

مقاله پژوهشی

بررسی میزان فراوانی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های چسبندگی در *استافیلوکوکوس اورئوس* های جدا شده از بیماران بستری شده 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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی و مسئول عفونت‌های شدید مهمی همچون باکتری، 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* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیماران بستری شده در بیمارستان‌های آموزشی زابل بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیماران بستری شده در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۹۱ جمع‌آوری گردید. ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های میکروپشناسی رایج مورد تأیید 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 تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ۵۰٪ ایزوله‌های مورد بررسی حداقل یکی از ژن‌های مورد مطالعه 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 مورد مطالعه 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

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 فیبرینوکتین به نام *FnbpA* و *FnbpB*، پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (*ClfB* و *ClfA*) (۶) می‌باشد که به ترتیب توسط ژن‌های *fnbA*, *fnbB* و *clfA* کد می‌شوند (۷، ۸). پروتئین‌های *ClfA* و *ClfB* اعضاء خانواده‌ی بزرگ‌تری از ساختارهای مربوط به پروتئین‌های سطحی می‌باشند که به‌وسیله حضور دومین R

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 متی‌سیلین) 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

* نویسنده مسئول: احمد راشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران
Email: ah_rashki@usa1.es

منتقل و روی محیط‌های آگار خونی، مانیتول سالت آگار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای 37°C گرما گذاری شد. سپس با استفاده از تست‌های رایج بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، کوآگولاز، اوره، DNase، حساسیت به نوویوسین و باسیتراسین، تعداد ۱۰۰ ایزوله/استافیلوکوکوس/ورئوس تعیین هویت گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (۱۳). به‌طور خلاصه ایزوله‌های استافیلوکوکوس/ورئوس در لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت BHI (مرک آلمان) به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای 95°C گرما گذاری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه با دور 14000rpm سانتریفیوژ گردیدند. بعد از خارج نمودن مایع رویی، دو بار با ۱ml 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 95°C داخل ترمومیکسر قرار گرفتند. مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور 14000rpm سانتریفیوژ گردیدند و سپس مایع رویی به تیوب‌های جدید منتقل شدند. DNA استخراج شده در دمای 20°C نگهداری شد. وجود DNA در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر و با بررسی جذب در 260nm 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/ورئوس از تکنیک PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای اقتباس شده از مطالعات Stutz, Booth و همکاران (۴، ۱۴) با کد دسترسی CP013231.1 در جدول ۱ آمده است.

(تکرارهای دی پپتید Ser-Asp) در آن مشخص می‌شوند (۹). تحقیقات نشان داده‌اند که اتصال به فیبرونکتین و فیبرینوژن که به ترتیب به‌واسطه *FnbBP* و *ClfA* انجام می‌شود در تهاجم به سلول‌های انسان و ایجاد عفونت لازم و ضروری است (۱۰). در این ارتباط اهمیت و نقش عوامل چسبندگی در طیف وسیعی از بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس/ورئوس مورد مطالعه قرار گرفته است (۴، ۱۱). اثبات شده 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. از این‌رو، انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط با قابلیت ژنتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس/ورئوس به لحاظ داشتن میانجی‌های چسبندگی امری ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای روی میزان حضور ژن‌های چسبندگی در جدایه‌های استافیلوکوکوس جمع‌آوری شده از نمونه‌های کلینیکی در مناطق مختلف ایران انجام نشده است، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی حضور ژن‌های *fnbA*, *clfA*, *clfB* 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 بستری شده در بیمارستان‌های منطقه سیستان در فاصله زمانی فروردین تا شهریور ۹۱ جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه میکروپوشناسی دانشگاه زابل

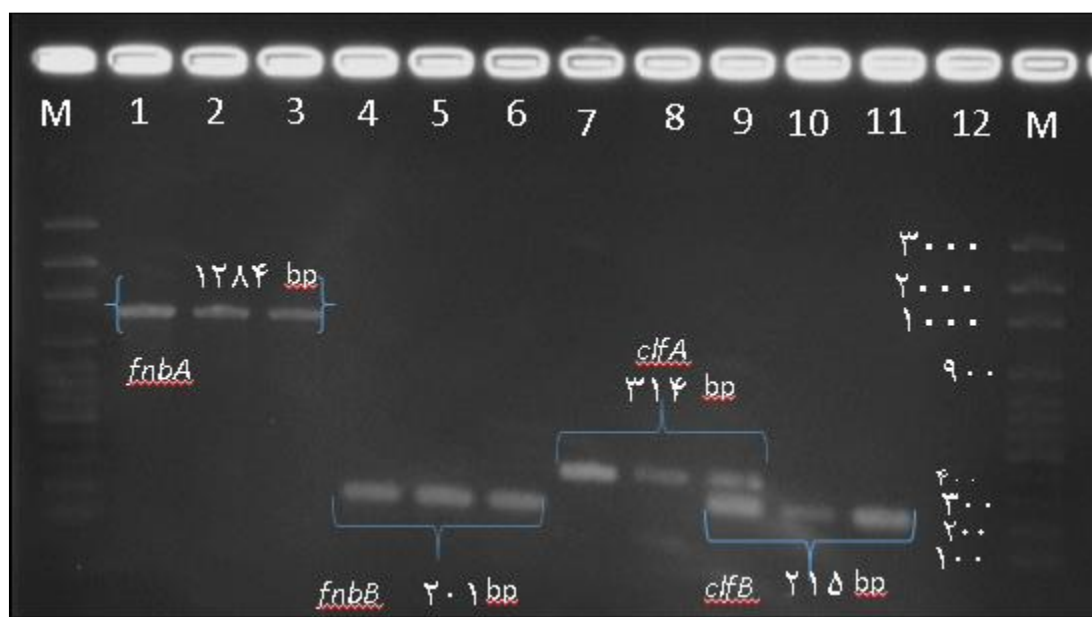
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	منبع
<i>clfA</i> -F	5'-CGC CGG TAA CTG GTG AAG CT-3'	۳۱۴	(4)
<i>clfA</i> -R	5'-TGC TCT CAT TCT AGG CGC ACT T-3'		
<i>clfB</i> -F	5'-ATG ATC TTG CTT GCG TT-3'	۲۱۵	(4)
<i>clfB</i> -R	5'-CCG ATT CAA GAG TTA CAC C-3'		
<i>fnbA</i> -F	5'-GCG GAG ATC AAA GAC AAG TA-3'	۱۲۸۴	(14)
<i>fnbA</i> -R	5'-CAC CAT CTA TAG CTG TGT GG-3'		
<i>fnbB</i> -F	5'-GGA GAA GGA ATT AAG GCG-3'	۲۰۱	(14)
<i>fnbB</i> -R	5'-GCC GTC GCC TTG AGC GT-3'		

نتایج

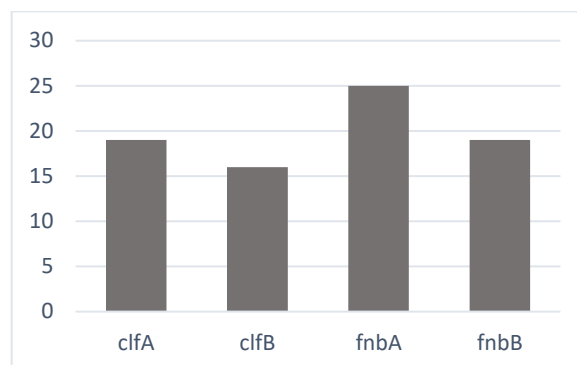
تعداد ۱۰۰ ایزوله باکتریایی پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. تمام ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست‌آمده جهت شناسایی ژن‌های تجمع (*clfA* و *clfB*) مورد استفاده قرار گرفتند. از این میان، ۱۹ و ۱۶ ایزوله به دنبال انجام PCR به ترتیب فراورده‌هایی به‌اندازه‌های ۳۱۴ و ۲۱۵ جفت باز تولید نمودند (شکل ۱). از این رو در مجموع ۱۹٪ و ۱۶٪ از ایزوله‌های مورد آزمایش در این مطالعه از نظر 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 مورد مطالعه ۲۵٪ و ۱۹٪ ایزوله به ترتیب از نظر داشتن ژن‌های مذکور واکنش مثبت نشان دادند (نمودار ۱). نتایج حاصل از این بررسی آماری ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد که ۵۰٪ ایزوله‌ها حداقل حضور یکی از ژن‌های مورد نظر 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.

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 مدت ۳۰ ثانیه)، برای ژن‌های *clfA* و *clfB* (۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه) و طولی شدن رشته الگو تکثیر در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان دمای طولی 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, دستگاه Cambridge) مشاهده شد. همچنین از مارکر ۱۰۰ جفت باز برای تأیید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه محصولات PCR ژن‌های کد کننده فاکتورهای حدت مورد مطالعه. ردیف ۱ و ۲ ژن تکثیرشده *fnbA*، ردیف ۳ کنترل مثبت (ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* با واکنش مثبت برای ژن *fnbA*)، ردیف ۴، ۵، ۶ ژن تکثیرشده *fnbB*، ردیف ۷، ۸ ژن تکثیرشده *clfA*، ردیف ۹ کنترل مثبت (ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* با واکنش مثبت برای ژن‌های *clfA* و *clfB*) و ردیف ۱۰، ۱۱ ژن تکثیرشده *clfB*

حاصل از این مطالعه مخالف با مشاهدات قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تهران مبنی بر این‌که تمام ایزوله‌های مورد مطالعه حضور ژن‌های *clfA* و *clfB* را نشان دادند، است (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Zmantar و همکاران (۲۰۰۸) روی ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس جداسده از عفونت‌های گوش انجام گرفت، نشان دادند که ۷۶٪ و ۳۴٪ ایزوله‌ها به ترتیب واجد ژن‌های *fmbA* و *clfA* بوده‌اند (۲۳). شماخی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای نشان دادند که ژن‌های *fmbA* و *fmbB* به ترتیب در ۸۰٪ و ۶۵٪ از ایزوله‌ها مشاهده شده است (۲۴). کیاوری و همکاران (۱۳۹۱) مشخص کردند که از ۱۲۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه، ژن *fmbB* در ۶۵٪ ایزوله‌های بالینی و ۵۴٪ ایزوله‌های بینی شناسایی شده است. قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای بر روی استافیلوکوک‌های جداسده از کودکان بستری شده در تهران دریافتند که ژن‌های *fmbA* و *fmbB* 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 *fmbA* (۹۸٪) و *fmbB* (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 *fmbA* بودند (۲۷). همچنین مطالعه Paniagua-Contreras و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مکزیک نشان داد که ۶۶٪ ایزوله‌های جداسده از کاتتر واجد ژن‌های *clfA* و *clfB* بودند (۲۸). از آنجائی که نقش ژن‌های *clfAB* و *fmbAB* به عنوان 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 انجام شده 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 انجام شده 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 مورد مطالعه بودند. به نظر می‌رسد چنین ایزوله‌هایی ممکن است از غالب بودن اتصال بیشتر و قابلیت انتشار بیشتری به بافت‌های بیماران برخوردار باشند. به‌طور



نمودار ۱- میزان فراوانی ژن‌های مورد مطالعه بر حسب درصد

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده‌های ضایعات چرکی در عفونت‌های پروتز مفصلی، سطحی پوست تا عمقی شناخته شده است (۱۵-۱۷). Hensen و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده‌اند که در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نظر اتصال و تهاجم تفاوت‌هایی وجود دارد (۱۸). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین‌های چسبان متعلق به خانواده MSCRAMMs مثل پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (*clfA*, *B*)، فیبرونکتین (*fmbA*)، کلاژن (*Cna*)، سیالوپروتئین (*Bbp*) و الاستین (*Ebps*) در این اتصال مؤثرند (۱۹، ۲۰). در پژوهش انجام شده 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 میوایپ 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. از این رو این مطالعه به منظور بررسی میزان فراوانی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های متصل شونده به فیبرینوژن (*clfA*, *B*)، فیبرونکتین (*fmbA*) در بیماران بستری شده در منطقه سیستم انجام شده است. در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۰۰ ایزوله جداسده، فراوانی ژن‌های *clfA* و *clfB* به ترتیب ۱۹٪ و ۱۶٪ و ژن‌های *fmbA* و *fmbB* به ترتیب ۲۵٪ و ۱۹٪ بودند. نتایج

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 منافی را اعلام ننموده‌اند.

خلاصه این مطالعه انتشار کم سه ژن از چهار ژن مورد مطالعه در بین ایزوله‌ها را نشان داد. اما با توجه به این نکته که از ۱۰۰ ایزوله مورد مطالعه، ۵۰ مورد از آن حداقل حضور یکی از ژن‌های مورد بررسی 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.

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, Pavčić 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 adhesin genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol*. 2008;48(4):308-314.
24. Chamakh M, Mousakhani F, Arjmandzadgan M, Dezfoul S. Examine the prevalence of antibiotic resistance and biofilm production of certain genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine mastitis. *J Clin 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 M¹, 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