انتشار کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران، کرج و اصفهان در سال ۱۳۹۷

فاتح رحیمی[۱]*، فاطمه محقق[۲]، نرگس سادات مصطفوی[۱]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: خرداد نود و نه پذیرش برای چاپ: مرداد نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یک بیماری‌زای انسانی بسیار خطرناک است که باعث ایجاد عفونتهای ادراری پایدار و عود شونده ناشی از بیوفیلم می شود که اثرات منفی شدیدی بر سلامت بیماران دارد. در این مطالعه، انتشار کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهرهای تهران، کرج و اصفهان تعیین گردید.*

روش کار: *در طی سال ۱۳۹۷، در مجموع ۲۹۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از بیمارستانهای شهرهای تهران، کرج و اصفهان جمع آوری شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nuc مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین از روش انتشار از دیسک سفوکسی تین با استفاده از دستورالعملهای CLSI و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن mecA استفاده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با استفاده از روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت تعیین گردید. جهت تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم از ترکیبی از روشهای مولکولی پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ و agr تایپینگ استفاده شد.*

یافته ها: *در مجموع ۸۳ سویه (۲۸ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از بیماران در هر ۳ شهر جدا گردید و شیوع سویه های مقاوم در تهران، اصفهان و کرج به ترتیب ۳۱، ۲۸ و ۲۳ درصد بود. در آزمون ژلوز قرمز کنگو به ترتیب ۸۰، ۵۴، ۸۶ درصد سویه های جدا شده از شهرهای تهران، کرج و اصفهان اسلایم مثبت و اسلایم کاذب بودند و فراوانی سویه های مولد بیوفیلم در شهرهای تهران، کرج و اصفهان به ترتیب ۷۰، ۵۴، ۷۶ درصد بود. در مجموع ۴ پروفاژ تایپ SGA، SGB، SGF و SGL، دو ساب تایپ SGFa و SGFb و ۴ الگوی پروفاژی در میان سویه ها شناسایی گردید که ۳ الگوی پروفاژی در میان سویه های هر ۳ شهر مشابه بودند. SCCmec تایپهای III، IV و V و ۴ agr تایپ مختلف نیز در میان سویه ها شناسایی گردید.*

نتیجه گیری: *حضور و دوام گروه های کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم واجد الگوهای تایپینگ مشابه در میان بیماران در شهرهای تهران، کرج و اصفهان نشان دهنده منشاء مشترک و انتشار گسترده این سویه ها در ایران است.*

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، تایپینگ، عفونت ادراری، پروفاژ، SCCmec، agr

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از برجسته ترین و مهمترین عوامل ایجاد عفونتهای باکتری اکتسابی از بیمارستان و جامعه در سطح جهان و به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد. با وجود اینکه علت ایجاد این بیماریها چندین عامل بوده و به طور گسترده ای وابسته به حساسیت میزبان می باشد، اما احتمالا ناهمگونی و غیریکنواخت بودن جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس نقش مهمی را در این فرآیند ایفا می کنند. ناهمگونی در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس تا حدودی در نتیجه برهمکنش با میزبانها ایجاد می شوند (۱). جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس از جمله عوامل نسبتاً غیررایج عفونتهای دستگاه ادراری محسوب می شوند و استفاده از ابزارهای خارجی از قبیل سوندهای ادراری باعث افزایش خطر حضور باکتریها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس در دستگاه ادراری می شود (۲). قابلیت ایجاد عفونت ادراری توسط استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از توانایی بالای این باکتری در ایجاد بیوفیلم است.

بیوفیلم باکتریایی اجتماع میکروبی پیچیده و سازمان یافته از سلولهای باکتریایی است که به یک سطح زنده یا غیر زنده متصل هستند و درون ماتریکس پلی‌ساکاریدی و یا پروتئینی محصور شده است. تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس شامل ۳ مرحله اتصال، بلوغ و انتشار است. بیوفیلم تشکیل شده و همچنین تغییر باکتریها در ساختار بیوفیلم به گونه ای است که باعث کاهش تأثیر مواد ضدمیکروبی از جمله آنتی بیوتیکها می شود (۳).

از زمان معرفی پنی سیلین برای اهداف بالینی در اوایل ۱۹۴۰، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام رو به افزایش نهاده است. این پدیده نتیجه کسب پلاسمید رمزکننده پنی سیلیناز (آنزیم هیدرولیز کننده پنی سیلین) است که قادر به شکستن حلقه بتا-لاکتام و متعاقبا غیرفعال کردن مولکول آنتی بیوتیک می باشد. جدایه های مقاوم به پنی سیلین به سرعت نه تنها در بیمارستانها و مراکز بهداشتی بلکه در اجتماع نیز پراکنده شدند. برای غلبه بر عفونتهای ناشی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین، یک پنی سیلین نیمه صناعی با طیف محدود (متی سیلین) معرفی گردید. اما به سرعت در سال ۱۹۶۱، نخستین جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی گردید. در ابتدا، مواجهه با جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تنها در بیمارستانها بود، اما در اواخر دهه ۱۹۹۰ نخستین کلونهای حاد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه که مشخصه بارز آنها وجود سم لوکوسیدین پنتون ولنتاین بود، شناسایی و با سرعت غیرقابل باوری گسترش پیدا کردند (۴, ۵). آنها به سرعت در سراسر جهان، ابتدا تنها در جوامع و بعدها در بیمارستانها و مراکز درمانی، گسترش یافتند و حتی جایگزین جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان شدند. به همین دلیل، امروزه افتراق میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه و بیشتر جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان واجد مقاومت چند آنتی بیوتیکی به یک چالش بزرگ تبدیل شده است. مقاومت نسبت به متی سیلین ناشی از حضور ژن mecA است که بخشی از Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) محسوب می شود. تاکنون ۱۳ SCCmec تایپ مختلف در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شده است که تعیین SCCmec تایپ یکی از ابزارهای مهم در تعیین انتشار کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین محسوب می شود (۵, ۶).

باکتریوفاژها نقش مهمی در زیست شناسی، تنوع و تکامل باکتریایی ایفا می کنند، که ناشی از ظرفیت و قابلیت آنها برای تبدیل ژنهای میزبان و میانجیگری کسب اطلاعات ژنتیکی تازه می باشد. توانایی باکتریوفاژها برای نشان دادن خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدید، نه تنها زمینه ای برای سازگار شدن با شرایط جدید را فراهم می کنند، بلکه در پاره ای از مواقع اجزاء حدت تازه ای را که مرتبط با بیماریزایی در عفونتهای باکتریایی انسانی می باشند را منتقل می کند (۱, ۷). روشهای معمول که برای شناسایی پروفاژ در جدایه های لیزوژنیک مورد استفاده قرار می گیرند که بیشتر مبتنی بر القاء پروفاژ از جدایه های لیزوژنیک می باشند بسیار طولانی، زمانبر و دشوار هستند که برای بررسیهای معمول چندان مناسب نیستند. روش مولکولی مبتنی بر PCR یک روش بسیار سریع و اختصاصی جهت تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به شمار می رود (۸).

این مطالعه با هدف تعیین انتشار کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهرهای تهران، کرج و اصفهان در سال ۱۳۹۷ به انجام رسیده است.

روش کار

در طی ۶ ماه اول سال ۱۳۹۷ در مجموع تعداد ۲۹۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در هر کدام از شهرهای تهران (۱۳۴ سویه، ۴۶ درصد)، کرج (۵۷ سویه، ۱۹ درصد) و اصفهان (۱۰۴ سویه، ۳۵ درصد) جمع آوری گردید. پلیتها به صورت هفتگی جمع آوری شده و به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی جدایه ها در ابتدا بر روی محیط ژلوز مغذی (Scharlau, Spain) به صورت خطی کشت داده شدند و به منظور شناسایی و تأیید نهایی جدایه ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nuc استفاده شد (۵).

جهت استخراج DNA برای انجام تمامی آزمونهای PCR در این مطالعه، از روش جوشاندن بر اساس پروتکل رحیمی و همکاران استفاده شد (۹). بر این اساس، چند کلنی از جدایه باکتریایی در میکروتیوب استریل واجد ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و سپس به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوب واجد باکتری حل شده، به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد و سپس ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور g × ۱۳۰۰۰، سانتریفیوژ گردید و سرانجام ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان DNA الگو جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی و تأیید جدایه هایی که در آزمایشگاه های بیمارستانهای مورد مطالعه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی اولیه قرار گرفته بودند از آزمون PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی ژن nuc بر اساس پروتکل و چرخه حرارتی که پیشتر توسط رحیمی و همکاران بهینه سازی شده بود، استفاده گردید (۱۰).

جهت بررسی مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته نسبت به متی سیلین، روش انتشار از دیسک آنتی بیوتیک سفوکسی تین (Rosco, Denmark) بر روی محیط ژلوز مولر هینتون (Biolife, Italy) بر اساس دستورالعملهای ارائه شده از طرف Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

جهت سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آزمون ژلوز قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۳). برای این منظور، باکتریها پس از کشت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. کلنیهای مشکی، قرمز روشن و قرمز تیره به ترتیب به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت، بیوفیلم منفی و مشکوک (حد واسط) گزارش شدند.

پس از غربالگری سویه های بیوفیلم مثبت و سویه هایی که از نظر تولید بیوفیلم مشکوک بودند، جهت بررسی تشکیل بیوفیلم در میان این سویه ها از روش کمی میکروتیتر پلیت بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۳). برای این منظور ابتدا از کشت باکتریها در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) حاوی ۰/۲۵٪ گلوکز غلظت 10^6 CFU/ml تهیه گردید، سپس از هر کشت باکتریایی تهیه شده ۲۰۰ میکرولیتر در سه چاهک از میکروپلیت (Greiner, Louis, MO, USA) تلقیح شد و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت، پلیتها شستشو شده و با استفاده از رنگ کریستال ویوله ۰/۳٪ (Sigma, Germany) رنگ آمیز شدند و پس از رنگبری با اتانول-استن، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ nm با خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100, USA) مورد سنجش قرار گرفت. بیوفیلم منفی: جذب نوری < جذب نوری کنترل، بیوفیلم قوی: جذب نوری > ۱، بیوفیلم متوسط یا نسبی: ۱> جذب نوری > ۰/۲، بیوفیلم ضعیف: جذب نوری < ۰/۲.جهت تأیید مقاومت نسبت به متی سیلین در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس که نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسی تین مقاومت نشان دادند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن mecA بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۲).

برای SCCmec تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد ژن mecA آزمون multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پروتکل اختصاصی که پیشتر توسط رحیمی و همکاران بهینه سازی شده بود مورد استفاده قرار گرفت (۵).

پروفاژ تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

جهت بررسی حضور پروفاژ تایپهای SGA، SGB، SGF (SGFa, SGFb)، SGD و SGL در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم از آزمون multiplex-PCR با استفاده از چرخه حرارتی و مخلوط واکنش بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۷).

جهت تعیین وجود تایپهای agr I-IV از آزمون multiplex-PCR با جفت پرایمرهای اختصاصی مطابق با دستورالعمل پیشین استفاده شد (۳).

یافته ها

تمامی ۲۹۵ جدایه جمع آوری شده از ۳ بیمارستان مورد مطالعه در شهرهای تهران، کرج و اصفهان با استفاده از آزمون PCR ژن nuc به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و تأیید شد و نتایج حاصل از آزمون مولکولی در این مطالعه با روشهای شناسایی فنوتایپی در آزمایشگاه های بیمارستانهای مورد نظر کاملا همخوانی داشت و تأیید کننده آن بود. علاوه بر این، ۸۳ سویه (۲۸ درصد) نسبت به دیسک سفوکسی تین مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در این مطالعه انتخاب شدند (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمون PCR ژن mecA نشان داد که تمامی ۸۳ سویه واجد این ژن بودند. بر این اساس مشخص شد که فراوانی سویه های مقاوم به متی سیلین در شهرهای تهران، اصفهان و کرج به ترتیب ۳۱، ۲۸ و ۲۳ درصد بود.

جدول ۱- فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهرهای مورد مطالعه.

سویه ها شهر	تعداد سویه ها (درصد)	سویه های مقاوم به متی سیلین (درصد)
تهران	**۱۳۴ (۴۶ درصد)**	**۴۱ (۳۱ درصد)**
کرج	**۵۷ (۱۹ درصد)**	**۱۳ (۲۳ درصد)**
اصفهان	**۱۰۴ (۳۵ درصد)**	**۲۹ (۲۸ درصد)**
تعداد کلی	**۲۹۵**	**۸۳ (۲۸ درصد)**

نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو نشان داد که از ۸۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شده، در مجموع ۲۹ سویه (۳۵ درصد) واجد کلنیهای مشکی بودند که به عنوان سویه های اسلایم منفی انتخاب شدند. همچنین، ۱۸ سویه (۲۲ درصد) نیز واجد کلنیهای قرمز روشن و اسلایم منفی بودند؛ و ۳۶ سویه (۴۳ درصد) نیز به عنوان سویه های مشکوک (واجد کلنیهای قرمز تیره) تعیین شدند (جدول ۲). بر این اساس مشخص گردید که از مجموع ۲۹ سویه اسلایم مثبت بیشتر سویه های اسلایم مثبت مربوط به سویه های شهر تهران بود (۵۵ درصد، ۱۶ سویه) و ۳۱ درصد (۹ سویه) و ۱۴ درصد (۴ سویه) سویه های اسلایم مثبت نیز به ترتیب از اصفهان و کرج جداسازی شدند. همچنین در میان ۳۶ سویه اسلایم مشکوک نیز ۴۸ درصد (۱۷ سویه)، ۴۴ درصد (۱۶ سویه) و ۸ درصد (۳ سویه) از بیماران در شهرای تهران، اصفهان و کرج جداسازی شدند. در مجموع ۶۵ سویه اسلایم مثبت و اسلایم کاذب جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت انتخاب شدند.

جدول ۲- فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در شهرهای مورد مطالعه.

روش بررسی	ژلوز قرمز کنگو (روش کیفی)			میکروتیتر پلیت (روش کمی)			
شهر	اسلایم مثبت (درصد)	اسلایم کاذب (درصد)	اسلایم منفی (درصد)	بیوفیلم قوی (درصد)	بیوفیلم متوسط (درصد)	بیوفیلم ضعیف (درصد)	بیوفیلم منفی (درصد)
تهران	۱۶ (۳۹)	۱۷ (۴۱)	۸ (۲۰)	۲۱ (۵۱)	۳ (۷)	۵ (۱۲)	۱۲ (۳۰)
کرج	۴ (۳۱)	۳ (۲۳)	۶ (۴۶)	۵ (۳۹)	۲ (۱۵)	-	۶ (۴۶)
اصفهان	۹ (۳۱)	۱۶ (۵۵)	۴ (۱۴)	۱۲ (۴۱)	۸ (۲۸)	۲ (۷)	۷ (۲۴)
تعداد (درصد)	۲۹ (۳۵)	۳۶ (۴۳)	۱۸ (۲۲)	۳۸ (۴۶)	۱۳ (۱۶)	۷ (۸)	۲۵ (۳۰)

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت مشخص شد که از سویه های اسلایم مثبت و اسلایم کاذب مورد بررسی به روش کیفی، ۵۸ سویه (۷۰ درصد) مولد بیوفیلم بودند که از این تعداد، ۳۸ سویه (۴۶ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۳ سویه (۱۶ درصد) بیوفیلم متوسط و ۷ سویه (۸ درصد) بیوفیلم ضعیف بودند (جدول ۲). همچنین، ۵۵ درصد (۲۱ سویه)، ۳۲ درصد (۱۲ سویه) و ۱۳ درصد (۵ سویه) سویه های مولد بیوفیلم قوی به ترتیب از شهرهای تهران، اصفهان و کرج جداسازی شدند.

در این مطالعه در مجموع ۴ پروفاژ تایپ (SGA, SGB, SGF, SGL) و دو ساب تایپ (SGFa, SGFb) در میان ۵۸ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم (قوی، متوسط و ضعیف) شناسایی گردید (جدول ۳). پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb در میان تمامی سویه ها حضور داشتند و به عنوان تایپ غالب در این مطالعه معرفی شدند. همچنین پروفاژ تایپهای SGA و SGL نیز در ۲۶ درصد سویه ها شناسایی شدند. علاوه بر این، ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان ۵۸ سویه شناسایی گردید که الگوی شماره ۴ شامل پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb به عنوان فراوانترین الگو تعیین گردید و ۴۰ درصد سویه ها واجد این الگو بودند. در میان سویه های جداسازی از شهرهای مختلف الگوهای پروفاژی متفاوت بودند. در شهرهای تهران و اصفهان سویه ها واجد هر ۴ الگوی پروفاژی بودند و در کرج سویه ها تنها واجد ۳ الگوی پروفاژی بودند. الگوی پروفاژی شماره ۴، فراوانترین الگو در شهرهای کرج و اصفهان بود و در شهر تهران الگوی شماره ۳ به عنوان فراوانترین الگو تعیین گردید.

جدول ۳- نتایج حاصل از پروفاژ تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم.

الگو	پروفاژ تایپ						تعداد	درصد	شهر		
	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb	SGL			تهران	کرج	اصفهان
۱	+	+	+	+	+	+	۸	۱۴	۲ (۷)	۱ (۱۴)	۵ (۲۲)
۲	+	–	+	+	+	+	۷	۱۲	۶ (۲۱)	–	۱ (۵)
۳	–	+	+	+	+	–	۲۰	۳۴	۱۱ (۳۸)	۲ (۲۹)	۷ (۳۲)
۴	–	–	+	+	+	–	۲۳	۴۰	۱۰ (۳۴)	۴ (۵۷)	۹ (۴۱)
تعداد (درصد)	۱۵ (۲۶)	۲۸ (۴۸)	۵۸ (۱۰۰)	۵۸ (۱۰۰)	۵۸ (۱۰۰)	۱۵ (۲۶)	۵۸	۱۰۰	۲۹ (۵۰)	۷ (۱۲)	۲۲ (۳۸)

نتایج آزمون multiplex-PCR جهت SCCmec تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم (قوی، متوسط و ضعیف) نشان داد که SCCmec تایپ III فراوانترین تایپ بود و ۴۳ سویه (۷۴ درصد) واجد این تایپ بودند (جدول ۴). همچنین، در هر ۳ شهر مورد مطالعه نیز SCCmec تایپ III غالبترین تایپ بود. علاوه بر این SCCmec تایپهای IV و V نیز به ترتیب در میان ۱۴ و ۱۲ درصد سویه ها شناسایی شدند. در سویه های شهر اصفهان برخلاف سویه های شهرهای تهران و کرج، فراوانی SCCmec تایپ V بالاتر از تایپ IV بود.

نتایج حاصل از بررسی وجود لوکوس ژنی agr در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم نشان داد که از مجموع ۵۸ سویه مورد مطالعه، ۳۹ سویه (۶۷ درصد) واجد تایپ I، ۱۲ سویه (۲۱ درصد) تایپ II، ۴ سویه (۷ درصد) تایپ III و ۳ سویه (۵ درصد) واجد تایپ IV بودند (جدول ۴). در تمامی سویه های جداسازی شده از شهرهای مختلف agr تایپ I، غالبترین تایپ بود و تایپهای II، III و IV در مراتب بعدی قرار داشتند. همچنین، در سویه های شهر اصفهان هیچدام از سویه ها واجد لوکوس ژنی agr تایپ IV نبودند.

جدول ۴- نتایج حاصل از SCCmec تایپینگ و agr تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم.

تایپینگ	SCC*mec* تایپ			*agr* تایپ			
شهر	III	IV	V	I	II	III	IV
تهران	۲۱ (۷۲ درصد)	۵ (۱۸ درصد)	۳ (۱۰ درصد)	۲۰ (۶۹ درصد)	۶ (۲۱ درصد)	۱ (۳ درصد)	۲ (۷ درصد)
کرج	۶ (۸۶ درصد)	۱ (۱۴ درصد)	-	۴ (۵۸ درصد)	۱ (۱۴ درصد)	۱ (۱۴ درصد)	۱ (۱۴ درصد)
اصفهان	۱۶ (۷۳ درصد)	۲ (۹ درصد)	۴ (۱۸ درصد)	۱۵ (۶۸ درصد)	۵ (۲۳ درصد)	۲ (۹ درصد)	-
تعداد (درصد)	۴۳ (۷۴ درصد)	۸ (۱۴ درصد)	۷ (۱۲ درصد)	۳۹ (۶۷ درصد)	۱۲ (۲۱ درصد)	۴ (۷ درصد)	۳ (۵ درصد)

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از بزرگترین مشکلات و معضلات بهداشتی در بیمارستانها و جوامع شناخته می شود. مقاومت بالای آنتی بیوتیکی و توانایی بالای کسب عوامل حدت مختلف این باکتری را به یکی از خطرناکترین بیماریزاها در دنیا مبدل کرده است. در این مطالعه که معطوف به بررسی فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در کلانشهرهای تهران، کرج و اصفهان بود نتایج متفاوتی حاصل گردید. بر این اساس مشخص گردید که شیوع این سویه ها در شهرهای تهران، اصفهان و کرج به ترتیب ۳۱، ۲۸ و ۲۳ درصد بود. تاکنون گزارشات مختلفی از شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهرهای مختلف ایران از جمله شهرهای مورد بررسی در این مطالعه ارائه شده است که در پاره ای از موارد بالاتر از نتایج این مطالعه بوده است (۳-۱, ۷-۵, ۹, ۱۰, ۳۰-۱۲). در این مطالعه ۳ کلانشهر اصلی در کشور انتخاب شدند که از نظر فراوانی جمعیت، طیف جمعیتی ساکن، عادتهای بهداشتی، شرایط آب و هوایی و ... تا حدودی با یکدیگر متفاوت بودند. در تهران به عنوان پایتخت کشور و بزرگترین و پرجمعیت ترین کلانشهر کشور شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بیشتر از اصفهان و کرج دیگر بود اما این اختلاف معنی دار نبود. در توجیه این فراوانی می توان اذعان داشت که با توجه به حضور بیماران از سایر نقاط کشور در مراکز درمانی تهران از جمله بیمارستان انتخاب شده در این مطالعه که از جمله رفرنسهای کشوری در زمینه بیماریهای کلیه و مجاری ادراری در کشور محسوب می شود، چنانکه تعدادی از سویه ها از بیماران مراجعه کننده از استانهای سمنان، سیستان و بلوچستان و آذربایجان غربی جداسازی شدند، این افزایش چندان دور از انتظار نبود. این اتفاق در مورد سویه های بیماران در شهر اصفهان نیز صادق است و برخی از سویه ها از بیماران مراجعه کننده از شهرها و استانهای همجوار (یزد، چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد) جداسازی شدند. در مقابل با توجه به فاصله نزدیک شهرهای تهران و کرج و رفت و آمد بسیار زیاد و آسان صورت گرفته در طی روز بین این دو شهر، و دسترسی راحت تر به مراکز درمانی رفرنس در شهر تهران، برخی از بیماران ترجیح داده در بیمارستانهای شهر تهران بستری شوند که همین امر از دلایل پایین بودن فراوانی سویه ها در کرج در این مطالعه است. اما به طور کلی می توان اذعان داشت که تفاوت در فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهرهای مختلف در کشور می تواند ناشی از تفاوت در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی، نمونه های مورد بررسی، تفاوت در سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانهای کشور، روشهای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی و همچنین سطح بهداشتی متفاوت در شهرهای مختلف باشد. علاوه بر این، در این مطالعه جهت تعیین مقاومت سویه ها نسبت به متی سیلین ضمن رعایت دقیق استانداردهای CLSI از دیسک استاندارد و خارجی آنتی بیوتیک سفوکسی تین (به عنوان جایگزین اگزاسیلین) استفاده گردید که می تواند از دلایل پایین بودن نرخ شیوع در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته در کشور باشد.

در مطالعه حاضر، جهت تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم از ترکیبی از روشهای فنوتایپی کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید. در مطالعه حاضر ۷۸ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اسلایم مثبت و اسلایم کاذب بودند و در آزمون میکروتیر پلیت نیز ۷۰ درصد سویه ها به عنوان سویه های مولد بیوفیلم انتخاب شدند. شیوع سویه های مولد بیوفیلم در شهرهای اصفهان، تهران و کرج به ترتیب ۷۶، ۷۰ و ۵۴ درصد بود. در شهرهای تهران و اصفهان تاکنون فراوانیهای مختلفی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم گزارش شده است. در اصفهان در سال ۱۳۹۸، کریمی و رحیمی فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم را در سویه هایی که در سال ۱۳۹۵ جمع آوری شده بودند را ۷۲ درصد گزارش کردند (۲). همچنین، رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که ۹۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت

ادراری بیوفیلم مثبت بودند (۳). یوسفی و همکاران فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم مثبت جدا شده از عفونت ادراری در سال ۲۰۱۶ را ۶۹/۲ درصد گزارش کردند (۳۱). در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای که توسط قاسمیان و همکاران بر روی سویه - های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم در شهر تهران به انجام رسید، فراوانی سویه های مولد بیوفیلم به روش آزمون ژلوز قرمز کنگو، ۶۷ درصد گزارش گردید (۱۵). تفاوت میان فراوانی سویه های مولد بیوفیلم در مطالعات مختلف می تواند ناشی از نوع نمونه های مورد بررسی و همچنین تفاوت در روشهای مورد استفاده در مطالعات مختلف باشد. بر اساس مطالعات انجام شده پیشین و همچنین مطالعه حاضر می توان گفت که روش ژلوز قرمز کنگو نسبت به روش میکروتیتر پلیت از حساسیت و دقت کمتری برخوردار است. در واقع می توان از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو جهت غربالگری استفاده کرد و از آزمون تأییدی میکروتیتر پلیت جهت تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم استفاده کرد (۲).

در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیان عوامل حدت مستقیما مرتبط با مقاومت نسبت به متی سیلین است. ژن mecA به صورت غیرمستقیم باعث فعال شدن پپتایدهای القاء کننده خودکار (AIPs) می شود که نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم و همچنین تولید برخی از عوامل کنترلی دارد. به نظر می رسد که مقاومت نسبت به متی سیلین باعث القاء تغییرات دیواره سلولی باکتریایی شده و متعاقبا سیستم agr را تحت تأثیر قرار می دهد. در طی فاز نمایی رشد باکتری، ادهزینهای سطحی سلول به میزان فراوانی بیان می شوند که منجر به کلنیزه شدن باکتری در موضع می گردد. اما زمانی که باکتری وارد فاز سکون می شود، لوکوس ژنی agr فعال شده که منجر به سرکوب بیان ادهزینها و در مقابل تشدید سنتز عوامل حدت مختلف از جمله توکسینها و آنزیمهای باکتریایی می گردد (۳۲). سیستم تنظیم کننده ژنی جانبی از جمله مهمترین و شناخته شده ترین اپرونها در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس محسوب می شود که وظیفه کنترل و تنظیم بیان ژنهای حدت را بر عهده دارد. در مطالعه کریمی و رحیمی در سال ۱۳۹۸ در شهر اصفهان تمامی سویه های واجد agr بودند و agr تایپ IV در میان سویه ها مشاهده نشد. در آن مطالعه agr تایپ I فراوانترین تایپ بود (۶). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شهر تهران، هیچکدام از سویه ها واجد agr تایپ IV نبودند و agr تایپ III غالبترین تایپ بود و در ۷۸ درصد سویه ها گزارش گردید (۳). در مطالعه قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۴، هر چهار تایپ agr شناسایی شد و ۶۷ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد agr تایپ I بودند (۳۳). طهماسبی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که ۳۵ و ۳۱ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از همدان و سیستان و بلوچستان، به ترتیب فاقد لوکوس ژنی agr بودند و در هر دو مرکز agr تایپ II فراوانترین تایپ بود (۳۲).

دسته بندی بر مبنای SCCmec مهمترین روش جهت تعیین ماهیت کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین است. در مطالعه حاضر نیز از این روش به عنوان یکی از روشهای ساده و بسیار مؤثر جهت تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین استفاده گردید. بر این اساس سه SCCmec تایپ III، IV و V در میان سویه های مولد بیوفیلم شناسایی گردید که SCCmec تایپ III به عنوان تایپ غالب در این مطالعه در هر سه شهر مورد بررسی شناسایی گردید که نشان دهنده شیوع بسیار بالاتر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان در شهرهای مختلف کشور است. این یافته ها کاملا منطبق بر سایر گزارشات از ایران است که در شهرهای مختلف و نمونه های مختلف مورد بررسی SCCmec تایپ III همچنان به عنوان تایپ غالب در طی سالهای مختلف معرفی شده است (۵, ۶, ۸, ۱۰, ۱۲, ۱۴, ۱۶, ۱۸, ۲۰, ۲۱, ۲۵-۲۳, ۲۹-۲۷, ۳۶-۳۴). در هر سه شهر مورد مطالعه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه نیز جداسازی شدند که در شهرهای تهران و اصفهان واجد SCCmec تایپهای IV و V بودند و در کرج تنها محدود به تایپ IV بود. در مطالعه حاضر چهار پروفاژ تایپ SGA، SGB، SGF و SGL و دو ساب تایپ SGFa و SGFb در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شدند و تمامی سویه ها در شهرهای مختلف حداقل واجد پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb بودند. بر این اساس چهار الگوی پروفاژی مختلف نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که سویه های جداسازی شده از شهر کرج واجد ۳ الگو و در دو شهر دیگر واجد ۴ الگوی پروفاژی بودند. در سایر گزارشات ارائه شده از کشور نیز الگوهای متفاوتی تاکنون در نمونه های مختلف گزارش شده است (۱, ۵, ۷, ۸, ۱۰, ۱۲, ۲۴, ۲۸, ۲۹, ۳۶). تفاوت در شیوع پروفاژ تایپهای مختلف را می توان ناشی از نوع نمونه ها اعم از بستری و سرپایی و همچنین تفاوت در شرایط جغرافیایی (تهران، کرج و اصفهان) و بالطبع تفاوت در سویه های مورد مطالعه دانست. در سایر مطالعات در کشور، گزارشات مختلفی در این زمینه در اختیار است. در این مطالعه ۲۶ درصد سویه ها واجد پروفاژ تایپهای SGA و SGL و SCCmec تایپهای IV و V بودند و به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه طبقه بندی شدند. در مطالعات پیشین، رحیمی و همکاران به وجود پروفاژ تایپ SGA به عنوان شاخص سویه های اکتسابی از جامعه اشاره کرده بودند که کاملا منطبق با یافته های این مطالعه بود (۵, ۱۰, ۱۲, ۲۸). به طور کلی حضور پروفاژ تایپهای مختلف در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان دهنده توانایی بالقوه

این سویه ها برای تولید طیف وسیعی از عوامل حدت مانند انتروتوکسینهای A، G، K، P و Q، بتا-لایزین، اکسفولیاتیو توکسین A، TSST1، لیپاز، استافیلوکیناز و لوکوسیدین پنتون ولنتاین می باشد (۷).

نتیجه گیری

این یافته ها نشان دهنده حضور کلون تایپهای مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهرهای تهران، کرج و اصفهان است. وجود کلون تایپهایی مولد بیوفیلم با الگوهای پروفاژی و SCCmec تایپها و agr تایپهای مشابه که بالقوه واجد طیف وسیعی از عوامل حدت مختلف می باشند در شهرهای مختلف کشور نشان دهنده انتشار گسترده این کلون تایپها در نقاط مختلف ایران است و مؤید منشاء مشترک این سویه ها می باشد. به عبارت بهتر می توان اذعان داشت که این کلون تایپها در بیمارستانها و جامعه در تمامی کشور اندمیک هستند که کاهش یا حذف آنها نیازمند تمهیدات و سیاستهای گسترده کنترل عفونت کشوری می باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است. نویسندگان مقاله تشکر خود را از خانم مینا ترابی جهت کمک در جمع آوری سویه های باکتریایی اعلام می نمایند.

REFERENCES

1. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):80-5.
2. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016 Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;24(86):26-35.
3. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.
4. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (Scc*mec*) classification and typing methods: an overview. Polish Journal of Microbiology. 2011;60(2):95-103.
5. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.
6. Karimi A, Rahimi F. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan during 2017 Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2019;24(87):43-50.
7. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-11

8. Rahimi F, Danesh M, Mehmandoost J, Shokri D. Prophage typing and SCC*mec* typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;20(71):49-58.
9. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.
10. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4): 389–98.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2016.
12. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.
13. Askarian M, Zeinalzadeh A, Japoni A, Alborzi A, Memish ZA. Prevalence of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its antibiotic susceptibility pattern in healthcare workers at Namazi Hospital, Shiraz, Iran. International Journal of Infectious Diseases. 2009;13(5):e241-e7.
14. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Aligholi M, Gilbert G, Taherikalani M, Jonaidi N, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from a teaching hospital in Tehran. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2009;62(4):309-11.
15. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized children. Iranian Journal of Pathology. 2015;10(4):258-64.
16. Goudarzi M, Abiri P, Nasirian S, Afshari SG. SCC*mec* and *spa* typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection: emergence of *spa* Types t426 and t021 in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2018;11(5):1-6.
17. Goudarzi M, Goudarzi H, Figueiredo AMS, Udo EE, Fazeli M, Asadzadeh M, et al. Molecular characterization of methicillin resistant S*taphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units in Iran: ST22-SCC*mec* IV/t790 emerges as the major clone. PloS One. 2016;11(5):e0155529.
18. Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, et al. Characterization of SCC*mec* types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Iran. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2011;64(1):28-33.
19. Rahimi F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(1):e29237.
20. Rahimi F. Molecular characteristics of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates causing urinary tract infections. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(6):e61704.
21. Rahimi F, Bouzari M. Biochemical fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from sewage and hospital in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19760.
22. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):144-9.

23. Rahimi F, Emami H, Arabestani MR, Parshad B. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in surface water in Karaj Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015;19(67):53-60.
24. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.
25. Rahimi F, Karimi S. Biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical samples in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(3):e33343.
26. Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains producing enterotoxins A, K and Q from chicken meat in Isfahan, Iran, 2014. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(4):e35601.
27. Rahimi F, Pourshafie MR. Aminoglycoside resistance among meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains ssolated from two hospitals in Tehran Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015;20(69):55-61.
28. Rahimi F, Qasemi A. Epidemiological link between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 2 different cities in Iran. Infectious Diseases in Clinical Practice. 2019;27(3):163–9.
29. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(5):e59385.
30. Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA, Shiade MJ. Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(6):e9601.
31. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. Iranian Journal of Public Health. 2016;45(4):485.
32. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Association between the accessory gene regulator (*agr*) locus and the presence of superantigen genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Research Notes. 2019;12(130):1-7.
33. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several virulence factors of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Tehran. International Journal of Enteric Pathogens. 2015;3(2):1-6.
34. Rahimi F, Karimi S. Antibiotic resistance pattern and prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from chicken husbandries in tehran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014;18(62):17-22.
35. Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Zayanderud river in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;21(72):55-60.
36. Rahimi F, Karimi S, Pourshafie MR. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014;19(64):21-30.