

بررسی فراوانی ادهسین ژن های *efb* و *fnbA* *fnbB* *cna* *bbp* *ica* *sdrE* در استافیلوکوکوس اورئوس

- مهلا تاجمیریاحی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- زهرا رضایی سوروباقی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- شهره زارع کاریزی*: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- معصومه مهدوی اورتاکند: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

عوامل حدت گوناگونی در بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس نقش دارند. پروتئین‌هایی که واسطه چسبندگی با سطح سلول میزبان هستند از مهم‌ترین عوامل در اتصال و تهاجم استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. لذا در این مطالعه فراوانی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های چسبندگی *efb*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *bbp*, *ica*, *sdrE* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شهر اهواز مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲۳۱ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از ۴ بیمارستان شهر اهواز پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شد. استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم برای این نمونه‌ها صورت گرفت و فراوانی ژن‌های *efb*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *bbp*, *ica*, *sdrE* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن به روش Multiplex PCR تعیین شد. در این مطالعه از ۱۶ srRNA به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. در پایان محصولات PCR روی ژل آکریل امید برده شد. فراوانی ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه به شرح زیر بود: ژن *fnbB* (۶۷/۵۳٪)، ژن *fnbA* (۵۳/۲۴٪)، ژن *ica* (۵۱/۹۴٪)، ژن *cna* (۴۰/۲۵٪)، ژن *efb* (۳۷/۶۶٪)، ژن *sdrE* (۲۶/۴۰٪) و ژن *bbp* (۱۱/۶۸٪). براساس این مطالعه فراوانی متغیر ژن‌های بیماری‌زا در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس موید این مطلب است که فاکتورهای ویروانس باکتریایی نقش مهمی در تهاجم و بیماری‌زایی باکتری دارا می‌باشد. با توجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد گستره وسیعی از بیماری‌ها و نقش ادهسین‌های متنوع تولید شده توسط این جرم در این رابطه، اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود ادهسین‌های مذکور در بین سویه‌های جدا شده در ایران ضروری است.

کلمات کلیدی: ادهسین، Multiplex PCR، استافیلوکوکوس اورئوس



مقدمه

سلولی: (The intracellular adhesion، Chavakis، ۲۰۰۵) و SdrE پروتئین‌های سطحی: Serine-aspartate repeat-containing protein (E، Josefsson، ۱۹۹۸) است. در این مطالعه فراوانی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های چسبندگی Bbp، Cna، Ica، FnbA، SdrE، FnbB و Efb در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس اهواز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی: در این مطالعه ۲۳۱ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری در چهار بیمارستان سینا، ابوزر، آریا و گلستان شهر اهواز گرفته شد. نمونه‌های مورد بررسی شامل خون، ادرار، آبسه، زخم، خلط و تراشه‌های پوستی بود.

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست‌های

افتراقی: شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های استاندارد میکروپشناسی مانند مشاهدات میکروسکوپی (بررسی کلنی‌های مشکوک) میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز، اکسیداز، تخمیر قندمانیتول، حساسیت به نوروبیوسین و انجام تست DNase صورت گرفت (Hamdan و همکاران، ۲۰۱۰).

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA مربوطه به جدایه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس از کشت ۲۴ ساعته در محیط BHI (Merck، آلمان) و از روش دستی فنل (Merck) و کلروفرم (Bioflux) استفاده گردید (Wilson، ۱۹۸۷). با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جذب DNA استخراج شده در سه طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت (Goudarzi و همکاران، ۲۰۱۹).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR): برای هر یک از ژن‌های

مورد بررسی این مطالعه پرایمر اختصاصی طراحی گردید (جدول ۱).

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهم‌ترین پاتوژن بیماری‌زای انسانی و از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است (Woodford و Livermore، ۲۰۰۹). بیماری‌زایی این باکتری به واسطه حضور آنزیم‌ها، سموم و عوامل ویروالانس متعدد هم‌چون پروتئین‌هایی است که واسطه چسبندگی باکتری با سطح سلول میزبان می‌باشند (Walker، ۱۹۹۹). استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند به طیف وسیعی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی میزبان متصل شود و پایبندی آن توسط یک گروه از پروتئین‌های سطحی که ادهسین نامیده می‌شوند، انجام می‌گردد. ادهسین‌ها هم توسط باکتری‌های بیماری‌زا و هم ساپروفیت بیان می‌گردند. استافیلوکوکوس اورئوس حاوی عوامل چسبندگی اختصاصی می‌باشد که می‌تواند به پروتئین‌های متنوعی از میزبان به‌ویژه در ماتریکس خارج سلولی (ECM) متصل شده و جایگزینی در بافت‌های میزبان را موجب شوند. این اتصال توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان اجزاء سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس (MSCRAMMs= Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) میانجی‌گری می‌شود (Höök و Foster، ۱۹۹۸). برخی از مهم‌ترین این پروتئین‌ها عبارتند از: Can (پروتئین متصل شونده کلاژن: Collagen adhesin) (Bingham، ۲۰۰۸)، Efb (پروتئین اتصالی فیبرینوژن: Extracellular fibrinogen binding protein) (Patti، ۱۹۹۴)، FnbA و FnbB (پروتئین‌های اتصالی فیبرونکتین: Fibronectin binding proteins A and B) (Siboo، ۲۰۰۱؛ JÖNSSON، ۱۹۹۱)، Bbp (پروتئین اتصالی استخوانی سیالوپروتئین: Bone sialoprotein binding protein) (Tung، ۲۰۰۰)، Ica (پروتئین چسبندگی داخل

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن و اندازه محصول PCR حاصل از تکثیر آن‌ها

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
۱۶S rRNA	F: 5- GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3 R: 5- CGC ACA TCA GCG TCA G-3	۲۲۸
sdrE	F: 5- TCCATCAGGAGAGGTCATTGC-3 R: ۵-ATCTCAGCTTTAGTGTGGTTGC-3	۳۵۳
ica	F: ۵-TGACTATGTAATGTGCTTGGATGC-3 R: ۵-GAGGTACTGCTGCGTTAATAATCC-3	۷۷۲
fnbB	F: ۵-GGGGAGTAACAGCTAATGGTCG-3 R: ۵-GTCAATTCATGCTTCTCCACTGG-3	۵۷۲
fnbA	F: ۵-CTGATAAAGTTGCTCTGGATGTCC-3 R: ۵-GCGACAGGTGAAGTTTTAGAAGG-3	۶۴۲
efb	F: ۵-TTGTTAACATTAGCGGCAATAGG-3 R: ۵-ATTGAGGACGTGCACCATSTTCG-3	۲۵۷
bbp	F: 5-AGTGGTGGTGTAGCAGATAATGG-3 R: 5- CCTGTTGAACTGCTAAGTCATCC-3	۲۹۲
cna	F: ۵-GGCAAGCAGTTATTACACCAGACG-3 R: ۵-TCCGTAATTGCACCTTGTCCACTG-3	۴۲۱



cna به ترتیب به اندازه ۵۷۲bp، ۶۴۲bp و ۴۲۱bp روی ژل پلی آکریل امید ۱۲٪ مشاهده شد (شکل ۲).

درصد فراوانی ادهسین ژن های *sdrE ica bbp cna fnbB fnbA*

در این مطالعه فراوانی هر یک از ژن های *sdrE ica fnbB cna bbp fnbA* و *efb* تعیین گردید. بیشترین فراوانی را ژن *fnbB* (۶۷/۵۳٪) داشت، پس از آن ژن های *fnbA* (۵۳/۲۴٪)، *ica* (۵۱/۹۴٪)، *cna* (۴۰/۲۵٪)، *efb* (۳۷/۶۶٪) و *sdrE* (۲۶/۴۰٪) در رتبه های بعدی قرار داشتند. کمترین فراوانی مربوط به ژن *bbp* (۱/۱۶۸٪) بود. بررسی ارتباط فراوانی هر یک از ادهسین ژن ها با نوع نمونه بالینی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: ارتباط فراوانی هر یک از ادهسین ها با نوع نمونه

ژن	نوع نمونه	خون	اداری	تراشه	خلط
<i>fnbB</i>	۶٪	۵۴٪	۴٪	۰	۰
<i>fnbA</i>	۲٪	۳۶٪	۰	۰	۰
<i>cna</i>	۲٪	۱۶٪	۰	۲٪	۰
<i>ica</i>	۱۲٪	۱۴٪	۰	۲٪	۰
<i>sdrE</i>	۱۰٪	۲۸٪	۰	۴٪	۰
<i>bbp</i>	۲٪	۱۵٪	۰	۲٪	۰
<i>efb</i>	۱۲٪	۳۳٪	۰	۲٪	۰

علاوه بر آزمایش های بیوشیمیایی، جهت تشخیص دقیق تر جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* از تکثیر ژن *rRNA 16S* نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای تعیین فراوانی ژن های مذکور از روش Multiplex PCR استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی ۳ میکرولیتر *PCR buffer 5x*، ۰/۷ میکرولیتر (۵۰ میکرومتر) *MgCl2*، ۰/۶ میکرولیتر (۱۰ میکرومتر) *dNTP*، ۳ پیکومول از پرایمرهای R و F، یک واحد آنزیم *Taq DNA polymerase* و ۸۰ نانوگرم DNA الگو بود.

الکتروفورز محصولات PCR: محصولات PCR روی ژل آگارز

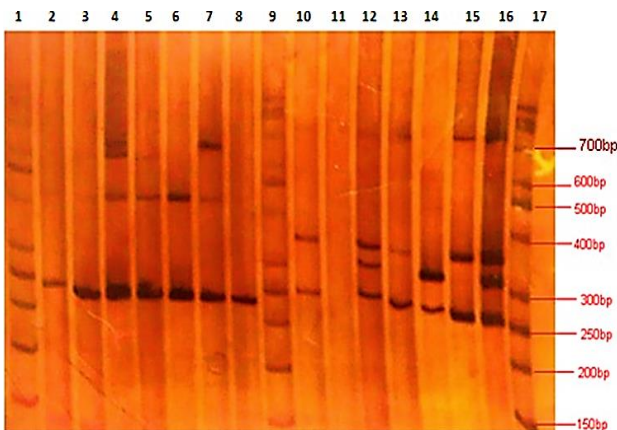
۱/۵ درصد و آکریل امید ۱۲ درصد برده شد و نتایج بررسی گردید.

نتایج

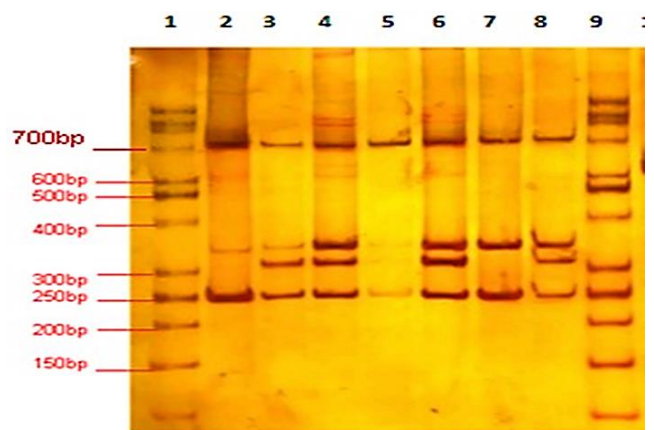
همه جدایه های باکتریایی که پس از آزمون های بیوشیمیایی استاندارد به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده بودند، در آزمون PCR از نظر ژن *rRNA 16S* اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند و پس از تکثیر ژن *rRNA 16S* و الکتروفورز محصولات PCR، باند ۲۵۰bp در تمامی نمونه ها مشاهده شد.

شناسایی ژن های چسبندگی *efb sdrE bbp ica* به روش

PCR: محصول PCR ژن های *efb sdrE bbp ica* به ترتیب به اندازه ۲۵۷bp، ۳۵۳bp، ۲۹۲bp و ۷۷۲bp روی ژل پلی آکریل امید ۱۲٪ مشاهده شد (شکل ۱). محصول PCR ژن های *fnbB fnbA* و



شکل ۲: محصول PCR ژن های *fnbB fnbA cna* و *cna* روی ژل آکریل امید ۱۲٪. چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک ۲ فقط *cna*، چاهک ۳ فقط *fnbA*، چاهک ۴ ژن های *fnbB fnbA cna* و *cna*، چاهک ۵ ژن *cna* و *cna*، چاهک ۶ ژن *cna* و *fnbB fnbA*، چاهک ۷ ژن *fnbA* و *fnbB*، چاهک ۸ فقط *fnbA*، چاهک ۹ سایز مارکر، چاهک ۱۰ ژن های *efb* و *sdrE*، چاهک ۱۱ بلانک، چاهک ۱۲ ژن های *efb sdrE bbp*، چاهک ۱۳ ژن *efb*، چاهک ۱۴ ژن های *efb* و *bbp*، چاهک ۱۵ ژن های *efb sdrE ica* و چاهک ۱۶ ژن های *efb sdrE bbp ica* و *sdrE*، چاهک ۱۶ سایز مارکر ۵۰ جفت بازی



شکل ۱: محصول PCR ژن های *efb sdrE bbp ica* و *ica* روی ژل آکریل امید ۱۲٪، چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک ۲ ژن های *efb ica*، چاهک ۳ ژن های *efb bbp ica* و *sdrE*، چاهک ۴ ژن های *efb sdrE bbp ica*، چاهک ۵ ژن *ica*، چاهک ۶ ژن های *efb sdrE bbp ica* و *sdrE*، چاهک ۷ ژن های *efb sdrE bbp ica* و *sdrE*، چاهک ۸ ژن های *efb sdrE bbp ica* و *sdrE*، چاهک ۹ سایز مارکر ۵۰ جفت بازی



جهت وجود ژن‌های ادهسین و تولید بیوفیلیم به روش Multiplex PCR آزمایش شدند. شایع‌ترین ژن مربوط به تشکیل بیوفیلیم *icaD* (۷۷/۳٪) بود و به دنبال آن فراوانی ژن‌های *icaA* (۷۶٪) و *icaB* (۵۷/۳٪) بود. میزان فراوانی ادهسین ژن‌های *ClfB*, *ClfA*, *fnbB*, *cna*, *ebp* و *bap* در ایزوله‌ها به ترتیب ۹۸/۷٪، ۹۲/۶۸٪، ۶۴/۶۴٪، ۶۰٪ و ۵/۳٪ بود. پروتئین Ica در سویه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی است. Ica باعث چسبندگی سلول به سلول و تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس می‌شود (Chavakis, ۲۰۰۵). پروتئین Bbp به عنوان یک عامل موثر در باکتری‌می، سپتی‌سمی و استئومیلیت استافیلوکوکوس اورئوس عمل می‌کند (Tung, ۲۰۰۰).

Mir و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی شیوع ژن‌های آگزوتوکسین، ادهسین و ژن‌های مربوط به بیوفیلیم در ایزوله‌های به دست آمده از نمونه‌های بیماران، پرسنل و سطوح بخش‌ها در بیمارستان سوختگی تهران پرداختند. فراوانی ژن‌های *hla*, *hnb*, *hlg*, *tst* و *pvl* به ترتیب ۹۲/۸٪، ۳۴/۷٪، ۸۹/۸٪، ۱۱/۹٪، ۱۰/۷٪ و ۰/۵٪ بود. بیش‌ترین فراوانی ژن‌های ادهسین و بیوفیلیم مربوط به *eno* (۶/۸۵٪) و به دنبال آن فراوانی ژن‌های *fib* (۸/۷۱٪)، *ClfB* (۷۰٪)، *cna* (۲/۵۹٪)، *fnbB* (۹/۱۷٪)، *icaA* (۴/۷۲٪) و *icaB* (۶/۸۵٪) بود. همکاران (۲۰۱۹) نرخ بیان ژن‌های *fnbA* و *fnbB* را در میان ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس گرفته شده از نمونه‌های بینی پرسنل بخش‌های مختلف بیمارستان‌های کاشانی و هاجر شهر کرد بررسی کردند. میزان فراوانی ژن‌های *ClfB*, *ClfA*, *fnbA* و *fnbB* به ترتیب ۳۶/۳٪، ۸۶/۳٪، ۷/۲٪ و ۴۳/۶٪ به دست آمد. این مطالعه نشان داد که ژن *ClfB* با فراوانی و بیان بالا نقش مهمی در کلونیزاسیون در بینی دارد. همکاران (Shahmoradi, ۲۰۱۸) به بررسی فراوانی ژن‌های تولید بیوفیلیم و حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند. میزان فراوانی ژن *cna* (۶۲٪)، ژن *fnbA* (۷۰٪)، ژن *fnbB* (۲۶٪) و ژن *pvl* (۲٪) اندازه‌گیری شد. در ۲۲٪ از ایزوله‌ها هر سه ژن *fnbA*, *fnbB* و *cna* وجود داشتند. Veisi و همکاران (۲۰۱۸) مطالعه‌ای روی نمونه‌های کلینیکی آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی شهر رشت انجام دادند فراوانی ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR ارزیابی شد. در میان ۹۰ نمونه، ۳۷ (۴۱٪) ایزوله مقاوم به متی‌سیلین و دارای ژن *mecA* بودند. میزان فراوانی ژن‌های *fnbA* و *fnbB* به ترتیب ۵۹ (۶۵/۵٪) و ۳۷ (۴۱٪) بود. فراوانی ژن‌های *fnbA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به طور مشخص از سویه‌های حساس به متی‌سیلین بیشتر بود ($P < 0.05$). نتایج این مطالعه بیانگر شیوع بالای سویه‌های مقاوم به

فراوانی همه ادهسین‌ها در نمونه ادرار بیش از سایر نمونه‌ها بود. علت این امر می‌تواند بیش‌تر بودن تعداد نمونه‌های ادرار در مقایسه با سایر نمونه‌ها باشد. فراوانی نمونه‌های خون، تراشه پوستی و خلط در ژن‌های مورد مطالعه متغیر است. در این مطالعه درصد فراوانی هم‌زمانی ادهسین ژن‌ها به شرح زیر بود: $50/64\%$ یک ژن (۱۵۲ سویه)، $51/94\%$ دو ژن (۱۲۰ سویه)، $64/08\%$ سه ژن (۱۱۷ سویه)، $14/71\%$ چهار ژن (۳۴ سویه) و $2/16\%$ پنج ژن (۵ سویه).

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهم‌ترین پاتوژن بیماری‌زای انسانی و از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است (Woodford and Livermore, ۲۰۰۹). بیماری‌زایی این باکتری به واسطه حضور آنزیم‌ها، سموم و عوامل ویروالانس متعدد هم‌چون پروتئین‌هایی است که واسطه چسبندگی باکتری با سطح سلول میزبان می‌باشند (Walker, ۱۹۹۹). استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند به طیف وسیعی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی میزبان متصل شود و پایبندی آن توسط یک گروه از پروتئین‌های سطحی که ادهسین نامیده می‌شود، انجام می‌شود (Foster and Höök, ۱۹۹۸). مطالعات بسیاری جهت شناسایی ادهسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های مختلف انجام گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی فراوانی ژن‌های *fnbA*, *fnbB*, *ica*, *sdrE* و *efb* در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس شهر اهواز می‌باشد تا قدمی اساسی در کوتاه کردن دوره درمان و بهبود نتایج درمان حاصل شود. این مطالعه توصیفی روی ۲۳۱ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. نمونه‌های خون، ادرار، آبسه، زخم، خلط و تراشه‌های بیماران از بیمارستان بستر شده در بیمارستان‌های سینا، ابودر، آریا و گلستان شهر اهواز جمع‌آوری گردید. فراوانی نمونه ادرار بیش از سایر نمونه‌ها بود. علت این امر می‌تواند بیش‌تر بودن تعداد نمونه‌های ادرار در مقایسه با سایر نمونه‌ها باشد. فراوانی نمونه‌های خون، تراشه پوستی و خلط در ادهسین‌های مورد مطالعه متغیر است. فراوانی ژن‌های *fnbA*, *cna*, *bbp*, *ica*, *efb* و *fnbB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن به روش Multiplex PCR تعیین شد. میزان فراوانی ژن *fnbB* (۶۷/۵۳٪)، *fnbA* (۵۳/۲۴٪)، *ica* (۵۱/۹۴٪)، *cna* (۴۰/۲۵٪)، *efb* (۳۷/۶۶٪) و *sdrE* (۲۶/۴۰٪) و ژن *bbp* (۶۸/۱۱٪) مشاهده شد.

Goudarzi و همکاران (۲۰۱۹) به مطالعه فراوانی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم و ادهسین‌ها و تفاوت توزیع آن‌ها در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند. در این مطالعه ۷۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از نمونه‌های عفونت ادراری



نقش کلیدی در SAB IE بازی کند. با این حال میزان اتصال ممکن است با تغییر ژنتیکی بین جدایه‌ها مرتبط باشد.

Luo و همکاران (۲۰۱۷) به مطالعه ساختار کریستالی دومین مرتبط با تهاجم SdrE در *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که SdrE²⁷⁸⁻⁵⁹¹ به‌طور مستقیم در ارتباط با تهاجم به سلول میزبان است. به علاوه ساختار کریستالی از SdrE²⁷⁸⁻⁵⁹¹ در وضوح ۱/۲۵ آنگستروم و ساختار سه بعدی که محل N2-N3 را فاش کرد و هم‌چنین دامنه‌هایی که شکلی شبیه به IgG دارند را نشان داد. به‌طور کلی این یافته‌ها به درک SdrE به‌عنوان یک عامل اصلی برای تهاجم در *استافیلوکوکوس اورئوس* کمک کردند.

پروتئین SdrE قادر به ترویج تجمع پلاکتی است که احتمالاً با اتصال به پروتئین‌های پلاسمایی به‌عنوان پلی میان این باکتری و گیرنده پلاکت عمل می‌کند (Foster و Höök، ۱۹۹۸؛ Josefsson، ۱۹۹۸). براساس این مجموع مطالعات می‌توان نتیجه‌گیری کرد که fnbB و fnbA جزو شایع‌ترین پروتئین‌های چسبندگی هستند که نقش مهمی در اتصال باکتری به سطح میزبان دارند و درصد بالای حضور ژن‌های کدکننده این دو در باکتری‌هایی که از محل زخم‌ها یا بیوفیلم‌های روی وسایل پزشکی جدا شده‌اند گویای این مساله است. ژن‌های fnbA و fnbB در نمونه‌های اداری و سپس خون بیش‌ترین فراوانی را داشتند. متفاوت بودن فراوانی ادهسین ژن‌های fnbB، ica، can، fnbA و efb تحقیق حاضر در مقایسه با تحقیقات دیگر در این زمینه ممکن است به دلیل تفاوت منابع جداسازی در مکان‌های مختلف، جایگاه طبیعی سویه‌ها، روش‌های بررسی، حساسیت آن‌ها و تعداد نمونه‌های مورد بررسی باشد. براساس این مطالعه فراوانی متغیر ژن‌های بیماریزا در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* موید این مطلب است که فاکتورهای ویروالانس باکتریایی نقش مهمی در تهاجم و بیماریزایی باکتری دارا می‌باشد. با توجه به اهمیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد گستره وسیعی از بیماری‌ها و نقش ادهسین‌های متنوع تولید شده توسط این باکتری در این رابطه، اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود ادهسین‌های مذکور در بین سویه‌های جدا شده در ایران ضروری است.

منابع

- Ahn, S.J.; Costa, J. and Emanuel, J.R., 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples Pre-or post-PCR. *Nucleic acids research*. Vol. 24, No. 13, pp: 2623-2625.
- Ajello, L. and Hay, R.J., 1998. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections*. Medical mycology. Arnold, Hodder Headline. Vol. 4.
- Bingham, R.J., 2008. Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnbA in complex

متی‌سیلین در نمونه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در رشت و نیز فراوانی ژن‌های fnb در این جدایه‌ها است. مطالعات نشان داده است که FnbB و FnbA به‌صورت معنی‌داری در استقرار بافتی در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم (Schroder، ۲۰۰۶؛ Chavakis، ۲۰۰۵)، استئومیلیت و آرتريت‌سپتیک (Quiblier، ۲۰۱۳؛ Kuo، ۲۰۱۲) و جایگزینی در سطوح ابزارهای پزشکی موثرند (Tokue، ۱۹۹۲). به‌طوری‌که در عفونت‌های مرتبط با ایمپلنت (تزریق دارو یا کاشت اعضای مصنوعی) به‌عنوان جزء بیماریزایی مهم مطرح است (Bingham، ۲۰۰۸). پروتئین Can کدشده توسط ژن cna تنها پروتئین چسبندگی شناخته شده است که به کلان‌ژن اتصال می‌یابد. پروتئین Cna به‌عنوان یکی از فاکتورهای ویروالانس، در سویه‌های تهاجمی رایج است می‌تواند به‌عنوان یک جزء مؤثر در ساخت واکسن مورد استفاده قرار گیرد (Hay و Ajello، ۱۹۹۸).

Demir و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی ژن‌های بیوفیلم (icaD، icaA و (bap) و ادهسین (can)، fnbA و ClfA) و هم‌چنین ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی الگوهای مقاومت حساسیت ضد میکروبی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* گرفته شده از زخم در ماردین ترکیه پرداختند. در این آزمایش به‌طور کلی ۲۲۰ نمونه زخم مورد بررسی قرار گرفت که ۱۱۲ نمونه حاوی *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. توانایی تولید بیوفیلم در ۷۹ ایزوله از ۱۱۲ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که ۹۷ سویه از تمام ایزوله‌ها از نظر ژن‌های icaA و icaD و ۱۵ ایزوله از نظر ژن bap مثبت بودند. میزان فراوانی ادهسین ژن‌های can، fnbA و ClfA به ترتیب ۸۷/۵٪، ۷۷/۷٪، و ۸۶/۶٪ بود. Alina uribe-garica و همکاران (۲۰۱۹) ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ضایعات پریدنتال بیماران را جهت بررسی بیان ژن‌های مرتبط با ادهسین در عفونت سلول‌های اپیتلیال انسانی و هم‌چنین شکل‌گیری بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آزمایش کردند. با اندازه‌گیری بیان ژن‌ها به روش real time PCR به این نتیجه دست یافتند که تمامی سویه‌ها دارای ژن‌های بیماریزایی spa، coa، icaAB و icaA بودند. ۹۶٪ دارای clfB و ۸۸٪ دارای ebpS و SdrD بودند. kim و همکاران (۲۰۱۹) در کره جنوبی به بررسی شاخصه‌های میکروبیولوژیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بر عفونت اندوکاردیت (IE) پرداختند. آن‌ها موارد S. aureus bacteremia (SAB) در ۱۰ بیمارستان طی ۷ سال کنترل کردند. از ۲۳۶۵ مورد SAB 92 مورد دارای IE بودند. براساس روش multiplex PCR 9/91 درصد از ایزوله‌های IE و ۱۰۰ درصد از ایزوله‌های فاقد IE دارای ژن fnbA بودند. در حالی که فراوانی متصل شونده به فیبرینوژن در این ایزوله‌ها مشابه بود، فراوانی متصل شونده به فیبرونکتین به‌طور قابل توجه در گروه IE بالاتر بود Fnbp می‌تواند



- Biofilm Forming Gene Profile of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates via Multiplex Colony PCR Method. Reports of Biochemistry & Molecular Biology. Vol. 7, No. 2, pp: 1041-1048.
۱۹. **Siboo, I.R., 2001**, Clumping Factor A Mediates Binding of *Staphylococcus aureus* to Human Platelets. Infection and immunity. Vol. 69, No. 5, pp: 3120-3127.
 ۲۰. **Soltani, E.; Farrokhi, E.; Zamanzad, B.; Shahini Shams Abadi, M.; Deris, F.; Soltaniand, A. and Gholipour, A., 2019**. Prevalence and distribution of adhesins and the expression of fibronectin-binding protein (FnbA and FnbB) among *Staphylococcus aureus* isolates from Shahrekord Hospitals. BMC Res Notes. Vol. 12, No. 1, pp: 49-55.
 ۲۱. **Tokue, Y., 1992**. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobia Agents and Chemotherapy. Vol. 36, No. 1, pp: 6-9.
 ۲۲. **Tung, H.S., 2000.**, A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the *staphylococcal Sdr* family. Biochem J. Vol. 345, pp: 611-619.
 ۲۳. **Uribe, A.G.; Luz, G.P.C.; Monroy, E.P.; Bustos, J.M.; da Hamdan, P.; Garzo, J.; Alan, J.; Quezada, R.; Vaca, F.P. and Vaca, S., 2019**. Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesion. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. Vol. 19, pp: 1182-1186.
 ۲۴. **Veisi, S. and Asadpour, L., 2018**. Frequency of Methicillin Resistance, *fnbA* and *fnbB* Genes in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. Iran J Med Microbiol. Vol. 12, No. 1, pp: 16-22.
 ۲۵. **Walker, T.S., 1999**: Microbiology Review. WB Saunders.
 ۲۶. **Wilson, K., 1987**. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology. Vol. 56, No. 1, pp: 2.4.1-2.4.5.
 ۲۷. **Woodford, N. and Livermore, D.M. 2009**. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. Journal of Infection. Vol. 59, pp: S4-S16.
- with fibronectin domains. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 105, No. 34, pp: 12254-12258.
۴. **Chavakis, T., 2005**. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. Thromb Haemost. Vol. 94, pp: 278-285.
 ۵. **Demira, C.; Demircib, M.; Yiginc, A.; Tokmand, H.B. and Yildiz, S.C., 2020**. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Vol. 29, pp: 101584-101588.
 ۶. **Foster, T.J. and Höök, M., 1998**. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology. Vol. 6, No. 12, pp: 484-488.
 ۷. **Goudarzi, M.; Mohammadi, A.; Amirpour, A.; Fazeli, M.; Nasiri, M.J.; Hashemi, A. and Goudarzi, H., 2019**. Genetic diversity and biofilm formation analysis of *Staphylococcus aureus* causing urinary tract infections in Tehran, Iran. Vol. 13, No. 9, pp: 777-785.
 ۸. **Hamdan, P.A.; Sainz, E.T. and Bustos, M.J., 2010**. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. Journal of clinical microbiology. Vol. 48, No. 5, pp: 1701-1705.
 ۹. **JÖNSSON, K., 1991.**, Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. European Journal of Biochemistry. Vol. 202, No. 3, pp: 1041-1048.
 ۱۰. **Josefsson, E., 1998**. Three new members of the serine aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. Vol. 144, No. 12, pp: 3387-3395.
 ۱۱. **Kim, C.J.; Song, K.H.; Choe, P.G.; Park, W.B.; Kim, E.S.; Park, K.U.; Kim, N.J.; Park, K.H.; Kwak, Y.G.; Cheon, S.; Jang, H.C.; Kim, Y.K.; Lee, S.H.; Kiem, S.M.; Lee, S.; Kim, H.B. and Oh, M.D., 2019**. The microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with native valve infective endocarditis. Virulence. Vol. 10, No. 1, pp: 948-956.
 ۱۲. **Kuo, S.C., 2012**. Comparison of microbiological and clinical characteristics based on SCCmec typing in patients with community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia. International journal of antimicrobial agents. Vol. 39, No. 1, pp: 22-26.
 ۱۳. **Luo, M.; Zhang, X.; Zhang, S.; Zhang, H.; Yang, .; Zhu, Zh.; Chen, K.; Bai, L.; Wei, J.; Huang, A. and Wang, D., 2017**. Crystal Structure of an Invasivity-Associated Domain of SdrE in *S. aureus*. PLoS ONE. Vol. 12, No. 1, pp: e0168814.
 ۱۴. **Mir, Z.; Nodeh Farahani, N.; Abbasian, S.; Alinejad, F.; Sattarzadeh, M.; Pouriran, R.; Dahmardehei, M.; Mirzaei, M.; Khoramrooz, S.S. and Darban Sarokhali, D., 2019**. The prevalence of exotoxins, adhesion, and biofilm related genes in *Staphylococcus aureus* isolates from the main burn center of Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci. Vol. 22, pp: 1267-1274.
 ۱۵. **Patti, J.M., 1994**. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annual Reviews in Microbiology. Vol. 48, No. 1, pp: 585-617.
 ۱۶. **Quiblier, C., 2013**. Secretome analysis defines the major role of SecDF in *Staphylococcus aureus*. Virulence. Vol. 8, No. 5, pp: e63513.
 ۱۷. **Schröder, A., 2006**. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. Molecular biology of the cell. Vol. 17, No. 12, pp: 5198-5210.
 ۱۸. **Shahmoradi, M.; Faridifar, P.; Shapouri, R.; Mousavi, S.F.; Ezzedin, M. and Mirzaei, B., 2019**. Determining the



Evaluation of adhesin frequency of *sdrE*, *ica*, *bbp*, *cna*, *fnbB*, *fnbA* and *efb* genes in *Staphylococcus aureus*

- **Mahla Tajmirriahy:** Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
- **Zahra Rezaei Sourbaghi:** Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
- **Shohreh Zare Karizi*:** Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
- **Masoumeh Mahdavi Ortakand:** Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: November 2019

Accepted: February 2020

Key words: Adhesin, Multiplex PCR, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Various virulence factors are involved in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Proteins that mediate adhesion to the host cell surface are important factors in the binding and invasion of *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to evaluate the frequency of genes encoding adhesion proteins *FnbA*, *FnbB*, *Cna*, *Efb*, *Ica*, *Bbp* and *SdrE* in *Staphylococcus aureus* strains in Ahvaz. In this study, 231 *Staphylococcus aureus* specimens were isolated from 4 hospitals in Ahvaz after biochemical tests. DNA was extracted by phenol-chloroform method and the frequency of *cna*, *fnbA*, *fnbB*, *efb*, *ica*, *bbp* and *sdrE* genes was determined using specific primers for each gene by Multiplex PCR. In this study 16srRNA was used as internal control. Finally, the PCR products were applied on acrylamide gel. The frequency of genes studied in this study were as follows: *fnbB* gene (67.53%), *fnbA* gene (53.24%), *ica* gene (51.94%), *cna* gene (40.25%), *efb* (37.66%), *sdrE* (26.40%) and *bbp* gene (11.68%). Based on this study, the variable frequency of pathogenic genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* confirms that bacterial virulence factors play an important role in bacterial invasion and pathogenicity. Given the importance of *Staphylococcus aureus* in creating a wide range of diseases and the role of various adhesins produced by this mass, complete information on the distribution of the aforementioned adhesins among isolated strains in Iran is essential.

* Corresponding Author's email: shohrehzare@yahoo.com

