مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۱ صفحات ۱۰۶-۹۸

شناسایی ژنهای کد کننده پروتئین های متصل شونده به فاکتورهای ویرولانس کلاژن (Cna) و فیبرونکتین (FnB) در ایزوله های *Staphylococcus aureus* جمع آوری شده از نمونه های بالینی و بینی با روش Multiplex – PCR

عاطفه کیاوری: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
آلکا حسنی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه میکروبشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: hasanialka@tbzmed.ac.ir
هائده مبین: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
محمد آقازاده: گروه میکروبشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
اکبر حسنی: گروه بیوشیمی و آزمایشگاههای بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
مجتبی ورشوچی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد آهنگرزاده رضایی: گروه میکروبشناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
لیلا دهقانی: آزمایشگاه میکروب شناسی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۰/۸/۹ **پذیرش**: ۹۰/۱۱/۲۷

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن های کد کننده فاکتورهای ویرولانس متعددی می باشد که به طور مجزا یا بصورت توأم، عفونت های متعددی را ایجاد می کنند. هدف از این تحقیق، بررسی ژنهای مربوط به فاکتورهای ویرولانس شامل پروتئین های متصل شونده به کلاژن (Cna) و فیبرونکتین (FnB) در سویه های *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه های بالینی مختلف و بینی بیماران بیمارستان های علوم پزشکی تبریز می باشد.

مواد و روش ها: در محدوده زمانی مرداد تا بهمن ماه سال ۱۳۸۸، تعداد ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف و ۵۰۴ نمونه بینی بیماران قلبی اخذ شد. ایزوله های *S. aureus* به وسیله روش های فنوتیپی شناسایی و با ردیابی ژن های *nuc* و *fem*B با روش PCR مورد تائید واقع شدند. ایزوله های MRSA با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار شناسایی و جهت ردیابی ژن *mec*A از روشPCR استفاده شد. ژن های *nuc* ، *fem*B و *mec*A با استفاده از روش Multiplex PCR و ژنهای *cna* و *fnb* با استفاده از روش های PCR و Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: از ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف و ۵۰۴ نمونه بینی به ترتیب ۱۲۱ و ۲۱۴ ایزوله غیر تکراری *S.aureus* جداسازی شد. در ۸۰/۹۹٪ ایزوله های بالینی و ۱۷/۲۹٪ ایزوله های جدا شده از بینی، ژن *cna* شناسایی شد. ژن *cna* به ترتیب در ایزوله های جدا شده از آرتریت عفونی، استئومیلیت و آندوکاردیت شیوع بالاتری داشت. ژن *fnb* در ۶۵/۲۹٪ ایزوله های بالینی و ۵۴/۶۷٪ ایزوله های بینی شناسایی شد و به ترتیب در بیماری های آندوکاردیت، استئومیلیت و زخم های مربوط به سوختگی فراوانی بالاتری داشت. هم در ایزوله های بالینی و هم در ایزوله های بینی، شیوع فاکتورهای ویرولانس در سویه¬های MRSA بیشتر از MSSA بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که مطالعه ژن های *nuc* ، *fem*B و *mec*A در یک تست همزمان، نه تنها به شناسایی ایزوله های *S.aureus* کمک می‌کند، بلکه در ردیابی اختصاصی و سریع ایزوله های MRSA مفید می‌باشد. تحقیق حاضر نشان داد که شیوع فاکتورهای ویرولانس در ایزوله های بالینی بیشتر از بینی و در ایزوله های MRSA بیش از MSSA بوده که نشاندهنده‌ی نقش حضور همزمان این فاکتورها در تهاجم و بیماریزایی این ایزوله ها می باشد.

کلید واژه‌ها: استافیلوکوکوس اورئوس، فاکتورهای ویرولانس، کلاژن، فیبرونکتین

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

Staphylococcus aureus یک باکتری بیماریزای مهم انسانی است. این باکتری دارای ژن های کد کنندهٔ فاکتورهای ویرولانس متعدد می‌باشد که بر روی کروموزوم یا ژنهای متحرک قرار گرفته اند. این فاکتورها موجب کلونیزاسیون میزبان، تهاجم به پوست آسیب دیده و موکوس، انتشار در بدن و فرار از مکانیسم های دفاع میزبان می‌شوند. ۵۰-۳۰٪ جمعیت انسانی در بینی خود، این ارگانیسم را حمل می‌کنند. بیماریزایی *S.aureus* به طور مرحله به مرحله ایجاد می‌شود و محققین پی برده اند که در هر مرحله یک یا چند فاکتور ویرولانس به خصوص، دارای نقش می‌باشد. امروزه علیرغم درمان های مناسب، عفونت های شدید مرتبط با *S.aureus* و به خصوص سویه¬های مقاوم به متی سیلین موجب میزان بالای مرگ و میر می‌شود (۱).

*S.aureus*دارای یکسری پروتئین های سطح سلولی می‌باشد که به عنوان ادهزین عمل می‌کنند و قادرند به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی سطح اپیتلیال و اندوتلیال }Microbial Surface Components Recognizing (MSCRAMMs){ Adhesive Matrix Molecules متصل شوند (۲). این اتصال میکروارگانیسم ها به پروتئین های ماتریکس قدم اول در فرآیند بیماریزائی است و منجر به کلونیزاسیون و تهاجم بعدی باکتری به سلول میزبان می‌شود. ادهزین ها به عنوان مهمترین فاکتورهای ویرولانس در فاز ابتدایی عفونت *S.aureus* به شمار می آیند. رایجترین پروتئین های مرتبط با ویرولانس مستقر در دیواره سلولی *S.aureus* عبارتند از: پروتئین های دارای تمایل به فیبرینوژن (ClfA, B)، فیبرونکتین (FnBA)، کلاژن (Cna)، سیالوپروتئین (BbP) و الاستین (EbPS) (۳). پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) ادهزین اصلی *S.aureus* می باشد که مسئول تمایل بالای اتصال به کلاژن بوده و احتمال داده می شود که یک فاکتور ویرولانس اصلی در عفونت و بیماری باشد. در مدل های آرتریت عفونی، استئومیلیت، کراتینیت، و آندوکاردیت، موتانت های فاقد ژن *cna* کمتر از ایزوله والد بیماریزا هستند. اخیراً در مطالعه ای نشان داده شده است که در مقایسه با سویه‌های کلونیزه کننده، ژن *cna* به ندرت در سویه‌های مهاجم مشاهده شده است (۴). فیبرونکتین، پروتئین دیگری در بین سایر پروتئین‌های سطح سلولی است که به طور اختصاصی به پروتئین‌های خارج سلولی ماتریکس و پلاسمای میزبان متصل می شود. دو پروتئین بسیار همولوگ متصل شونده به فیبرونکتین، (FnBPB وFnBPA)، کد شونده به وسیله ژنهای *fnb*A و *fnb*B شناسایی شده اند و نشان داده شده که این پروتئین‌ها در چسبیدن به دریچه‌های آسیب دیده قلب دخالت داشته و ورود داخل سلولی *S.aureus* را به واسطه سلول های اپیتلیال بیشتر می‌کنند (۵). تحقیقات دانشمندان بر روی مدل های آزمایشگاهی نشان داده است که بیان رسپتورها برای فیبرونکتین با آندوکاردیت مرتبط بوده در حالی که حضور ادهزین‌ها برای کلاژن، با آرتریت و استئومیلیت ارتباط دارد (۶). به دلیل اهمیت بیماری های ایجاد شده به وسیله سویه¬های *S.aureus* حساس و مقاوم به متی سیلین، این تحقیق در نظر داشت ژنهای فاکتورهای ویرولانس Cna و FnB را در سویه های *S.aureus* جدا شده از نمونه های بالینی و بینی بیماران بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی تبریز بررسی نماید تا ارتباط بین فاکتورهای ویرولانس مذکور و بیماری های به وجود آمده مشخص گردد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی مختلف بیماران مراجعه کننده و بستری در بیمارستان و نمونه های اخذ شده از بینی بیماران بستری در مراکز آموزشی- درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (امام رضا، شهید مدنی، سینا) بود. به این صورت که در فاصله زمانی مرداد تا بهمن ماه ۱۳۸۸، از تعداد ۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف شامل: خون، ادرار، زخم، مایع مغزی- نخاعی، مایعات بدن، لوله تراشه، آبسه و نازوفارنکس از بیماران مورد مطالعه جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. در همین محدوده زمانی از۵۰۴ بیمار قلبی بستری شده در بیمارستان نمونه بینی تهیه شد. درتهیه نمونه از بینی بیماران از هر بیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پذیرش، با استفاده از سواب از سوراخ های قدامی بینی نمونه برداری به عمل آمد. اطلاعات بیماران اعم از جنس، سن، تاریخ پذیرش، بخش بستری، مدت زمان بستری، سابقه بیماری قلبی، تاریخ نمونه‌برداری، علت بستری ثبت گردیده و مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌های جدا شده با استفاده از روش های متداول فنوتیپیک شامل مورفولوژی کلنی روی بلاد آگار و مانیتول سالت آگار، نوع همولیز، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، آزمایش کواگولاز اسلایدی و لوله ای و تست DNase شناسایی شدند (۷). جهت تائید قطعی ایزوله های *S.aureus*، ردیابی ژن های نوکلئاز پایدار در برابر حرارت (*nuc*) و فاکتور ضروری غشاء (*fem*B) با روش PCR انجام شد. ابتدا جهت شناسایی سویه های *S.aureus* مقاوم به متی سیلین (MRSA)، از روش دیسک دیفیوژن آگار (Kirby-Bauer) با بکار بردن دیسک های اگزاسیلین (۱µg) و سفوکسی تین (۳۰µg)(Mast Diagnostics, UK) استفاده شد. در تأیید MRSA ردیابی ژن A*mec* به وسیله PCR به عنوان روش مرجع بکار گرفته شد. در این مطالعه، سویه استاندارد *S.aureus* ATCC29213 به عنوان ایزوله حساس به متی سیلین بکار گرفته شده و نتایج با مقادیر استاندارد مقایسه شد (۸).

جهت ردیابی ژنهای *nuc* ، *fem*B ، *mec*A ، *cna* و *fnb* در روش مولکولی PCR و multiplex-PCR، ابتدا DNA ایزوله

Archive of SID

www.SID.ir

های مورد مطالعه با استفاده از روش SDS–Proteinase K استخراج شد. محصول استخراج در ۱۰۰ µl محلول بافر TE حل و در ۲۰°C- تا زمان استفاده، نگهداری شد (۹و۸). توالی پرایمر های اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژن های *nuc* ، *femB* ،*mecA* ،*cna* ،*fnb* با روش PCR در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۴-۱۰). این پرایمرها ازکارخانه Eurofins آلمان خریداری شدند.

ابتدا هر یک از ژن های مورد مطالعه به طور جداگانه با روش PCR مورد بررسی واقع شدند و قطعات مورد نظر با اندازه ذکر شده در جدول ۱ شناسایی شدند. در مرحله بعد مجدداً با روش Multiplex PCR سه ژن *nuc* ،*mecA* ،*femB* و دو ژن فاکتورهای ویرولانس *cna* و *fnb* در ایزوله های مورد مطالعه مورد بررسی واقع شدند.

واکنش PCR با استفاده از ۲۵ µl مخلوط واکنش انجام شد. ترکیب مواد مورد استفاده برای واکنش به طور جداگانه برای هر کدام از ژن های *mecA* ،*femB* ،*Cna* ،*fnb* حاوی ۱۰/۷ µl آب دیونیزه، ۲/۵ µl PCR (10X) بافر، ۰/۸ µl ($MgCl_2$ (50mM، ۰/۵µl dNTPmix (10mM)، ۱ µl از هر یک از پرایمر Forward و Reverse، ۰/۵ µl TaqDNA پلیمراز و ۲۰۰ Pmol DNA باکتریایی بود. فقط برای ژن *nuc* مقادیر ۱۰/۹ µl آب دیونیزه و۰/۶ µl ($MgCl_2$ (50mM مورد استفاده قرار گرفت.

مقادیر مواد مورد استفاده جهت واکنش Multiplex-PCR ژن های *nuc* ،*femB* و *mecA* وMultiplex-PCR ژنهای*fnb* و *cna* عینا مشابه مقادیر بکار گرفته شده در روش PCR بود؛ با این تفاوت که در گروه اول ۶/۷ µl و در گروه دوم۴/۷ µl آب دیونیزه به کار برده شد.

ترکیب اجزاء مورد استفاده جهت واکنش Multiplex-PCR ژن های *nuc* ،*femB* و *mecA* و همچنین *fnb* و *cna* نیز از همان مقادیر استفاده شد با این تفاوت که در گروه اول ۶/۷ µl و در گروه دوم ۴/۷ µl آب دیونیزه به کار برده شد.

برنامه دستگاه ترموسایکلر در آزمایشات PCR و Multiplex PCR برای تمام ژنها ۳۰ سیکل و برای Multiplex ژنهای *nuc* ،*mecA* ،*femB* ۳۵ سیکل انتخاب شد. دناتوراسیون اولیه برای تمام ژنهای مورد مطالعه به جز *nuc* ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه و در ژن *nuc* ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه بوده است. مراحل تکثیر ژن های مورد مطالعه در روشهای PCR و Multiplex-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. تکثیر نهایی برای انجام PCR ژنهای *mecA* ،*cna* و *fnb* بطور جداگانه و برای انجام Multiplex PCR ژن های *nuc* ،*mecA* و *femB* در دمای ۷۲° C به مدت ۴ دقیقه و برای ژن های *nuc* و *femB* و Multiplex PCRژن های *cna* و *fnB* دمای ۷۲° C به مدت ۵ دقیقه انتخاب شد. برای ارزیابی محصول PCR، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (۱۵).

یافته ها

از تعداد۱۹۳۶ نمونه بالینی مختلف مورد مطالعه، تعداد ۱۲۱ (۶/۲۵ ٪)ایزوله *S.aureus* شامل ۶۳ ایزوله از زخم، ۲۴ ایزوله از خون، ۱۲ ایزوله از ادرار و ۲۲ ایزوله از سایر نمونه ها و از ۵۰۴ نمونه اخذ شده از بینی بیماران بستری، ۲۱۴ (۴۲/۴۶ ٪) ایزوله *S.aureus*، جداسازی شد.

پس از جداسازی و شناسایی ایزوله ها با روش های متداول فنوتیپی، جهت تأیید ایزوله های *S.aureus*، با استفاده از روش PCR ژن *nuc* و ژن *femB* استفاده شد و همه سویه¬های بالینی و نمونه های اخذ شده از بینی باندی واضح با اندازه مورد نظر را تولید کردند (شکل ۱).

در شناسایی سویه¬های MRSA با استفاده از روش های فنوتیپی با بکار بردن آنتی بیوتیک های اگزاسیلین و سفوکسیتین، سویه¬های بالینی و بینی به ترتیب ۶۳/۶۴٪ و ۲۵/۲۳٪ نسبت به اگزاسیلین و ۵۱/۲۴٪ و ۷۰/۵۶٪ نسبت به سفوکسیتین مقاومت نشان دادند و در ردیابی ژن *mecA* به عنوان روش "استاندارد طلایی" با روش PCR، در کل ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی و بینی، تعداد ۵۵ سویه (۴۵/۴۵٪) بالینی و ۴۹ سویه (۲۲/۹٪) بینی محصول ژن فوق را تولید نموده و به عنوان سویه¬های MRSA در نظر گرفته شدند (شکل۱).

نتایج Multiplex PCR ژن های *nuc* ،*mecA* و *femB* در تمام ایزوله ها عینا مشابه با روش PCR بود (شکل ۱).

در ردیابی ژنهای *cna* و *fnb* با روش PCR در سویه های جدا شده از نمونه های بالینی به ترتیب تعداد ۹۸ (۸۰/۹۹٪) و ۷۹ (۶۵/۲۹٪)و در سویه های جدا شده از بینی به ترتیب تعداد ۳۷ (۱۷/۲۹٪) و ۱۱۷ (۵۴/۶۷٪) باند مورد نظر ژنهای فوق مشاهده شد (شکل ۲).

نتایج Multiplex PCR ژن های *cna* و *fnb* در تمام ایزوله‌ها عینا مشابه با روش PCR بود (شکل ۲). در بین ۱۲۱ سویه بالینی و ۲۱۴ سویه بینی به ترتیب ۱۱۴ سویه (۹۴/۲۱٪) و ۱۹۹ سویه (۹۲/۹۹٪) حداقل یکی از ژن های *cna* یا *fnb* را داشتند. ۷ سویه بالینی و ۱۵ سویه بینی فاقد هر دو ژن فاکتورهای ویرولانس مورد مطالعه بودند.

حضور ژن *cna* و*fnb* در نمونه های بالینی اخذ شده از بیماران با سابقه بیماریهای مختلف نیز مورد بررسی واقع شد. بیشترین حضور ژن *cna* در ایزوله های جداشده از آرتریت عفونی (۴۳ مورد)، استئومیلیت (۳۱ مورد)و آندوکاردیت (۲۴ مورد)، گزارش شد (p<۰/۵). در هیچ یک از ایزوله های جدا شده از زخم های مربوط به سوختگی، عفونت های پوست و بافت نرم، آبسه های پوستی، پنومونی، باکتریمی و سپتی سمی، این ژن یافت نشد. بیشترین شیوع ژن *fnb* در آندوکاردیت (۳۹ مورد)، و سپس استئومیلیت (۲۳ مورد) بوده است (p<۰/۱۰). کمترین شیوع این ژن به ترتیب در عفونت های پوست و بافت نرم (۲ مورد)، پنومونی (۳مورد)، آرتریت عفونی (۵ مورد) و زخم های مربوط

Archive of SID

www.SID.ir

به سوختگی (۷مورد) مشاهده شد. ژن *fnb* در هیچیک از ایزوله های جدا شده از آبسه های پوستی، باکتریمی و سپتی سمی یافت نشد.

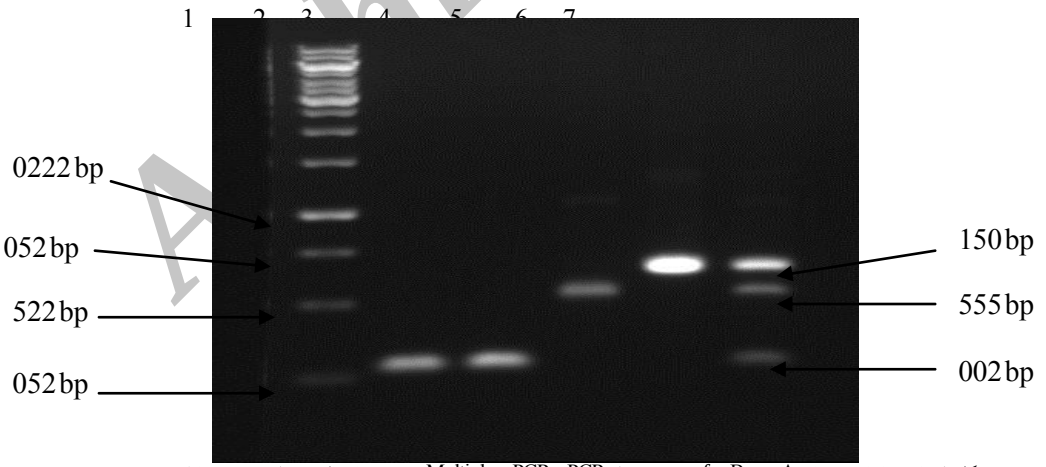
فراوانی ژن *fnb* در نمونه های زخم، خون، ادرار، مایعات بدن، لوله تراشه، نازوفارنکس و آبسه به ترتیب ۷۳/۰۲، ۷۹/۱۷، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۸/۵۷، ۴۰ درصد و ژن *cna* به ترتیب ۹۰/۴۸، ۸۷/۵۰، ۹۱/۶۷، ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۰ درصد بود. فراوانی ژنهای *cna* و *fnb* به ترتیب در سویه¬های MRSA بالینی ۸۵/۴٪ و ۹۲/۷٪ و در سویه های MSSA بالینی ۷۷/۲٪ و ۴۲/۴٪ بود. همچنین فراوانی این ژنها به ترتیب در سویه¬های MRSA بینی ۳۲/۶٪ و ۹۱/۱٪ و در سویه های MSSA بینی ۱۲/۷٪ و ۴۶/۶٪ بود.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمایش PCR در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی و بینی

ژن	توالی اختصاصی	اندازه باند بر حسب bp	منابع
cna	forward: 5'-AGT GGT TAC TAA TAC TG-3 reverse : 5'- CAG GAT AGA TTG GTT T	۷۴۴	۱۱
fnb	forward: 5'-CAC AAC CAG CAA ATA TAG-3 reverse : 5'-CTG TGT GGT AAT CAA TGTC-3	۱۲۷۹	۱۰
nuc	*nuc*-1: 5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3 *nuc*-2: 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3	۲۷۰	۱۴
***mec*A**	*mec*A-1: 5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3 *mec*A-2: 5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3	۵۳۳	۱۳
***fem*B**	*fem*B-1: 5' TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC-3 *fem*B-2: 5' ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT-3	۶۵۱	۱۱و۱۲

جدول ۲: مراحل تکثیر ژن های مورد مطالعه در روش های PCR و Multiplex-PCR در ایزوله های *S. aureus* جدا شده از نمونه های بالینی و بینی

مرحله	دما برحسب C° و زمان برحسب ثانیه بکار رفته در ژنهای PCR										دما برحسب C° و زمان برحسب ثانیه بکاررفته در ژنهای Multiplex-PCR			
	nuc		*fem*B		*mec*A		*cna*		*fnb*		*nuc* و *fem*B، *mec*A		*fnb* و *cna*	
	دما	زمان	دما	زمان	دما	زمان	دما	زمان	دما	زمان	دما	زمان	دما	زمان
دناتوراسیون	۹۴	۳۰	۹۴	۴۵	۹۴	۳۰	۹۴	۶۰	۹۴	۶۰	۹۴	۳۰	۹۴	۶۰
آنیلینگ	۵۸	۳۰	۵۰	۴۵	۵۵	۳۰	۴۶	۶۰	۴۶	۶۰	۵۴	۳۰	۵۲	۶۰
تکثیرنهایی	۷۲	۴۵	۷۲	۶۰	۷۲	۶۰	۷۲	۶۰	۷۲	۶۰	۷۲	۶۰	۷۲	۶۰

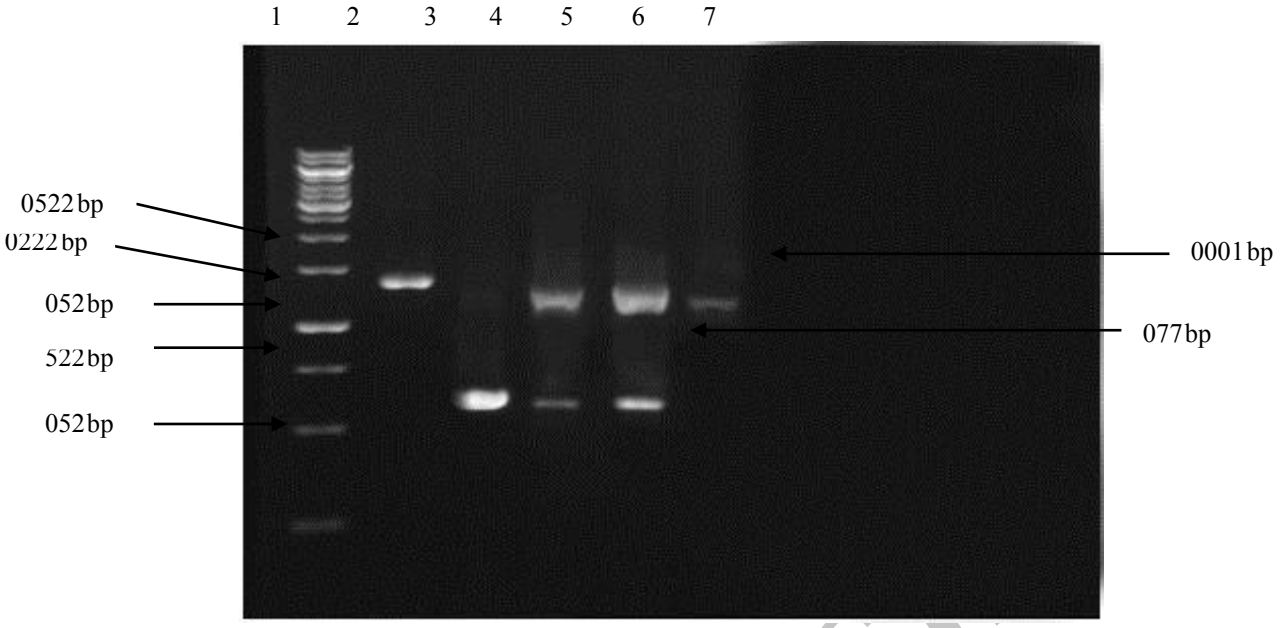


شکل ۱: نتایج شناسایی ژن های *mec*A، *fem*B، *nuc*، بوسیله PCR و Multiplex PCR در سویه¬های بالینی مختلف و بینی بیماران

ستون ۱: سایز مارکر (kb Ladder۱)
ستون ۲: باند مربوط به کنترل مثبت ژن *nuc* سویه *S.aureus* ATCC ۲۹۲۱۳
ستون ۳: باند مربوط به ژن *nuc*
ستون ٤: باند مربوط به ژن *mec*A
ستون ٥: باند مربوط به ژن *fem*B
ستون ٦: باند مربوط به ژنهای *nuc*، *fem*B و *mec*A(Multiplex PCR)
ستون ۷: کنترل منفی (آب دیونیزه)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: نتایج شناسایی ژن های *fnb ,cna* در سویه¬های بالینی و بینی

ستون ۱: سایز مارکر (۱kb Ladder)
ستون ۲: باند مربوط به ژن *fnb*
ستون ۳: باند مربوط به ژن *cna*
ستون ٤: باند مربوط به ژن های *fnb ,cna* (Multiplex PCR)
ستون ٥: باند مربوط به ژن های *fnb,cna* (Multiplex PCR)
ستون ٦: باند مربوط به ژن *fnb* (Multiplex PCR)
ستون۷: کنترل منفی (آب دیونیزه)

بحث

مطالعات بسیاری در دسترس است که اهمیت حمل *S. aureus* در بینی را به عنوان یک ریسک فاکتور برای ایجاد عفونت زخم پس از جراحی ارزیابی کرده اند. در این تحقیق، بیماران بخش جراحی قلب قبل از مصرف هر گونه آنتی بیوتیک، از نظر حامل بودن بررسی شدند. ۴۲/۴۶٪ از این بیماران به عنوان حامل *S.aureus* شناسایی شدند که در مقایسه با گزارش Kluytmans و همکارانش یعنی ۲/۰۲٪ فراوانی بسیار بالایی را نشان داده است (۱۶).

از اواخر دهۀ ۱۹۵۰ سویه های *S.aureus* مقاوم به بنزیل پنی سیلین باعث افزایش نگرانی ها شد. این سویه ها به طور تیپیک آنزیمی به نام بتالاکتاماز تولید می کنند. تلاش هایی جهت سنتز مشتقات پنی سیلین که به هیدرولیز بتالاکتاماز مقاوم باشند صورت گرفت. در سال ۱۹۵۹ با سنتز متی سیلین به این هدف دست یافتند. متأسفانه، به محض استفاده بالینی متی سیلین، ایزوله های *S.aureus* مقاوم به متی سیلین (MRSA) ظاهر شدند که مقاومت آنها به خاطر تولید بتالاکتاماز نبوده بلکه به دلیل بیان یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP2a) اکتسابی از سایر گونه ها بود. مکانیسم اصلی مقاومت به متی سیلین در *S.aureus* به واسطه بیان یک PBP بیگـانه، (PBP2a) می بـاشد کـه به عمل متی سیلین مقاوم است. سنتز PBP2a تنظیمی بوده و به طور معمول در سطح پایین نگه داشته می شود، اما در صورتی که در ژن های تنظیمی، موتاسیون رخ دهد، سطح سنتز می تواند افزایش یابد. ردیابی ژن *mecA* و یا محصول آن PBP2a، به عنوان استاندارد طلایی در شناخت ایزوله های مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته شد. CLSI نشان داده است که دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین از اکثر آزمایشات فنوتیپی قبلی بهتر می باشد (۱۷).

در این تحقیق با استفاده از دیسک اگزاسیلین در نمونه های بالینی و بینی به ترتیب ۶۳/۶۴٪ و ۲۵/۲۳٪ و با استفاده از دیسک سفوکسی‌تین، به ترتیب ۵۱/۲۴٪ و ۷۰/۵۶٪ مقاومت به متی-سیلین شناسایی شد. این نتایج با روش PCR به ۴۵/۴۵٪ و ۲۲/۹٪ تقلیل یافت. مغایرتی که بین نتایج حاصل از دیسک اگزاسیلین (۱µg) و سفوکسی‌تین (۳۰µg) و PCR مشاهده شد ممکن است به خاطر کیفیت دیسک های خریداری شده از خارج از کشور یا به خاطر شرایط مختلف کشت بوده باشد. مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق، در مطالعه Pereira و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در پرتغال بر روی ۱۴۸ سویه

Archive of SID

www.SID.ir

S.aureus، ۳۸٪ سویه ها مقاوم به اگزاسیلین بودند در حالی که تنها ۰/۶۸٪ سویه ها حضور ژن *mec*A را نشان دادند (۱۸).

امروزه تنها وسیله استاندارد شناسایی مقاومت به متی‌سیلین در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی، تست‌های حساسیت مانند دیسک دیفیوژن آگار یا روش های تعیین رقت و غربالگری آگار است. انجام این تستها اشکالات زیادی دارد زیرا فاکتورهایی مانند مقدار تلقیح، PH محیط کشت و غلظت نمک محیط کشت و قرارگیری در معرض آنتی بیوتیک های بتالاکتام، بیان فنوتیپی مقاومت را تحت تأثیر قرار می دهند. شناسایی صحیح و سریع *S.aureus* و الگوی حساسیت به متی‌سیلین آن، پیچیدگی‌های قابل توجهی برای معالجه و مدیریت بیماران کلونیزه شده و عفونی دارد. سایر فاکتورهای بارز کروموزومی مانند اپرون FemA-FemB، که همانند ژن های تنظیم کننده عمل می کنند، برای بیان مقاومت به متی‌سیلین در *S.aureus* ضروری هستند. به نظر می رسد همکاری *fem*A و *fem*B و *mec*A لازم می باشد، اما مکانیسم آن به خوبی شناخته شده نیست. به نظر می‌رسد به طور جالب توجهی *fem*A و *fem*B یک فاکتور بی نظیر برای *S.aureus* باشند که در سایر گونه‌های استافیلوکوکوس یافت نمی‌شوند (۱۹). بنابراین ردیابی همزمان ژن های *fem*A و *fem*B و *mec*A در یک میکروتیوپ PCR مزیت شناسایی همزمان سویه و مقاومت فنوتیپی آن را دارد. لذا، در این تحقیق ایزوله ها از نظر حضور ژن های *nuc*، همچنین *fem*B و *mec*A با استفاده از روش PCR و Multiplex PCR بعنوان یک استراتژی مناسب برای تشخیص افتراقی سریع و اختصاصی MRSA و MSSA مورد مطالعه واقع شدند و ارتباط کامل بین بیان ژن *fem*B در سویه¬های نوکلئاز مثبت یافت شد. این اطلاعات تأیید می کنند که بیان *fem*B یک خصوصیت بی نظیر *S.aureus* است که اجازه ردیابی اختصاصی آن را می دهد. Murakami، Geha، Vannuffel نتایج مشابهی را گزارش کرده اند (۲۱و۲۰و۱۴). بر اساس نتایج به دست آمده، استراتژی Multiplex PCR می تواند اطلاعات سریع و منطقی را نه تنها برای شناسایی باکتری های بیماریزا بلکه برای مدیریت درمان به پزشکان بدهد. در مطالعه حاضر، فراوانی سویه¬های MRSA در نمونه‌های زخم، خون و لوله تراشه بیشتر از سویه¬های MSSA بود. مطالعات متعددی جهت ارزیابی بیماریزایی سویه-های MRSA نسبت به MSSA صورت گرفته است و نتایج متفاوتی گزارش شده است. برخی محققین قائل بر بیماریزاتر بودن سویه¬های MRSA هستند در حالی که سایرین معتقدند که این سویه ها از نظر حمل ژن های فاکتورهای ویرولانس و از نظر بیماریزایی تفاوتی با یکدیگر ندارند (۲۲و۱). در سال ۲۰۰۹، Kyong Ran Peck و همکارانش، ۷۰ ایزوله جدا شده از خون را با ۹۵ ایزوله جدا شده از سواب بینی حاملین را از نظر شیوع برخی فاکتورهای ویرولانس با هم مقایسه کردند و نشان دادند که شیوع فاکتورهای ویرولانس در ایزوله های MRSA و MSSA جدا شده از خون با یکدیگر متفاوت بوده و شیوع این فاکتورها در MSSA به طور قابل توجهی بیشتر از MRSA می باشد (P=۰/۰۴۱). در حالی که این شیوع در سویه¬های MRSA و MSSA جدا شده از بینی، یکسان می باشد (۱).

فاکتورهای ویرولانس در ایجاد عفونت و بیماری، همچنین در پایداری و انتشار باکتری نقش به سزایی را دارند (۲۲). دو خصوصیت قابل توجه *S.aureus* آن است که فاکتورهای ویرولانس آن ممکن است اعمال مختلفی را در بیماریزایی انجام دهند و دوم اینکه ممکن است چندین فاکتور ویرولانس یک عمل مشابه را انجام دهند (۶و۲). در این تحقیق حضور فاکتورهای ویرولانس Cna، FnB و ژن های مربوط به آن ها در سویه¬های *S.aureus* در ارتباط با عفونت های خاص و کلونیزاسیون باکتری در ارگانیسم میزبان به منظور پیش بینی سویه¬های خطرناک بالقوه بررسی شد. همچنین این فاکتورها را در سویه¬های MRSA و MSSA بالینی و بینی بررسی و مقایسه شد.

بر اساس مطالعات انجام شده به وسیله محققین نشان داده شده که ژن فاکتورهای ویرولانس انتخاب شده، در سویه¬های مهاجم بیشتر یافت می شوند و دارای اهمیت بیشتری می باشند (۲۳). همچنین حمل *S.aureus* در بینی به عنوان ریسک فاکتور برای ایجاد عفونت زخم پس از جراحی ارزیابی شده است (۱۶). لذا در این تحقیق حضور فاکتورهای ویرولانس Cna و FnB در سویه¬های بالینی و بینی بررسی شد.

مدل های آزمایشگاهی نشان می دهند که بیان رسپتورها برای فیبرونکتین با آندوکاردیت مرتبط است در حالی که حضور ادهزین ها برای کلاژن، با آرتریت و استئومیلیت ارتباط دارد (۱۱و۶). Roseline Therrien و همکارانش در سال ۲۰۰۷، اثبات کردند پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) اصلی ترین و مهمترین ادهزین *S.aureus* است که مسئول اتصال محکم به کلاژن می باشد و عمده ترین فاکتور ویرولانس در عفونت و بیماری می باشد. آنها شیوع ژن *cna* را بین ۵۶-۰ ٪ در ایزوله ها بیان کردند (۲۴). در مطالعه حاضر در بیش از ۸۰٪ سویه¬های بالینی ژن *cna* شناسایی شد در حالی که تنها در ۱۷/۲۹٪ سویه¬های بینی این ژن وجود داشت. ژن *cna* به ترتیب در سویه¬های جدا شده از آرتریت عفونی، استئومیلیت و اندوکاردیت شیوع بالاتری داشت. به ترتیب نمونه های نازوفارنکس، ادرار، زخم، خون و لوله تراشه بیشترین فراوانی ژن *cna* را داشتند. Van Leeuwen و همکارانش در هلند نشان دادند که در مقایسه با ایزوله های کلونیزه کننده، ژن *cna* به ندرت در ایزوله های مهاجم مشاهده می شود. این در حالی است که Peacock و همکارانش نشان دادند ژن *cna* در بین ایزوله های مهاجم بیشتر یافت می شود (۲۵). در سال ۲۰۰۹، Ruud H Deurenberg و همکارانش در ۴۲٪ ایزوله های

Archive of SID

www.SID.ir

MSSA و ۲۲٪ ایزوله های MRSA ژن *cna* را شناسایی کردند (۲۶). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر حاکی از آن است که حضور ژن *cna* در ایزوله های MRSA بیشتر از MSSA می باشد (هم در سویه¬های بالینی و هم بینی) که این مسئله ممکن است از نظر مقاومت باکتری و ایجاد عفونت حائز اهمیت باشد.

در بررسی ژن *fnb* به عنوان یک فاکتور ویرولانس دیگر در این مطالعه، این ژن در ۶۵/۲۹٪ سویه¬های بالینی و ۵۴/۶۷٪ سویه¬های بینی شناسایی شد که این نتایج با تحقیق Peacock و Mongodin (۲۷و۲۵) همخوانی داشته ولی در تضاد با Nozohoor و Nashev (۲۸) می باشد. آن‌ها بیان کردند سویه-های بینی و سویه¬های عفونت پوستی *S.aureus*، ژن *fnb*A را با فراوانی بالایی تولید می کنند. در حالی که این ژن در سویه¬های بالینی این مطالعه بیشتر از سویه¬های بینی بوده و به ترتیب در بیماری‌های آندوکاردیت، استئومیلیت و زخم های مربوط به سوختگی شیوع بالاتری داشت. به ترتیب لوله تراشه، خون، زخم، مایعات بدن، آبسه، نازوفارنکس و ادرار بیشترین فراوانی ژن *fnb*A را داشتند. همچنین نتایج این مطالعه با مطالعه John A wright سازگار می باشد. مطالعه فوق در سال ۲۰۰۹ نشان داد ژن *fnb*A نقش اصلی را در ایجاد عفونت در استخوان دارد (۱۰). Peacock و Mongodin نشان دادند fnbA و fnbB به طور قابل توجهی در بیماری های تهاجمی مثل اندوکاردیت، استئومیلیت، آرتریت عفونی و پنومونی بیمارستانی دخالت دارند (۲۷). در سال ۲۰۰۵، Arciola و همکارانش حضور ژن *FnB*A را در ۹۸٪ ایزوله ها و ژن *cna* کدکننده پروتئین متصل شونده به کلاژن را در ۴۶٪ ایزوله های بالینی مرتبط با عفونت های ارتوپدی گزارش کردند. در سال ۲۰۰۶، Mouna Ben Nejma و همکارانش ۷۲ ایزوله MRSA را مطالعه کردند و ژن *fnb*A را در موارد عفونت های پوستی (فورنکل ها و عفونت های زخم) و در موارد عفونت های تهاجمی (اوتیت و استئومیلیت) شناسایی کردند.

در سال ۲۰۰۸، Lowy و Gordon نشان دادند که ژن های *cna* و *fnb* با آندوکاردیت، استئومیلیت و آرتریت عفونی در ارتباط می باشند (۲۲). Tristan Ferry و همکارانش، ارتباط فاکتورهای ویرولانس *S.aureus* با بیماری های بالینی مانند بیماری های مرتبط با توکسین، شوک سپتیک و عفونت های موضعی شدید مانند آرتریت، اندوکاردیت عفونی و پنومونی نکروزه کننده را مورد مطالعه قرار دادند. آن ها نشان دادند که بیماریزایی *S.aureus* در برخی از بیماریها مانند سندرم شوک توکسیک و پنومونی نکروزه کننده گاهی اوقات عمدتاً به واسطه یک فاکتور ویرولانس ساده می باشد. در مقابل، در سایر بیماری های مربوط به *S.aureus* مانند شوک سپتیک فاکتورهای ویرولانس متعددی نقش دارند. آن‌ها همچنین پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) را در ایزوله های جدا شده از آرتریت و استئومیلیت، اندوکاردیت عفونی، پنومونی نکروزه کننده شناسایی نموده و نشان دادند پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین (FnBA) در ایزوله‌های جدا شده از آندوکاردیت عفونی، پنومونی حاصل از مکانیسم تهدید و شوک سپتیک حضور دارد. آن ها اثبات کردند ClFA و FnBP دو فاکتور ویرولانس مهم در آندوکاردیت عفونی هستند (۲۹).

Michael .W.Ellis و همکارانش بر روی نمونه های بینی سربازان مطالعه نموده و نشان دادند در ۳/۹٪ نمونه‌ها، ایزوله های *S.aureus* کلونیزه شده اند (۳۰). همچنین Wertheim و همکـارانش نشان دادند افرادی که *S.aureus* در بینی آنها کلونیزه می شود؛ در معرض خطر افزایش یافته‌ای برای گسترش عفونت های *S.aureus* هستند (۲۶). در سال ۲۰۰۸، Rachel J Gordon و همکارانش در مورد بیماریزایی سویه های *S.aureus* مقاوم به متی سیلین مطالعه‌ای انجام و نشان دادند که تقریباً ۲۰٪ افراد به طور دائمی و ۳۰٪ به طور متناوب *S.aureus* در بینی شان کلونیزه شده است (۲۲).

با مقایسه فاکتورهای ویرولانس در ایزوله های MRSA و MSSA بالینی و بینی در تحقیق حاضر نشان داد که هم در سویه¬های بالینی و هم در سویه¬های بینی، شیوع فاکتورهای ویرولانس در سویه¬های MRSA بیشتر از MSSA می باشد. در سال ۲۰۰۹، Kyong Ran Peck و همکارانش، درمطالعه روی ارگانیسم های جدا شده از خون و سواب بینی نشان دادند که شیوع فاکتورهای ویرولانس در ایزوله های MRSA و MSSA جدا شده از خون با یکدیگر متفاوت بوده و شیوع این فاکتورها در MSSA به طور قابل توجهی بیشتر از MRSA می باشد (P=۰/۰۴۱) در حالی که این شیوع در سویه¬های MRSA و MSSA جدا شده از بینی، یکسان می باشد (۱). توجه به این نکته که شیوع بالاتر هر دو فاکتور ویرولانس مورد بررسی در این مطالعه در ایزوله های MRSA که دارای مقاومت و پایداری بیشتر

می باشند حائز اهمیت می باشد. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه Van Leeuwen و همکارانش در هلند متفاوت می باشد؛ ایشان اعلام کردند هیچ تفاوت مهمی بین میزان ایزوله های MRSA و MSSA از انواع مختلف عفونت های پوست و بافت نرم وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که جهت ردیابی سویه¬های MRSA با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار و آنتی بیوتیک های اگزاسیلین و سفوکسی تین حدود ۲۲٪ نتایج مثبت کاذب وجود دارد که نیاز به ردیابی مولکولی ژن *mec*A را روشن می نماید. بکار بردن ژن های *nuc*، *fem*B و *mec*A در یک تست همزمان با روش Multiplex PCR نه تنها به شناسایی سویه¬های *S.aureus* کمک می کند بلکه در ردیابی اختصاصی و سریع سویه¬های MRSA نیز مفید می باشد. به جز ۷ سویه

Archive of SID

www.SID.ir

بالینی و ۱۵ سویه بینی، همه سویه های MRSA و MSSA جدا شده از نمونه های مختلف اعم از بالینی و بینی، دارای حداقل ۱ ژن فاکتورهای ویرولانس مورد بررسی بودند. به دلیل اینکه شیوع ترکیبات فاکتورهای ویرولانس در سویه¬های بالینی بیشتر از بینی بود می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است حضور همزمان این فاکتورهای ویرولانس در تهاجم و بیماریزایی این سویه ها نقش داشته باشند و همچنین شیوع بیشتر فاکتورهای ویرولانس در سویه¬های MRSA نسبت به MSSA میتواند نشاندهنده نقش فاکتورهای ویرولانس مذکور در تهاجم و بیماریزایی این سویه ها باشد.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه ریاست مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، جناب آقای دکتر نقیلی و نیز از تمام پرسنل محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان سینا و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی در انجام این تحقیق و همچنین جناب آقای دکتر محمدرضا نهایی جهت راهنمایی های علمی ایشان، تشکر و قدردانی می شود.

References

1. 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**: 585-591.
2. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 585-617.
3. Tung H. A bone Sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J* 2000; **345**: 611-619.
4. Rivas JM, Brown EL, Liang X, Hook M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CAN in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen, *J Infect Dis* 2004; **189**(12): 2323–2333.
5. Jonsson KC, Signas H, Muller P, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*: The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 1991; **202**: 1041-1048.
6. Johansson A. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orthop Relate Res* 2001; **382**: 241-246.
7. Mac Faddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore/London, Williams and Wilkins; 2002, PP: 51.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Document M100-S16, CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.
9. Mannuse Luis G. Mahun. *Text book of diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia, Saundars Company, 2000; PP: 329-341.
10. Wright JA, Nair SP. Interaction of Staphylococci with bone. *J Med Microbiol* 2009; **10**: 1003-1016.
11. Sauer P. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin- resistant *S. aureus* isolates from the university Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 403-410.
12. Kobayashi N. Detection of *mec*A, *fem*A and *fem*B genes in clinical strains of Staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol infect* 1994; **113**: 259-266.
13. Taweeporn S, Chariya Ch, Kunyaluk Ch, Temduang L, Chaisiri W. Evaluation of different primers for detecting *mec*A gene by PCR in comparison with phenotypic Methods for discrimination of Methicillin–resistant *Staphylococcus aurous*, *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; **33**(4): 758-769.
14. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Traoka H. Identification of methicillin–resistant strains of Staphylococci by polymerise chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 2240-2244.
15. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning*: *A laboratory Manual*. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory press, 2001; PP: 84-85.
16. Kluytmans JA, Moutpn JW, Ijzerman EP. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* as a Major Risk Factor for Wound Infections after Cardiac Surgery. *The Journal of Infection Diseases* 1995; **171**: 216-219.
17. Felten A, Grandry B, lagrange PH. Evaluation of three techniques for detection of low- level of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2766-2771.
18. Pereira V, Lopes C, Castra A, Siliva J, Gibbs P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* 2009; **26**(3): 278-282.
19. Berger-Bachi BL, Barberis-Maino A, Strassle, Kayser FH. *fem*A, a host- mediated factor essential for Methicillin–resistance in *Staphylococcus aureus*:

Archive of SID

www.SID.ir

molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989; **219**: 263-269.
20. Mohanas oundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic Versus genotypic methods in detection of methicillin – resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Med Res* 2008; **127**: 78-84.
21. Geha D, Uhl C, Gustaferro L, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin – resistant Staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1764-1772.
22. Gordon Rachel J, lowy franklin D. Pathogenesis of Methicillin- Resistant staphylococcus *aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 5350-5359.
23. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M.O. Involvement of Panton–Valentine leukocidin–producing *S.aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1128–1132.
24. Roseline T, lacasse P. Lack of protectin of mice agains *S.aureus* despite a signil–icant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen- binding protein. *Vaccine* 2007; **55**: 5053-5061.
25. Peacock SJ, Moore CF, Day NP. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2002; **70**: 4987-4996.
26. Deurenberg R. The *staphylococcus aureus* Lineage-specific markers collagen adhesion and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence Typing clonal complexes within spa clonal complexes. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 2009; **65**: 116-122.
27. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J. Fibronectin–binding proteins of *staphylococcus aureus* is involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002; **70**: 620-630.
28. Nashev D, Toshkora K. Distribution of virulence genes of *staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol let* 2004; **233**: 450-520.
29. Tristan F. Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* and Their Involvement in Clinical Syndromes. *Current Infectious Disease Reports* 2005; **7**: 420-428.
30. Ellis MW, Griffitn ME, Jorgensen JH. Presence and Molecular Epidemiology of Virulence Factors in Methicillin – Resistant *staphylococcus aureus* strains colonizing and infecting soldiers. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(4): 940-945.

Archive of SID

www.SID.ir