مقاله پژوهشی

ارزیابی شیوع ژن‌های *fnBP* و *clfA* در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* و تأثیر فاکتورهای میزبانی و نمونه بالینی بر الگوی پراکنش آن‌ها

المیرا شفائی، سحر هنرمند جهرمی*، فاطمه نوربخش

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بوده که دارای فاکتورهای چسبندگی اختصاصی است و می‌تواند به پروتئین‌های مختلفی از ماتریکس خارج سلولی میزبان متصل شده و در بافت‌های میزبان جایگزین شود. این اتصال توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان (MSCRAMM) که شامل پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین (FnBP) و پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن (Clf) است صورت می‌گیرد. انجام مطالعات جامع در ارتباط با قابلیت ژنتیکی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ویژه MRSA به لحاظ داشتن میانجی‌های چسبندگی امری ضروری است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۷۴۵۷۲ نمونه بالینی خون، ادرار، خلط، بینی و سایر نمونه‌های بالینی از بیماران سرپایی و بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان میلاد تهران نمونه‌گیری انجام شد. پس از انجام تست‌های تشخیصی ۱۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. جهت تعیین جدایه‌های MRSA از روش انتشار دیسک و مقاومت به دیسک سفوکسی تین استفاده شد. حضور و فراوانی ژن‌های *fnbB*، *fnbA* و *clf* با روش PCR تعیین گردید.

نتایج: از تعداد ۱۸۰ سویه ۱۵ سویه (۸۸٪) ژن *fnbA*، ۴۷ سویه (۲۶٪) ژن *fnbB* و ۳۶ سویه (۲۰٪) ژن *clf* را دارا بودند. فراوانی همزمان دو ژن *fnbA* و *fnbB* ۴۲ (۲۳٪)، *fnbA* و *clf* ۳۲ (۱۸٪) و *fnbB* و *Clf* ۹ (۵٪) بود و همچنین حضور همزمان هر سه ژن مورد مطالعه ۹(۵٪) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که بین فراوانی ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *clf* و نوع نمونه بالینی، جنسیت، سن بیمار و جدایه‌های MRSA و MSSA رابطه معناداری وجود ندارد.

کلمات کلیدی: *استافیلو کوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *Clf*، *PCR*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری پاتوژن انسانی همه‌جا حاضر هم در عفونت‌های بیمارستانی و هم جوامع است گرچه به‌عنوان فلور نرمال انسان هم شناخته می‌شود (۱). حدود ۲۰٪ افراد این باکتری را در بینی خود حمل می‌کنند و ۶۰٪ افراد، ناقلین واسطه هستند (۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب است که می‌تواند عفونت‌های سطحی پوست و همچنین عفونت‌های تهاجمی شدید مانند ارتریت سپتیک و اندوکاردیت ایجاد کند (۳). سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین[1] از مهم‌ترین باکتری‌های مقاوم به دارو هستند که عفونت‌های ناشی از آن‌ها با میزان بالایی از مرگ‌ومیر در سراسر جهان همراه است (۴-۶). *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای عوامل چسبندگی اختصاصی است که می‌توانند به پروتئین‌های مختلف میزبانی به‌ویژه در ماتریکس خارج سلولی متصل شده و موجب استقرار در بافت‌های میزبان شوند. اتصال توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان اجزا سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس[2] میانجیگری می‌شود. این پروتئین‌ها باعث اتصال *استافیلوکوکوس اورئوس* به سطح سلول‌های میزبانی و

*نویسنده مسئول: **سحر هنرمند جهرمی**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران Email: sahar_hj2@yahoo.com

[1] Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)
[2] Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs)

تخریب بافت شده و به باکتری کمک می‌کنند تا بتواند از فاگوسیتوز توسط سلول‌های نوتروفیل فرار کند (۷-۹). پروتئین‌های چسبنده که به‌طور کووالان به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری اتصال دارند شامل پروتئین متصل شونده به کلاژن[1]، پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن[2]، پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین و پروتئین متصل شونده به الاستین می‌باشند (۱۰). از مهم‌ترین پروتئین‌های سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* FnbA، FnbB و Clf هستند (۱۳-۱۱). این پروتئین‌ها باعث چسبندگی استافیلوکوکی و تهاجم به انواع مختلفی از سلول‌ها ازجمله سلول‌های اپی تلیال، اندوتلیال، فیبروبلاست و استئوبلاست می‌گردند و نقش کلیدی در شروع اندوواسکولار، عفونت استخوان و مفصل و پروتز بازی می‌کنند (۱۴ و ۱۵). مطالعات نشان داده که FnbB و FnbA به‌صورت معنی‌داری در استقرار بافتی در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم، استئومیلیت و آرتریت سپتیک و استقرار در سطح ابزارهای پزشکی مؤثرند (۱۶ و ۱۷). بر طبق مطالعه Higgins و همکاران در *استافیلوکوکوس اورئوس* Clf از مهم‌ترین فاکتورهای ویرولانس استافیلوکوکوس اورئوس است که نقش مهمی در پاتوژنز سپسیس و ارتریت سپتیک ایفا می‌کند. این امر به خاطر توانایی برای اتصال به فیبرینوژن محلول و محدود کردن جذب اپسونین است (۱۸).

افزایش دانش مرتبط با برهمکنش‌های باکتری- میزبان که طی ایجاد و گسترش عفونت رخ می‌دهد ممکن است اهداف جدیدی را برای پیشگیری و مداخله ضد استافیلوکوکی در آینده پدید آورد. با توجه به اهمیت فاکتورهای چسبندگی در بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز اهمیت سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین هدف از انجام این تحقیق بررسی شیوع و فراوانی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های FnBPA، FnBPB و Clf در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران و تعیین اثر سن، جنسیت و نوع نمونه بر الگوی پراکنش آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بالینی و تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه به‌طور تصادفی ۷۴۵۷۲ نمونه بالینی که شامل نمونه‌های خون، ادرار، خلط، بینی، کاتاتر، حلق، واژینال، مجرای تناسلی آقایان، ترشحات چشم، مایعات بدن، مایع مغزی نخاعی و لوله تراشه بیماران سرپایی و بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان میلاد تهران بود، از تاریخ ۹۳/۲/۱ تا ۹۳/۴/۳۰ جمع‌آوری شد. جهت شناسایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی و به‌منظور تهیه کشت خالص، نمونه‌ها روی محیط آگار خون‌دار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند. پس از شناسایی و جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تست‌های تشخیصی، در محیط BHI حاوی گلیسرول ۱۵٪ تلقیح و در فریزر منفی ۸۰ درجه نگهداری شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ژن‌های 16SrRNA، *fnbA*، *fnbB* و *clf*

نام پرایمر	توالی پرایمر (′3 -′5)	طول محصول PCR (جفت باز)
FnbA-F	GAT ACA AAC CAG GTG GTG G	191
FnbA-R	TGT GCT TGA CCA TGC TCT TC	
FnbB-F	GGG GAG TAA CAG CTA ATG GTC	570
FnbB-R	GTC AAT TCA TGC TTC TCC ACT GG	
ClfA-F	GGC TTC AGT GCTTTG AGG	980
ClfA-R	TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	
16SrRNA F	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC	228
16SrRNA R	CGC ACA TCA GCG TCA G	

[1] Collagen-binding surface
[2] Clumping factor A (ClfA)

تعیین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک

جهت تعیین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یا MRSA از تست حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) با روش آنتی بیوگرام و بر اساس استاندارد ۲۰۱۴CLSI استفاده شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) برای تکثیر ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *clf*

به‌منظور استخراج DNA همه جدایه‌های باکتریایی از کیت استخراج DNA باکتری گرم مثبت شرکت سینا ژن استفاده شد. جهت تکثیر و بررسی فراوانی ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *clf* با *روش PCR*، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توالی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است و بر اساس میزان و غلظت مواد موردنیاز PCR انجام گرفت (جدول ۲). همچنین به‌منظور تائید هویت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از تکثیر ژن *16S rRNA* استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله

جدول ۲- غلظت مواد PCR جهت تکثیر ژن‌های *fnbB*،*fnbA*،*16SrRNA* و *clf*

مواد	مقدار
Master mix(BQ-Mgcl2-dNTP –Tag)	۱۲,۵µlit
fnbA R	۱pmol
fnbA F	۱pmol
fnbB R	۱pmol
fnbB F	۱pmol
clf R	۱pmol
clf F	۱pmol
16S rRNA (F)	۰/۸pmol
16S rRNA(R)	۰/۸pmol
TEM	۰/۱ U/µlit
DDW	۷/۹
حجم کل	۲۵µlit

واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه در ۳۲ سیکل و مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

جهت بررسی محصولات PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده‌شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک موردبررسی قرار گرفت. سویه *Staphylococcus aureus* ATCC33592 به‌عنوان کنترل مثبت برای تشخیص ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *clf* و باکتری *اشریشیا کلی* به‌عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و با استفاده از آزمون آماری توصیفی تست مربع کای (X^2) برای بررسی ارتباط فراوانی ژن‌ها با فاکتورهای میزبانی جنسیت، سن، نوع نمونه بالینی، بستری و سرپایی بودن بیمار و نیز MRSA و MSSA بودن سویه‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

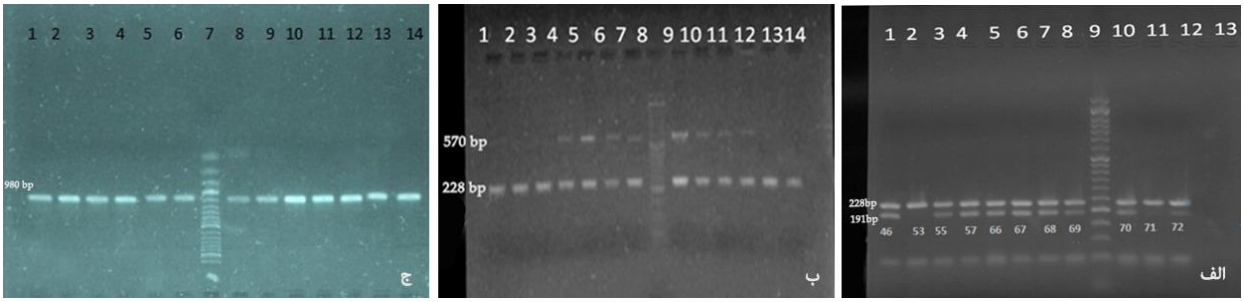
از ۷۴۵۷۲ نمونه بالینی موردمطالعه ۱۸۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کواگولاز وDNas مثبت و مقاومت به دیسک نووبیوسین شناسایی و جداسازی شد. از ۱۸۰ سویه موردمطالعه، ۹۲(۵۱٪) از زنان و ۸۸(۴۹٪) از مردان جدا شده بودند. بیماران ازنظر سن نیز به دو گروه سنی زیر ۴۰ سال (<۴۰)، ۴۰ و بالای ۴۰ سال (>۴۰) تقسیم شدند. نتایج نشان داد فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در افراد بالای ۴۰ و خود ۴۰ سال ۱۰۴(۵۸٪) و زیر ۴۰ سال ۷۶(۴۲٪) است. از مجموع ۱۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده، ۱۱۱(۶۲٪) از بیماران مراجعه‌کننده به‌صورت سرپایی و ۶۹(۳۸٪) از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان میلاد جداسازی شدند. از بین سویه‌های جداشده ۹۵ (۵۳٪) مقاوم به دیسک سفوکسی تین بودند که جدایه‌های MRSA در نظر گرفته شدند و ۸۵(۴۷٪) حساس به سفوکسی تین که به‌عنوان جدایه‌های MSSA تعیین شدند.

نتایج PCR نشان داد که از ۱۸۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۵۹ مورد (۸۸٪) دارای ژن *fnbA* بودند. ۴۷ مورد (۲۶٪) دارای ژن *fnbB* و ۳۶ مورد (۲۰٪) ژن *clf* را داشتند.

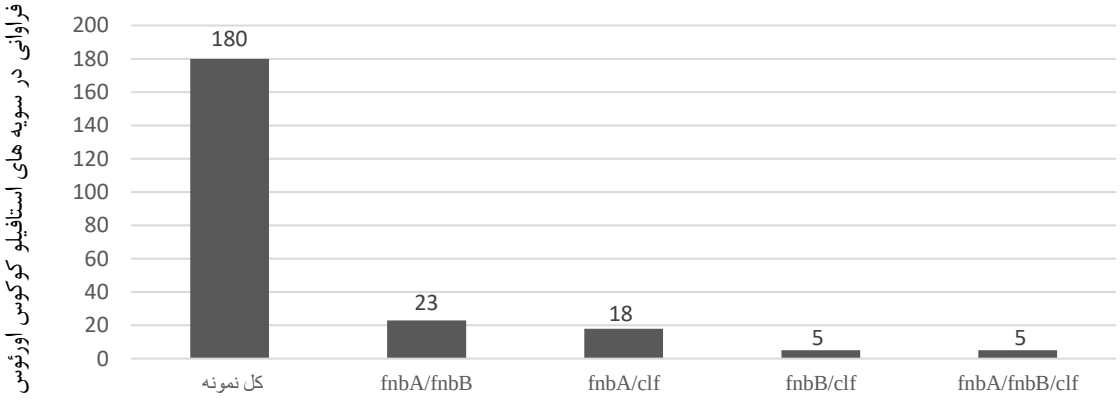
تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ژن‌های 16SrRNA، *fnbB*،*fnbA* و *clf* در *شکل* ۱ نشان داده شده است.

بررسی فراوانی همزمان ۲ ژن و ۳ ژن در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد همزمانی دو ژن *fnbA*، *fnbB* ۴۲(۲۳٪)، *ژن‌های fnbA و clf* ۳۲(۱۸٪) *و ژن‌های fnbB و clf* ۹(۵٪) است. فراوانی حضور همزمان سه ژن *fnbA*، *fnbB* و *clf* ۹(۵٪) نیز *گزارش* شد (شکل ۲).

آنالیز آماری نشان داد از ۹۲ سویه جداشده از بیمار زن موردمطالعه ۷۹(۸۵٪/۸) دارای ژن *fnbA*، ۲۸(۲۱٪) ژن *fnbB* و ۱۷(۱۸٪/۵) ژن *clf* را داشتند. از ۸۸ سویه جداشده از بیمار مرد ۸۰(۹۰٪/۹) ژن *fnbA*، (۳۲٪) ژن *fnbB* و ۱۹(۲۱٪/۶) ژن *clf* را دارا بودند (جدول ۳). از ۱۰۴ سویه جداشده از بیمار بالای ۴۰ سال ۹۳(۸۹٪/۴) دارای ژن *fnbA*،۳۲(۳۰٪/۸) ژن *fnbB* و ۲۰(۱۹٪/۲) دارای ژن *clf* بودند. از ۷۶ سویه جداشده



شکل ۱– تصویر الکتروفورز محصول PCR (الف) باندهای با طول ۲۲۸ جفت باز، ژن *16SrRNA*. چاهک‌های شماره‌های (1,3,4,5,6,7,8,10,12) ژن *fnbA* با *طول ۱۹۱ جفت باز* و چاهک شماره ۹ سایز مارکر ۵۰ جفت بازی را نشان می‌دهد. (ب) باندهای با طول ۵۷۰ جفت باز برای چاهک‌های شماره‌های (4,5,6,7, 9,10,11,12) مربوط به ژن *fnbB* و چاهک شماره ۹، سایز مارکر ۵۰ جفت بازی را نشان می‌دهد. (ج) باندهای با طول ۹۸۰ جفت باز برای چاهک‌های شماره‌های (1,2,3,4,5,6,8,9.10,11.12) ژن *clf* و چاهک شماره ۷ سایز مارکر ۵۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.



شکل ۲– نمودار فراوانی همزمان ۲ ژن و ۳ ژن در سویه‌های *استافیلو کوکوس اورئوس*

در این مطالعه فراوانی ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *clf* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بیماران بر اساس، جنسیت، سن بیمار، نوع نمونه بالینی، بیماران بستری و سرپایی و سویه‌های MRSA و MSSA مورد بررسی قرار گرفت.

از بیمار زیر ۴۰ سال ۶۶(۸۶٪/۹) واجد ژن *fnbA* بودند، ۱۵(۱۹٪/۷) ژن *fnbB* و ۱۶(۲۱٪/۱) ژن *clf* را دارا بودند (جدول ۳). از ۱۰۰ سویه جداشده از نمونه ادرار موردمطالعه ۸۶٪ ژن *fnbA*، ۳۰٪ دارای ژن *fnbB* و ۲۱٪ دارای ژن *clf*

بودند. از ۲۴ سویه جداشده از نمونه لوله تراشه ۲۳(۹۵٪/۸) ژن *fnbA*، ۵(۲۰٪/۸) ژن *fnbB* و ۱(۴٪/۲) ژن *clf* را داشتند. از ۲۲ سویه جداشده از نمونه زخم ۱۹(۸۶٪/۳) دارای ژن *fnbA*، ۵(۲۲٪/۷) دارای ژن *fnbB* و ۱(۴٪/۵) ژن *clf* بودند. در سویه‌های جداشده از بین سایر نمونه‌ها که ۲۳ نمونه بودند، ۲۲(۹۵٪/۶) ژن *fnbA*، ۵(۲۱٪/۷) ژن *fnbB* و ۹(۳۹٪/۱) ژن *clf* را داشتند (جدول ۳). از ۶۹ سویه جداشده از بیماران بستری ۶۴ (۹۲٪/۸) دارای ژن *fnbA*، ۱۸(۲۶٪/۱) دارای ژن *fnbB* و ۱۰ (۱۴٪/۵) دارای ژن *clf* بودند و از ۱۱۱ سویه جداشده از بیماران سرپایی ۹۵(۸۵٪/۶) دارای ژن *fnbA*، ۲۹(۲۶٪/۱) دارای ژن *fnbB* و ۲۶(۲۳٪/۴) دارای ژن *clf* بودند (جدول ۳). فراوانی ژن *fnbA* در ۹۵ سویه MRSA ۹۱(۹۵٪/۸)، ژن *fnbB* ۳۰(۳۲٪) و ژن *clf* ۱۶(۱۶٪/۸) گزارش شد و فراوانی ژن *fnbA* در ۸۵ سویه MSSA ۶۵ (۷۶٪/۵)، ژن *fnbB*۱۷(۲۰٪) و ژن *clf* ۲۰(۲۳٪/۵) گزارش شد (جدول ۳).

نتایج نشان داد که بین فراوانی هر یک از ژن‌ها در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس جنسیت و سن بیمار، نوع نمونه بالینی، شرایط بیمار و MRSA و MSSA بودن سویه‌ها اختلاف معناداری وجود ندارد (P> ۰/۰۵)

بحث و نتیجه گیری

اساس پاتوژنیسیته *استافیلوکوکوس اورئوس* بستگی به فاکتورهای ویرولانسی دارد که از فاگوسیتوز ممانعت می‌کنند و در توانایی میزبان برای بروز پاسخ‌های ایمنی به‌منظور جلوگیری از عفونت اختلال ایجاد می‌کنند. سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* با انواع متنوعی از مولکول‌های چسبنده قابل اتصال به پروتئین‌های مختلف موجود در پلاسما یا ماتریکس خارج سلولی میزبان مانند FnbA، FnbB و Clf پوشیده شده است که در بیماری‌زایی باکتری نقش مهمی ایفا می‌کنند.

Rice و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش دادند بخش زیادی

ژن		fnbA	Value	Asymp. Sig. (2-sided)	fnbB	Value	Asymp. Sig. (2-sided)	clf	Value	Asymp. Sig. (2-sided)
جنسیت	زن	۸۵/۸(۷۹)	۲/۹۲۳	۰/۰۸۷	۱۹(۲۱)	۱/۹۸۵	۰/۳۷۱	۱۷(۱۸/۵)	۰/۴۹۷	۰/۴۸۱
	مرد	۸۰(۹۰/۹)			۲۸(۳۲)			۱۹(۲۱/۶)		
سن	≥۴۰	۹۳(۸۹/۴)	۰/۵۳۴	۰/۴۶۵	۳۲(۳۰/۸)	۴/۲۳۹	۰/۱۲۰	۲۰(۱۹/۲)	۰/۰۹۵	۰/۷۵۸
	<۴۰	۶۶(۸۶/۹)			۱۵(۱۹/۷)			۱۶(۲۱/۱)		
شرایط بیمار	بستری	۶۴(۹۲/۸)	۱/۵۵۵	۰/۲۱۲	۱۸(۲۶/۱)	۱/۵۹۰	۰/۴۵۲	۱۰(۱۴/۵)	۱/۸۴۰	۰/۱۷۵
	سرپایی	۹۵(۸۵/۶)			۲۹(۲۶/۱)			۲۶(۲۳/۴)		
نوع نمونه بالینی	ادرار	۸۶(۸۶)	۴/۶۶۶	۰/۴۵۸	۳۰(۳۰)	۲/۷۰۴	۰/۹۸۸	۲۱(۲۱)	۱۰/۲۵۶	۰/۰۶۸
	لوله تراشه	۲۳(۹۵/۸)			۵(۲۰/۸)			۱(۴/۲)		
	زخم	۱۹(۸۶/۴)			۵(۲۲/۷)			۱(۴/۵)		
	خون	۹(۸۱/۸)			۲(۱۸/۲)			۴(۳۶/۴)		
	سایر نمونه‌ها	۲۲(۹۵/۶)			۵(۲۱/۷)			۹(۳۹/۱)		
نوع سویه	MRSA	۹۱(۹۵/۸)	۰/۴۳۳	۰/۰۶۸	۳۰(۳۲)	۰/۷۶۹	۰/۰۷۵	۱۶(۱۶/۸)	./۲۳۸	۰/۶۲۵
	MSSA	۶۵(۷۶/۵)			۱۷(۲۰)			۲۰(۲۳/۵)		

از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از عفونت‌های مختلف بالینی موردمطالعه (بیش از ۹۵٪) حاوی ژن *fnbA* بودند (۱۹).

Arciola و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ فراوانی ژن *fnbA* را در نمونه‌های بالینی جداشده از بیماران مبتلابه عفونت‌های بالینی اورتوپدیک و انواع جراحی‌های پیوند ۹۸٪ گزارش دادند (۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Duran و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ۸۸ نمونه حاصل از زخم‌های جراحی صورت گرفت فراوانی ژن *fnbA* ۹۷٪/۷ نشان داده شد. همچنین میزان فراوانی ژن *fnbB* بالای ۸۵٪ گزارش شده است (۲۱). در مطالعه حاضر ۸۸/۳٪ سویه‌ها دارای ژن *fnbA* و ۲۶٪ ژن *fnbB* را داشتند. دلیل این اختلاف فراوانی ممکن است به نوع نمونه بالینی موردمطالعه بستگی داشته باشد. در مطالعه‌های Arciloa و Duran اغلب نمونه‌ها شامل نمونه‌های گرفته‌شده از جراحی‌ها، عفونت‌های ارتوپدیک، پیوندها و عفونت‌های بالینی و زخم بوده ولی در این مطالعه نمونه‌ها غالباً نمونه‌های بالینی جداشده از بیماران شامل نمونه‌های ادراری، خون و سایر نمونه‌ها است.

در مطالعه Ghasemian و همکاران در سال ۲۰۱۵، ۶۳/۶٪ نمونه‌ها دارای ژن *fnbA* و ۵۰٪ دارای ژن *fnbB* بودند (۲۲). نمونه‌های موردمطالعه ایزوله‌های بالینی کودکان بستری‌شده در بخش‌های عفونی بیمارستان بودند. همچنین در مطالعه Ghasemian ارتباط معناداری بین فراوانی ژن‌ها و سویه‌های MRSA وMSSA مشاهده نشد همان‌طور که در مطالعه حاضر نیز ارتباطی بین فراوانی ژن‌های موردمطالعه با سویه‌های MRSA گزارش نشد. در مطالعه دیگری توسط Ghasemian و همکاران در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژن‌های *clfAB, fnbAB* در نمونه‌های زخم ۱۰۰٪ گزارش شد (۲۳). طی مطالعه Netsvyetayeva در کشور اوکراین در سال ۲۰۱۴ بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله شده از بخش قدامی بینی افراد سالم، نشان داده شد که فراوانی ژن *fnbA* ۵۹٪ است (۲۴) در مطالعهNashev و همکاران از ۴۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* که ۲۲ سویه از بین افراد سالم، ۸ سویه از بین افراد دارای عفونت پوستی و ۴ سویه از عفونت جداشده بود ۳۶/۷٪ دارای ژن *fnbB* بودند (۲۵). Kyong RP و همکاران طی یک مطالعه در سال ۲۰۰۶ شیوع فاکتورهای ویرولانس مانند ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در سویه‌های MSSA را بیشتر ازMRSA گزارش دادند (۲۶).

Wiśniewska و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش دادند که فراوانی ژن *fnbA* در سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی ۸۵٪ است ولی اختلاف معناداری بین فراوانی ژن با نوع نمونه بالینی مشاهده نشد (۲۷). در مطالعه حاضر نیز بین فراوانی ژن‌های *fnbA* و*fnbB* *با* جنسیت، سن بیمار و نوع نمونه بالینی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بیماران بستری و سرپایی اختلاف معناداری گزارش نشد. مطالعات Klain و همکاران در سال 2012 شیوع *clf* را ۹۱٪ گزارش دادند که بیشتر از نتایج حاصل از این مطالعه ۳۶(۲۰٪) بود (۲۸). احتمالاً دلیل این اختلاف بررسی سویه‌های با منشأ دامی بوده است. همچنین در سال ۲۰۰۸، Zamantar و همکاران میزان فراوانی ژن‌های *fnbA* و *clf را* به ترتیب ۷۶/۱٪ و ۳۰/۴٪ گزارش دادند (۲۹).

Nowrouzian در سال ۲۰۱۱ میزان فراوانی ژن‌های*fnbA* و *fnbB* و *clf* را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نوزادان به ترتیب ۷۸٪، ۹۹٪ و ۹۹٪ گزارش کرد. این امر توانایی اتصال و کلنیزه شدن شدید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در بافت‌های بدن نوزاد در ماه‌های اول تولد نشان می‌دهد (۳۰).

در ارتباط با حضور هم‌زمان ژن‌ها، هم‌زمانی ژن‌های *fnbA/fnbB* ۴۲ (۲۳٪)، *fnbA/Clf* ۳۲ (۱۸٪)، *fnbB/Clf* ۹ (۵٪) و *fnbA/fnbB/Clf* ۹ (۵٪) گزارش شد. در مطالعه Peacock و همکاران ۷۷٪ سویه‌های موردمطالعه دارای هردو ژن *fnbA* و *fnbB بودند*. بین پروتئین‌های متصل به فیبرینوژن و پروتئین‌های متصل به فیبرونکتین به‌ویژه *fnbA* یک اثر افزایشی در عملکرد وجود دارد. به‌علاوه ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در بین سویه‌های مختلف به‌شدت حفاظت‌شده هستند و بر روی کروموزوم پیوسته هستند (۳۱).

در مطالعه Savolainen هم‌زمانی ژن‌های *fnbA* و *fnbB* بین سویه‌ها ۴۵/۴٪ گزارش شد. به‌علاوه در هیچ‌یک از سویه‌های موردمطالعه *Clf* شناسایی نگردید (۳۲).

در مطالعه Foster و همکاران هم‌زمانی ژن‌های *fnbA* و *ClfA* و *Cna* در ۱۵٪ سویه‌های موردمطالعه گزارش‌شده است (۳۳). Machuca در سال ۲۰۱۳ گزارش داد که فراوانی ژن‌های

ادهسین *clfB*،*clfA* و *fnbA* در سویه‌های MRSA جداشده از کودکان موردمطالعه به ترتیب ۸۹٪، ۸۷٪ و ۸۳٪ بود (۳۴).

Contreras طی مطالعه خود در سال ۲۰۱۲ بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از کاتترهای بیماران مکزیکی همودیالیزی نشان داد که فراوانی فاکتورهای ادهسین *fnbA* و *fnbB* و *Clf* به *ترتیب* ۳۴/۵٪، ۵۶/۳٪ و ۱۰۰٪ است و گزارش داد همراهی فاکتورهای ویرولانس ازجمله ادهسین‌ها می‌تواند در کلونیزاسیون باکتری در کاتترها نقش مهمی دارد (۳۵).

مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام‌شده بیشترین علت اختلاف در فراوانی ژن‌های ادهسین *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ویژه ژن‌های *fnbB* و *Clf* را در نوع نمونه‌ی موردمطالعه مانند نمونه‌های بالینی، عفونی، زخم و جراحی‌ها، جایگاه عفونت و اختلافات اپیدمیولوژیکی می‌داند و به نظر می‌رسد حضور این دو ژن به‌تنهایی یا همراه با ژن *fnbA* در بروز بیماری‌های عفونی ایجادشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* اهمیت بسیاری دارد. از طرفی در این مطالعه هیچ ارتباطی بین فراوانی ژن‌ها با فاکتورهای میزبانی مانند نوع نمونه بالینی، جنسیت، سن، بستری یا سرپایی بودن بیماران و نوع سویه‌هایMRSA و MSSA وجود نداشت.

به‌طورکلی *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن خارج سلولی است که هنوز مکانیسم ورود آن به درون سلول کامل شناخته نشده است ولی مشخص شده پروتئین‌های سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* برهمکنش خاصی بین باکتری و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی میزبان برقرار می‌کنند که به استقرار باکتری کمک می‌کند. از طرفی اتصال و ورود به درون سلول اولین مرحله در شروع پاتوژنز باکتری و بقای آن در مقابل شرایط نامساعد محیطی و فرار از سیستم ایمنی میزبان است تا بتواند زنده بماند و منجر به تداوم عفونت باکتریایی گردد. درنتیجه بررسی وجود و نقش فاکتورهای ادهسین در ایجاد عفونت‌های باکتریایی حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

از همکاری جناب آقای امید حسینی کارشناس بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تهران سپاس‌گزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of Staphylococcus aureus:Novel Function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. J Pathogen.2011;2011:1- 13.
2. Kluytmans, J, van Belkum, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus epidemiology. underlying mechanisms and associated risks. ClinMicrobiol Rev. 1997;10(3): 505–520.
3. Fowler VG Jr, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. JAMA. 2005; 293(24):3012-3021.
4. Zinderman, CE.Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus among military recruits. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10(5):941-944.
5. Young DM Harris HW, Charlebois ED, Chambers Campbell A, Perdreau-Remington F, et al. An epidemic of methicillin-resistant Staphylococcus aureus soft tissue infections among medically underserved patients. Arch. Surg. 2004;139(9):947-953.
6. You JH, Ip DN, Wong CT, Ling T, Lee N.Meticillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia in Hong Kong. J Hosp Infect. 2008;70(4):379-81.
7. Gomez Ml, Lee A,Reddy B,Muir A,Soong G,Pitt A,et al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial Inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med.2004;10(8):842-848.
8. Vazquez V, Liang X, Horndahl JK, Ganesh VK, Smeds E, Foster TJ, et al. Fibrinogen is a ligand for the Staphylococcus aureus microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM)

bone sialoprotein-binding protein (Bbp). J Biol Chem. 2011;286(34):29797–805.
9. Higgins J, Loughman A, vankessel KP,vanStrijp JA,Foster TJ. Clumping factor A of Staphylococcus aureus inhibits phagocytosis by human polymorpho nuclear leucocytes. FEMS Microbial Leet.2006;258(2):290-296.
10. Heilmann C. Adhesion mechanisms of staphylococci. Adv Exp Med Biol. 2011;715:105–23.
11. Rice K, Huesca M, Vaz D, McGavin MJ. Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in Staphylococcus aureus: Identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant S. aureus. Infect Immun. 2001;69(6): 791-9.
12. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat Rev Microbiol. 2014;12(1):49–62.
13. 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):20520–3.
14. Massey RC, Kantzanou MN, Fowler T, et al. Fibronectin-binding proteinA of Staphylococcus aureus as multiple substituting binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. Cell Microbiol.2001; 3(12):839–51.
15. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. Infect Immun.2001; 69(5):2872–7.
16. Kalorey DR, Shanmugam Y, Kurkure NV, Chousalkar KK, Barbuddhe SB. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in Staphylococcus aureus from bovine subclinical mastitis cases. Journal of veterinary science. 2007;8(2):151-4.
17. Peacock SJ, Day NP,Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ.Clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibit diversity in fnb Genes and adhesion to human Fibronectin. Journal of Infection. 2000 ; 41(1); 23–31.
18. Higgins J, Loughman A, Van Kessel KP, Van Strijp JA, Foster TJ. Clumping factor A of Staphylococcus aureus in habits phagocytosis by human polymorph nuclear leucocytes. FEMS Microbial Litters. 2006; 258(2):290-6
19. Kelly Rice, Huesca M, Vaz D, McGavin MJ. Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in Staphylococcus aureus: Identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of Methicillin-resistant S. aureus. Infect Immun. 2001;69(6):3791-9.
20. Arciol 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 Microbiology Letters 246 (2005) 81–86.
21. Duran N, Dogramaci,Y, Ozar, B, Demir C, Kalaci A. Detection of adhesion genes and Slime production among Staphylococci in orthopedic surgical wound. African J Microbial Res. 2010; 4 (9): 708-715.
22. Ghasemian A, Najar Peerayeh SH, 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
23. Ghasemian A, Najar Peerayeh SH, Bakhshi B, Mirzaee M. High Frequency of icaAD, clumping factors A/B, fib and eno Genes in Staphylococcus aureus Species Isolated From Wounds in Tehran, Iran during 2012-2013. Arch Clin Infect Dis. 2015; 10(4): e23033.
24. Netsvyetayeva I, Fraczek M, Piskorska K, Golas M, Sikora M, Mlynarczyk A, et al. Staphylococcus aureus nasal carriage in Ukraine antibacterial resistance and virulence factor encoding genes. BMC Infectious Diseases.2014;14(1):128.
25. Nashev D, Toshkora K. Distribution of virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from stable nasal carriers.FEMS Microbiol let. 2004; 233(1): 45-52.
26. Kyong RP, Jin Yang B. Comparison of Genotypes and Enterotoxines Genes between Staphylococcus aureus isolates from Blood and nasal colonizers in a Korean Hospital. J Korean Med Sci. 2009; 24(4): 585-591.
27. Wiśniewska K, Garbacz K, PiechowiczL. Genotypic screening of atypical Staphylococcus aureus strains isolated from clinical samples for presence of selected adhesion genes. Med Mal Infect. 2008;38(10):549-53.
28. Klein RC, Fabres–Klein MH, Brito MA Fietto LG, Ribon Ade O. Staphylococcus aureus of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. Vet Microbiol. 2012;160(1-2):183-8.
29. Zmantar T, Chained K, Makni H, Bakhrof A. Detection by PCR of adhesions genes and Slime production in clinical S. aureus.J. Basic Microbial. 2008; 48(4): 308 – 314.
30. Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, et al. Superantigen genes and the capacity of Staphylococcus aureus to Colonize the Infantile Gut. The Journal of Infectious Diseases.2011;204(5):714–21.
31. Peacock SJ, Day NPJ, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibit diversity in fnb Genes and Adhesion to Human Fibronectin. Journal of Infection. 2000 ; 41(1): 23–31.

32. Savolainen K, Paulin L, Westerlund-Wikström B, Foster TJ, Korhonen TK, Kuusela P. Expression of pls, a Gene Closely Associated with the mecA Gene of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Prevents Bacterial Adhesion In Vitro. Infect Immun. 2001; 69(5): 3013–3020.
33. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 1998;6(12):484–488.
34. Machuca MA, Sosa LM, González CI. Molecular typing and virulence characteristic of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus isolates from Pediatric patients in Bucaramanga, Colombia. PLOS ONE. 2013:8(8): e73434
35. Contreras GP, Espuñes TS, Pérez EM, Moctezuma RR, Aranda DA, Abascal EN, et al. Virulence Markers in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. Advances in Microbiology,2012; 2(4): 476-487.

Original Article

Investigation of *Fnbp* and *Clf* Genes Prevalence among Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains and Assessment of the Effects of Host Factors and Clinical Specimens on their Distribution

Shafaei E, Honarmand Jahromy S*, Noorbakhsh F

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin- Pishva Branch, Iran

Received: 30 Jun 2016 Accepted: 05 Nov 2016

Abstract

Background & Objective: *Staphylococcus aureus* is a common cause of nosocomial infections that has several specific adhesion molecules factors, which can be bound to a variety of host matrix extracellular proteins and replaced by host tissues. This binding is mediated by a family of proteins known as microbial surface components known as adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) which includes fibronectin-binding protein (FnBP) and fibrinogen binding protein (Clf). Comprehensive studies regarding the genetic abilities of S. aureus isolates especially MRSA which have binding mediators seem essential.

Materials & Methods: In this study 74572 clinical samples of blood, urine, sputum and other clinical samples of patients who were admitted to Tehran Milad Hospital were collected. 180 *Staphylococcus aureus* strains were identified after diagnostic tests. In order to determine MRSA isolates Cefoxitin disc diffusion method was used. The presence and frequency of *fnbA, fnbB* and *clf* genes was determined by PCR.

Results: From 180 *Staphylococcus aureus* strains 159 strains (88%) had *fnbA* gene, 47 strains (26%) had *fnbB* gene and 36 strains (20%) had *clf* gene. The simultaneous frequency of *fnbA* and *fnbB* was 42 (23%), *fnbA* and *Clf* was 32 (18%) and *fnbB* and *Clf* was 9 (5%). The presence of all three genes together was 9 (5%).

Conclusion: The results showed that there was no significant relationship between *fnbA*, *fnbB* and *clf* genes and clinical sample type, gender and age of patients and MRSA and MSSA isolates.

Keywords: Methicilin Resistance Staphylococcus aureus, *FnbA*, *FnbB* and *clf* genes, PCR

*** Corresponding author: Sahar Hoanrmand Jahromy,** Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin- Pishva Branch, Iran,
Email: Sahar_hj2@yahoo.com