پلی مرفیسم طولی ناحیه ′۳ ژن clfA در نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی‌شده از سه بیمارستان شهر قم

رضا یاری[۱]*، محمدرضا مهرابی[۲]، فاطمه محمدصالحی[۳]

۱. استادیار بیولوژی سلولی ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۲. استادیار هماتولوژی و بانک خون، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۵)

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس آنزیم، پروتئین و توکسینهای متعددی جهت حفظ بقاء، تجزیه پروتئینها، قندها، چربیها و اسیدهای نوکلئیک میزبان، مقاومت در برابر داروها، اتصال به سلولهای میزبان و افزایش بیماریزایی تولید می کند. از مهمترین عوامل بیماریزای سطحی این باکتری، فاکتور تجمع یا Clf A است. این پروتئین باعث اتصال باکتری به فیبرینوژن می شود. هدف مطالعه حاضر بررسی وجود تنوع در انتهای′۳ ژن clf A می باشد.

مواد و روش کار: ۱۰۰ نمونه بالینی جداسازی شده از ۳ بیمارستان نکویی(هدایتی)، کامکار–عرب نیا و شهید بهشتی پس از تایید در آزمونهای میکربی، بیوشیمیایی و ملکولی 16s rRNA انتخاب شدند. از پرایمرهای اختصاصی جهت ارزیابی ناحیه متغیر ژن استفاده شد.

نتایج: ۱۰۰ نمونه پس از آزمونهای مختلف برای بررسی ژن clf A انتخاب شدند. پس از PCR اختصاصی ژن مذکور، کلیه نمونه‌ها امپلیکونهایی با اندازه ۱۱۰۰ bp تولید کردند. امپلیکونها جهت مقایسه توالی‌ها با توالی استاندارد به شرکت مربوطه جهت توالی یابی ارسال شد.

نتیجه‌گیری: سایر محققان در نتیجه مطالعه با همین پرایمر امپلیکونهایی با اندازه‌های ۹۰۰ تا ۱۰۰۰ bp گزارش کردند. این نخستین گزارش از پلی مرفیسم طولی دیگری در ناحیه ′۳ ژن clf A می باشد. در این ناحیه تکرار ۱۸ نوکلئوتیدی مینی ساتلایت گزارش شده که باعث خطا در همانندسازی بصورت Replication Slippage توسط DNA پلیمراز می شود و منجر به ایجاد نسخه جدیدی از این ژن و فراگیری آن در نمونه‌های شهرستان قم شده است. این مطالعه نیاز به بررسی بیشتر توالی مذکور و نیز پروتئین کدشده دارد.

کلیدواژگان

استافیلوکوکوس اورئوس، پلی مرفیسم، ژن clf A.

* نویسنده مسئول، رایانامه: rezayari1352@gmail.com

مقدمه

در سال ۱۹۳۰ آزمون کوآگولاز دانشمندان را قادر به شناسایی آنزیم منعقد کننده پلاسمای خون ترشح شده از استافیلوکوکوس اورئوس کرد. این باکتری خطرناک ترین نوع استافیلوکوکوس‌ها بوده و هنوز هم شایع ترین علت عفونت‌های زخم در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود(۱). باکتری دارای گستردگی وسیعی در طبیعت بوده و جزء باکتری‌های بیماریزای فرصت طلب قلمداد می شود و در مواردی نظیر استفاده از تجهیزات پزشکی خصوصاً در افراد بسیار جوان، افراد مسن و بیمارانی که نقص ایمنی دارند عفونت ایجاد می کند(۲). تقریباً تمام گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس گروهی از آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و توکسینها شامل کوآگولاز، نوکلئاز، پروتئاز، لیپاز، هیالورونیداز، کاتالاز و کلامپینگ فاکتور را برای بقاء، تجزیه پروتئینها، قندها، چربیها و اسیدهای نوکلئیک میزبان، مقاومت در برابر داروها، اتصال به سلول‌های میزبان و افزایش بیماری‌زایی ترشح می‌کنند و استافیلوکوکوس اورئوس به علت دارابودن این عوامل قادر به ایجاد عفونت در تمام نقاط بدن می‌باشد (۳ و ۴).

استافیلوکوکوس اورئوس چندین پروتئین اتصالی خاص (MSCRAMMs)[1] را در سطح خود برای شناسایی اجزاء سطحی ماتریکس چسبنده تولید می‌کند. اتصال خاص استافیلوکوکوس اورئوس به فیبرینوژن عمدتاً با کمک فاکتور تجمع A می باشد که توسط ژن کروموزومی clf A[2] کدگذاری می شود. ژن clf A به طول ۱۰۷۱ جفت باز می باشد. پروتئین Clf A مسئول چسبندگی استافیلوکوکوس اورئوس است و یکی از اجزاء دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس است که به فیبرینوزن سطح سلول متصل شده و عامل بیماریزایی مهم در چند مدل عفونت از جمله آرتریت عفونی به شمار می رود. فاکتور تجمع از کوآگولاز متمایز بوده و جزء ترکیب سطحی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (۵).

Clf A مسئول تجمع غیرآنزیمی استافیلوکوکوس اورئوس در پلاسما است و برای بهبود چسبندگی سلول‌های باکتری به سطوح فیبرینوژن بکار می رود (۶). این پروتئین به میزان زیادی از استافیلوکوکوس اورئوس در برابر فاگوسیتوز ماکروفاژها محافظت می کند. بیان clf A توسط استافیلوکوکوس اورئوس باعث افزایش تکثیر سلول‌های طحال می شود. هم محافظت در برابر فاگوسیتوز و هم فعالیت ایمنی افزایش یافته توسط بیان clf A، به بیماریزایی استافیلوکوکوس اورئوس در داخل بدن کمک می کند (۷). توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در اتصال به فیبرینوژن، نقش مهمی در پیشبرد چسبندگی باکتریایی به کاتترهای داخل عروقی و بافت میزبان در طول عفونت دارد (۸).

طبق مطالعات انجام شده تکثیر ژن clf A منجر به تولید یک قطعه واحد با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز می گردد که نشان می دهد این ژن در اندازه خود پلی مرفیسم ندارد (۹). بیش از ۱۴ ٪ از توالی اسید آمینه اولیه clf A بین توالی ایزوله‌ها متفاوت است که می تواند ترکیب اپی توپ و آنتی ژنیسیته clf A و ایمنی زایی بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس را تغییر دهد (۱۰). تفاوت در اندازه ژن بین سروتیپ‌ها بعلت وجود توالی‌های مینی ساتلایتی۳ می باشد که باعث ایجاد پدیده لغزش در عملکرد DNA پلیمراز در زمان همانند سازی می گردد و احتمال ایجاد سویه‌هایی با جهش و تکرار را ایجاد خواهد کرد (۱۱). توالی‌های مینی ساتلایتی از DNA با تکرار زیاد در حدود یک تا ۱۵ کیلوباز هستند که به صورت پشت

1. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
2. Clumping Factor A
3. Minisatellite

سر هم قرار گرفته اند و طول واحدهای تکرار شونده در آنها ۱۰ تا ۶۰ جفت باز است (۱۲).

هدف از مطالعه حاضر بررسی وجود پلی مرفیسم طولی احتمالی در ناحیه ′۳ ژن clf A در نمونه‌های بومی ایران در شهر قم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در مطالعات سایر محققان است. در مطالعات گذشته نشان داده شده بود که ناحیه مذکور فاقد پلی مرفیسم طولی است و قطعات حاصله با پرایمرهای یکسان حدود هزار جفت باز بودند.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری و کشت نمونه‌ها

تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی تهیه گردید و در حداقل زمان با حفظ شرایط سرمایشی به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد منتقل گردید. این نمونه‌ها از ۳ بیمارستان کامکار (۴۶ نمونه)، نکویی (۶۳ نمونه) و شهید بهشتی (۵۱ نمونه) شهرستان قم جمع آوری شده بود. در کلیه مراحل پژوهش حقوق بیماران و کلیه پروتکل‌های بین المللی اخلاقی رعایت گردید. تعداد نمونه‌ها با استفاده از فرمول کوکران برای جمعیت فوق محاسبه گردید. همچنین در این تحقیق، سویه استاندارد بومی ۶۳۳۸ ATCC باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان کنترل مثبت و شاهد مورد استفاده قرار گرفت. سایر اطلاعات نظیر جنسیت، سن و.. لحاظ نشده است.

از محیط‌های کشت BHI[1] آگار و TSA جهت رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و استخراج DNA آن استفاده شد. از رنگ آمیزی گرم، آزمونهای بیوشیمیایی و میکربی افتراقی نظیر کوآگولاز، MSA، DNase و نیز آزمون ملکولی ۱۶s rRNA در ایجاد امپلیکون‌های ۴۷۹ bp جهت شناسایی قطعی نمونه‌ها استفاده شد (۴، ۱۳ و ۱۴). تصویر ژل و تست‌های بیوشیمیایی ارایه نشده است.

ب) استخراج و تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی

به منظور استخراج ژنوم باکتری جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، از دو کشت ۲۴ ساعته در محیط BHI آگار و BHI براث استفاده گردید. طی دو روز متوالی و دو دوره ۲۴-۱۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی محیط BHI آگار و سپس BHI براث، رشد باکتری به حداکثر رسید(۴). سپس طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (کیت استخراج باکتری گرم مثبت سیناکلون Cat No. PR881614) مراحل استخراج انجام شد.

سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بر اساس بررسی همزمان دو شاخص غلظت DNA استخراج شده (بر حسب میزان ماکروگرم DNA در یک میلی لیتر) با کمک ژل الکتروفورز و فاکتور خلوص DNA (طبق شاخص جذب A۲۶۰/A۲۸۰) با کمک نانودراپ بررسی شد.

ج) انجام PCR و ژل الکتروفورز

پرایمرها و برنامه PCR جهت شناسایی ژن clf A در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه ترموسایکلرBIO-RAD مدل T۱۰۰ براساس داده‌های جداول ۱ و ۲ بهینه سازی شد. از سوش استافیلوکوکوس اورئوس ۶۳۳۸ ATCC به عنوان کنترل مثبت در تمام مراحل PCR استفاده شد.

1. Brain Heart Infusion Agar

جدول ۱- ژن‌های هدف و پرایمرهای به کار رفته در مطالعه به همراه اندازه امپلیکونهای حاصل از PCR

ژن	توالی پرایمر('3-'5)	اندازه امپلیکون (bp)	منبع
s rRNA۱۶	F: GGAATTCAAATGAATTGACGGGGG	۴۷۹	۱۴
	R: CGGGATCCCAGGCCCGGGACCGTATTCAC		
clf A	F: GGCTTCAGTGCTTGTAGG	۹۰۰ تا ۱۰۰۰	۹، ۱۳ و ۱۵
	R: TTTTCAGGGTCAATATAAGC		

واکنش PCR در حجم۲۵ ماکرولیتر و در ۳۵ چرخه دمایی/زمانی مشخص شده انجام شد.

جدول ۲- برنامه دمایی/زمانی بهینه شده واکنش PCR ژن clf A

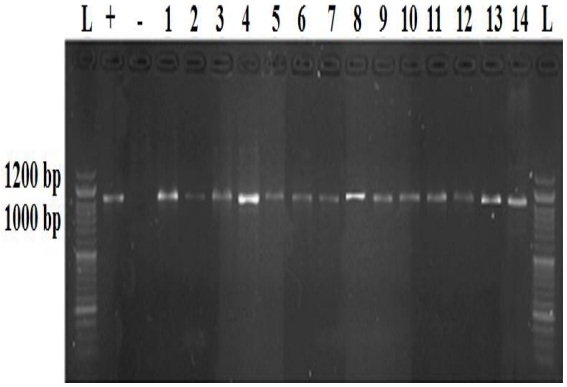
برنامه دمایی-زمانی PCR		
۹۴ درجه سانتی گراد	۳ دقیقه	دناتوراسیون اولیه
۹۴ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	دناتوراسیون در چرخه
۵۶ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	اتصال پرایمر
۷۲ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	پلیمریزاسیون
۷۲ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	پلیمریزاسیون نهایی

از آنزیم DNA پلیمراز Pfu جهت تکثیر DNA استفاده شد. جهت مشاهده DNA استخراج شده و مشاهده محصول تولید شده از تکثیر ژن‌های مورد نظر به ترتیب از الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ و ۱/۸ درصد با کمک رنگ DNA safe stain و در حضور DNA مارکر bp ۵۰ شرکت سینا کلون(Cat. No. PR 901633) استفاده شد.

نتایج

۱۰۰ نمونه بالینی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفتند که به ترتیب فراوانی ۳۹٪ از بیمارستان نکویی، ۳۲٪ بیمارستان شهید بهشتی و ۲۹٪ از بیمارستان کامکار جداسازی شدند.

طی واکنش PCR محصول واکنش با اندازه ۱۱۰۰ جفت باز در تمامی نمونه‌ها مطابق شکل (۱) مشاهده گردید. قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی حاصله در مقایسه با نمونه شاهد ATCC ۶۳۳۸ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است، مثبت انگاشته شد. جهت تعیین اندازه قطعات تکثیری از نشانگر ملکولی ۵۰bp در ستونهای L استفاده شد. ستونهای (+) و (-) بیانگر کنترلهای مثبت و منفی بوده و ستون‌های ۱ تا ۱۴ نمونه‌های دارای ژن clf A به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز می باشند (شکل ۱).



شکل ۱- ژل الکتروفورز ۱/۸٪ آگارز امپلیکون‌های حاصل از تکثیر ژن clf A

بحث

در دهه گذشته چندین مطالعه در خارج از کشور بر روی این ژن انجام شده است اما تاکنون گزارشی از مطالعه پلی مرفیسم این ژن در ایران ارائه نشده است(۸-۱۱). با توجه به ضرورت بررسی این ژن در ایران اقدام به بررسی آن در نمونه‌های جداسازی شده از پوست بیماران بستری در سه بیمارستان قم گردید. در این مطالعه بر خلاف سایر مطالعات انجام شده بر روی ژن clf A که همگی قطعه ای در حدود ۹۰۰ تا

۱۰۰۰ جفت باز را با پرایمرهایی یکسان تکثیر کردند، قطعه امپلیکون ۱۱۰۰ جفت بازی در تمامی ۱۰۰ نمونه نشان داده شد.

در مطالعه Reinoso و همکاران در سال ۲۰۰۸ که بر روی ۴۵ سویه جمع آوری شده از انسان، گاو و مواد غذایی در آرژانتین انجام شده بود، در ۴۰ نمونه قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی و ۵ نمونه قطعه ۹۰۰ جفت بازی تکثیر شد و مشخص شد که این ژن از نظر اندازه تفاوتی بین گونه‌های مختلف جداسازی شده ندارد(۹). همچنین Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۲ نتیجه ای مشابه با نتایج مطالعه Reinoso و همکاران بدست آوردند. آنها از مجموع ۱۰۳ نمونه جداسازی شده از گاو مبتلا به ورم پستان در ۸ مزرعه مختلف در آلمان، تکثیر ژن clf A را در یک قطعه با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز در اکثر نمونه‌ها مشاهده کردند. در این میان فقط ۸ نمونه جداسازی شده مورد مطالعه مربوط به یکی از مزارع پرورش دام، تکثیر قطعه ۹۵۰ جفت باز را نمایش داد. آنها نیز بر این باورند که پلی مرفیسمی بین نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس موجود در ورم پستان گاو در بین گله‌های مختلف در نقاط مختلف دنیا وجود ندارد و تمام قطعه‌های تکثیر شده از این ژن حدوداً یکسان و نزدیک بوده است(۱۵). از دیگر موارد متفاوت با مطالعه حاضر، مطالعه Aher و همکاران در سال ۲۰۱۲ بود که تحقیقی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس موجود در دستگاه تنفسی بزهای به ظاهر سالم انجام داده بودند. این محققین پس از جداسازی نمونه‌های شناخته شده استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از سه ژن آنها را مورد بررسی قرار دادند و از مجموع ۴۳ نمونه شناسایی شده استافیلوکوکوس اورئوس، تنها ۱۱ نمونه (۲۵/۶ ٪) ژن clf A را در اندازه ۹۸۰ جفت باز تکثیر کردند(۱۳). در نتیجه تفاوت سه مطالعه مشابه با مطالعه حاضر، از لحاظ اندازه قطعه تکثیر شده و همه گیری این ژن در تمامی نمونه‌ها با مطالعه حاضر کاملاً مشهود بود. از آنجایی که بیش از ۱۴ ٪ از توالی اسیدآمینه اولیه clf A بین توالی ایزوله‌ها متفاوت است (۱۰) و طبق مقاله Sabat و همکاران در سال ۲۰۰۳ مبنی بر اینکه ژن clf A دارای یک تکرار ۱۸ نوکلئوتیدی در منطقه ′۳ خود است که تکرارهای دی پپتید Ser-Asp را کدگذاری می کند(۱۱) در نتیجه احتمال ایجاد تفاوت در اندازه ژن بین سروتیپ‌های مختلف باکتری‌ها بالا می رود چرا که وجود این توالی‌های مینی ساتلایتی باعث ایجاد پدیده لغزش در عملکرد DNA پلیمراز در زمان همانند سازی می گردد و احتمال ایجاد سویه‌هایی با جهش و تکرار را ایجاد خواهد کرد(۱۳). علت تفاوت طول ژن clf A تکثیر شده در این مطالعه با برخی از مطالعات دیگر نیز به ماهیت این توالی‌های ماهواره ای باز می گردد که توانسته باعث ایجاد جهش دو برابرسازی و تکرار در ناحیه متغیر این ژن گردد. ایجاد نسخه توالی جدید این ژن در تمامی نمونه‌های تکثیر شده در این مطالعه به نظر مربوط به فراگیری این نسخه از ژن clf A در ایران و به خصوص در شهرستان قم می باشد.

نکته مهم در این مطالعه وجود امپلیکون ۱۱۰۰ bp در تکثیر ژن clf A ایزوله استاندارد ATCC ۶۳۳۸ می باشد که در یک فرضیه می تواند حاکی از بومی بودن این نوع پلی مرفیسم در ایران باشد و یا به دلایلی ناشناخته این پلی مرفیسم در باکتری استاندارد فوق نیز بوجود آمده است که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

شباهتی بین طول قطعات تکثیر شده clf A با تحقیقات گذشته جهانی مشاهده نشد. تفاوت در اندازه ژن بین سروتیپ‌های مختلف باکتری‌های مورد مطالعه بعلت وجود تکرار ۱۸ نوکلئوتیدی در

منطقه′۳ ژن clf A می باشد. به دلیل عدم وجود مطالعه ای مشابه در ایران می توان تنها علت ایجاد توالی متفاوت در این تحقیق را مربوط به منشاء جداسازی باکتری و فراگیری این ژن در شهرستان قم و به طور کلی در ایران دانست که نیاز به مطالعات بیشتر نظیر تعیین توالی و بررسی پروتئین کد شده می باشد. امپلیکونها جهت تعیین توالی و مقایسه با توالی استاندارد ژن clf A مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان نامه خانم فاطمه محمد صالحی دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی ملکولی دانشگاه آزاد واحد بروجرد با کد ۱۱۲۳۰۵۵۴۹۲۰۰۶ می باشد. از تلاشهای صمیمانه دکتر علی جوادی و مهندس لدنی در دانشکده‌های پزشکی واحدهای قم و بروجرد تشکر و قدردانی می شود.

تعارض منافع

نویسندگان بدینوسیله بدون هیچ گونه تعارض، رضایت خویش را با چاپ مقاله حاضر در مجله اعلام می دارند.

منابع و مآخذ

1. Kloos, W.E. Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. Ann Rev Microbiol. 1980. 34:559–592.
2. Nair, N., Biswas, R., Gotz, F. and Biswas, L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. Infect Immun. 2014. 82(6):2162-2169.
3. Abdel-hamid, M. and Bendary, M. Association between *agr* alleles and toxin gene profiles of *staphylococcus aureus* isolates from human and animal sources in Egypt. Int J Adv Res. 2013.1(8):133-144.
4. Karmostaji, A., Moradi, N., Boushehri, E., Jahed, M., Dadestan, B., Sanginabadi, F., et al. Nasal carrier rates and antibiogram pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital staff teaching hospitals in Bandar Abbas. Hormozgan Med J. 2008. 12(2):95-101.
1. 5- Dickson, R.B., Nagel, J.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Proctor, R.A. and Cooper, S.L. Quantitative Comparison of Clumping Factor- and Coagulase-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Surface-Bound Fibrinogen under Flow. Infect Immun. 1995. 63(8):3143-3150.
5. Luczak-Kadlubowska, A., Krzysztion-Russjan, J. and Hryniewicz, W. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Poland in 1996 to 2004 That Were Deficient in Species-Specific Proteins. J Clin Microbiol. 2006. 44(11):4018-4024.
6. Palmqvist, N., Patti, J.M., Tarkowski, A. and Josefsson, E. Expression of staphylococcal *clumping factor A* impedes macrophage phagocytosis. Microb Infect. 2004. 6(2):188-195.
7. Wolz, Ch., McDevitt, D., Foster, T.J. and Cheung, A.L. Influence of *agr* on Fibrinogen Binding in *Staphylococcus aureus* Newman. Infect Immun. 1996. 64(8):3142-3147.
8. Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lammler, C., Bogni, C. and Zschock, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiol Res. 2008. 163(3):314-322.
9. Brady, R.A., Mocca, CH.P. and Burns, D.L. Immunogenicity Analysis of *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A Genetic Variants. Clin Vac Immunol. 2013. 20(8):1338-1340.
10. Sabat, A., Krzyston-Russian, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. and Potempa, J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol. 2003. 41(4):1801-1804.
11. Vergnaud, G. and Denoeud, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. Genome Res. 2000. 10(7):899-907.
12. Aher, T.K., Roy, A. and Kumar, P. Molecular detection of virulence genes associated with pathogenicity of Gram positive isolates obtained from respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats. Vet World. 2012. 5(11):676-681.
13. Nafisi, M.R., Kalhor, H., Zamanzad, B., Karimi, A., Farokhi, E. and Validi, M. Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-Kord 2007. Arak Med Uni J. 2008. 11(2):94-101.
14. Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W. and Zschock, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitic. Clin Diagn Lab immunol. 2001. 8(5):956-964.