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

حبیب دستمالچی‌ساعی[۱]، سارا اقدسی[۲] و حامد محمدزاده[۲]

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, cna* و *fnbB* 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 کار گیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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 ژن‌های 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 نماید.


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

## مقدمه

*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. 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

[۱] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه E-mail: HDSaei561@gmail.com (نویسنده مسئول)

[۲] دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

هنگام شیردوشی مؤثر است (۱۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی عوامل چسبندگی[1] اختصاصی می‌باشد که می‌توانند به پروتئین‌های متنوعی از میزبان به ویژه در ماتریکس خارج سلولی (ECM)[2] متصل شده و جایگزینی در بافت‌های میزبان را موجب شوند (۱۱). این اتصال توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها تحت عنوان اجزا سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس[3] (MSCRAMMs) میانجی‌گری می‌شود. این موارد شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که به طور کووالانسی به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری اتصال داشته و شامل پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) (۱۸ و ۴۶)، پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن (FbBP) (۴۴)، پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین (FnBP) (۲۱)، پروتئین متصل شونده به الاستین (EbpS) (۳۵) و غیره می‌باشند. Cna کد شده توسط ژن *cna*، تنها پروتئین چسبندگی شناخته شده می‌باشد که به کلاژن اتصال می‌یابد. Cna بر خلاف سایر MSCRAMMها، توسط حدود ۴۰ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود (۱۱). مشخص شده است که سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴-۸۳۲۵ حاوی دو ژن پشت سر هم و مشابه، *fnbA* و *fnbB*، می‌باشد که به ترتیب پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین FnBPA و FnBPB را کد می‌نمایند (۴۵). با این حال، برخی از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی یک ژن *fnb* هستند (۱۳ و ۳۷). تحقیقات نشان داده‌اند که اتصال به فیبرونکتین به واسطه FnBPs در تهاجم به سلول‌های یوکاریوت لازم و ضروری است (۱۶). در این ارتباط اهمیت و نقش عوامل چسبندگی در طیف وسیعی از بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار گرفته است. اثبات شده است که *cna*، *fnbA* و *fnbB* به صورت معنی‌داری در استقرار بافتی در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم (۱۹ و ۴۰)، استئومیلیت و آرتریت سپتیک (۹ و ۴۶) و جایگزینی در سطح ابزارهای پزشکی موثرند (۵) به طوری که *استافیلوکوکوس* در عفونت‌های مرتبط با ایمپلنت (تزریق دارو و یا کاشت اعضای مصنوعی) به عنوان یک جرم بیماری‌زای مهم مطرح می‌باشد (۳۶). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین موجود در سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* برای چسبیدن و تهاجم به سلول‌های بافت پستان گاو مورد نیاز هستند (۲۳). شواهدی نیز وجود دارند که نشان می‌دهند برخی از پروتئین‌های چسبندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* با عفونت‌های تهاجمی خاص ارتباط دارند (۱۸، ۲۰ و ۳۶). به علاوه، نتایج حاصل از مدل‌های تجربی نشان داده‌اند که برخی از پروتئین‌های چسبندگی ممکن است اهداف بالقوه‌ای جهت جلوگیری از عفونت‌های استافیلوکوکی باشند (۱۰ و ۱۵). از این رو، انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط با قابلیت ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به لحاظ داشتن میانجی‌های چسبندگی امری ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد تورم پستان گوسفند از نظر حضور ژن‌های چسبندگی انجام نشده است، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی حضور ژن‌های *cna*، *fnbA* و *fnbB* در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد تورم پستان گوسفند و نقش احتمالی آن‌ها در روند بیماری‌زایی تورم پستان بود.

## مواد و روش کار

### نمونه‌برداری

تعداد ۳۲۰ نمونه شیر بر طبق استانداردهای توصیه شده توسط NMC[4] (۳۳) از گوسفندان در اواسط دوره

1- Adhesins
2- Extracellular matrix (ECM)
3- Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs)
4- National Mastitis Council

شیرواری جمع‌آوری گردید. میش‌ها 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 کارتیه 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 کارتیه‌های 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 کواگولاز انجام گرفت (۳۳). تمامی جدایه‌های کواگولاز 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 مولکولی در محیط TSB[1] (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 پلیمراز Taq، بافر واکنش، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ 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 به‌جای 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، ۳۵ 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 درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

1- Tryptic soy broth

دقیقه انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (CORBETT, Australia) انجام گردید. فرآورده PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد و مشاهده در زیر دستگاه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصول PCR با استفاده از مارکرهای (*Hae*III) ΦX174 DNA/*Bsu*RI و GeneRuler 100 bp DNA ladder plus ساخت شرکت فرمنتاز کشور آلمان مشخص گردید. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تشخیص قطعی وجود ژن ترمونوکلئاز به طول تقریبی ۲۷۹ جفت باز به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند.

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

آزمون PCR جهت تکثیر ژن *cna* با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی انجام شد (۱). ژن‌های *fnbA* و *fnbB* نیز با استفاده از پرایمرهای مربوطه که قبلاً توسط Montanaro و همکاران (۱۹۹۹) طراحی شده بودند، تکثیر داده شد (۱ و ۲۹). این پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه شدند و ردیف بازهای آن و اندازه محصول PCR حاصل از تکثیر در جدول ۱ آمده است. جهت انجام PCR، مخلوط واکنش طبق دستور بروشور کیت PCR ساخت شرکت سیناژن تهیه گردید. بدین ترتیب که برای هر نمونه، ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی PCR (PCR Master mix)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مربوط به ژن *cna* هر کدام با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۸/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه استریل در لوله‌های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط شدند. برای هر واکنش یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت نیز تهیه شد. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل به جای اسید نوکلئیک استفاده گردید. برای کنترل مثبت از جدایه‌های به دست آمده در این مطالعه با واکنش مثبت استفاده شد. تکثیر ژن *cna* با الگوی دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی هر کدام شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. مرحله امتداد نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۲۸). واکنش تکثیر هر یک از ژن‌های *fnbA* و *fnbB* نیز با برنامه زمانی: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً مرحله نهایی واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. یک محصول PCR با اندازه‌های ۱۹۱ و ۲۰۱ جفت باز به ترتیب برای هر یک از ژن‌های *fnbA* و *fnbB* به دست آمد.

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

| ژن | توالی پرایمر | اندازه محصول (جفت باز) | رفرنس |
|---|---|---|---|
| ***nuc*** | 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3'<br>5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3' | ۲۷۹ | ۳ |
| ***cna*** | 5'-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA-3'<br>5'-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT-3' | ۱۹۲ | ۱ |
| ***fnbA*** | 5'-GATACAAACCCAGGTGGTGG-3'<br>5'-TGTGCTTGACCATGCTCTTC-3' | ۱۹۱ | ۱ |
| ***fnbB*** | 5'-TGTGCTTGACCATGCTCTTC-3'<br>5'-AGTTGATGTCGCGCTGTATG-3' | ۲۰۱ | ۱ |

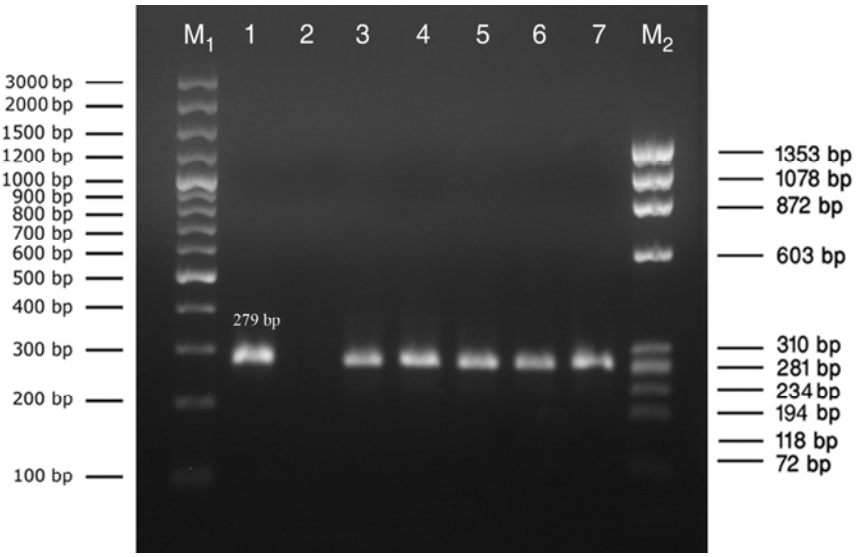
**الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر *cna*، *fnbA* و *fnbB***

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 ΦX174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) و GeneRuler$^{TM}$ 100 bp DNA ladder ساخت شرکت فرمنتاز 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 ترمونوکلئاز (*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).



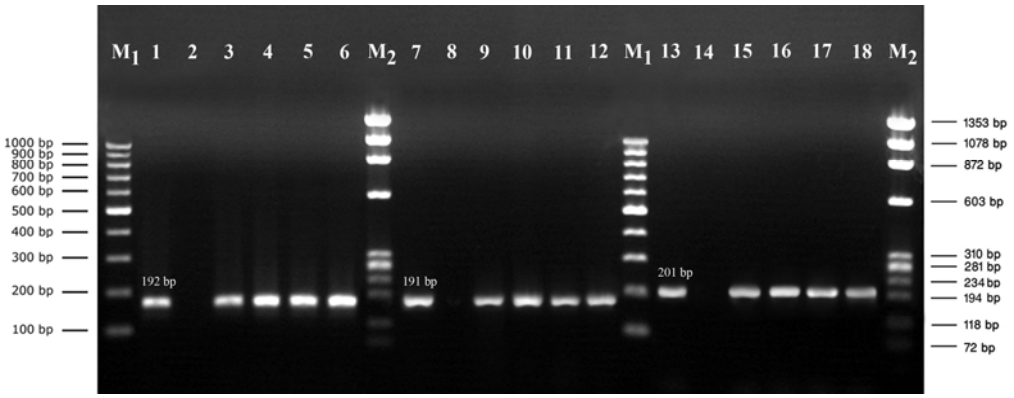

***شکل ۱: تصویر الکترفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن nuc. چاهک $M_1$: GeneRuler$^{TM}$ 100 bp DNA ladder plus marker؛ چاهک ۱: کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213)؛ چاهک ۲: کنترل منفی (واکنش بدون DNA)؛ چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷: جدایه‌های مثبت استافیلوکوکوس اورئوس؛ چاهک $M_2$: مارکر ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII).***

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

**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

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 *استافیلوکوکوس 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).




***شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن‌های cna، fnbA و fnbB: چاهک‌های $M_1$: مارکر GeneRuler$^{TM}$ 100 bp DNA ladder؛ چاهک‌های $M_2$: مارکر ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII)؛ 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+** *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+** *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+** *استافیلوکوکوس اورئوس*.

## بحث

*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 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

می‌دهند که پروتئین‌های متعلق به خانواده MSCRAMMs مثل پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) و پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (FNBPA , FNBPB) 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 منشاء 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 باکتریمی همراه با عفونت استخوانی یا مفصلی گزارش نمودند (۴۱). این 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 (FnBPA و FnBPB) 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 عفونت-های 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*، *fnbB* بودند. به نظر می‌رسد چنین جدایه‌هایی از قابلیت اتصال بیشتری به بافت پستان برخودار 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

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 محافظت کننده 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 اتصالی مختلف می‌تواند مؤثرتر باشد. یک مطالعه اولیه نشان داده است که واکسیناسیون گاوها با نوعی پروتئین امتزاجی حاوی 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 اتصالی 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.


## 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 Microbiology, 2th 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 Gillaspy A.F. (2000). Molecular pathogenesis of staphylcoccal osteomyelitis. Poultry Science, 79: 1042-49.

47- Smeltzer M.S., Gillaspy 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.