مقاله پژوهشی

بررسی میزان فراوانی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های چسبندگی در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداشده از بیماران بستری‌شده در بیمارستان های آموزشی شهرستان زابل به روش Multiplex PCR

مریم ملایی[۱]، احمد راشکی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب جداشده از عفونت‌های بیمارستانی و مسئول عفونت‌های شدیدِ مهمی همچون باکتریمی، اندوکاردیت و عفونت‌های پوستی است. پروتئین‌های سطحی مثل پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن و فیبرونکتین از عوامل مهم در اتصال و تهاجم *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند. از این‌رو هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های *fnbA, clfA, clfB* و *fnbB* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های کلینیکی بیماران بستری‌شده در بیمارستان‌های آموزشی زابل بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیماران بستری‌شده در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۹۱ جمع‌آوری گردید. ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های میکروب‌شناسی رایج مورد تائید قرار گرفتند. DNA ژنومی ایزوله‌ها به روش جوشاندن استخراج شد و برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زا از Multiplex-PCR استفاده گردید. نتایج با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ۵۰٪ ایزوله‌های مورد بررسی حداقل یکی از ژن‌های موردمطالعه را نشان دادند. فراوانی ژن‌های کد کننده فیبرینوژن (*clfA,clfB*) به ترتیب ۱۹٪ و ۱۶٪ و فیبرونکتین (*fnbA, fnbB*) ۲۵٪ و ۱۹٪ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های موردمطالعه در درصد کمی از ایزوله‌ها یافت شدند. تحقیقات بیشتر نقش این ژن‌ها و رابطه آن‌ها را با بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* روشن می‌کند.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، فیبرینوژن، فیبرونکتین، Multiple-PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن اصلی عفونت‌های بیمارستانی است که در انسان توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک توکسیک (TSS) و مسمومیت غذایی را دارد (۱، ۲). امروزه علیرغم درمان‌های مناسب، عفونت‌های شدید مرتبط با *استافیلوکوکوس اورئوس* (به‌خصوص سویه‌های مقاوم به متی سیلین) موجب مرگ‌ومیر بالایی می‌شود. این باکتری طیف وسیعی از عوامل چسبندگی خارج سلولی را تولید می‌کند که به نظر می‌رسد در قدرت بیماری‌زایی آن مؤثر باشد (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از این عوامل می‌تواند به پروتئین‌های متنوعی از میزبان به‌ویژه در ماتریکس خارج سلولی متصل شده و موجب کلونیزاسیون، تهاجم به بافت آسیب‌دیده، انتشار در بدن و فرار از مکانسیم‌های دفاع میزبان شوند (۴). این اتصال توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان اجزا سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس (MSCRAMMs) میانجیگری می‌شود (۴، ۵). این موارد شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که به‌طور کووالانسی به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری اتصال داشته و شامل پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینونکتین به نام FnbpA و FnbpB، پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (ClfB و ClfA) (۶) می‌باشد که به ترتیب توسط ژن‌های *fnbA*، *clfA* *fnbB* و *clfB* کد می‌شوند (۷، ۸). پروتئین‌های ClfA و ClfB اعضاء خانواده‌ی بزرگ‌تری از ساختارهای مربوط به پروتئین‌های سطحی می‌باشند که به‌وسیله حضور دومین R

* **نویسنده مسئول: احمد راشکی**، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران Email: ah_rashki@usal.es

(تکرارهای دی پپتید Ser-Asp) در آن مشخص می‌شوند (۹). تحقیقات نشان داده‌اند که اتصال به فیبرونکتین و فیبرینوژن که به ترتیب به‌واسطه FnbpB و ClfA انجام می‌شود در تهاجم به سلول‌های انسان و ایجاد عفونت لازم و ضروری است (۱۰). دراین‌ارتباط اهمیت و نقش عوامل چسبندگی در طیف وسیعی از بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* موردمطالعه قرار گرفته است (۴، ۱۱). اثبات‌شده است fnbA و fnbB به‌طور معنی‌داری در استقرار بافتی در بیماری‌هایی مثل کراتیت چشم (۱۲)، استئومیلیت و آرتریت سپتیک (۱۰) مؤثرند. به‌علاوه، با استفاده از نتایج حاصل از مدل‌های تجربی نشان داده‌اند که برخی از پروتئین‌های چسبندگی ممکن است اهداف بالقوه‌ای جهت جلوگیری از عفونت‌های استافیلوکوکی باشند. ازاین‌رو، انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط باقابلیت ژنتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به لحاظ داشتن میانجی‌های چسبندگی امری ضروری به نظر می‌رسد. ازآنجایی‌که تاکنون مطالعه‌ای روی میزان حضور ژن‌های چسبندگی در جدایه‌های استافیلوکوکوس جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های کلینیکی در مناطق مختلف ایران انجام‌نشده است، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی حضور ژن‌های *clfB*, *clfA*، *fnbA* و *fnbB* در ایزوله‌های کلینیکی منطقه سیستان بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۲۵۰ نمونه کلینیکی (ادرار، خون و ترشحات بینی و ریه) از بیماران بستری‌شده در بیمارستان‌های منطقه سیستان در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۹۱ جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه زابل منتقل و روی محیط‌های آگار خونی، مانیتول سالت آگار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرما گذاری شد. سپس با استفاده از تست‌های رایج بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، کوآگولاز، اوره، DNase، حساسیت به نوبیوسین و باسیتراسین، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین هویت گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (۱۳). به‌طور خلاصه ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت BHI (مرک آلمان) به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۹۵°C گرما گذاری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند. بعد از خارج نمودن مایع رویی، دو بار با 1ml محلول PBS (1X) (Phosphate Buffer Salin) شستشو داده شدند. در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به تیوب‌ها اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C داخل ترمومیکسر قرار گرفتند. مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند و سپس مایع رویی به تیوب‌های جدید منتقل شدند. DNA استخراج شده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. وجود DNA در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر و با بررسی جذب در ۲۶۰nm بررسی گردید.

بررسی فراوانی ژن‌های بیماری‌زا

برای مطالعه وجود ژن‌های کد کننده پروتئین‌های فیبرو نکتین (*fnbA* و *fnbB*) و فیبرینوژن (*clfA* و *clfB*) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از تکنیک PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای اقتباس‌شده از مطالعات Stutz، Booth و همکاران (۴، ۱۴) با کد دسترسی CP013231.1 در جدول ۱ آمده است.

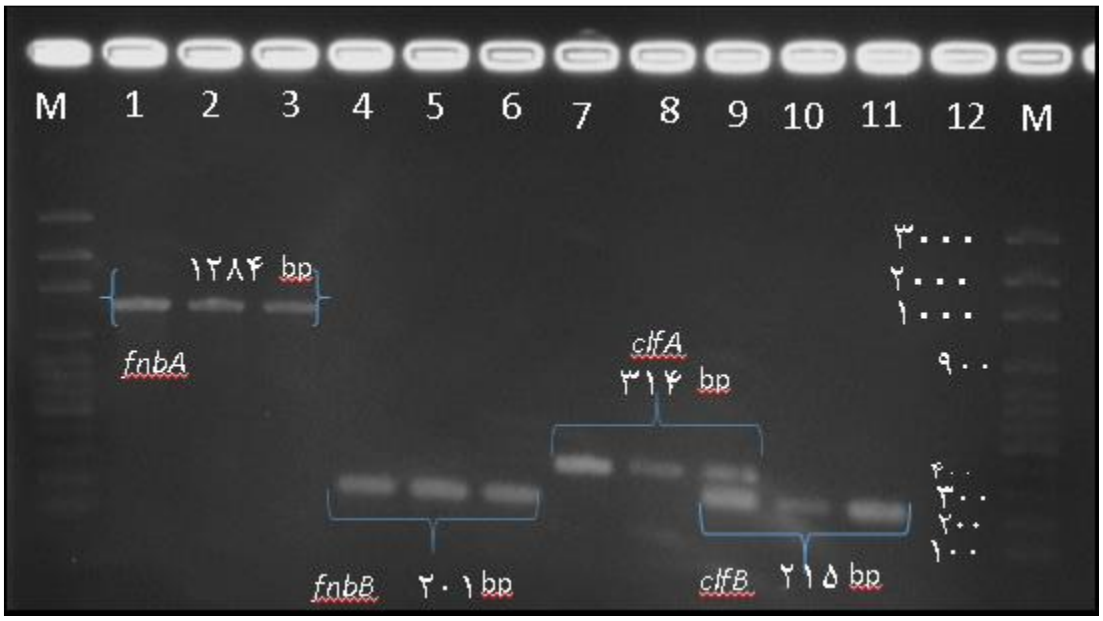
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	منبع
clfA-F	5'-CGC CGG TAA CTG GTG AAG CT-3'	۳۱٤	(4)
clfA-R	5'-TGC TCT CAT TCT AGG CGC ACT T-3'		
clfB-F	5' -ATG ATC TTG CTT GCG TT-3'	۲۱٥	(4)
clfB-R	5'-CCG ATT CAA GAG TTA CAC C-3'		
fnbA-F	5'-GCG GAG ATC AAA GAC AAG TA-3'	۱۲۸٤	(14)
fnbA-R	5'-CAC CAT CTA TAG CTG TGT GG-3'		
fnbB-F	5'-GGA GAA GGA ATT AAG GCG-3'	۲۰۱	(14)
fnbB-R	5'-GCC GTC GCC TTG AGC GT-3'		

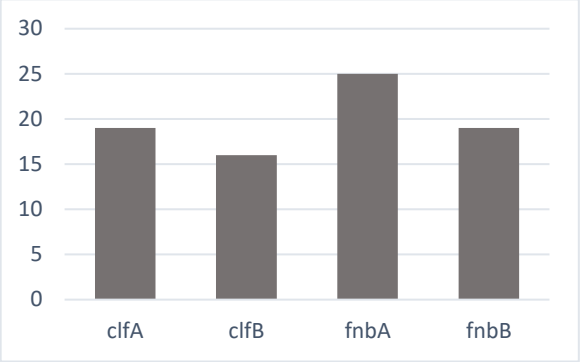
واکنش Multiple-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. جهت انجام PCR آنزیم MasterMix ۲×Red از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش، دو میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم MasterMix ۲×Red و ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکو مول) از هر پرایمر را باهم مخلوط و حجم نهایی آن با آب مقطر دو بار تقطیر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR شامل مراحل زیر بود. واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به DNA الگو برای ژن‌های *fnbA* و*fnbB* (۵۶°C به مدت۳۰ ثانیه)، برای ژن‌های *clfA* و *clfB* (۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه) و طویل شدن رشته الگو تکثیر در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان دمای طویل شدن نهایی در ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه انجام شد (۴). پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۸۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. قطعات تکثیرشده پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه GelDocumentation (UVITEC, Cambridge) مشاهده شد. همچنین از مارکر ۱۰۰ جفت باز برای تائید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید (شکل ۱).

نتایج

تعداد ۱۰۰ ایزوله باکتریایی پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. تمام ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست‌آمده جهت شناسایی ژن‌های تجمع (*clfA* و *clfB*) مورداستفاده قرار گرفتند. از این میان، ۱۹ و ۱۶ ایزوله به دنبال انجام PCR به ترتیب فراورده‌هایی به‌اندازه‌های ۳۱۴ و ۲۱۵ جفت باز تولید نمودند (شکل ۱). ازاین‌رو درمجموع ۱۹٪ و ۱۶٪ از ایزوله‌های مورد آزمایش در این مطالعه ازنظر حضور ژن‌های *clfA* و *clfB* مثبت بودند (نمودار ۱). تکثیر ژن‌های کد کننده پروتئین‌های چسبندگی FnbA و FnbB نیز به ترتیب فراورده‌های PCR به‌اندازه ۱۲۸۴ و ۲۰۱ جفت باز تولید نمودند (شکل ۱) که از بین ۱۰۰ ایزوله موردمطالعه ۲۵٪ و ۱۹٪ ایزوله به ترتیب ازنظر داشتن ژن‌های مذکور واکنش مثبت نشان دادند (نمودار ۱). نتایج حاصل از این بررسی آماری ایزوله‌های موردمطالعه نشان داد که ۵۰٪ ایزوله‌ها حداقل حضور یکی از ژن‌های موردنظر را نشان دادند که از این مقدار ۳۱٪ آن‌ها فقط حاوی یک ژن، ۱۳٪ آن‌ها دارای دو ژن و ۶٪ درصد آن‌ها سه ژن از چهار ژن را دارا بودند.



شکل ۱- نمونه محصولات PCR ژن‌های کد کننده فاکتورهای حدت موردمطالعه. ردیف ۱ و ۲ ژن تکثیرشده *fnbA*، ردیف ۳ کنترل مثبت (ایزوله *استافیلوکوکوس اورئو س* با واکنش مثبت برای ژن *fnbA*)، ردیف ۴، ۵، ۶ ژن تکثیرشده *fnbB*، ردیف ۷، ۸ ژن تکثیرشده *cifA*، ردیف ۹ کنترل مثبت (ایزوله *استافیلوکوکوس اورئو س* با واکنش مثبت برای ژن‌های *cifA* و *cifB*) و ردیف ۱۰، ۱۱ ژن تکثیرشده *cifB*



نمودار ۱- میزان فراوانی ژن‌های موردمطالعه برحسب درصد

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده‌های ضایعات چرکی در عفونت‌های پروتز مفصلی، سطحی پوست تا عمقی شناخته‌شده است (۱۵-۱۷). Hensenو همکاران (۲۰۰۰) نشان داده‌اند که در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ازنظر اتصال و تهاجم تفاوت‌هایی وجود دارد (۱۸). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین‌های چسبان متعلق به خانوادهMSCRAMMs مثل پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (*clfA, B*)، فیبرونکتین (*fnBA*)، کلاژن (Cna)، سیالوپروتئین (Bbp) و الاستین (Ebps) در این اتصال مؤثرند (۱۹، ۲۰). در پژوهش انجام‌شده توسط Wann و همکاران (۲۰۰۰) مشخص شد که اتصال اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به سلول‌های اپیتلیال مجرای شیردهی میزبان به تعامل بین پروتئین‌های سطحی چسبان باکتری و سلول‌های میواپی تلیال و فیبروبلاست میزبان بستگی دارد (۲۱). دسترسی به اطلاعات مربوط به میزان حضور ژن‌های کد کننده پروتئین‌های چسبان سطحی، در ارتباط با درک بهتر از نحوه بیماری‌زایی و نیز در تسهیل کنترل و جلوگیری از عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر است. مطالعات کمی جهت شناسایی این عوامل در مناطق مختلف کشور وجود دارد. ازاین‌رو این مطالعه به‌منظور بررسی میزان فراوانی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (*clfA, B*)، فیبرونکتین (*fnBA*) در بیماران بستری‌شده در منطقه سیستان انجام‌شده است. در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۰۰ ایزوله جداشده، فراوانی ژن‌های *clfA* و *clfB* به ترتیب ۱۹٪ و ۱۶٪ و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* به ترتیب ۲۵٪ و ۱۹٪ بودند. نتایج حاصل از این مطالعه مخالف با مشاهدات قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تهران مبنی بر این‌که تمام ایزوله‌های موردمطالعه حضور ژن‌های *clfA* و *clfB* را نشان دادند، است (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Zmantar و همکاران (۲۰۰۸) روی ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* جداشده از عفونت‌های گوش انجام گرفت، نشان دادند که ۷۶٪ و ۳۴٪ ایزوله‌ها به ترتیب واجد ژن‌های *fnbA* و *clfA* بوده‌اند (۲۳). شماخی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای نشان دادند که ژن‌های *fnbA* و *fnbB* به ترتیب در ۸۰٪ و ۶۵٪ از ایزوله‌ها مشاهده‌شده است (۲۴). کیاوری و همکاران (۱۳۹۱) مشخص کردند که از ۱۲۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* موردمطالعه، ژن *fnbB* در ۶۵٪ ایزوله‌های بالینی و ۵۴٪ ایزوله‌های بینی شناسایی‌شده است. قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای بر روی استافیلوکوک‌های جداشده از کودکان بستری‌شده در تهران دریافتند که ژن‌های *fnbA* و *fnbB* به ترتیب در ۶۳٪ و ۶٪ ایزوله‌ها وجود داشت (۲۵). Arciola و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اکثریت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ارتباط با عفونت‌های ارتوپدی واجد ژن‌های کد کننده *fnbA* (۹۸٪) و *fnbB* (۹۹٪) بود (۲۶). در مطالعه‌ای که توسط Duran و همکاران (۲۰۱۰) روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصل از زخم‌های جراحی انجام شد، نشان دادند که ۸۶ (۹۷٪) ایزوله حاوی ژن *fnbA* بودند (۲۷). همچنین مطالعه Paniagua-Contreras و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مکزیک نشان داد که ۶۶٪ ایزوله‌های جداشده از کاتتر واجد ژن‌های *clfA* و*clfB* بودند (۲۸). از آنجائی که نقش ژن‌های *clfAB* و *fnbAB* به‌عنوان یک شاخص حدت در بیماری‌های مختلفی مثل آرتریت سپتیک، تضعیف سیستم ایمنی میزبان و عفونت‌های استخوانی نیز مشخص گردیده است (۲۹، ۳۰) یافته‌های حاصل از این مطالعه مخالف با مشاهدات انجام‌شده فوق است. با توجه به این‌که منبع عفونت نقش مهمی در تنوع الگوی فراوانی ژن کد کننده پروتئین‌های چسبیده سطحی را دارد (۲۵)، تفاوت نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام‌شده می‌تواند متأثر از منطقه جغرافیایی، محل نمونه‌برداری و خصوصیات ژنتیکی ایزوله‌ها باشد. مطالعه حاضر نشان داد که ۶٪ از ایزوله‌ها حاوی ۳ ژن از ۴ ژن موردمطالعه بودند. به نظر می‌رسد چنین ایزوله‌هایی ممکن است از غالب بودن اتصال بیشتر و قابلیت و انتشار بیشتری به بافت‌های بیماران برخوردار باشند. به‌طور

خلاصه این مطالعه انتشار کم سه ژن از چهار ژن موردمطالعه در بین ایزوله‌ها را نشان داد. اما با توجه به این نکته که از ۱۰۰ ایزوله موردمطالعه، ۵۰ مورد از آن حداقل حضور یکی از ژن‌های موردبررسی را نشان دادند بیانگر نقش احتمالی پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن و فیبرونکتین در بیماری‌زایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیماران این منطقه می‌باشد؛ لذا اهمیت مطالعات بیشتر و پژوهش‌های گسترده‌تر در خصوص ژن‌های کد کننده پروتئین‌های چسبیده سطحی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به تفکیک محل عفونت توسط سایر پژوهشگران را می‌طلبد تا نقش آن‌ها در بیماری‌زایی بهتر آشکار گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، بخشی از پایان‌نامه مریم مولایی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل می‌باشد، بدین‌وسیله از اساتید و کارشناس ژنتیک آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده دامپزشکی و گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را برای انجام این پژوهش فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام ننموده اند.

References

1. Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O, Witte W, Strommenger B, et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in Nigeria. BMC Microbiol. 2011;11(92).:1-8
2. Cotar AI, Chifiriuc MC, Dinu S, Bucur M, Iordache C, Banu O, 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.
3. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Yazdchi SB .Molecular Typing of Clinical and Nasal Carriage Isolates of Staphylococcus aureus by spa Gene Patterns. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012;22(94):27-34.
4. Stutz K, Stephan R, Tasara T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol. 2011;49(2):638-646.
5. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence Staphylococcus aureus isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Vet Microbiol. 2004;103(3-4):241-247.
6. Murphy E, Lin SL, Nunez L, Andrew L, Fink PS, Dilts DA, et al. Challenges for the evaluation of Staphylococcus aureus protein based vaccines: monitoring antigenic diversity. Hum Vaccin. 2011 Jan-Feb;7 Suppl:51-59
7. Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lammler C, Zschock M. Distribution of virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from stable nasal carriers. FEMS Microbiol Lett. 2004;233(1):45-52.
8. Burke FM, McCormack N, Rindi S, Speziale P, Foster TJ. Fibronectin-binding protein B variation in Staphylococcus aureus. BMC Microbiol. 2010;10(1):160-175.
9. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penades J, Litt D, et al. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. Mol Microbiol. 2002;44(4):1033-1044.
10. Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM ,Foster T. Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. J Infect Dis. 2001;184(12):1572-1580.
11. Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by Staphylococcus aureus. Curr Opin Microbiol. 2006;9(1):5-11.
12. Jett BD, Gilmore MS. Internalization of Staphylococcus aureus by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. Infect Immun. 2002;70(8):4697-4700.
13. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Rashki Ghalehnoo M. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic Escherichia coli Isolates Collected From Patients With Urinary Tract Infection. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(8): 22647.

14. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among Staphylococcus aureus isolates from various sites of infection. Infect Immun. 2001;69(1):345-352.
15. Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz J, Alvarez MA, Martin MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. J Clin Microbiol. 2005;43(3):1278-1284.
16. Bravo-Molina A, Linares-Palomino JP, Lozano-Alonso S, Asensio-Garcia R, Ros-Die E, Hernandez-Quero J. Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot syndrome. J Diabetes Complications. 2012;30(2):329-334.
17. Chen YJ, Liu KL, Chen CJ, Huang YC. Comparative Molecular Characteristics of Community-Associated and Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates From Adult Patients in Northern Taiwan. Medicine (Baltimore). 2012;94(49):e1961.
18. Hensen SM, Pavić MJ, Lohuis JA, Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of Staphylococcus aureus strains. J Dairy Sci. 2000;83(3):418-429.
19. Tung H, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Ryden C. A bone sialoprotein-binding protein from Staphylococcus aureus: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem J. 2000;345(3):611-619.
20. Hudson MC, Ramp WK, Frankenburg KP. Staphylococcus aureus adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. FEMS Microbiol Lett. 1999;173(2):279-284.
21. Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. J Biol Chem. 2000;275(18):13863-13871.
22. Ghasemian A, Najar PS, Bakhshi B, Mirzaee M. Several Virulence Factors of Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus Isolates From Hospitalized Patients in Tehran. Int J Enteric Pathog. 2015; 3(2): 25196.
23. Zmantar T, Chaieb K, Makni H, Miladi H, Abdallah FB, Mahdouani K, et al. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical Staphylococcus aureus. J Basic Microbiol.2008;48(4):308-314.
24. Chamakh M, Mousakhani F, Arjmndzadgan M, Dezful S. Examine the prevalence of antibiotic resistance and biofilm production of certain genes in Staphylococcus aureus isolates of bovine mastitis J Clinic Vet Med. 2012;3(4): - 234-235.
25. 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. Iran J Pathol. 2015;10(4): 258-264.
26. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among Staphylococcus aureus isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiol Lett. 2005;246(1):81-86.
27. Duran N, Dogramaci Y, Ozer B, Demir C, Kalaci A. Detection of adhesin genes and slime production among Staphylococci in orthopaedic surgical wounds. African J Microbial Res. 2010;4(9):708-715.
28. Paniagua-Contreras G ,Monroy-Perez E, Gutierrez-Lucas R, Sainz-Espunes T, Bustos-Martinez J, Vaca S. Genotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. Folia Microbiol (Praha). 2014;59(4):295-302.
29. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat Rev Microbiol. 2014;12(1):49-62.
30. Kang M, Ko YP ,Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. J Biol Chem. 2013;288(28):20520-20531

Original Article

The Prevalence of Adhesive Surface Encoding Genes in Staphylococcus Aureus Isolated from Hospitalized Patients in Zabol-Iran by Multiplex PCR

Mollaei M[1], Rashki A[2]*

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Department of Physiopathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 02 Jan 2016 Accepted: 14 May 2016

Abstract

Background & Objective: *Staphylococcus aureus* is one of the most frequently opportunistic pathogens isolated from nosocomial infections, responsible for severe infections such as bacteremia, endocarditis, and skin infections. Surface proteins such as fibrinogen and fibronectin-binding proteins are important factors in adhesion and invasion of *S. aureus*. Therefore, the objective of this study is to evaluate the presence of genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, and *fnbB* in isolates of *S. aureus* collected from clinical specimens of hospitalized patients in Hospitals of Zabol -Iran.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 100 *S. aureus* isolates were collected from January to August 2013 from hospitalized patients at zabol-Iran. The isolates were confirmed by conventional biochemical tests. DNA of all isolates was extracted by boiling method. Multiplex PCR was used to identify the presence of virulence genes. The data were analyzed using Fisher's exact test.

Results: The results of this study showed that 50% of isolates possess at least one of the studied genes. The frequency of genes encoding fibrinogen (*clfA*, *clfB*) and fibronectin (*fnbA*, *fnbB*) were 19%, 16% and 25%, 19% respectively.

Conclusion: This study showed that the studied genes are found in small percentage of isolates. Further investigations on these genes are needed to clarify their role in the pathogenesis of *S. aureus* infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Fibrinogen, Fibronectins, Multiplex PCR

***Corresponding author: Ahmad Rashki**, Department of Physiopathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
Email: ah_rashki@usal.es

Journal of Fasa University of Medical Sciences 6 (2016): 296-302