

Virulence factors in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from children referred to Tehran Children's Medical Center Hospital

Hiva Kadkhoda¹, Zohreh Ghalavand¹, Bahram Nikmanesh², Hamidreza Hour¹,
Donya Taghizadehmaleki¹, Gita Eslami^{1*}

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Lab Medical Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2018/01/21

Accept: 2017/12/3)

Abstract

Background: *Staphylococcus* is a bacterium responsible for a wide range of diseases, from mild skin infections to lethal necrosis pneumonia. The aim of the present study was to determine the virulence factors among methicillin resistant and sensitive strains isolated from clinical specimens of children referred to the pediatric medical center and also to find out about their antibiotic resistance.

Materials and Methods: In the present study, 100 strains of *Staphylococcus aureus*, susceptible and resistant to methicillin, were collected during one year. First, biochemical tests were performed to detect *Staphylococcus aureus* bacteria. Then, antibiotic susceptibility test was performed using antibiotic disks (MAST; England) according to CLSI guidelines. The presence of *hlg*, *mecA*, *nuc*, and *pvl* genes was investigated using PCR method and then sequenced.

Results: A total of 30 samples (30%) were methicillin-resistant (MRSA) using the cefoxitin disk. Vancomycin was determined to be the most susceptible to antibiotics with 100% and penicillin had the highest resistance to antibiotics with 98%. The prevalence values for *hlg*, *mecA*, and *pvl* genes were 30%, 95%, and 6%, respectively.

Conclusion: The present study showed that vancomycin and cotrimoxazole were the best effective antibiotics against MRSA strains.

Keywords: *Staphylococcus Aureus*; Panton-Valentine Leukocidin; Gamma Hemolysin

* Corresponding author: Gita Eslami
E-mail: G_eslami@yahoo.com

بررسی ویروالانس فاکتورها در سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوک اورئوس جدا شده از کودکان مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران

هیوا کدخدا^۱، زهره قلاوند^۱، بهرام نیک منش^۲، حمیدرضا حوری^۱، دنیا تقی زاده ملکی^۱، گیتا اسلامی^{۱*}

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۹/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱

چکیده:

سابقه و هدف: جنس استافیلوکوک از جمله باکتری‌هایی است که مسئول طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، از عفونت‌های پوستی خفیف تا پنومونی نکرودهنده، کشنده است. هدف از این مطالعه بررسی ویروالانس فاکتورها در بین سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های بالینی کودکان مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان و همچنین آگاهی از میزان مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوک اورئوس حساس و مقاوم به متی‌سیلین طی یک سال جمع‌آوری شد. ابتدا با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، باکتری استافیلوکوک اورئوس تشخیص داده شد. سپس تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی (MAST، انگلستان) طبق دستورالعمل‌های CLSI انجام شد. حضور ژن‌های *pvl*، *hlg*، *mecA*، *nuc* با روش PCR، بررسی و تعیین توالی شد.

یافته‌ها: با استفاده از دیسک سفوکسی‌تین، تعداد ۳۰ نمونه (۳۰ درصد) مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بود. بیشترین حساسیت به ونکومایسین با ۱۰۰ درصد و بیشترین مقاومت به پنی‌سیلین با ۹۸ درصد مشاهده شد. توزیع فراوانی ژن‌های *pvl*، *mecA*، *hlg* به ترتیب ۳۰، ۹۵ و ۶ درصد بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین و کوتریموکسازول بهترین فعالیت را علیه سویه‌های MRSA دارند.

واژگان کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، لوکوسیدین پنتون والتین، همولیزین گاما.

مقدمه:

این مقاومت ناشی از حضور ژن *mecA* است که کد کننده یک پروتئین متصل شونده به پنیسیلین (PBP2a) است که میل ترکیبی آن در اتصال به متی‌سیلین کمتر از سایر پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین در دیواره باکتری است (۷۶). توکسین پنتون والتین لکوسیدین (PVL) و همولیزین گاما (*hlg*)، اگزوتوکسین‌های همولیتیک هستند که باعث افزایش قدرت نفوذپذیری غشاء سلولی و در نتیجه سبب لیز شدن لکوسیت‌ها و نکروز بافت می‌شود (۸).

هدف از این مطالعه بررسی ویروالانس فاکتورها در سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوک اورئوس جدا شده از کودکان مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان در سال‌های ۹۵-۹۴ و همچنین تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌هاست.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی، از دی ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۵، تعداد ۱۰۰ نمونه از کودکان زیر ۱۵ سال مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان تهران از بخش‌های مختلف بیمارستان شامل (عفونی، گوارشی، بیمارستان سرپایی، نوزادان، هماتولوژی، نورولوژی، جراحی، نفرولوژی، تنفسی، اورژانس، قلب و بخش‌های مراقبت

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن شایع مرتبط با مراقبت‌های بیمارستانی در سراسر دنیا شناخته می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، هوازی-بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپوری می‌باشد که در بخش قدامی حفره بینی (که شایع ترین محل کلونیزاسیون می‌باشد)، پوست به ویژه پوست آسیب دیده، ناحیه پرینه، واژن، زیر بغل، ناف نوزادان و اوروفارنکس کلونیزه می‌شود (۱ و ۲). این باکتری می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل آبسه، پنومونی، مسمومیت غذایی، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های پس از جراحی، عفونت‌های زخم، عفونت‌های بافت نرم، استئومیلیت، سندرم شوک سمی، سپتی سمی، باکتری می و اندوکاردیت را ایجاد کند (۳ و ۴). با افزایش روزافزون مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌ها باوجود استفاده از آنتی بیوتیک‌های قوی و بهبود شرایط بهداشت عمومی و کنترل عفونت‌های بیمارستانی، هنوز هم استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم در انسان محسوب می‌شود (۵).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) یک سویه اختصاصی از استافیلوکوک است که مقاومت آنتی بیوتیکی را به بتا لاکتام‌ها ایجاد می‌کند.

نویسنده مسئول: گیتا اسلامی

پست الکترونیک: G_eslami@yahoo.com

از الکتروفورز برای جداسازی محصولات PCR ژن های مورد نظر استفاده شد. در این مطالعه با توجه به محصول DNA و نیز محصول ژن تکثیر شده مورد نظر از ژل آگاروز با غلظت ۱/۵ درصد برای جداسازی محصولات تکثیر یافته استفاده شد. بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه ها توسط شرکت تکاپوزیست به شرکت Bioneer کره فرستاده، تعیین توالی و میزان همولوژی توالی ها با توالی های بانک ژنی مقایسه شد.

فراوانی ژن های مورد نظر، اطلاعات دموگرافیک بیماران و نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی در نمونه های MRSA و MSSA با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ آنالیز شد. مقدار $P \text{ value} \leq 0.05$ به عنوان معنادر در نظر گرفته شد. ارتباط بین سویه های حساس و مقاوم به متی سیلین با حضور ژن های ویرولانس با استفاده از آزمون کای ۲ بررسی شد.

نتایج:

این تحقیق روی ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از کودکان زیر ۱۵ سال مرکز طبی کودکان تهران انجام شد. از تعداد ۱۰۰ بیمار مورد بررسی، ۵۱ نفر مونث و ۴۹ نفر مذکر بودند. تعداد ایزوله ها برحسب نوع نمونه جدا شده در جدول شماره ۲ ذکر شده است. همچنین الگوی مقاومت دارویی ایزوله های

جدول شماره ۱) تعداد ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی سیلین جدا شده از کودکان مراجعه کننده به مرکز طبی تهران برحسب نوع نمونه جدا شده

نمونه	تعداد و درصد نمونه ها
گلو	۴۸
خلط	۱۲
مایعات بدن	۱۱
زخم	۶
خون	۶
چشم	۴
لاواژ برونکو آلوئولار	۴
آبسه	۴
گوش	۴
بینی	۱
جمع	۱۰۰

ویژه جدا شد. ابتدا با استفاده از تست های تعیین هویت شامل کاتالاز، کوآگولاز اسلایدی و لوله ای، مانیتول سالت آگار و Dnase، باکتری استافیلوکوک اورئوس تشخیص داده شد. سپس تست حساسیت آنتی بیوتیکی طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) و دیسک های آنتی بیوتیکی (MAST، انگلستان) انجام شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه، سپس با استفاده از سوآپ استریل روی سطح محیط مولر هیتون آگار تلقیح و دیسک ها با فاصله مناسب روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک ها بعد از گرم خانه گذاری به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد (۹). برای انجام این مطالعه، دیسک های آنتی بیوتیک کلیندامایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، پنی سیلین و سفوکسیتین از شرکت MAST انگلستان تهیه شد. برای آنتی بیوتیک ونکومایسین، MIC با استفاده از روش (Liiofelchem، ایتالیا) E-TEST تعیین شد. به این صورت که ابتدا سوسپانسیون مطابق ۰/۵ مک فارلند از باکتری به محیط مولر هیتون تلقیح شد. سپس نوار حاوی ونکومایسین در شرایط آسپتیک روی محیط قرار داده شد. نتایج پس از گذشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (۱۰ و ۱۱). بررسی فنوتیپی مقاومت به متی سیلین با استفاده از دیسک سفوکسیتین و تایید مقاومت به متی سیلین با بررسی وجود ژن mecA به روش PCR انجام شد. همچنین تایید گونه استافیلوکوک اورئوس با استفاده از شناسایی ژن nuc با تکنیک PCR انجام شد. سویه استافیلوکوک اورئوس (25923ATCC) برای کنترل کیفی استفاده شد.

برای استخراج DNA از جدایه ای استافیلوکوکوس اورئوس، از کیت شرکت Roche آلمان استفاده شد. غلظت DNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ Denovix کشور ایتالیا سنجیده شد.

برای انجام مراحل کار PCR، ابتدا در هر میکروتیوب ۱۲/۵ لاند از Master Mix (Master Mix)، از شرکت Bioscience Sinaclon، ۱ لاند از هر کدام از پرایمرهای Reverse و Forward، ۸/۵ لاند آب مقطر دیونیزه و ۲ لاند از DNA نمونه مورد نظر را وارد کرده و با استفاده از سمپلر آن را خوب سمپلینگ کردیم (مواد Master Mix باید در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شوند، زیرا آنزیم Taq پلیمرز نسبت به دماهای بالا بسیار حساس بوده و به سرعت غیر فعال می شود). باید توجه داشت که در هر سری از تست PCR باید DNA مربوط به کنترل مثبت و کنترل منفی (برای اطمینان از نبود آلودگی در تست) به همراه نمونه های مجهول PCR شود. سپس میکس های PCR که حاوی DNA های مجهول و DNA های کنترل است، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. لازم به ذکر است برای کنترل منفی از تمام مواد مورد نیاز در یک واکنش PCR به جز DNA الگو استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن های hlg، mecA، nuc و pvl در جدول زیر ارائه می شود.

توالی پرایمر ژن های بررسی شده در این مطالعه:

منبع	توالی پرایمر (۵' به ۳')	اندازه قطعه (bp)	پرایمر
McClure J-A 2006 (12)	F-GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA R-CCAATTCCACATTGTTTCGCTCTAA	310	mecA
Chakraborty SP 2011 (13)	F-GCGATTGATGGTGATACGGTT R-AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC	270	nuc
Shahnaz Armin 2015 (14)	F-ATCATTAGGTAAAAATGTCTGGA CATGATCCA R-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433	pvl
Ani-Ioana Cotar 2010 (15)	F-GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC R-CCATAGACGTAGCAACGGAT	937	hlg



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز برای ژن‌های M: C-Ladder 100-bp: + C- سویه استاندارد کنترل مثبت - C- کنترل منفی - نمونه ۳ تا ۱: ژن pvl (طول قطعه ۴۳۳ bp)

اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های حساس به متی‌سیلین مشاهده نشد توزیع فراوانی هر یک از ژن‌های بررسی شده با استفاده از روش PCR، نشان داد که تعداد ۳۰ ایزوله دارای ژن *mec-A* ۶ ایزوله دارای ژن *PVL* و ۹۵ نمونه دارای ژن *hlg*. همچنین همه ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین دارای ژن *nuc* باشد.

در مطالعه حاضر، ۴ سویه *MSSA* و ۲ سویه *MRSA* دارای ژن *PVL* بودند. ارتباط معنا داری بین وجود ژن *PVL* با سویه‌های *MRSA* و *MSSA* به دست نیامد ($p\text{-value}=0.58$).

همچنین براساس این مطالعه، ۶۸ سویه *MSSA* و ۲۷ سویه *MRSA* دارای ژن *hlg* بودند. بین وجود ژن *mec-A* و ژن *hlg* ارتباط معناداری حاصل نشد ($p\text{-value}=0.158$).

بحث:

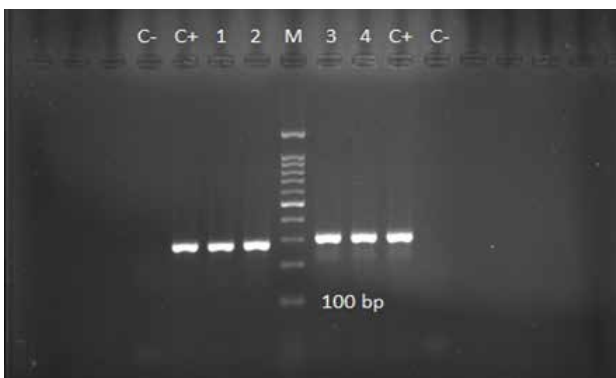
استافیلوکوک‌ها در انسان یک بخش از فلور نرمال هستند، بنابراین جزو میکرو ارگانیسم‌های کومنسال همزیست محسوب می‌توانند در مواردی به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها عمل نمایند زیرا آن‌ها سازگاری سریع تری به فشارهای انتخابی ایجاد شده توسط میزبان انسانی نشان دهند (۱۶). از مهم‌ترین راه کارهای پیش گیری از توسعه عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس، شناسایی و درمان به موقع عفونت‌های *MRSA* می‌باشد. از آنجا که میزان مرگ و میر عفونت‌های بیمارستانی با سویه‌های *MRSA* بالا می‌باشد، درمان صحیح عفونت‌ها و تعیین و آگاهی از الگوی منطقه‌ای مقاومت در انتخاب داروی مناسب کمک کننده خواهد بود (۱۷).

در مطالعه ما الگوی مقاومت آنتیبیوتیکی در ۱۰۰ ایزوله جداسازی شده نشان داد که تمامی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس به ونکومايسين حساس بودند بنابراین آنتی بیوتیک ونکومايسين می‌تواند به عنوان داروی انتخابی در سویه‌های مقاوم در نظر گرفته شود. ۱۴ درصد از ایزوله‌ها به کوتریموکسازول مقاوم بودند. پنسیلین با بیشترین میزان مقاومت ۹۸٪ و بعد از آن اریترومايسين با ۴۸٪ و کلیندامایسین ۴۲٪ مقاومت نشان دادند. بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Zahra Shokravi و همکاران انجام شد میزان مقاومت به ونکومايسين در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متیسیلین، ۰٪ کلیندامایسین ۵۵٪ و پنسیلین ۹۶٪ گزارش شده است که مشابه با مطالعه ما بوده است (۱۸).

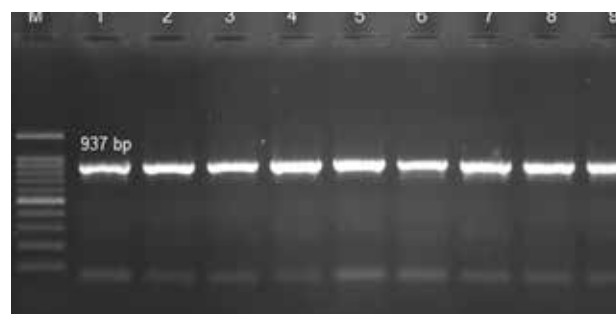
در مطالعه شکوهی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ۲۰۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس، میزان مقاومت به اریترومايسين، کوتریموکسازول و کلیندامایسین به ترتیب ۵۶٪، ۳۳٪ و ۵۶٪ بوده است (۱۹)، همچنین در مطالعه‌ی Geoffrey Omuse که در سال ۲۰۱۴ در کنیا بر روی سویه‌های مقاوم به متیسیلین انجام شد میزان مقاومت آنتیبیوتیکی کوتریموکسازول ۴۲٪ و مقاومت به ونکومايسين ۰٪ گزارش شد. در این بررسی‌ها میزان مقاومت به کوتریموکسازول بیشتر از مطالعه ما بوده که می‌تواند بیانگر افزایش مصرف این آنتی بیوتیک در این مناطق باشد و این مسئله به عنوان مشکل جدی در درمان بیماران در این مناطق به حساب می‌آید.

جدول شماره ۲) الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌درصدهای استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از کودکان مراجعه کننده به مرکز طبی تهران

آنتی بیوتیک	(%) تعداد مقاوم	(%) تعداد حد واسط	(%) تعداد حساس
پنی سیلین	(۹۸)	(۰)	(۲)
اریترومايسين	(۴۸)	(۹)	(۴۳)
کلیندامایسین	(۴۲)	(۸)	(۵۰)
سفو کسیتین	(۳۰)	(۰)	(۷۰)
کوتریموکسازول	(۱۴)	(۲)	(۸۴)
ونکومايسين	(۰)	(۰)	(۱۰۰)



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز برای ژن‌های *nuc* و *mecA*: M: C-bp=100 Ladder: + C- سویه استاندارد کنترل مثبت - C- کنترل منفی - نمونه ۱ و ۲: ژن *nuc* (طول قطعه ۲۷۰ bp) - نمونه ۳ و ۴: ژن *mecA* (طول قطعه ۳۱۰ bp)



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز برای ژن *hlg*: M: C-Ladder 100 bp: + C- سویه استاندارد کنترل مثبت - C- کنترل منفی - نمونه ۱ تا ۹: ژن *hlg* (طول قطعه ۹۳۷ bp)

استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک و ونکومايسين ۱۰۰ درصد و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین ۹۸ درصد مشاهده شد.

با انجام تست‌های تشخیصی آزمایشگاهی از میان نمونه جدا شده، با استفاده از دیسک سفوکسیتین، تعداد ۳۰ نمونه (۳۰ درصد) مقاوم به متی‌سیلین (*MRSA*) و تعداد ۷۰ نمونه (۷۰ درصد) به متی‌سیلین (*MSSA*) *pshs* بودند.

هیچ ارتباط معناداری بین سن و جنس با فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس

(۲۰)

مقاومت به متی سیلین و حضور ژن hlg به دست نیامد. Mayra Alejandra Machuca و همکاران در سال ۲۰۱۳ شیوع ژن hlg را ۱۰۰ درصد گزارش کرده بودند که تا حدود زیادی با نتایج ما هم خوانی داشت (۲۳). بر اساس یافته‌های این مطالعه، تقریباً همه سویه‌ها به پنی سیلین مقاوم بودند در نتیجه جهت درمان عفونت‌های حاصل از استافیلوکوک اورئوس پنی سیلین‌ها نباید به عنوان داروی انتخابی در نظر گرفته شوند. وجود ژن‌های ویروالانسی مانند pvl و hlg با مقاومت و یا حساسیت به متی سیلین ارتباط معنا داری نشان نداد. بنابراین پیشنهاد می گردد که حضور سایر فاکتورهای ویروالانسی را در بین سویه‌های حساس و مقاوم به متی سیلین بررسی نمود.

مطالعه ما نشان داد که ۶ درصد ایزوله‌ها واجد ژن pvl می‌باشند اما هیچ ارتباط معنایی بین مقاومت به متی سیلین و حضور ژن pvl به دست نیامد. مطالعه Meiji Soe Aung و همکاران در سال ۲۰۱۶ شیوع ژن pvl را ۱۲٫۵ درصد گزارش نمودند که تا حدودی با نتایج ما هم خوانی داشت (۲۱). همچنین مطالعه ما با مطالعه Seyed Asghar Havaei که شیوع ژن pvl ۲۳ درصد بود زیاد همخوانی نداشته که علت آن می‌تواند مخازن جداسازی عفونت و محل جغرافیایی باشد (۲۲). همچنین بر اساس این مطالعه شیوع ژن hlg در بین سویه‌های حساس و مقاوم به متی سیلین استافیلوکوک اورئوس ۹۵ درصد بود و هیچ ارتباط معنایی بین

منابع:

1. Ghaznavi-Rad E, Shamsudin MN, Sekawi Z, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, et al. Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *Journal of clinical microbiology* 2010;48(3):867-72.
2. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):629-41.
3. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron M. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assay for rapid identification of *S. aureus*. *J clin microbial* 1998; 36(3):618-623.
4. Grundig A, schneewid O. Cross-Linked peptidoglycan media test lysostaphing to the cell wall envelope of *staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006;188(7):2463-72.
5. Amghalia E, Nagi A, Al-Haj N, Mariana N, Son R, Rosli R, et al. Multiplex PCR Assays for the Detection of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Malaysian Hospitals. *Res J of Bio Sc* 2009; 4(4): 444-448.
6. Gunawardena ND, Thevanesam V, Kanakaratne N, Abeysekera D, Ekanayake A, Perera N. Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in *Staphylococcus aureus*. *Sri Lankan J Infect Dis* 2012; 2(2): 18-29.
7. Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4037-4041.
8. Mola Abaszadeh Hamed MH, Mirzaee Hamid. Identification of Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients Imam Reza and Tabriz martyrs Hospital by Real-Time PCR. *Iran J Med Microbial* 2013; 6(4): 72-80.
9. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 17th ed. USA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2007. CLSI/NCCLS document M100S17.
10. Mozghan Esmaeili Benvidi, Hamidreza Houri, Zohreh Ghalavand, Bahram Nikmanesh, Hadi Azimi, Roghaye Samadi, et al. Toxin production and drug resistance profiles of pediatric methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran. *J Infect Dev Ctries* 2017; 11(10):759-765.
11. Davood Yadegarynia, Maryam Taheri, Zahra Arab-Mazar, Azar Darvishi. Evaluation of antimicrobial susceptibility among *staphylococcus aureus* by E-test method at Khatam-ol-Anbia hospital during 2013–2014. *Research in Medicine* 2016; 40 (1); 24-29.
12. Jo-Ann McClure, John M. Conly, Vicky Lau, Sameer Elsayed, Thomas Louie, Wendy Hutchins, et al. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin Genes and Simultaneous Discrimination of Methicillin-Susceptible from -Resistant Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 1141–1144.
13. Subhankari Prasad Chakraborty, Santanu KarMahapatra, Manjuri Bal, Somenath Roy. Isolation and Identification of Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* from Post Operative Pus Sample. *Al Ameen J Med Sci* 2011; 4 (2):152-168.
14. Shahnaz Armin, Farhad Fareghi, Fatemeh Fallah, Masoud Dadashi, Bahram Nikmanesh, Zohreh Ghalavand. Prevalence of hlg and pvl Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Health Care Staff in Mofid Children Hospital, Tehran, Iran. *Journal of pure and applied microbiology* 2015; 9(2); 1001-1005.
15. Ani-Ioana Cotar, Mariana-Carmen Chifiriuc, Sorin Dinu, Marcela Bucur, Carmen Iordache, Otilia Banu, et al. Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from Clinical Infections. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11(12), 5273-5291.
16. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 2011;60(2):95-103.
17. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10(4):781-791.
18. Byeong Su Jung, Yong Ju Lee, Na-Kyoung Lee, Hyoun Wook Kim, Mi-Hwa Oh, Hyun-Dong Paik. Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolated from Korean Pork bulgogi: Enterotoxin Production and Antimicrobial Resistance. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2015; 35(4): 502–506.
19. Shervin Shokouhi, Ilad Alavi Darazam, and Mohammad-Hossein Zamanian. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus carriage rate and antimicrobial susceptibility in a tertiary center, Iran. J Res Med Sci 2017; 22: 71.

20. Hassan Momtaz and Laleh Hafezi. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. Bosn J Basic Med Sci 2014; 14(4): 219–226.

21. Meiji Soe Aung, Thida San, Mya Mya Aye. Prevalence and Genetic Characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* Isolates Harboring Panton-Valentine Leukocidin, Enterotoxins, and TSST-1 Genes from Food Handlers in Myanmar. Toxins (Basel) 2017; 9(8): 241.

22. Seyed Asghar Havaei, Farkhondeh Poursina, Maryam Ahmadpour, Seyed Roholla Havaei, and Meisam Ruzbahani. Detection of Panton-valentine Leukocidin Gene Isoforms of *Staphylococcus aureus* Isolates in Al-Zahra Hospital, Isfahan-Iran. Adv Biomed Res 2017; 6: 93.

23. Mayra Alejandra Machuca, Luis Miguel Sosa, Clara Isabel González. Molecular Typing and Virulence Characteristic of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Pediatric Patients in Bucaramanga, Colombia. PLOS ONE 2013; 8 (8); 73434.