود، ۱۲ نمونه (۶۳٪) مقاوم به متی سیلین بودند و الگوی ۷۵۰bp که در ۱۱ ایزوله مشاهده شده بود ۹ ایزوله (۸۲٪) مقاوم به متی سیلین بودند؛ و در بین الگوهای RFLP الگوی ۴۰۰+۲۸۰bp که در ۱۳ ایزوله مشاهده شده بود ۷ ایزوله (۵۴٪) مقاوم به متی سیلین بودند، الگوی ۴۷۰+۲۸۰bp که در ۴ ایزوله مشاهده گردیده بود هر ۴ ایزوله (۱۰۰٪) نسبت به متی سیلین

مقاوم بودند، الگوی ۷۵۰bp که در ۷ ایزوله (۰/۷۱) مشاهده گردیده بود ۵ ایزوله نسبت به متی سیلین مقاوم بودند و در نهایت الگوی ۳۴۰bp که در ۶ ایزوله مشاهده شده بود ۵ ایزوله (۰/۸۳) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، واکنش زنجیره ای پلیمرز، متی سیلین، انتروتوکسین.

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس آئروس طیف گسترده ای از اگزو پروتئینها را تولید میکند که علت اصلی بیماریها در میزبان است. عده ای از سویه ها خانواده ای از توکسینهای پیروژنیک شامل انتروتوکسینها، توکسین سندرم شوک سمی TSST و توکسین اکسفولیاتیو را ترشح میکنند (۱). تحقیقات مختلف نشان میدهد که ۸۰-۱۵٪ سویه های استافیلوکوکوس آئروس جدا شده از منابع مختلف، قادر به تولید انتروتوکسین میباشند (۲-۴). مطالعات متعددی در مورد انتروتوکسین های تولید شده توسط سویه های استافیلوکوکوس آئروس انجام شده است و امروزه علاوه بر ۵ نوع کلاسیک انتروتوکسین ها (SEC, SEB, SEA, SEG, SHE), ۱۴ نوع جدید از آنها نیز که شامل (SEI, SEJ, SEK, SED, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU, SEIV) میشوند نیز معرفی شده است (۵-۸). هر دوی SEs و TSST به عنوان سوپر آنتی ژن ((Sags عمل میکنند (۹, ۱۰). سوپر آنتی ژنها با فعالسازی ناحیه متغیر زنجیره $V\beta$ در گیرنده سلولهای T خارج از جایگاه اتصالشان متصل میشوند در نهایت باعث ایجاد پاسخهای اتوایمون تهدید کننده حیات میشوند که نتیجه آن بیماری های مهلک التهابی است. در هر حال، ژنهای رمز کننده انتروتوکسین استافیلوکوکی توسط عناصر ژنتیکی متحرک مثل باکتریوفاژها (sep, see, sea) یا پلاسمیدها (set, ses, ser, sej, sed) و یا توسط جزیره های بیماریزایی (SaPIs) بر روی قطعات کروموزمی (seb, sec, seh, sei, sek,) استافیلوکوک رمز میشوند (۱۱-۱۴). امروزه شناسائی و تعیین الگوی SEs با تکنیک های فنوتیپی شامل آگلوتیناسیون لاتکس، ELISA، رادیوایمونواسی و ایمونودیفرانسیون یا تکنیک های ژنوتیپی Real time PCR و Multiplex RCR, PCR صورت می گیرد. از آنجا که مقاومت نسبت به داروهای ضد میکروبی در حال گسترش است و استافیلوکوکوس آئروس بیش از اکثر باکتریهای دیگر مقاومت دارویی نشان می دهد مکانیسم های دفاعی سیستم ایمنی به عنوان استراتژی ضد میکروبی این باکتری بسیار مورد توجه می باشد. از طرفی استافیلوکوکوس آئروس به روش های مختلفی در برابر مکانیسم های دفاعی بدن مقاومت کرده یا از آن می گریزد (۱۵-۱۷). تولید آنزیم کوآگولاز توسط استافیلوکوکوس آئروس بسیار مورد توجه پژوهشگران بالینی بوده به عنوان یک شاخص مهم در شناسایی این باکتری به حساب می آید. آنزیم کوآگولاز در استافیلوکوک آئروس یک آنزیم خارج سلولی می باشد که عملکرد آن تبدیل فیبرینوژن به فیبرین بوده که توسط ترومبین کاتالیز می گردد (۱۸-۲۰). کوآگولاز-ترومبین نه تنها موجب انعقاد فیبرینوژن می گردد بلکه موجب فعالیت پروتئولیتیک و افزایش ویرولانسی باکتری می گردد. کوآگولاز با ایجاد سدی از فیبرین در دور محل ضایعه، استافیلوکوک را در مقابل فاگوسیتوز به وسیله گلبول های سفید محافظت می کند (۲۱-۲۳). ژن coa که پروتئین کوآگولاز را کد می کند به علت داشتن توالی های متغیر در ناحیه کدکننده ۳' بسیار پلی مورف است و می تواند در متمایز کردن جدایه های این باکتری مورد استفاده قرار گیرد (۲۴, ۲۵). ناحیه متغیر ژن coa از توالی های تکراری ۸۱ جفت بازی تشکیل شده است که تعداد تکرار این توالی ها در سویه های مختلف استافیلوکوکوس آئروس متغیر است. در بسیاری از کشور ها تعیین ژنوتیپ استافیلوکوکوس آئروس بخشی از برنامه های سیستم های نظارتی بوده ابزار مهمی در مطالعه منشاء سویه ها، تعیین ارتباط کلون ها و اپیدمیولوژی موارد شیوع است (۲۶-۲۸). مولکولار تایپینگ نقش اساسی در مطالعات اپیدمیولوژیک عفونت های فرصت طلب ناشی از استافیلوکوکوس آئروس دارد. کاراترین روش تایپینگ مولکولی Pulsed Field gel Electrophoresis می باشد که تکنیک پیچیده، گران و وقت گیری است. به همین دلیل تلاش هایی در جهت دست یابی به تکنیک های ساده، سریع و ارزان انجام پذیرفت (۶, ۱۲, ۲۹). مطالعات مختلف نشان داد تکثیر مناطق ژنی بسیار متغیر و آنالیز هضم آنزیمی محصول

(RFLP-PCR) یکی از روش های کارا در تایپینگ مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. در پژوهش حاضر ۱۶۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی از نظر وجود ژن Coa بررسی، و همچنین وجود و عدم وجود ژن های رمز کننده انترتوکسین های A و B و ارتباط معنی دار بین آنها بررسی می گردد. به علت اینکه در تکنیکهای فنوتیپی نیاز به بیان ژنهای انترتوکسین میباشد و سروتیپهای انترتوکسین دارای شباهت آنتی ژنتیک هستند، احتمال ایجاد واکنش متقاطع وجود دارد، لذا استفاده از روشهای ژنوتیپی برای شناسایی ژن انترتوکسین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های بالینی ترجیح داده میشود، با اینکه وجود ژن به تنهایی دلیل بر تولید انترتوکسین نمی باشد. شیوع گسترده و اهمیت بهداشتی عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس سبب شد در سراسر دنیا، تحقیقات گسترده در مورد ژن های موثر در پاتوژن و شناسایی ژنوتیپ های مختلف این باکتری انجام گیرد. کوآگولاز به عنوان مهم ترین عامل پاتوژن در استافیلوکوکوس شناخته شده است. با توجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت های بیمارستانی، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی این باکتریها در منطقه در برنامه های کنترل، پیشگیری، درمان و پیش آگهی از پیامد عفونت (به ویژه بیماری های التهابی) حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری، جداسازی و کشت باکتری

جدایه های بالینی استافیلوکوکوس ارئوس از نمونه های خون، ادرار، مایع مفصلی، خلط، زخم و آبسه بیماران مراجعه کننده به بیمارستان نفت اهواز توسط پزشکان متخصص جمع آوری گشته و به آزمایشگاه منتقل گردید. یک کلنی از باکتری مورد مطالعه بر محیط به صورت خطی بر روی محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شد. پس ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در این محیط در نتیجه تخمیر مانیتول در اطراف کلنی های استافیلوکوک اورئوس هاله زرد رنگ مشاهده می گردد.

آزمون بیوشیمیایی

به منظور شناسایی باکتری ها از تست های شیمیایی کوآگولاز به دو روش اسلایدی و لوله ای، تست کاتالاز، تست DNase و رنگ آمیزی گرم استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز

جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA باکتری های گرم مثبت شرکت سیناژن (Cat. No. PR881614) استفاده گردید. به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز و تکنیک الکتروفورز استفاده شد. در این آزمایش از ۱ جفت پرایمراختصاصی برای تکثیر اختصاصی ژن Coa و همچنین ۱ جفت پرایمر srRNA23 استافیلوکوک اورئوس جهت شناسایی مولکولی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز

نام پرایمر	توالی الیگونوکلوئیدی	طول محصول (bp)
Se universal-F	5' TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC 3'	
SEA-R	5' ATT AAC CGA AGG TTC TGT 3'	270
SEB-R	5' GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC 3'	477
Coa Forward primer	5' ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3'	410
Coa reverse primer	5' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C 3'	
23rs RNA Forward primer	5' ACGGAGTTACAAAGGACGAC 3'	320
23rs RNA Reverse primer	5' AGCTCAGCCTTAACGAGTAC 3'	

حجم نهایی محصول PCR، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل Master Mix (۱۲/۵ میکرولیتر)، پرایمر رفت و برگشت (۱ میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۱ میکرولیتر)، DNA الگو (۲ میکرولیتر) و آب (۷/۵ میکرولیتر) بود. چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل Initial Denaturation (۹۴ درجه سانتی گراد، ۴ دقیقه)، ۳۰ چرخه (Denaturation) (۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه)، annealing (۵۷ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه) و Extention (۷۲ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه) و Final extention (۷۲ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه) بود.

واکنش RFLP PCR

در این آزمایش از آنزیم AluI ساخت شرکت Thermo Scientific استفاده گردید. AluI در نواحی از ژن که دارای توالی AGCT باشد بین باز های G و C برش ایجاد می کند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR درون میکروتیوب های ۲۰۰ میکرولیتری ریخته شد سپس ۱۸ میکرولیتر آب Nuclease-free، آنزیم AluI و Buffer Tango 10X هر کدام ۲ میکرولیتر به آن اضافه گردید. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه گردید. پس از ۱۶ ساعت ویال به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری $65^{\circ}C$ قرار گرفت تا فعالیت آنزیم AluI مهار گردد. در نهایت محصول با انجام عمل الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده گردید.

تعیین فراوانی انتروتوکسین A و B

برای شناسایی وجود ژن های انتروتوکسین در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران از تکنیک PCR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلرو با مخلوط مستر میکس ساخت شرکت Ampliqon به شماره کاتالوگ A190303 در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه تکثیر شامل واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها به DNA الگو در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو در 72 درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده انتروتوکسین که در این تحقیق به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند شامل، ATCC14458:SEB+، D4508: SEA+ بود.

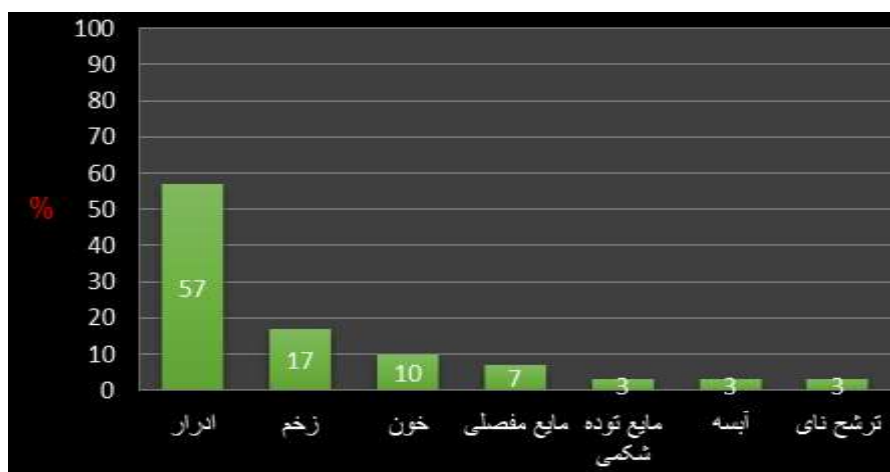
تست آنتی بیوگرام

در ابتدا حدود ۵CC از محیط کشت مولر هینتون براث درون لوله آزمایش ریخته و استریل شد سپس به منظور ایجاد کدورت ۰/۵ مک فارلند مقداری از کشت ۲۴ ساعته باکتری با استفاده از لوپ استریل در این محیط تلقیح شد در مرحله بعدی سوپ استریل را به محیط کشت نوترینت براث حاوی باکتری مورد نظر وارد کرده سپس به صورت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گردید. سپس بلافاصله با استفاده از پنس استریل دیسک های آنتی بیوتیک (شرکت پادتن طب) شامل: کلیندامایسین، سفازولین، جنتامایسین، کلوزاسیلین، آمپی سیلین، نیتروفرنتوئین، ونکومایسین، کو-تریموکسازول، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، سفالکسین، متی سیلین، آموکسی سیلین، آموکسی کلاو، سفالتین و تتراسایکلین بر روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. این دیسک ها به فاصله ۲ سانتیمتر از دیسک مجاور و ۲ سانتیمتر از لبه پلیت بر روی محیط کشت قرارداده شدند. سپس محیط کشت مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷C° قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت میزان مقاوت یا حساسیت باکتری ها با اندازه گیری قطر حاله عدم رشد مشخص گردید.

نتایج

جداسازی باکتری ها

در این بررسی ۳۰ جدایه از باکتریهای کوکسی گرم مثبت تخمیر کننده مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار با قابلیت تولید آنزیم های کاتالاز، کوآگولاز، همولیزین و DNase به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفت. درصد فراوانی باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی مختلف در نمودار ۱ آمده است.



نمودار ۱: درصد باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی

کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار

تمامی نمونه ها بر روی محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شدند که به دلیل تخمیر قند مانیتول توسط استافیلوکوک اورئوس رنگ قرمز محیط به صورت زرد رنگ در آمد.

تست کواگولاز

تمامی نمونه ها از لحاظ تست کواگولاز اسلایدی و لوله ای مورد آزمایش قرار گرفتند که تشکیل لخته در هر دو تست مشاهده گردید

تست DNase

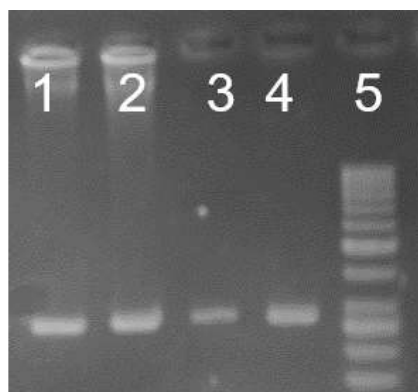
تست DNase در تمامی جدایه ها مثبت بوده است.

رنگ آمیزی گرم

به منظور تشخیص بر روی تمامی نمونه ها رنگ آمیزی گرم انجام گردید که جدایه های استافیلوکوک اورئوس با آرایش خوشه انگوری و بنفش زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند.

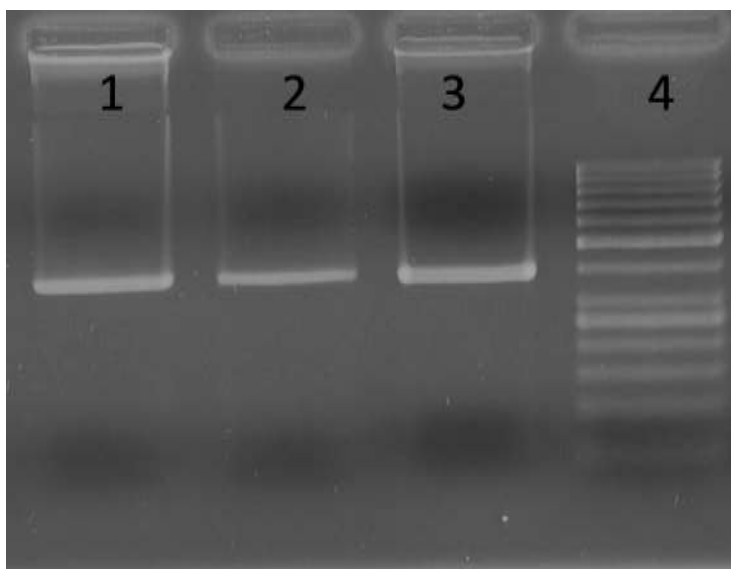
شناسایی مولکولی

تمامی نمونه های استافیلوکوک اورئوس با استفاده از پرایمر $23S rRNA$ مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند که پس از الکتروفورز ژل آگارز باندهایی با وزن مولکولی تقریباً ۳۲۰ جفت باز حاصل شد (تصویر ۶)



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن S rRNA 23 باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. ستون های ۴-۱: محصول PCR جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، ستون ۵: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

از تکثیر منطقه متغیر ژن کوآگولاز ۳۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در واکنش PCR یک دسته محصول با وزن ۷۱۰ bp.



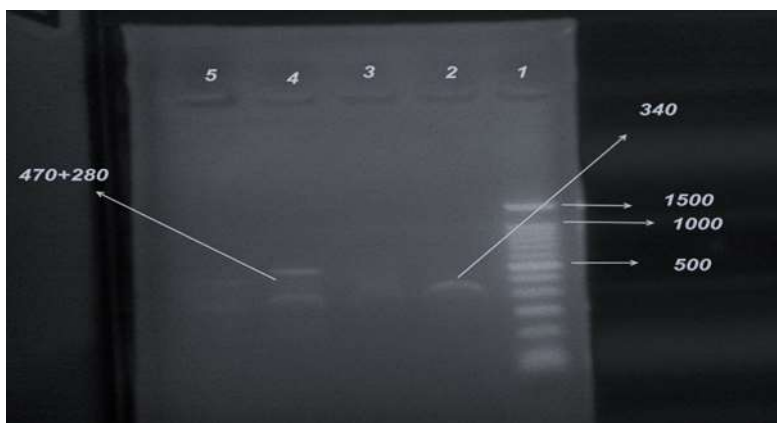
تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR منطقه متغیر ژن coa. ستون ۱ - ۳ محصول PCR به اندازه ۷۱۰ bp؛ و ستون ۴ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی

واکنش RFLP PCR

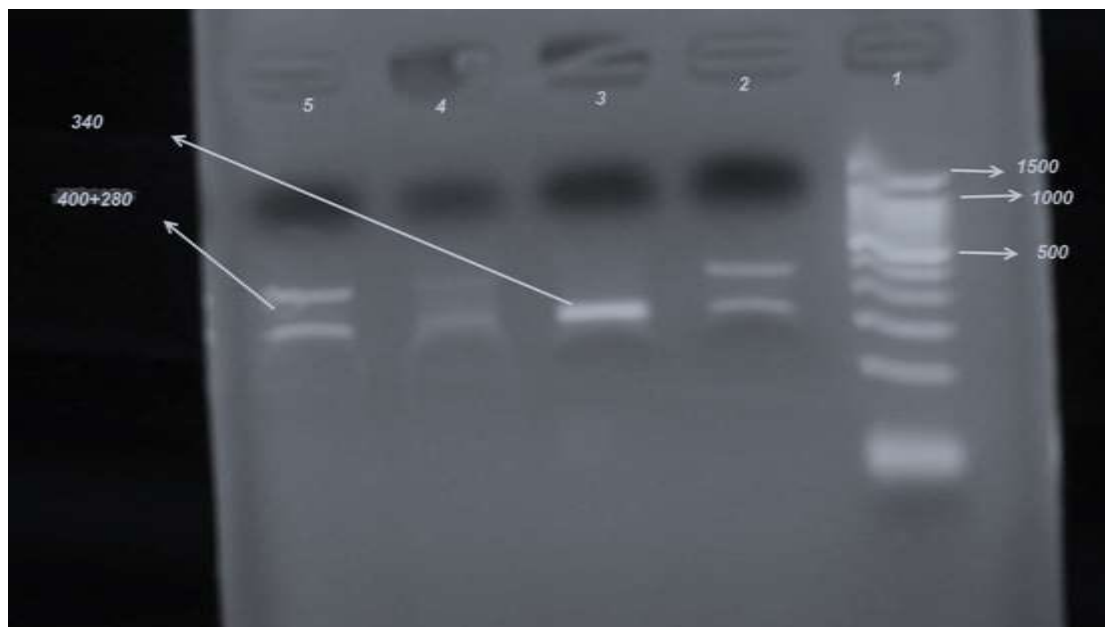
از هضم محصولات PCR منطقه متغیر ژن coa ۵۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آنزیم Alu I در نهایت ۴ الگوی مختلف مشاهده گردید

۱- الگوی ۲۸۰ + ۴۰۰ در ۱۳ ایزوله (۴۵٪)، ۲- الگوی ۲۸۰ + ۴۷۰ در ۴ ایزوله (۱۲٪)

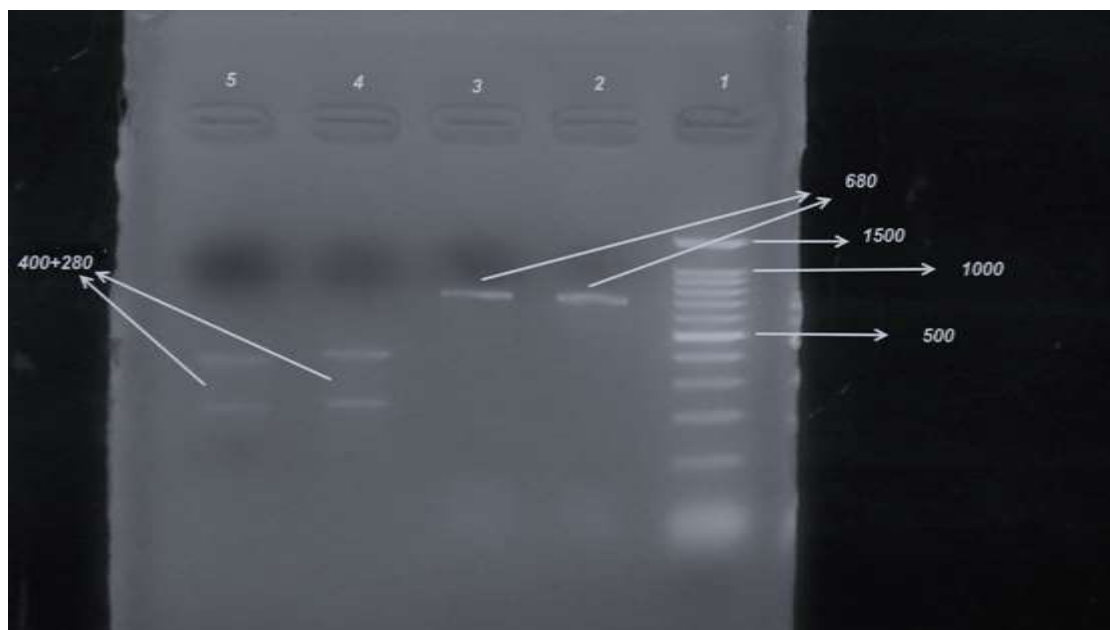
۳- الگوی ۳۴۰ + ۳۴۰ در ۶ ایزوله (۱۹٪)، ۴- الگوی بدون هضم ۷۱۰ در ۷ ایزوله (۲۴٪)



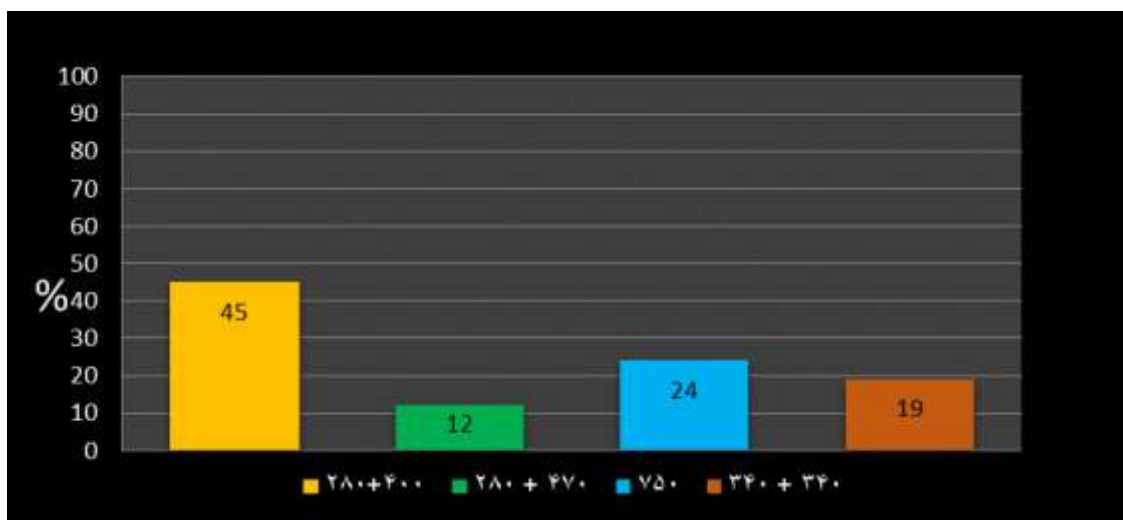
تصویر ۳: تصویر الکتروفورز الگوی RFLP $۲۸۰ + ۴۷۰$ و $۳۴۰ + ۳۴۰$. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۲: باند ۳۴۰ bp
 ۳۴۰ . ستون ۴: باند $۴۷۰ + ۲۸۰$ bp



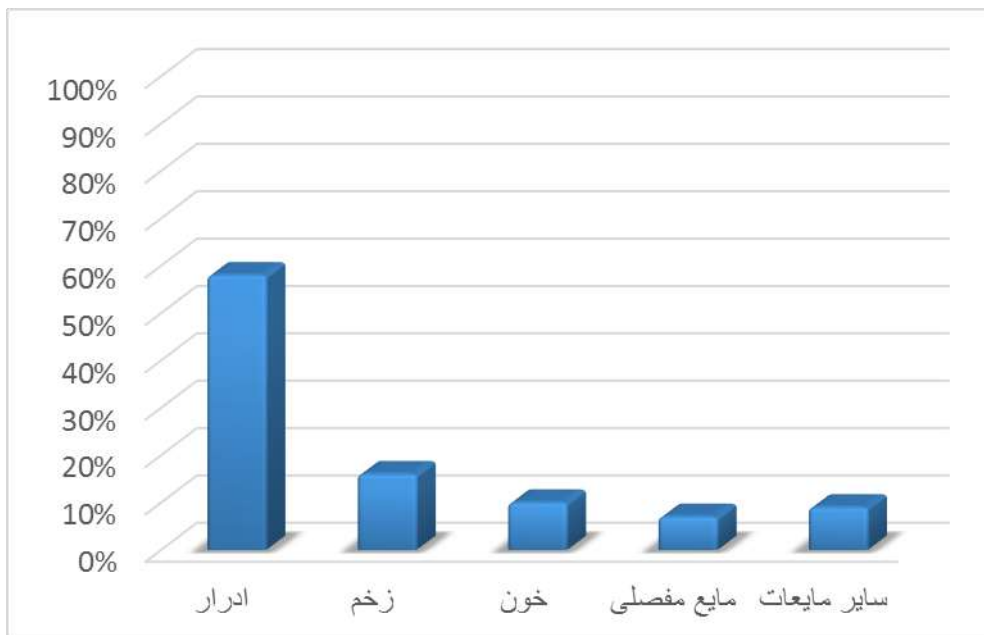
تصویر ۴: الگوی RFLP $۲۸۰ + ۴۰۰$ و $۳۴۰ + ۳۴۰$. ستون ۱: مارکر. ستون ۲، ۴ و ۵: باند $۴۰۰ + ۲۸۰$ bp. ستون ۳: باند ۳۴۰ bp



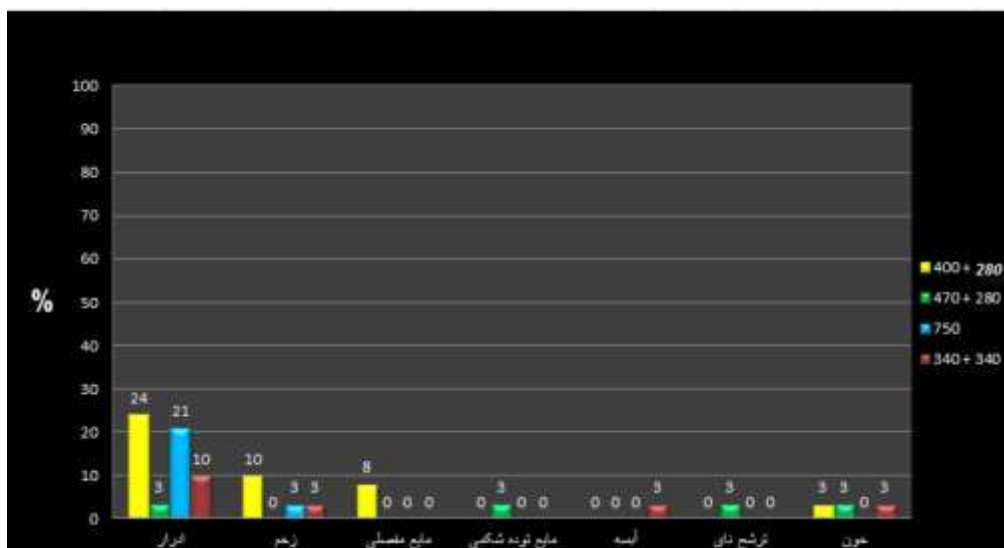
تصویر ۵: الگوی RFLP PCR ۴۰۰ + ۲۸۰ حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ۶۸۰ جفت بازی. ستون ۱: مارکر، ستون ۲ و ۳: باندهای ۶۸۰bp محصول PCR. ستون ۴ و ۵: باندهای ۴۰۰+۲۸۰ محصول هضم آنزیمی



نمودار ۲: درصد فراوانی هر یک از الگوهای RFLP PCR در جدایه های مورد مطالعه



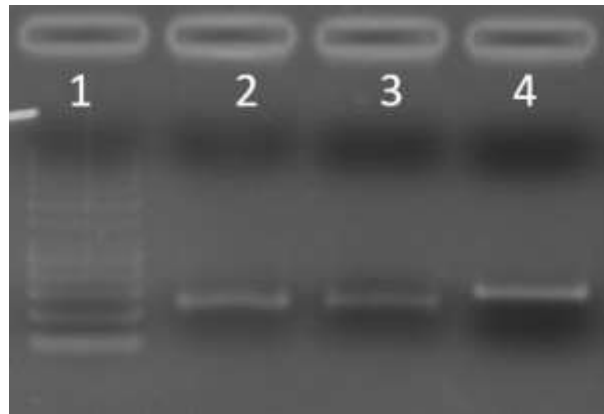
نمودار ۳: نشان دهنده درصد هر یک از الگوهای PCR در ضایعه های مختلف



نمودار ۴: نشان دهنده درصد هر یک از الگوهای RFLP در ضایعه های مختلف

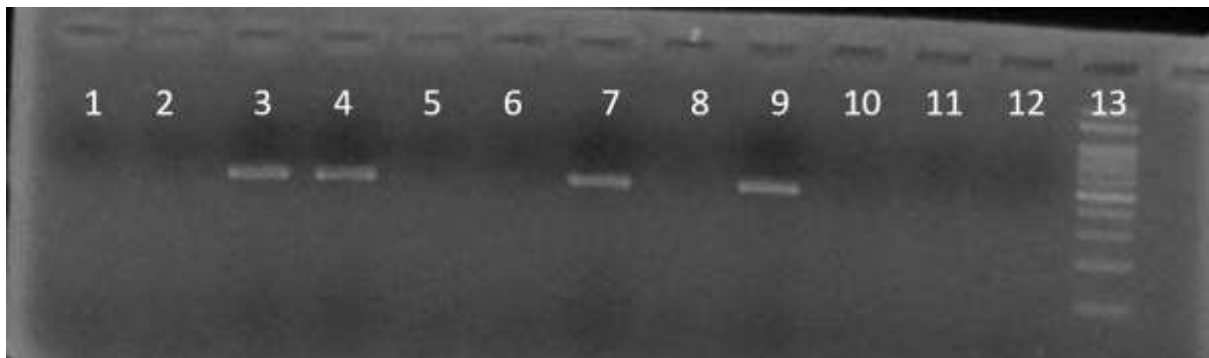
PCR ژن انتروتوکسین

از تکثیر منطقه متغیر ژن انتروتوکسین A ۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس ارئوس در واکنش PCR یک دسته محصول با وزن ۲۷۰bp.



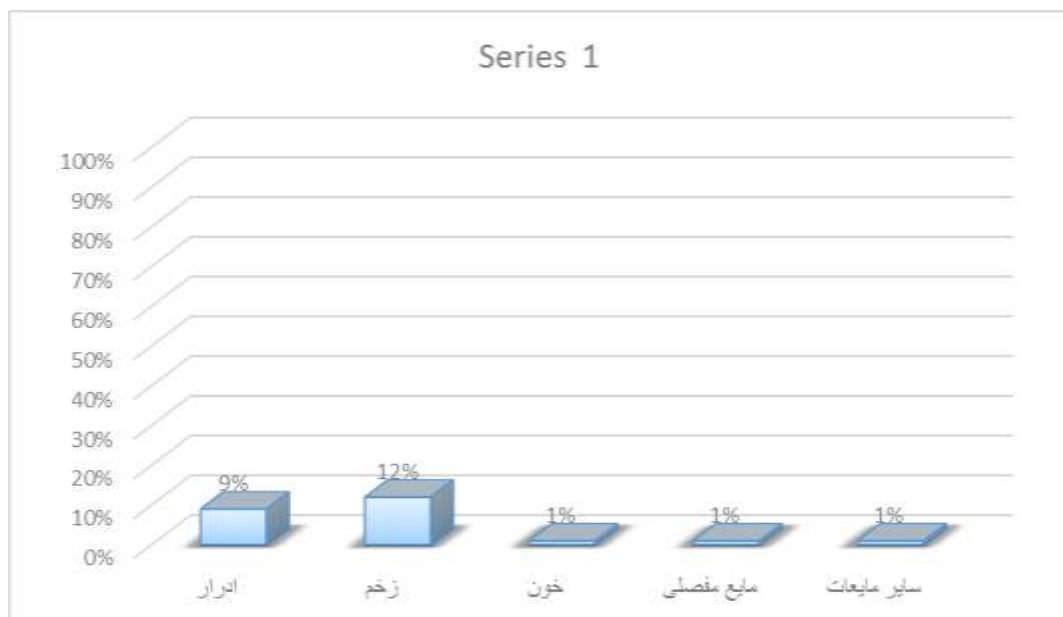
تصویر ۶: الکتروفورز محصول PCR منطقه متغیر ژن انتروتوکسین a. ستون ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی ستون ۲ - ۴ محصول PCR به اندازه ۲۷۰ bp.

از تکثیر منطقه متغیر ژن انتروتوکسین B ۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس ارئوس در واکنش PCR یک دسته محصول با وزن ۴۷۷bp.



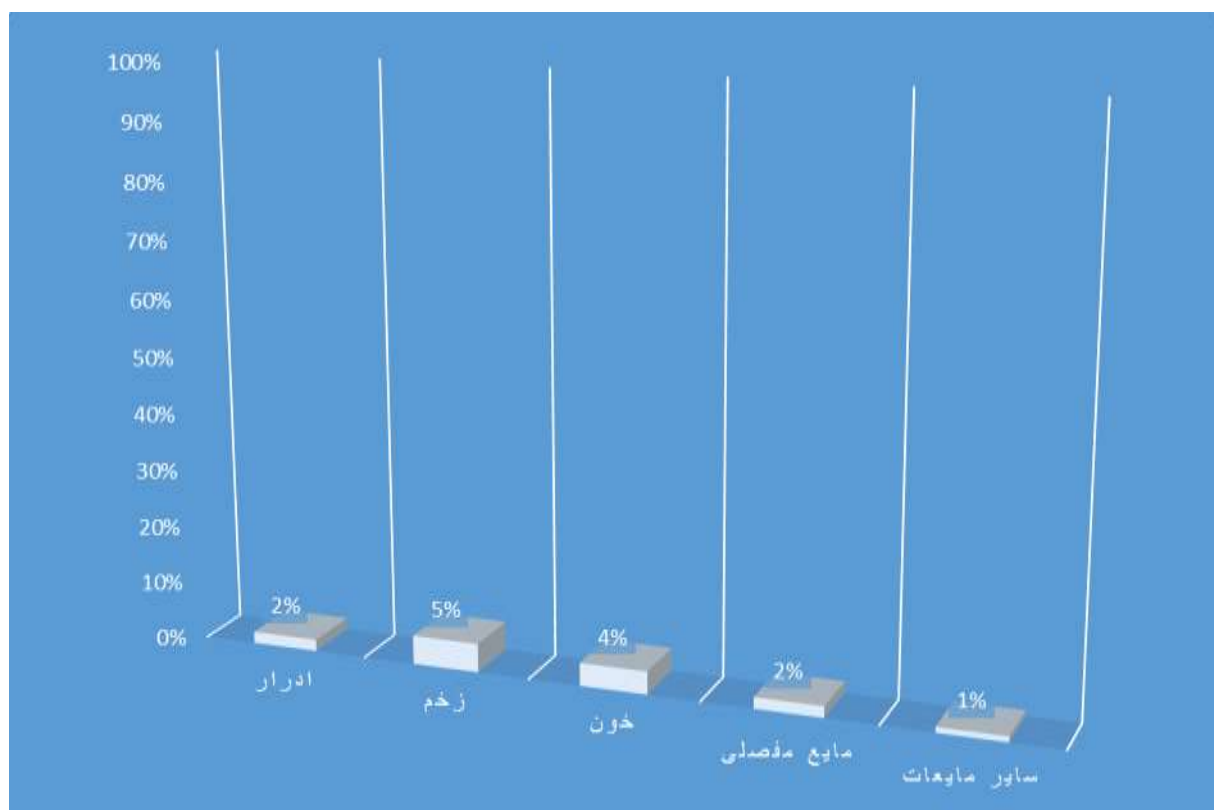
تصویر ۷: الکتروفورز محصول PCR منطقه متغیر ژن انتروتوکسین b. ستون ۱-۱۳=۲ محصول PCR به اندازه ۴۷۷ bp (ردیفهای ۳، ۴، ۷ و ۹ مثبت هستند) ستون ۱۳ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی

نتایج حاصل از ارتباط الگوهای PCR ژن انتروتوکسین آلفا با محل ضایعه در نمودار ۵ نشان داده شده است.



نمودار ۵: نشان دهنده درصد فراوانی انتروتوکسین آلفا در ضایعه های مختلف

نتایج حاصل از ارتباط الگوهای PCR ژن انتروتوکسین بتا با محل ضایعه در نمودار ۶ نشان داده شده است.

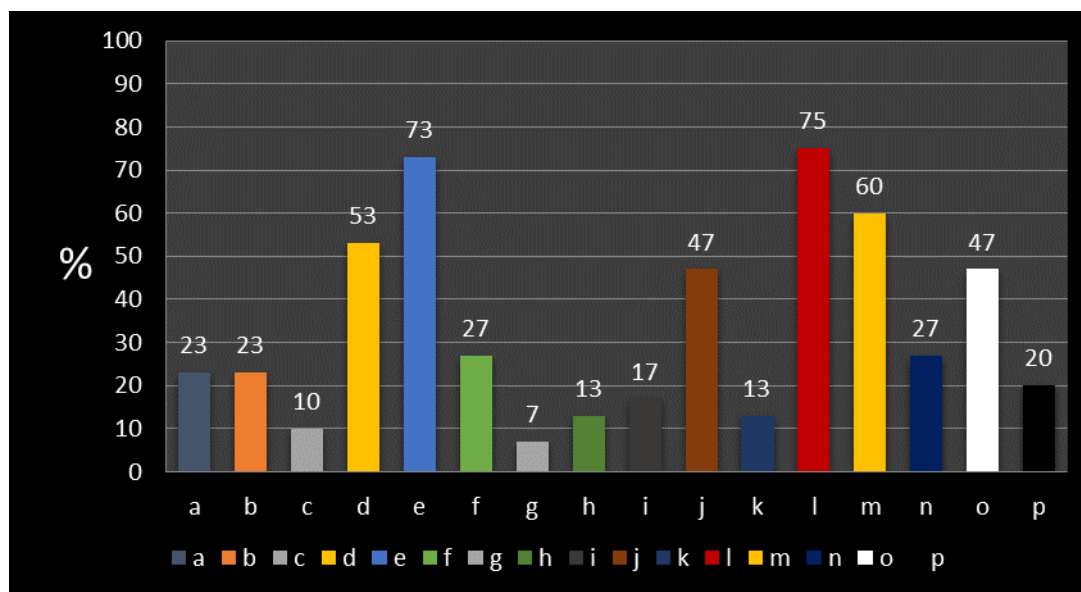


نمودار ۶: نشان دهنده درصد فراوانی انتروتوکسین بتا در ضایعه های مختلف

نتایج تست آنتی بیوگرام

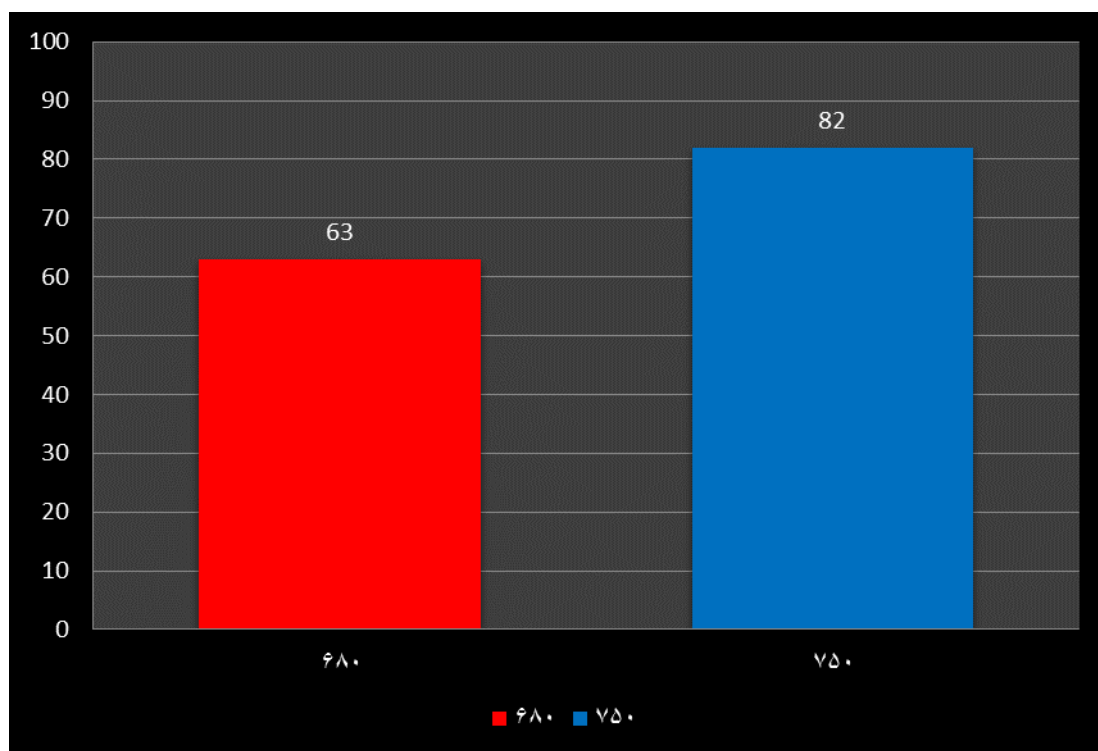
تست آنتی بیوگرام بر روی تمامی ایزوله های مورد نظر از استافیلوکوک اورئوس ها انجام پذیرفت که نتایج درصد مقاومت هر یک از ایزوله های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده به صورت زیر می باشد:

کلیندامایسین ۲۳٪، سفازولین ۲۳٪، جنتامایسین ۱۰٪، کلوزاسیلین ۵۳٪، آمپی سیلین ۷۳٪، نیتروفورنتائین ۲۷٪، ونکومایسین ۷٪، کو-تریموکسازول ۱۳٪، سیپروفلوکساسین ۱۷٪، اریترومایسین ۴۷٪، سفالکسین ۱۳٪، متی سیلین ۷۵٪، آموکسی سیلین ۶۰٪، آموکسی کلاو ۲۷٪، سفالتین ۴۷٪، تتراسایکلین ۲۰٪. درصد مقاومت ایزوله های مختلف نسبت به هر یک از آنتی بیوتیک ها در نمودار ۴-۶ نشان داده شده است. همچنین در نمودار های ۷ و ۸ درصد مقاومت هر یک از الگوهای PCR و RFLP نسبت به متی سیلین نشان داده شده است؛ که در بین الگوهای PCR: الگوی ۶۸۰ bp که در ۱۹ ایزوله مشاهده شده بود، ۱۲ نمونه (۶۳٪) مقاوم به متی سیلین بودند و الگوی ۷۵۰ bp که در ۱۱ ایزوله مشاهده شده بود ۹ ایزوله (۸۲٪) مقاوم به متی سیلین بودند؛ و در بین الگوهای RFLP: الگوی ۴۰۰+۲۸۰ bp که در ۱۳ ایزوله مشاهده شده بود ۷ ایزوله (۵۴٪) مقاوم به متی سیلین بودند، الگوی ۴۷۰+۲۸۰ bp که در ۴ ایزوله مشاهده گردیده بود هر ۴ ایزوله (۱۰۰٪) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند، الگوی ۷۵۰ bp که در ۷ ایزوله (۷۱٪) مشاهده گردیده بود ۵ ایزوله نسبت به متی سیلین مقاوم بودند و در نهایت الگوی ۳۴۰ bp که در ۶ ایزوله مشاهده شده بود ۵ ایزوله (۸۳٪) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند.

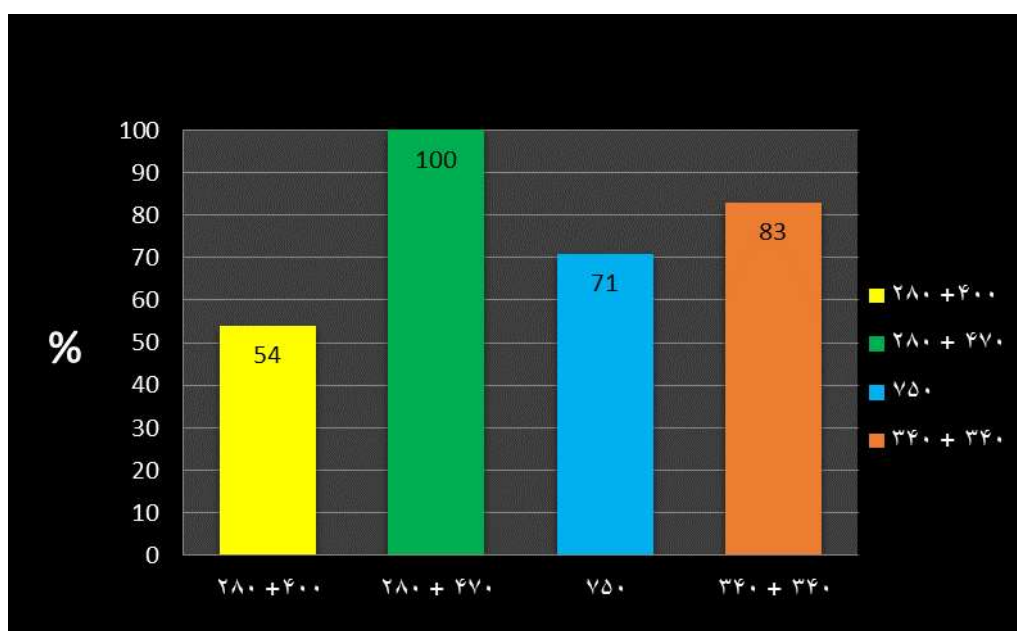


نمودار ۷: نشان دهنده درصد مقاومت هر یک از ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف.

Clindamycin. a Cefazolin. b Gentamicin. c Cloxacillin. d Ampicillin. e Nitrofurantoin. f Vancomycin. g Co-trimoxazole. h Ciprofloxacin. i Erythromycin. j Cefalexin. k Methicillin. l Amoxicillin. m Amoxi-clav. n Cephaletin. o Tetracyclin. p



نمودار ۸: نشان دهنده درصد مقاومت هر یک از الگوهای PCR نسبت به متی سیلین



نمودار ۹: نشان دهنده درصد مقاومت هر یک از الگوهای RFLP نسبت به متی سیلین

بحث

استافیلوکوک اورئوس مهمترین پاتوژن انسان در بین استافیلوکوک ها می باشد (۳۰) و یک علت مکرر از عفونت های انسانی است که اگر ناشی از سویه های مقاوم به داروهای ضد میکروبی باشد، می تواند جدی تر شود (۳۱). این باکتریها را می توان به عنوان یک علت مرتبط با سلامت و عفونت های شناخته شده در هر منطقه از جهان دانست (۳۲).

S. aureus یک پاتوژن مشترک است که با بیماریهای جدی در جامعه و بیمارستان مرتبط بوده و مدتهاست که به عنوان یک مشکل اصلی بهداشت عمومی در نظر گرفته می شود (۳۳ و ۳۴). اگرچه برخی از نویسندگان گزارش کرده اند که سایر استافیلوکوکهای کوآگولاز مثبت، مانند *S. intermedius* و *S. hyicus*، ممکن است انتروتوکسیژنیک باشند (۳۵). *S. aureus* گونه شایع درگیری در شیوع مسمومیت های ناشی از مواد غذایی است (۳۶). این ارگانیسم سومین علت شایع مسمومیت غذایی در جهان است (۳۷). با توجه به پیشرفت نسبتاً سریع مسمومیت غذایی با استافیلوکوک و بازگشت سریع به وضعیت بهداشتی عادی (برای اکثر افراد)، پیش بینی می شود که بیشتر موارد گزارش نشده است (۳۸). *S. aureus* توانایی تطبیق پذیری بالایی در ساکن شدن در میزبانهای مختلف و ایجاد عفونت در سایت های مختلف آناتومیک را دارد. فرض بر این است که فرآیندهای مولکولی مسئول بیماری اختصاصی میزبان تا حدودی به دلیل تفاوت در محتوای ژنی و تغییرات آلی بین سویه ها ایجاد می شود (۳۹). توانایی این ارگانیسم در ایجاد طیف گسترده ای از عفونت ها تا حدی به بیان هماهنگ و تنظیم شده چندین فاکتور بیماری زایی مرتبط با سلول و سطح بستگی دارد (۴۰ و ۴۱). یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری زایی برای *S. aureus* ژن کوآگولاز است (۴۲). تصور می شود بیان این ژن باعث افزایش رشد باکتری ها و ترویج عفونت در مواجهه با مکانیسم های دفاعی میزبان از جمله فاگوسیتوز شود (۴۳)؛ بنابراین ما در این مطالعه ژن کوآگولاز را مورد ارزیابی دادیم، نتایج مطالعه بر اثر هضم آنزیم *Alu I* در نهایت ۴ الگوی مختلف از این ژن کوآگولاز مشاهده گردید.

ژن کوآگولاز در اشکال مختلف آلی وجود دارد، بخشی از آن به دلیل وجود انواع ژن در منطقه کدینگ ۳ انتهایی است و این منطقه شامل یک سری توالی *DNA*، ۸۱ جفت بازی است که هم در تعداد تکرارهای پشت سر هم و هم در جایگاه های اثر آنزیم محدودالثر متفاوت است (۴۴). تایپینگ ژن کوآگولاز یکی از تکنیک های بی شمار مولکولی برای شناسایی و مقایسه انواع ژنوتایپ *S. aureus* است. این روش به عنوان روشی ساده، دقیق، به اندازه کافی تکرارپذیر، اختصاصی، قابلیت تفسیر آسان و افتراقی در مورد تایپینگ ایزوله های *S. aureus* مورد توجه قرار گرفته است (۴۵-۴۸) ناهمگونی ژنتیکی قابل توجهی در جمعیت های طبیعی ایزوله های *S. aureus* نشان داده شده است (۴۹). علاوه بر این محصولات تک رشته *PCR* ژن کوآگولاز در *S. aureus* نشأت گرفته از حیوانات گزارش شده است (۵۰)، در حالی که محصولات تکثیر دو رشته ای از برخی ایزوله های منشأ انسانی گزارش شده است (۵۱).

همچنین شناسایی باند های منفرد توسط *PCR* ژن کوآگولاز در تمام *S. aureus* های انسانی جدا شده نشان می دهد که این ایزوله ها ممکن است منشأ گاوی باشد و نه انسانی و احتمال انتقال باکتری ها را از گاوها به انسان نشان می دهد. برای مثال نمونه های چرکی از بیماران بیمارستان نمازی شیراز که یک مرکز اصلی پزشکی در استان فارس است جمع آوری شد و بیشتر بیماران این بیمارستان از شهرهای کوچک نزدیک شیراز می آیند که شغل آنها غالباً با حیوانات مزرعه همراه است. می توان نتیجه گرفت که آلودگی انسان ممکن است در نتیجه تماس نزدیک با حیوانات باشد. برخلاف مطالعه ما هضم محصولات *PCR* ژن کوآگولاز جدا شده انسانی، با *AluI* و *Hin6*، به ترتیب باعث ایجاد ۸ و ۷ پروفایل محدود کننده مختلف شد، که نشان دهنده ناهمگونی قابل توجهی در ژن کوآگولاز این ایزوله ها می باشد (۵۲).

مشابه مطالعه ما در مطالعه ای هضم محصولات *PCR* ژن کوآگولاز ماستیتیک جدا شده با *AluI* و *Hin6*، ۳ پروفایل محدود کننده متفاوت را ایجاد کرد که نشان دهنده وجود هتروژنی در ژن کوآگولاز در منطقه شیراز است (۵۳)؛ اما در تحقیق دیگری هضم محصولات *PCR* کوآگولاز با *AluI* و *Hin6*، ۶ پروفایل محدود کننده مختلف را ایجاد کرد که نشان دهنده وجود هتروژنی در ژن کوآگولاز این جدا شده ها است (۵۴). مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر، طول و محدودیت های مختلف

پروفایل ژن انعقادی را نشان داد (۵۵). دلیل پلی مورفیسم در بین *S. aureus* جدا شده، نامشخص است اما به نظر می رسد به دلیل جهش حذف یا درج شده است که توسط آن بخشی از ناحیه انتها ۳ ژن کوآگولاز حذف می شود یا چندین نوکلئوتید درج می شود و در نتیجه اندازه ژن کوآگولاز و احتمالاً خاصیت آنتی ژنی آنزیم کوآگولاز تغییر می کند. این منطقه از ژن کوآگولاز ممکن است نقش مهمی در تغییرات آنتی ژنی کوآگولاز و فرار آن از اثر مهارى عوامل ضد انعقادی داشته باشد. عوامل آنتی بادی و غیر آنتی بادی می توانند فعالیت انعقاد خون را خنثی کنند و بنابراین مقاومت در برابر عفونت های استافیلوکوکی را افزایش دهند (۵۶).

برخی از گونه های *S. aureus* توسط آنزیم های محدود کننده هضم نمی شوند. توضیح احتمالی ممکن است تغییرات ژنتیکی در ناحیه مکرر پلی مورفیک ژن *coa* به دلیل جهش نقطه ای باشد (۵۷). تا به امروز چندین گزارش از توالی ژنوم کامل *S. aureus* وجود دارد. در مطالعه ای، تجزیه و تحلیل ژن کوآگولاز از ۵ جدا شده انتخابی، شباهت بالایی را بین توالی ژن *coa* آنها و سایر گزارش ها نشان داد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی جمع شده در مناطق تکراری هر ۵ جدا شده و هر یک از جدا شده ها هویت بالایی را در مناطق تکراری ژن *coa* نشان داد. با توجه به نمودار توالی یابی، می توان نتیجه گرفت که تفاوت بین توالی ژن *coa* در ۵ جدا شده انتخابی با سایر گزارشات بسیار قابل قبول بوده و به دلیل جهش نقطه ای بوده است (۵۸). روش RFLP-PCR برای گروه بندی سریع و ارزان *S. Aureus* بسیار عالی است، و می تواند به عنوان یک غربالگری اولیه ایزوله ها برای بهداشت عمومی و مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. تجزیه و تحلیل محدود کننده ژن کوآگولاز یک روش قابل اعتماد برای تعیین روابط اپیدمیولوژیک بین ایزوله های *S. aureus* است و می تواند یک روش مناسب برای تعیین منشأ ایزوله های *S. aureus* در نظر گرفته شود. همچنین، توالی یابی ناحیه ژنی کوآگولاز سویه های *S. aureus* با همان الگوهای RFLP برای کشف میزان تغییرپذیری ژن کوآگولاز پیشنهاد شده است.

علاوه بر بررسی ژن کوآگولاز، در این مطالعه انتروتوکسین های A و B در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های بیماران مراجعه کننده به بیمارستان نفت اهواز بررسی شد، PCR مربوط به دو انتروتوکسین نشان دهنده درصد فراوانی متفاوتی از انتروتوکسین آلفا در ضایعه های مختلف بود که بیشترین درصد فراوانی مربوط به نمونه های ادراری و کمترین مربوط به مایعات مفصلی و خون بود؛ اما در مورد انتروتوکسین بتا بیشترین درصد فراوانی مربوط به زخم و کمترین مربوط به نمونه های ادرار بود. علاوه بر این تست آنتی بیوگرام بر روی تمامی ایزوله های مورد نظر از استافیلوکوک اورتوس ها انجام پذیرفت که نتایج درصد مقاومت هر یک از ایزوله های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه گزارش شد. این نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین (۷۵٪) بود. همچنین درصد مقاومت هر یک از الگوهای PCR و RFLP نسبت به متی سیلین بررسی شد که در بین الگوهای PCR الگوی ۶۸۰bp که در ۱۹ ایزوله مشاهده شده بود، ۱۲ نمونه (۶۳٪) مقاوم به متی سیلین بودند و الگوی ۷۵۰bp که در ۱۱ ایزوله مشاهده شده بود ۹ ایزوله (۸۲٪) مقاوم به متی سیلین بودند؛ و در بین الگوهای RFLP الگوی ۴۰۰+۲۸۰bp که در ۱۳ ایزوله مشاهده شده بود ۷ ایزوله (۵۴٪) مقاوم به متی سیلین بودند، الگوی ۴۷۰+۲۸۰bp که در ۴ ایزوله مشاهده گردیده بود هر ۴ ایزوله (۱۰۰٪) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند، الگوی ۷۵۰bp که در ۷ ایزوله (۷۱٪) مشاهده گردیده بود ۵ ایزوله نسبت به متی سیلین مقاوم بودند و در نهایت الگوی ۳۴۰bp که در ۶ ایزوله مشاهده شده بود ۵ ایزوله (۸۳٪) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند. مشابه این مطالعه در مقاله ای مشخص شد که از ۱۱۷ سویه کوآگولاز منفی متعلق به خانواده *Micrococcaceae*، ۱۲ سویه انتروتوکسین تولید می کنند، توزیع سروتایپ های انتروتوکسینی متنوعی که توسط این ۱۲ سویه تولید می شوند، نشان دادند

که انتروتوکسین SEC از همه انتروتوکسینها بیشتر مشاهده شد (در ۶ سویه) در حالیکه SEA در ۵ سویه و SEB در یک سویه تشخیص داده شدند. سویه مولد SEB توانایی تولید SEA و SEC را نیز دارا بود. توکسینهای سیتولیتیک و همولیتیک در استافیلوکوک های کواگولاز منفی مشاهده شده اند (۵۹) و *S. epidermidis* چند بار مشکوک به ایجاد مسمویت غذایی تشخیص داده شده است (۶۰). علاوه بر این Noletto و Bergdoll (۶۱) وقتی نتوانستند سویه مولد انتروتوکسینی تشخیص دهند، چنین موردی را توصیف کردند. فقط *S. aureus* غیر انتروتوکسیژنیک یا سویه های کواگولاز منفی متعلق به خانواده Micrococcaceae جداسازی و شناسایی شدند. در یک مورد دیگر، در ۱۴۵ نفر مبتلا به گاستروانتریت ناشی از مسمویت غذایی، *S. epidermidis* بعنوان منبع بیماری پیشنهاد شد (۶۲).

واضح است که تولید انتروتوکسین در اعضای خانواده Micrococcaceae فقط به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت محدود نمی شود (۶۳). Bergdoll و همکاران (۶۱) از بین ۲۲ سویه متعلق به *S. epidermidis* که از واژن بیماران مبتلا به سندرم شوک سمی ۱ جداسازی شده بودند، دو سویه مولد انتروتوکسین استافیلوکوکی F را یافتند و این بیانگر آن است که *S. epidermidis* احتمالا باید جدی تر گرفته شود.

در یک مطالعه نشان داد که تولید انتروتوکسین در سویه های استافیلوکوک کواگولاز منفی متعلق به گونه های *S. epidermidis*، *S. haemolyticus*، *S. capitis*، و *M. luteus* نیز رخ میدهد. اختصاصیت کواگولازهای تولید شده توسط سویه های جداسازی شده از حیوانات مختلف منجمله انسان برای لخته کردن پلاسمای خون از حیوانات مختلف، بیانگر هتروژنیک بودن ۲ این کواگولازهاست؛ بنابراین برای اطمینان از کواگولاز منفی بودن سویه های انتروتوکسیژنیک در مطالعه حاضر، پلاسمای خون تمام حیواناتی که این باکتریها از آنها جداسازی شدند، مورد استفاده قرار گرفت. مثبت بودن تست واکنش DNase که در برخی از سویه ها مشاهده شد، حاکی حضور احتمالی *S. hyicus* می باشد، اما این گونه با استفاده از معیارهای دوریس شناسایی نشد (۶۴). اگر تست DNase روی غذای مشکوک انجام می گرفت، اینها را می شد بعنوان عامل مسمویت غذایی تشخیص داد. سویه های انتروتوکسیژنیک در بین کوکسی های کواگولاز منفی شیوع ۱۱ درصدی داشتند، درحالیکه شیوع آنها در بین سویه های متعلق به *S. aureus* حدود ۶۰٪ بود. Danielson و Hellberg (۶۵) گزارش دادند که ۷٪ استافیلوکوک های کواگولاز منفی انتروتوکسین تولید می کنند. البته آنها تست کواگولاز را فقط روی پلاسمای خرگوش انجام داده بودند.

بنظر میرسد که استفاده از شیوه های ایمنولوژیک رویکرد نسبتا کارآمدتری برای تشخیص انتروتوکسین باشد. تکنیک الایزا حساس، اختصاصی و سهل استفاده است. در صورت حضور موادی که تداخل ایمنولوژیکی ایجاد می کنند، ممکن است پاسخ مثبت کاذب حاصل شود، اما با توجه به تجربیاتی که تابحال بدست آورده ایم، این احتمال هیچ مشکلی بوجود نمی آورد. سویه های کواگولاز منفی متعلق به خانواده Micrococcaceae را باید تولیدکنندگان احتمالی انتروتوکسین در نظر گرفت، هرچندکه تعداد آنها مشخصا از سویه های *S. aureus* کمتر است. این سویه های کواگولاز منفی در مقایسه با سویه های *S. aureus* مقادیر مشابهی انتروتوکسین تولید می کنند، اما مقدار آن در برخی سویه های جداسازی شده از موارد مبتلا به مسمومیت غذایی ممکن است به ۱۰۰ µg/ml برسد.

¹ Toxic Shock Syndrome

² Heterogenicity

منابع

1. E. OrtegaMorenteA, Gálvezdel Postigo Ruiz, R. P. Pulido. Staphylococcus: Detection. Encyclopedia of Food and Health. 2016:128-32.
2. E. Martin, G. Lina, Dumitrescu O. STAPHYLOCOCCUS | Staphylococcus aureus. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). 2014:501-7.
3. A. F. Gillasp, J. J. Iandolo. STAPHYLOCOCCUS | Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). 2014:482-6.
4. Cuong Vuong, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microbes and Infection. 2002;4(4):481-9.
5. AnicaGraf, Richard J. Lewis, StephanFuchs, MartinPagels, SusanneEngelmann, Katharin, et al. The hidden lipoproteome of Staphylococcus aureus. International Journal of Medical Microbiology 2018;308(6):569-81.
6. WE K. Natural populations of the genus Staphylococcus. Annual Review of Microbiology. 1980;34:559-92.
7. Tong SY, Schaumburg F, Ellington MJ, Corander J, Pichon B, Leendertz F, et al. Novel staphylococcal species that form part of a Staphylococcus aureus-related complex: the non-pigmented Staphylococcus argenteus sp. nov. and the non-human primate-associated Staphylococcus schweitzeri sp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2015;65:15-22.
8. Cimolai. MRSA and the environment: implications for comprehensive control measures. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2008;27(7):481-93.
9. Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, F G. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress. Infection and immunity 2006;74(8):4950-3.
10. Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: A semantic awareness issue. Trends in Microbiology. 2009;17(4):139-45.
11. Madigan, Michael T, Martinko JM. Brock Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall. 2006.
12. Patel AH, Nowlan P, Weavers ED, T F. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of Staphylococcus aureus isolated by allele replacement. Infect Immun. 1987;55(12):3103-10.
13. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, et al. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(10):5399-404.
14. WF V. A type-specific antigenic protein derived from the staphylococcus. The Journal of Experimental Medicine. 1940;71(5):635-44.

15. Shey-YingChen, HaoLee, Xiao-MeiWang, Tai-FenLee, Chun-HsingLiao, Lee-JeneTeng, et al. High mortality impact of *Staphylococcus argenteus* on patients with community-onset staphylococcal bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018;52(6):747-53.
16. Svec P, Vancanneyt M, Sedláček I, Engelbeen K, Stetina V, Swings J, et al. Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska-Czerwinska et al. ۱۹۹۵ as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus* Webster et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54:2213-5.
17. Yasser S. Mahmmod, Ilka ChristineKlaas, LineSvennesen, KarlPedersen, HanneIngmer. Communications of *Staphylococcus aureus* and non-aureus *Staphylococcus* species from bovine intramammary infections and teat apex colonization. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(8):7322-33.
18. Gessica Perin, Matheus D. Baldissera, Antonise M. Jaguezeski, Regiane B. Crecencio ,Silva ASd. Involvement of the phosphoryl transfer network on cardiac energetic metabolism during *Staphylococcus aureus* infection and its association to disease pathophysiology. *Microbial Pathogenesis*. 2019;126:318-22.
19. Mostafa Mostafa, Mohammad Nassef, Badr A. Computational determination of the effects of virulent *Escherichia coli* and *salmonella* bacteriophages on human gut. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2016;135:27-35.
20. Takahashi T, Satoh I, N K. Phylogenetic relationships of ۳۸ taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999;49:725-8.
21. Patrick T. LaBreck, Zhaozhang Li, Kevin P. Gibbons, Merrell DS. Conjugative and replicative biology of the *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance plasmid, pC02. *Plasmid*. 2019;102:71-82.
22. Monika Zovčáková, Alena Španová, Roman Pantůček, Jiří Doškař, Rittich B. Efficient non-enzymatic cleavage of *Staphylococcus aureus* plasmid DNAs mediated by neodymium ions. *Analytical Biochemistry*. 2016;507(۷۰-۶۶).
23. Tibor Botka, Vladislava Růžicková, Karla Svobodová, Roman Pantůček, Doškař J. Two highly divergent lineages of exfoliative toxin B-encoding plasmids revealed in impetigo strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017;307(6):291-6.
24. Maysaa El, Sayed Zaki, Samah Bastawy, Montasser K. Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;17:94-7.
25. Suresh Kumar Mendem, Triveni Alasthimannahalli Gangadhara, Channappa T. Shivannavar, Gaddad SM. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multi center study from India. *Microbial Pathogenesis*. 2016;98:167-70.

26. Nerida Cole, Emma B. H. Hume, Shamila Khan, Linda Garthwaite, Willcox MDP. The role of CXC chemokine receptor 2 in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Experimental Eye Research*. 2014;127:184-9.
27. Andrea Mendoza Bertelli, María Victoria Delpino, Santiago Lattar, Constanza Gai, Gómez MI. *Staphylococcus aureus* protein A enhances osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(10):1975-83.
28. James P. Grayczyk, Cameron J. Harvey, Irina Laczkovich, Alonzo F. A Lipoylated Metabolic Protein Released by *Staphylococcus aureus* Suppresses Macrophage Activation. *Cell Host & Microbe*. 2017;22(5):678-87.
29. Emilia Bonar, Jacek Międzobrodzki, Władysław B. The Staphylococcal Coagulases. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* 2018. p. 95-102.
30. Winn, W., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger and G. Woods (۲۰۰۶). "Color atlas and textbook of diagnostic microbiology." ۶th ed. Wolters Kluwer Company.
31. Schlegelova, J , M. Dendis, J. Benedik, V. Babak and D. Rysanek (۲۰۰۳). "Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype." *Vet. Microbiol* , ۹۲: ۳۳۴-۳۲۷.
32. El-Jakee, J., A. S. Nagwa, W. A. Gad El-Said, M. A. Bakry, A. A. Samy, E. A. Khairy and E. A. Elgabri (۲۰۱۰). "Diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from human and bovine estimated by PCR -gene analysis." *J. Am. Sci.*, ۴۹۸-۶: ۴۸۷
33. Pesavento, G., B. Ducci, N. Comodo and A. L. Nostro (۲۰۰۷). "Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." *Food. Control.*, ۱۸: ۲۰۰-۱۹۶
34. Pereira, V., C. Lopes, A. Castro, J. Silva, P. Gibbs and P. Teixeira (۲۰۰۹). "Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal." *Food. Microbiol.*, ۲۶: ۲۸۲-۲۷۸.
35. Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy, G. Prevost, C. Lapeyre, M. Bes, Y. Brun and J Fleurette (۱۹۹۶). "Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese." *Int. J. Food. Microbiol.*, ۳۰: ۲۸۰-۲۷۱
36. Aragon-Alegro, L. C., E. M. Konta, K. Suzuki, M. G. Silva, A. F. Júnior, R. Rall and V. L. M. Rall (۲۰۰۷). "Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains." *Food Control.*, ۱۸: ۶۳۴-۶۳۰.

37. Acco, M., F. S. Ferreira, J. A. P. Henriques and E. C. Tondo (۲۰۰۳). "Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers." *Food Microbiol.*, ۲۰: ۴۹۳-۴۸۹
38. Pinto, B., E. Chenoll and R. Aznar (۲۰۰۵). "Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques." *Syst. Appl. Microbiol.*, ۲۸: ۳۵۲-۳۴۰
39. Danielson, M. -L. & Hellberg, B.: The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. *Acta vet. scand.* 18: 266-273, 1977.
40. Devriese, L. A.: Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Am. J. vet. Sci.* 38: 787- 791, 1976. I I. Devriese, L. A. & Oeding, P.: Characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from different animal species. *Res. vet. Sci.* 21: 284-291, 1976.
41. Gemmel, C. G. & Roberts, C. E.: Toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci isolated from human infections. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Praha)* 18: 276-280, 1974.
42. Noleto. A. L. & Bergdoll, M. S.: Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enter
43. Olsvik, O. & Berdal, B. P.: A sensitive ELISA method for protein A detection. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 89: 289-290, 198 1.
44. Olsvik, O., Berdal. B. P. Fossum. K. & Omland. T.: Enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. *Acta path. microbiol. and. Sect. B*, 89: 423-426. 198 I.
45. Omori, G. & Kato, Y.: A staphylococcal foodpoisoning caused by a coagulase-negative strain, *Biken J.* 2: 92-96, 1959.
46. Sandvik, O.: The occurrence of antibodies against staphylococcal deoxyribonucleases in blood sera from different species. *Acta vet. scand.* 15: 631- 635. 1974.
47. Schleijer, K. H. & Kloos, W. E.: A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. clin. Microbiol.* I: 337-338, 1975.
48. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and micrococci. Appendix. 1. Identification of staphylococci. *Int. J. system. Bacteriol.* 26: 333-334. 1976.
49. Tager, M.: Current views on the mechanisms of coagulase action in blood clotting. In: Recent advances in staphylococcal research. *Ann. N. Y. Acad. Sci. (Wash.)* 236: 277-291. 1974.
50. Victor. R., Lachica. E., Weiss, K. F. & Deibel, R. H.: Relationship among coagulase, enterotoxin and heatstable deoxyribonuclease by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18: 126-1 27. 1969.
51. Bergdoll, M. S.: Enterotoxins. In: Montie. T. C., Kadis, S. & Ali. S. J. (Eds.): *Microbial toxins*. Academic press, New York 1970, pp. 266-321.
52. Bergdoll, M. S., Weiss, K. F. & Muster, M. J.: The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative microorganism. *Baa. Proc.* 12. 1967. 6.

53. Bergdoll, M. S. Crass, B. A., Reiser, R. F., Robbins. R. N. & Davis, J. P.: A new staphylococcal enterotoxin F. associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* i: I07 1-102 I, I98 I.
54. Breckinridge, J. C. & Bergdoll. M. S.: Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing staphylococcus. *N. Engl. J. Med.* 284: 541-543, 1971. 8. Casman, E. P.: Staphylococcal enterotoxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 128: 124-131. 1965.
55. Akatov. A. K., Mochmann, H., Kharenever M. L., Richter, U., Kushko. 1. V. Karsh. W., Voropaeva, S. D. & Mazurenko, M. K.: Occurrence of enterotoxigenic strains among *Staphylococcus aureus* isolated from different sources. *Zh. Mikrob. Epidem. Immun. SSSR.* 11: 56-60. 1980.
56. Danielson, M. -L. & Hellberg, B.: The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. *Acta vet. scand.* 18: 266-273, 1977.
57. Olsvik, ., Fossum. K. & Berdal. B. P. Staphylococcal enterotoxin A. B. and C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococcaceae. *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. B.* ۱۹۸۲, ۴۴۴-۹۰:۴۴۱.
58. Maria I. Bokarewa TJ, Andrej Tarkowski. *Staphylococcus aureus: Staphylokinase. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2006;38(4):504-9.
59. Harris LG, Foster SJ, RG R. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells & Materials.* 2002(4):39-60.
60. Shey-YingChen, HaoLee, Xiao-MeiWang, Tai-FenLee, Chun-HsingLiao, Lee-JeneTeng, et al. High mortality impact of *Staphylococcus argenteus* on patients with community-onset staphylococcal bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2018;52(6):747-53.
61. Winn, W., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger and G. Woods (۲۰۰۶). "Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. " ۹th ed. Wolters Kluwer Company.