

## بررسی فراوانی ژن‌های چسبندگی *cna*، *fnbA* و *fnbB* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد تورم پستان گوسفند

حبیب دستمالچی‌ساعی<sup>۱</sup>، سارا اقدسی<sup>۲</sup> و حامد محمدزاده<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۲

### خلاصه

عوامل حدت مختلفی در بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس نقش دارند. پروتئین‌های سطحی مثل پروتئین‌های متصل شونده به کلاژن (Cna) و پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (FnBP) از عوامل مهم در اتصال و تهاجم استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های *fnbA*، *fnbB* و *cna* در بین جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از موارد تورم پستان بالینی و تحت بالینی در گوسفند بود. در این مطالعه ۴۵ جدایه بوسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد و نیز تکثیر ژن ترمونوکلئاز اختصاصی گونه (*nuc*) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. سپس جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های چسبندگی *cna*، *fnbA* و *fnbB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن و با به کارگیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مورد آنالیز قرار گرفتند. به دنبال استفاده از پرایمرهای مختص ژن اختصاصی گونه (*nuc*)، قطعه‌ای به اندازه ۲۷۹ جفت باز از تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تکثیر یافت. جالب این که تعداد ۴۳ مورد از جدایه‌ها (۹۵/۵۵٪) از نظر داشتن ژن *cna* مثبت بودند. به علاوه، از بین ۴۵ جدایه مورد مطالعه ۳۹ و ۳۵ جدایه به ترتیب حامل ژن‌های *fnbA* و *fnbB* بودند. با توجه به انتشار وسیع هر سه ژن *cna*، *fnbA* و *fnbB* در بین جدایه‌های مورد مطالعه می‌توان عنوان نمود که *CBP*، *FnbPA* و *FnbPB* کد شده توسط ژن-های مذکور احتمالاً در بیماری‌زایی تورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده و جدایه‌ها احتمالاً گیرنده‌هایی برای پروتئین‌های ماتریکس مثل کلاژن و فیبرونکتین بیان می‌نمایند. این موضوع توسعه راهکارهای نوین جهت پیشگیری از تورم پستان را بر اساس لیگاندهای آنتاگونیست ترغیب می‌نماید که می‌توانند با عوامل چسبندگی سطحی بر هم کنش داده و اتصال اختصاصی آن را با پروتئین‌های ماتریکس بلوکه نمایند.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های چسبندگی، تورم پستان، گوسفند

### مقدمه

مطالعات در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) روی روند اتصال استافیلوکوکوس اورئوس به سلول‌های اپی‌تلیال مجاری و آلوئول‌های غده پستان نشان داده‌اند که استقرار مرحله‌ای مهم در گسترش تورم پستان می‌باشد (۵۰)، به طوری که چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال یا پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک مرحله اولیه و مهم در پروسه عفونت تورم پستان مطرح بوده و این چسبندگی در ممانعت از جریان رو به خارج باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس یک جرم بیماری‌زای فرصت طلب می‌باشد که موجب عفونت‌های مختلف در انسان و حیوانات می‌گردد. این باکتری یکی از معمول‌ترین اجرام عامل تورم پستان در میش می‌باشد (۱۲ و ۳۱) که موجب خسارات اقتصادی قابل ملاحظه در صنعت پرورش گوسفند در سراسر جهان می‌شود (۳۰). حدت این جرم اساساً به واسطه عوامل حدت مختلف از جمله مولکول‌های چسبندگی سطحی میانجی‌گری می‌شود.

(نویسنده مسئول)

E-mail: HDSaei561@gmail.com

<sup>۱</sup> استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۲</sup> دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

پاتولوژيكي گوناگون مثل كراتيت چشم (۱۹ و ۴۰)، استئوميليت و آرتريت سپتيك (۹ و ۴۶) و جايگزيني در سطح ابزارهاي پزشكي موثرند (۵) به طوري كه استافيلوكوكوس در عفونت‌هاي مرتبط با ايمپلنت (تزريق دارو و يا كاشت اعضاي مصنوعي) به عنوان يك جرم بيماري‌زاي مهم مطرح مي‌باشد (۳۶). همچنين تحقيقات نشان داده‌اند كه پروتئين‌هاي متصل شونده به فيبرونكتين موجود در سطح استافيلوكوكوس/اورئوس براي چسبیدن و تهاجم به سلول‌هاي بافت پستان گاو مورد نياز هستند (۲۳). شواهدی نیز وجود دارند كه نشان می‌دهند برخی از پروتئين‌هاي چسبندگي استافيلوكوكوس/اورئوس با عفونت‌هاي تهاجمي خاص ارتباط دارند (۱۸، ۲۰، ۳۶). به علاوه، نتايج حاصل از مدل‌هاي تجربی نشان داده‌اند كه برخی از پروتئين‌هاي چسبندگي ممكن است اهداف بالقوه‌اي جهت جلوگیری از عفونت‌هاي استافيلوكوكي باشند (۱۰ و ۱۵). از اين رو، انجام مطالعات جامع و كامل در ارتباط با قابليت ژنتيكي جدایه‌هاي استافيلوكوكوس/اورئوس به لحاظ داشتن ميانجی‌هاي چسبندگي امري ضروري به نظر می‌رسد. از آنجايي كه تاكنون مطالعه‌اي روی جدایه‌هاي استافيلوكوكوس/اورئوس به دست آمده از موارد تورم پستان گوسفند از نظر حضور ژن‌هاي چسبندگي انجام نشده است، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزيابي حضور ژن‌هاي *cna*، *fnbA* و *fnbB* در بين جدایه‌هاي استافيلوكوكوس/اورئوس به دست آمده از موارد تورم پستان گوسفند و نقش احتمالي آن‌ها در روند بيماري‌زايی تورم پستان بود.

## مواد و روش کار

### نمونه برداری

تعداد ۳۲۰ نمونه شير بر طبق استانداردهاي توصيه شده توسط NMC<sup>۴</sup> (۳۳) از گوسفندان در اواسط دوره

هنگام شيردوشي مؤثر است (۱۴). استافيلوكوكوس اورئوس حاوی عوامل چسبندگي<sup>۱</sup> اختصاصی می‌باشد كه می‌تواند به پروتئين‌هاي متنوعي از ميزبان به ويژه در ماتريكس خارج سلولي (ECM)<sup>۲</sup> متصل شده و جايگزيني در بافت‌هاي ميزبان را موجب شوند (۱۱). اين اتصال توسط خانواده‌اي از پروتئين‌ها تحت عنوان اجزا سطحی ميكروبي شناسايی كننده مولكول‌هاي چسبنده ماتريكس<sup>۳</sup> (MSCRAMMs) ميانجی‌گري می‌شود. اين موارد شامل پروتئين‌هايی می‌باشند كه به طور كووالانسی به پپتيدوگليكان ديواره سلولي باكتري اتصال داشته و شامل پروتئين متصل شونده به كلازن (Cna) (۱۸ و ۴۶)، پروتئين متصل شونده به فيبرينوژن (FbBP) (۴۴)، پروتئين متصل شونده به فيبرونكتين (FnBP) (۲۱)، پروتئين متصل شونده به الاستين (EbpS) (۳۵) و غيره می‌باشند. Cna كد شده توسط ژن *cna*، تنها پروتئين چسبندگي شناخته شده می‌باشد كه به كلازن اتصال می‌يابد. Cna بر خلاف ساير MSCRAMM‌ها، توسط حدود ۴۰ درصد از جدایه‌هاي استافيلوكوكوس/اورئوس توليد می‌شود (۱۱). مشخص شده است كه سويه استاندارد استافيلوكوكوس اورئوس ۴-۸۳۲۵ حاوی دو ژن پشت سر هم و مشابه، *fnbA* و *fnbB* می‌باشد كه به ترتيب پروتئين‌هاي متصل شونده به فيبرونكتين FnBPA و FnBPB را كد می‌نمايند (۴۵). با اين حال، برخی از جدایه‌هاي استافيلوكوكوس اورئوس حاوی يك ژن *fnb* هستند (۱۳ و ۳۷). تحقيقات نشان داده‌اند كه اتصال به فيبرونكتين به واسطه FnBPs در تهاجم به سلول‌هاي يوكاربيوت لازم و ضروري است (۱۶). در اين ارتباط اهميت و نقش عوامل چسبندگي در طيف وسيعی از بيماري‌هاي ناشی از استافيلوكوكوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفته است. اثبات شده است كه *cna*، *fnbA* و *fnbB* به صورت معنی‌داری در استقرار بافتی در شرايط

1- Adhesins

2- Extracellular matrix (ECM)

3- Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs)

4- National Mastitis Council

مولکولی در محیط TSB<sup>1</sup> (Merck، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### استخراج DNA

به منظور استخراج DNA مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کشت ۲۴ ساعته در محیط BHI (Merck، آلمان) و از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermentas، آلمان) استفاده گردید.

### آزمون PCR برای شناسایی ژن ترمونوکلئاز (*nuc*)

علاوه بر آزمایش‌های بیوشیمیایی، جهت تشخیص دقیق‌تر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از تکثیر ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) به روش PCR و با استفاده از پرایمرها (جدول ۱) و چرخه‌های دمایی ارائه شده توسط Brakstad و همکاران (۱۹۹۲) استفاده گردید (۳). واکنش PCR با استفاده از کیت ساخت شرکت سیناژن (ایران) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی PCR (PCR Master mix) با غلظت 2X (حاوی ۰/۰۴ U/μl آنزیم DNA پلیمرز Taq، بافر واکنش، ۳ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub> و ۰/۴ میلی‌مولار از هر dNTP)، غلظت ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام گرفت. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل به جای اسیدنوکلئیک استفاده گردید. از DNA استخراج شده از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش تکثیر با برنامه زمانی: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، چرخه دمایی شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

شیرواری جمع‌آوری گردید. میس‌ها بر اساس ابتلا به تورم پستان بالینی و تحت بالینی (مثبت از نظر کشت باکتریایی و آزمایش CMT) از ۹ گله از شهرهای ارومیه، تبریز و میاندوآب انتخاب گردیدند. نحوه مدیریت و پرورش این گله‌ها به صورت پرورش سنتی در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی بود. جهت نمونه‌برداری برای جلوگیری از آلودگی سرپستانک‌ها، از شستشوی سرپستانک‌ها با آب ولرم استفاده شد. سپس هر کارتیبه به وسیله الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی گردید و پس از ضدعفونی با حوله‌های یک بار مصرف خشک گردیدند. سه دوشش اولیه دور ریخته شد، سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر مربوط به کارتیبه‌های درگیر در لوله‌های استریل جمع‌آوری شدند. نمونه‌های مزبور تا زمان انجام آزمایش‌های باکتری‌شناسی در داخل فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### کشت و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

جهت کشت باکتریایی، ۱۰۰ میکرولیتر از قسمت میانی هر نمونه شیر روی محیط مانیتول سالت آگار (Merk، آلمان) انتقال داده شد و کشت اولیه تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کلنی‌های زرد رنگ ظاهر شده روی این محیط که مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس بودند انتخاب و به منظور تهیه کشت خالص روی محیط آگار خون‌دار حاوی ۵٪ خون گوسفند خالص‌سازی گردیدند. جهت شناسایی جدایه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس، رنگ‌آمیزی گرم، ظاهر کلنی‌ها، آزمایش‌های کاتالاز و کوآگولاز انجام گرفت (۳۳). تمامی جدایه‌های کوآگولاز مثبت جهت تشخیص دقیق تحت آزمایش‌های میکروبی استاندارد قرار گرفتند (۳۸). تعداد ۴۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده جداسازی و خالص گردید. جدایه‌های به دست آمده تا زمان انجام آزمایشات

از پرايمرهاي مربوط به ژن *cna* هر کدام با غلظت نهايي ۰/۴ ميكرومولار، ۲ ميكروليتر از DNA استخراج شده و ۸/۵ ميكروليتر از آب مقطر ديونيزه استريل در لوله‌هاي مخصوص PCR با يكدیگر مخلوط شدند. براي هر واكنش يك كنترل منفي و يك كنترل مثبت نيز تهيه شد. براي كنترل منفي از آب مقطر استريل به جاي اسيد نوكلتيك استفاده گرديد. براي كنترل مثبت از جدايه‌هاي به دست آمده در اين مطالعه با واكنش مثبت استفاده شد. تكثير ژن *cna* با الگوي دمائي شامل دناتوراسيون اوليه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقيقه، ۳۵ چرخه دمائي هر کدام شامل مرحله دناتوراسيون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانيه، مرحله اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانيه و مرحله امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانيه انجام گرفت. مرحله امتداد نهايي در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقيقه انجام گرفت (۲۸). واكنش تكثير هر يك از ژن‌هاي *fnbA* و *fnbB* نيز با برنامه زماني: دناتوراسيون اوليه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقيقه، ۳۵ چرخه دمائي شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقيقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانيه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقيقه و نهايتاً مرحله نهايي واكنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقيقه انجام گرفت. يك محصول PCR با اندازه‌هاي ۱۹۱ و ۲۰۱ جفت باز به ترتيب براي هر يك از ژن‌هاي *fnbA* و *fnbB* به دست آمد.

دقيقه انجام گرفت. واكنش زنجيره‌اي پليمرز در دستگاه ترموسايكلر (CORBETT, Australia) انجام گرديد. فرآورده PCR پس از الكتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد و مشاهده در زیر دستگاه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصول PCR با استفاده از ماركرهاي  $\Phi X174$  DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) و GeneRuler 100 bp DNA ladder plus ساخت شرکت فرمتاز کشور آلمان مشخص گرديد. جدايه‌هاي استافيوكوكوس اورئوس پس از تشخيص قطعي وجود ژن ترمونوكلاز به طول تقريبي ۲۷۹ جفت باز به عنوان استافيوكوكوس اورئوس در نظر گرفته شدند.

#### آزمون PCR برای شناسایی ژن‌های چسبندگی *cna*، *fnbB* و *fnbA*

آزمون PCR جهت تكثير ژن *cna* با استفاده از جفت پرايمرهای اختصاصی انجام شد (۱). ژن‌هاي *fnbA* و *fnbB* نيز با استفاده از پرايمرهای مربوطه که قبلاً توسط Montanaro و همکاران (۱۹۹۹) طراحی شده بودند، تكثير داده شد (۱ و ۲۹). اين پرايمرها توسط شرکت سيناژن (تهران، ايران) تهيه شدند و رديف بازهاي آن و اندازه محصول PCR حاصل از تكثير در جدول ۱ آمده است. جهت انجام PCR، مخلوط واكنش طبق دستور بروشور كيت PCR ساخت شرکت سيناژن تهيه گرديد. بدین ترتيب که برای هر نمونه، ۱۲/۵ ميكروليتر از مخلوط اصلي PCR (PCR Master mix)، ۱ ميكروليتر از هر يك

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

ژن	توالی پرايمر	اندازه محصول (جفت باز)	رفنس
<i>nuc</i>	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'	۲۷۹	۳
<i>cna</i>	5'-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA-3' 5'-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT-3'	۱۹۲	۱
<i>fnbA</i>	5'-GATACAAAACCCAGGTGGTGG-3' 5'-TGTGCTTGACCATGCTCTTC-3'	۱۹۱	۱
<i>fnbB</i>	5'-TGTGCTTGACCATGCTCTTC-3' 5'-AGTTGATGTGCGCTGTATG-3'	۲۰۱	۱

## الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر *cna*

### *fnbB* و *fnbA*

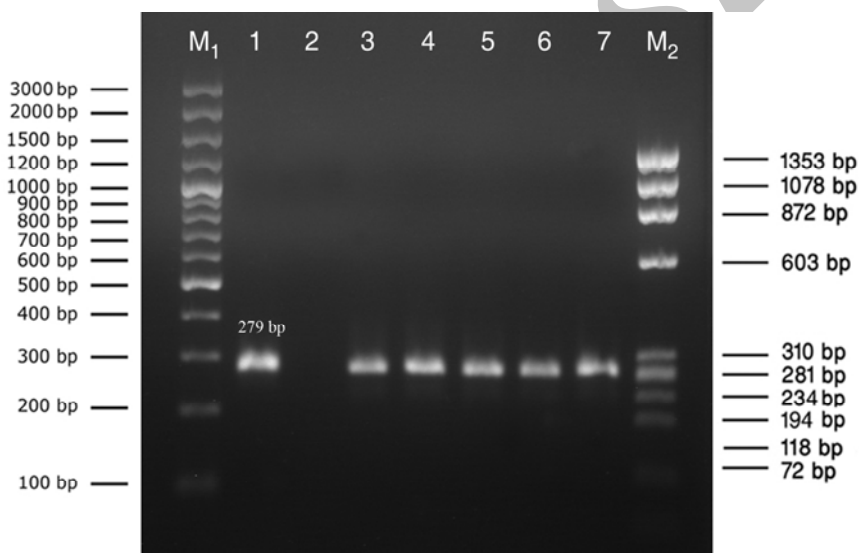
فرآورده‌های PCR مربوط به تکثیر هر یک از ژن‌های چسبندگی مورد مطالعه از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ و مشاهده در زیر دستگاه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه محصولات PCR با استفاده از مارکر GeneRuler™ و  $\Phi X174$  DNA/BsuRI (*Hae*III) و 100 bp DNA ladder ساخت شرکت فرمتاز کشور آلمان مشخص گردیدند.

## نتایج

شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از طریق

### تکثیر ژن *nuc* به روش PCR

همه جدایه‌های باکتریایی که پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده بودند، در آزمون PCR از نظر ژن ترمونوکلائاز (*nuc*) اختصاصی گونه استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، قطعه‌ای به اندازه ۲۷۹ جفت باز را در تمامی جدایه‌ها تکثیر دادند (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *nuc*. چاهک  $M_1$ : GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus marker؛ چاهک ۱: کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213)؛ چاهک ۲: کنترل منفی (واکنش بدون DNA)؛ چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷: جدایه‌های مثبت استافیلوکوکوس اورئوس؛ چاهک  $M_2$ : مارکر  $\Phi X174$  DNA/BsuRI (*Hae*III).

شناسایی ژن‌های چسبندگی *cna*، *fnbA* و *fnbB* به

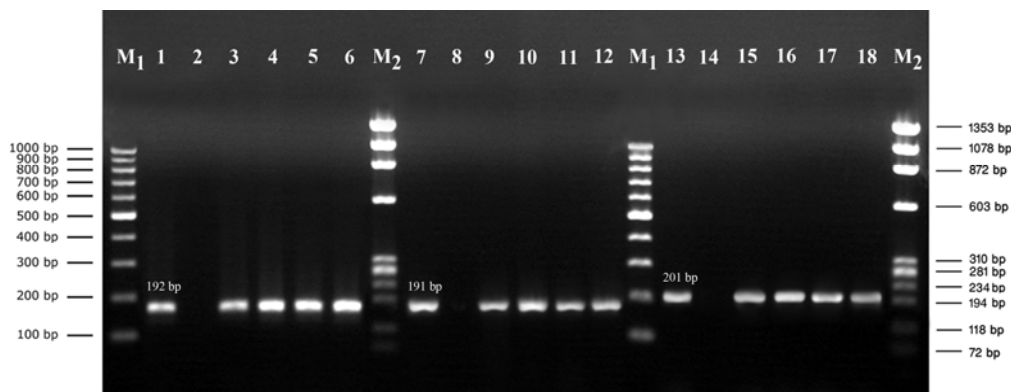
### روش PCR

از بین ۴۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده که جهت شناسایی ژن چسبندگی *cna* مورد استفاده قرار گرفتند، ۴۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس به دنبال

در ردیف کنترل منفی که در آن از آب مقطر استریل به جای DNA استفاده شده بود، هیچ گونه بانندی مشاهده نگردید. در ردیف کنترل مثبت که از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 استفاده شده بود، باند مثبت مشاهده گردید.

استافيلوكوكوس اورئوس مورد مطالعه ۳۹ و ۳۵ جدایه به ترتیب از نظر داشتن ژن‌های مذکور واکنش مثبت نشان دادند. از این رو در مجموع ۹۰/۱ و ۷۷/۷ درصد از جدایه‌های مورد آزمایش در این مطالعه به ترتیب از نظر داشتن ژن مولد FnBPA و FnBPB مثبت بودند (شکل ۲).

تکثیر ژن *cna* فرآورده PCR به اندازه ۱۹۲ جفت باز تولید نمودند. از این رو در مجموع ۹۵/۵۵٪ از جدایه‌های مورد آزمایش در این مطالعه از نظر داشتن ژن *cna* مثبت بودند (شکل ۲). تکثیر ژن‌های *fnbA* و *fnbB* نیز به ترتیب فرآورده‌های PCR به اندازه ۱۹۱ و ۲۰۱ جفت باز تولید نمودند که از بین ۴۵ جدایه



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن‌های *cna*، *fnbA* و *fnbB* چاهک‌های  $M_1$ : مارکر *GeneRuler*<sup>TM</sup> 100 bp؛ چاهک‌های  $M_2$ : چاهک‌های  $M_2$ : مارکر  $\Phi X174$  DNA/BsuRI (*Hae*III)؛ چاهک ۱: کنترل مثبت برای ژن *cna* (جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با واکنش مثبت)؛ چاهک ۲: کنترل منفی برای ژن *cna* (واکنش بدون DNA)؛ چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: جدایه‌های *cna*<sup>+</sup> استافیلوکوکوس اورئوس؛ چاهک ۷: کنترل مثبت برای ژن *fnbA* (جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با واکنش مثبت)؛ چاهک ۸: کنترل منفی برای ژن *fnbA* (واکنش بدون DNA)؛ چاهک‌های ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲: جدایه‌های *fnbA*<sup>+</sup> استافیلوکوکوس اورئوس؛ چاهک ۱۳: کنترل مثبت برای ژن *fnbB* (جدایه استافیلوکوکوس اورئوس با واکنش مثبت)؛ چاهک ۱۴: کنترل منفی برای ژن *fnbB* (واکنش بدون DNA)؛ چاهک‌های ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸: جدایه‌های *fnbB*<sup>+</sup> استافیلوکوکوس اورئوس.

## بحث

مطالعات قبلی (۴۲ و ۴۳) قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار ۲۷۹ جفت باز از همه جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد. از این رو نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از تکثیر ژن *nuc* به روش PCR می‌توان به عنوان یک روش مولکولی تکمیلی برای آزمایشات فنوتیپی جهت شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از موارد تورم پستان استفاده نمود.

در حال حاضر مشخص شده است که جهت شروع عفونت در یک ناحیه خاص، باکتری باید به سلول‌های میزبان یا لایه پوشاننده آنها متصل گردد. شواهد نشان

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تورم پستان در گوسفند و گاو مطرح می‌باشد (۲ و ۳۱). دسترسی به اطلاعات در ارتباط با ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس در درک بهتر نحوه بیماری‌زایی و نیز در تسهیل کنترل و جلوگیری از عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در گله‌های شیری مؤثر است. در این مطالعه ۴۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از ۹ گله شیری واقع در نواحی تبریز، ارومیه و میاندوآب بر اساس ویژگی‌های کشت و بیوشیمیایی و نیز تکثیر ژن *nuc* اختصاصی گونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. همچون

اختلافات در میزان شیوع ژن *cna* می‌تواند ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی و شرایط محیطی باشد (۱).

مشخص شده است که پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (FnBPB و FnBPA) نقش بسیار مهمی در تجمع، اتصال و تهاجم *استافیلوکوکوس اورئوس* به سلول‌های غده پستان (۲۲) و از آن جمله غده پستان گاو دارند (۸ و ۲۳). مطالعات Brouillette و همکاران (۲۰۰۳) در مدل موشی تورم پستان نشان داد که حضور FnBPها روی سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* قابلیت باکتری در جایگزینی در غده پستان را تحت شرایط فشار ناشی از مکیدن در مقایسه با موتان فاقد FnBPها افزایش می‌دهد (۴). در یک مطالعه که روی ۱۶۳ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد، مشخص گردید که همه آنها حاوی حداقل یکی از دو ژن *fnb* هستند (۳۷). Arciola و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان دادند که اکثریت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ارتباط با عفونت‌های ارتوپدی واجد ژن‌های کد کننده FnBPA (۹۸٪) و FnBPB (۹۹٪) می‌باشند (۱). در مطالعه‌ای که توسط Duran و همکاران (۲۰۱۰) روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصل از زخم‌های جراحی انجام گردید، ۶۹ جدایه از ۸۸ جدایه مورد مطالعه (۷۸/۴٪) حاوی ژن *cna* و ۸۶ جدایه (۹۷/۷٪) حاوی ژن *fnbA* بوده‌اند (۷).

همان طوری که از نتایج حاصل از این مطالعه برمی‌آید، اکثریت جدایه‌های مورد مطالعه حاوی هر سه ژن *cna*، *fnbA* و *fnbB* بودند. به نظر می‌رسد چنین جدایه‌هایی از قابلیت اتصال بیشتری به بافت پستان برخوردار بوده و نسبت به جدایه‌های دیگر از غالبیت و انتشار زیادی برخوردارند. نتایج حاصل از مطالعات Hensen و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان داده است که در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر اتصال و تهاجم اختلاف وجود دارد (۱۷). با توجه به حضور بالای ژن‌های چسبندگی در بین جدایه‌های مورد مطالعه، تصور می‌شود پروتئین‌های متصل شونده به کلاژن و فیبرونکتین

می‌دهند که پروتئین‌های متعلق به خانواده MSCRAMMs مثل پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) و پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (FnBPB, FnBPA) در این اتصال مؤثرند (۱۸ و ۴۶). چندین مطالعه نشان داده‌اند که *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی قابلیت اتصال و ورود به درون سلول‌های اپی‌تلیال پستان گاو را دارند (۱۴ و ۱۷).

در مطالعه حاضر ژن کد کننده *cna* در ۴۳ از ۴۵ جدایه مورد مطالعه شناسایی گردید. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً روند اتصال به کلاژن نقش مهمی در بیماری‌زایی تورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته باشد. گیرنده برای کلاژن روی جدایه‌های حاصل از عفونت‌های داخل پستانی گاوان نیز شناسایی شده است (۲۶ و ۲۷). با این حال یافته حاصل از این مطالعه مخالف با مشاهدات قبلی مبنی بر این که اکثر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس cna* کد نمی‌نمایند، می‌باشد (۴۷). نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌اند که وفور ژن *cna* هم در بین جدایه‌های با منشأ انسان (۳۲) و هم دام‌ها (۳۹، ۴۹ و ۵۱) پایین است. با این حال انجام مطالعات جامع‌تر با استفاده از تعداد جدایه‌های بیشتر حاصل از موارد تورم پستان جهت ارزیابی میزان حضور *cna* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مرتبط با تورم پستان لازم و ضروری است. نقش *cna* به عنوان یک شاخص حدت در بیماری‌های مختلفی مثل آرتریت سپتیک و عفونت‌های استخوانی نیز مشخص گردیده است (۹ و ۳۶). Thomas و همکاران (۱۹۹۹) ۱۵۹ سویه به دست آمده از نواحی جغرافیایی مختلف را مورد آنالیز قرار دادند و مشاهده نمودند که شیوع ژن *cna* در انگلستان و نیوزلند به ترتیب ۶۷ و ۴۴ درصد می‌باشد. مطالعات انجام شده در آمریکای شمالی میزان شیوع را ۴۳٪ گزارش نمودند (۴۸). در حالی که در سوئد، Ryding و همکاران (۱۹۹۷) شیوع ۵۷ درصدی را برای جدایه‌های به دست آمده از بیماران مبتلا به آندوکاردیت یا باکتری می‌همراه با عفونت استخوانی یا مفصلی گزارش نمودند (۴۱). این

عرصه متصل شونده به فیبرونکتین FnBP موجب ایجاد حفاظت قابل ملاحظه بر ضد عفونت داخل پستانی و تجربی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۳۴). همچنین نشان داده شده است که ایمنی‌زایی با پروتئین‌های امتزاجی حاوی عرصه‌های D متصل شونده به فیبرونکتین FnBP/استافیلوکوکوس اورئوس موجب تحریک تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌شود که در فعالیت اتصال باکتری تداخل می‌نمایند (۶ و ۲۴).

به طور خلاصه این مطالعه انتشار وسیع هر سه ژن *cna*، *fnbA* و *fnbB* را در بین جدایه‌های حاصل از موارد تورم پستان گوسفند نشان می‌دهد. جالب این که تعداد زیادی از جدایه‌ها حامل ژن *cna* بودند و حداقل یکی از دو ژن *fnbA* و *fnbB* در اکثریت جدایه‌ها شناسایی گردید. این یافته می‌تواند بیانگر نقش احتمالی پروتئین‌های متصل شونده به کلاژن و فیبرونکتین در بیماری‌زایی تورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوسفند باشد. همچنین این موضوع توسعه راه‌کارهایی جدید جهت جلوگیری از تورم پستان را بر اساس لیگاندهای آنتاگونیست که قادر به برهم‌کنش با عوامل چسبندگی سطحی و ممانعت از اتصال اختصاصی آن به پروتئین‌های ماتریکس می‌باشند، تشویق می‌نماید.

نقش مؤثری در بیماری‌زایی تورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوسفند داشته باشند. با توجه به این یافته، احتمالاً استفاده از واکسن‌های حاوی پروتئین‌های سطحی تخلیص شده مؤثر در اتصال *استافیلوکوکوس اورئوس* (مثل CBP، FnBPA، FnBPB) در گوسفند می‌تواند محافظت‌کننده باشد. چنین واکسن‌هایی می‌توانند اتصال باکتری را مهار کرده و در نتیجه بیگانه‌خواری باکتری متصل نشده را افزایش دهند. با این حال، نتایج گزارش شده توسط Mamo و همکاران (۱۹۹۴)، نشان داد که در موش‌های ایمن شده با پروتئین امتزاجی glutathione S-transferase-CBP حفاظت در برابر چالش با *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد نمی‌شود (۲۵). یک توجیه برای این موضوع این است که پروتئین امتزاجی که در آن مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است تنها حاوی عرصه A مؤثر در اتصال به کلاژن می‌باشد، از این رو احتمالاً عرضه CBP به روش دیگر ممکن است موجب القاء حفاظت گردد. از طرف دیگر باید توجه نمود که *استافیلوکوکوس اورئوس* به چندین پروتئین مختلف میزبان متصل می‌گردد. لذا به کارگیری اپی‌توپ‌های مربوط به چند پروتئین اتصال مختلف می‌تواند مؤثرتر باشد. یک مطالعه اولیه نشان داده است که واکسیناسیون گاوها با نوعی پروتئین امتزاجی حاوی

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که هزینه تحقیق را فراهم نمودند قدردانی و تشکر می‌شود.

### منابع

1- Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Baldassarri L. and Montanaro L. (2005). 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: 81-86.

2- Bergonier D., de Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G. and Berthelot X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. Veterinary Research, 34: 689-716.

3- Brakstad O.G., Aasbakk K. and Maeland J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology, 30: 1654-60.

4- Brouillette E., Grondin G., Shkreta L., Lacasse P. and Talbot B.G. (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. Microbial Pathogenesis, 35: 159-168.



- 5- Cheung A.L. and Fischetti V.A. (1991). The role of fibrinogen in mediating staphylococcal adherence to fibers. *Journal of Surgical Research*, 50: 150-155.
- 6- Ciborowski P., Flock J.I. and Wadstrom T. (1992). Immunological response to a *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein. *Journal of Medical Microbiology*, 37: 376-381.
- 7- Duran N., Dogramaci Y., Ozer B., Demir C. and Kalaci A. (2010). Detection of adhesin genes and slime production among *Staphylococci* in orthopaedic surgical wounds. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9): 708-715.
- 8- Dziewanowska K., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W., Trumble W.R. and Bohach G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67: 4673-78.
- 9- Elasri M.O., Thomas J.R., Skinner R.A., Blevins J.S., Beenken K.E., Nelson C.L., et al. (2002). *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone*, 30: 275-280.
- 10- Flock J.I. (1999). Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Molecular Medicine Today*, 5: 532-537.
- 11- Foster T.J. and Hook M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6: 484-488.
- 12- Goni P., Vergara Y., Ruiz J., Albizu I., Vila J. and Gomez-Lus R. (2004). Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *International journal of Antimicrobial Agents*, 23: 268-272.
- 13- Greene C., Vaudaux P.E., Francois P., Proctor R.A., McDevitt D. and Foster T.J. (1996). A low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus* 879R4S has Tn918 inserted into its single *fnb* gene. *Microbiology*, 142 (Pt 8): 2153-60.
- 14- Gudding R., McDonald J.S. and Cheville N.F. (1984). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 2525-31.
- 15- Hall A.E., Domanski P.J., Patel P.R., Vernachio J.H., Syribeys P.J., Gorovits E.L. and et al. (2003). Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. *Infection and Immunity*, 71: 6864-70.
- 16- Hauck C.R. and Ohlsen K. (2006). Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 5-11.
- 17- Hensen S.M., Pavicic M.J., Lohuis J.A. and Poutrel B. (2000). Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Dairy Science*, 83: 418-429.
- 18- Hudson M.C., Ramp W.K. and Frankenburg K.P. (1999). *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 279-284.
- 19- Jett B.D. and Gilmore M.S. (2002). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infection and Immunity*, 70: 4697-4700.
- 20- Johansson A., Flock J.I. and Svensson O. (2001). Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 382: 241-246.
- 21- Jonsson K., Signas C., Muller H.P. and Lindberg M. (1991). Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 202: 1041-48.
- 22- Lammers A., Nuijten P.J., Kruijt E., Stockhofe-Zurwieden N., Vecht U., Smith H.E., et al. (1999). Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Veterinary Microbiology*, 67: 77-89.
- 23- Lammers A., Nuijten P.J. and Smith H.E. (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 103-109.
- 24- Luk J.M., Flock J.I. and Wadstrom T. (1989). Detection in rabbit sera of blocking antibodies against staphylococcal fibronectin-binding protein by enzyme-linked immunosorbent assay. *FEMS Microbiology Immunology*, 1: 505-510.
- 25- Mamo W., Boden M. and Flock J.I. (1994). Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 10: 47-53.
- 26- Mamo W., Froman G. and Wadstrom T. (1988). Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 18: 163-176.

- 27- Mamo W., Lindahl M. and Jonsson P. (1992). Binding of fibronectin and type II collagen to *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: reduction of binding after growth in milk whey. *Microbial Pathogenesis*, 12: 443-449.
- 28- Montanaro L., Arciola C.R., Baldassarri L. and Borsetti E. (1999). Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials*, 20: 1945-49.
- 29- Montanaro L., Arciola C.R., Borsetti E., Collamati S., Baldassarri L. and Montanaro L. (1999). Detection of fibronectin-binding protein genes in staphylococcal strains from peri-prosthesis infections. *The New Microbiologica*, 22: 331-336.
- 30- Mork T., Tollersrud T., Kvitle B., Jorgensen H.J. and Waage S. (2005). Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Veterinary Microbiology*, 106: 265-273.
- 31- Mork T., Waage S., Tollersrud T., Kvitle B. and Sviland S. (2007). Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49: 23.
- 32- Nashev D., Toshkova K., Salasia S.I., Hassan A.A., Lammler C. and Zschock M. (2004). Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters*, 233: 45-52.
- 33- National mastitis council, (1999). Laboratory handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Inc, Madison, WI, pp: 39-46.
- 34- Nelson L.F., Flock J.L., Hook M., Lindberg M., Muller H.P. and Wadstrom T. (1991). Adhesins in staphylococcal mastitis as vaccine components. *Flemish Veterinary Journal*, 62 Supplementary 1: 111-125.
- 35- Park P.W., Rosenbloom J., Abrams W.R., Rosenbloom J. and Mecham R.P. (1996). Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 15803-09.
- 36- Patti J.M., Bremell T., Krajewska-Pietrasik D., Abdelnour A., Tarkowski A., Ryden C., et al. (1994). The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infection and Immunity*, 62: 152-161.
- 37- Peacock S.J., Day N.P., Thomas M.G., Berendt A.R. and Foster T.J. (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *The Journal of Infection*, 41: 23-31.
- 38- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. and Carter G.R. (1998). *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd ed., (Mosby-London, UK). pp: 118-127.
- 39- Reinoso E.B., El-Sayed A., Lammler C., Bogni C. and Zschock M. (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research*, 163: 314-322.
- 40- Rhem M.N., Lech E.M., Patti J.M., McDevitt D., Hook M., Jones D.B., et al. (2000). The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Infection and Immunity*, 68: 3776-79.
- 41- Ryding U., Flock J.I., Flock M., Soderquist B. and Christensson B. (1997). Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 176: 1096-99.
- 42- Saha B., Singh A.K., Ghosh A. and Bal M. (2008). Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *Journal of Medical Microbiology*, 57: 72-79.
- 43- Salasia S.I., Khusnan Z., Lammler C. and Zschock M. (2004). Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science*, 5: 103-109.
- 44- Siboo I.R., Cheung A.L., Bayer A.S. and Sullam P.M. (2001). Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infection and Immunity*, 69: 3120-27.
- 45- Signas C., Raucci G., Jonsson K., Lindgren P.E., Anantharamaiah G.M., Hook M., et al. (1989). Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 699-703.
- 46- Smeltzer M.S. and Gillaspay A.F. (2000). Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poultry Science*, 79: 1042-49.
- 47- Smeltzer M.S., Gillaspay A.F., Pratt F.L., Jr., Thames M.D. and Iandolo J.J. (1997). Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene*, 196: 249-259.

48- Thomas M.G., Peacock S., Daenke S. and Berendt A.R. (1999). Adhesion of *Staphylococcus aureus* to collagen is not a major virulence determinant for septic arthritis, osteomyelitis, or endocarditis. The Journal of Infectious Diseases, 179: 291-293.

49- van Leeuwen W.B., Melles D.C., Alaidan A., Al-Ahdal M., Boelens H.A., Snijders S.V., et al. (2005). Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 187: 4584-91.

50- Wanasinghe D.D. (1981). In vitro adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary gland epithelial cells. Acta Veterinaria Scandinavica, 22: 99-108.

51- Zecconi A., Binda E., Borromeo V. and Piccinini R. (2005). Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. The Journal of Dairy Research, 72: 203-208.

Archive of SID