ORIGINAL ARTICLE

Bioinformatic and In-vitro Characterization of scaF as a Novel Gene for Identification of Staphylococcus aureus Isolates

Mohammad Reza Pourmand1,
Elaheh Salami2,
Jalil Fallah Mehrabadi3,
Azar Hadadi4, Rahil Mashhadi5

[1] Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] MSc Student in Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Assistant Professor, Department of Bioscience and Biotechnology, Malekashtar University of Technology, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] M.Sc. in Cellular and Molecular Biology, Urology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received May 31, 2014 ; Accepted August 9, 2014)

Abstract

Background and purpose: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens is essential to minimize the transfer and spread of this pathogen. An appropriate method for rapid and suitable detection of *S. aureus* is detection of one of its genes. The aim of this study was to identify the *S. aureus* using *scaF* gene.

Material and Methods: The study was conducted on 45 isolates of *S. aureus* separated from clinical specimens of patients who referred to hospitals affiliated with Tehran University of Medical Sciences in 2013. At first, *scaF* gene was analyzed by bioinformatic tools. *S.aureus* isolates were confirmed using biochemical and diagnostic tests. Following DNA extraction, *scaF* gene was amplified by polymerase chain reaction using gene-specific primers. The results of PCR were examined by gel electrophoresis.

Results: The *scaF* gene was present in all studied isolates. Bioinformatics evaluation revealed that this gene encodes a protein with a molecular weight of 33kDa and contains 297amino acids with a PI value of 6.3.

Conclusion: The *scaF* gene belongs to *Staphylococcal conserved antigen* family which is conserved in *S. aureus* strains recorded in JCVI database. Furthermore, due to lack of the same gene in *Staphylococcus epidermidis* and other species, it could be used for detection of *S. aureus* infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, polymerase chain reaction, detection, *scaF*

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(116): 52-57 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۶ شهریور سال ۱۳۹۳ (۵۷-۵۲)

بررسی بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی ژن جدید *scaF* جهت شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس

محمدرضا پورمند[۱]
الهه سلیمی[۲]
جلیل فلاح مهرآبادی[۳]
آذر حدادی[۴]
راحیل مشهدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به تنوع ژنومی گونه‌ها و سویه‌های استافیلوکوکوس، تشخیص سریع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی برای کاهش انتقال و گسترش این پاتوژن امری ضروری است. یکی از راه‌های تشخیص سریع، انتخاب یکی از ژن‌های آن جهت شناسایی است. هدف از این مطالعه، شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از ژن scaF می‌باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه در سال ۱۳۹۲ روی ۴۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. ابتدا ژن *scaF* با کمک نرم‌افزارهای وب مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه با کمک روش‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های تشخیصی، ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد تائید قرار گرفتند. متعاقب استخراج DNA ژنومی، ژن scaF با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و پرایمرهای اختصاصی در این ایزوله‌ها تکثیر یافت. نتایج حاصل از (PCR)polymerase chainreaction توسط روش ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: در همه ایزوله‌های مورد مطالعه وجود ژن scaF، مثبت گردید. بررسی بیوانفورماتیک نشان داد که این ژن، پروتئینی به وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون را کد کرده که دارای ۲۹۷ اسیدآمینه است و نقطه ایزوالکتریک آن۶/۳می‌باشد. تاکنون این پروتئین مورد بررسی آزمایشگاهی قرار نگرفته است.

استنتاج: ژن *scaF* متعلق به خانواده ژنی Staphylococcal conserved antigens بوده که در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی JCVI، حفاظت شده می‌باشد. علاوه بر این، به علت عدم وجود ژن مشابه در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سایر گونه‌ها می‌توان از آن برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌ها استفاده کرد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، واکنش زنجیره ای پلیمراز،(PCR)، scaF

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه بوده که می‌تواند عامل عفونت‌های مهمی همچون باکتریمی، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندرم شوک توکسیک و

مولف مسئول: محمدرضا پورمند– تهران- میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

۱. دانشیار میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استادیار میکروب شناسی پژوهشکده علوم وفناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۴. دانشیار بیماری های عفونی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ، مرکز تحقیقات ارولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۳/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۵/۱۸

عفونت‌های پوستی باشد(۲،۱). هم‌چنین به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون استافیلوکوکوس اورئوس در برابر داروهای ضدمیکروبی، این موضوعبه یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در جهان تبدیل شده است(۳). در تشخیص عفونت نمونه‌های بالینی، شناسایی مولکولی عامل عفونی در زمان کوتاه، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است(۴). روش‌های تشخیصی متداول مبتنی بر ویژگی های فنوتیپی و واکنش های بیوشیمیایی دارای معایبی همچون زمان بر بودن می باشند(۷-۵). امروزه روش‌های سریع تشخیص مولکولی پاتوژن ها گسترش یافته و به کارگیری این روش ها، زمان تشخیص عامل عفونی را از ۲تا ۳ روز (مورد نیاز روش‌های فنوتیپی) به چندین ساعت کاهش می دهد و برنامه‌های کنترل سلامت را بهبود می‌بخشند(۸). ژن *scaF*(sacol0270) متعلق به خانواده Sca یا Staphylococcal conserved antigens می‌باشد که تاکنون بررسی آزمایشگاهی و مولکولی در مورد آن تاکنون صورت نگرفته است. خانوادهSca در استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب مجموعه‌ای از ۹و ۱۰ پروتئین را شامل می شود که براساس شماره لوکوس پروتئین‌های فوق و میزان هومولوژی که در ۱۱۰ اسیدآمینه بخش C ترمینال خود دارند، در استافیلوکوکوس اورئوس به نام های ScaA-I و در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به نام‌های ScaA-J نام گذاری گردیدند(۹). پروتئین‌های این خانواده استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ویژگی‌های مشابهی در نقطه ایزوالکتریک، درصد هومولوژی و همچنین وجود سیگنال پپتید دارند. بیش‌ترین هومولوژی در پروتئین های ScaB و ScaG با ۷۰ درصد و کم‌ترین هومولوژی بین پروتئین‌های ScaI با ۳۸ درصد در بین دو گونه مشاهده شده است(۹). با توجه به عدم وجود مطالعات دامنه‌دار در زمینه ژن‌های یاد شده و به منظور استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی، مطالعه حاضر به استفاده از ژن *scaF* در شناسایی ایزوله‌های بالینیاستافیلوکوکوس اورئوس می‌پردازد که می‌تواند به عنوان یک رویکرد جدید در جهت شناسایی این پاتوژن در عفونت‌های مربوط به آن مورد توجه قرار گیرد.

مواد و روش ها

این مطالعه روی ۴۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. ویژگی‌های بیوشیمیایی متداول شامل رشد و تغییر رنگ درمحیط مانیتول سالت آگار، کاتالاز، کواگولاز وDNase به منظور تأیید باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در این ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ژنوم ۴۵ ایزوله تائید شده و همچنین سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (۸۳۲۵/۴) از کشت‌های ۲۴ ساعته باکتری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (کیاژن- آلمان) استخراج گردید. سپس به منظور تکثیر ژن scaF از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. توالی این پرایمرها به شرح زیر است:

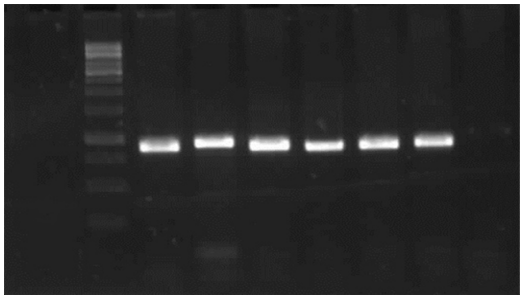
scaF1:GCGCGCGCTAGCATGTATACGAATGATAGCAAAACATTAG
scaF2:GCGCGCCTCGAGATGGATGTAATTATATGATGAAACTTCTG

واکنش (PCR) (PCRPolymrase Chain Reaction شامل ۱ میکرو لیتراز DNAاستخراج شده، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک ازپرایمرها (۱۰pM) و ۱۲/۵ میکرولیتر از Mastermix 2x(Cinagene, Cat.No: PR8250C) بود و در نهایت با اضافه کردن آب مقطر حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به دست آمد. سپس مخلوط واکنش PCRدر دستگاه ترموسایکلر (Sensoquest, Labcycler, Germany) قرار گرفت و قطعه مورد نظر طبق برنامه زیر تکثیر شد: دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل دمایی شامل دمای ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. پس از انجام PCR به

منظور بررسی قطعات تکثیر شده، محصولات PCR توسط KBC power load روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و زیر نور فرابنفش مورد مشاهده قرار گرفتند. با توجه به اختلاف سایز در یکی از ایزوله ها، سه بار تکثیر ژن *scaF* برای آن صورت گرفت و دو ایزوله با سایز متفاوت برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مربوطه و توسط نرم افزار gene runner آنالیز شد.

یافته ها

همه ۴۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده توسط روش‌های بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفتند.



تصویرشماره ۱: الکتروفورز آگارزژل ۱ درصد محصول PCR ۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس: ستون ۱: مارکر ۱kb (Vivantis,Cat.No:NL1411kb). ستون ۶-۲: محصول PCR ژن (*scaF*)894bp در ۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس . ستون ۷: کنترل مثبت(سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ۸۳۲۵/۴). ستون ۸: کنترل منفی.

نتایج حاصل از PCR و ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز (تصویر شماره ۱) نشان داد که در همه ۴۵ ایزوله، باندی حدود ۸۹۴ جفت باز حضور دارد ولی در دو محصول PCR دو اندازه متفاوت با حدود ۱۰۰ جفت باز مشاهده گردید. آزمایشات تعیین توالی *scaF* و نتایج تعیین توالی هیچ اختلاف اندازه‌ای را تائید نکردند. بررسی بیوانفورماتیک نشان داد که این ژن پروتئینی به وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون را کد کرده و دارای ۲۹۷ اسیدآمینه با نقطه ایزوالکتریک ۶/۳ می‌باشد. این پروتئین در بخش N ترمینال خود دارای یک سیگنال پپتید بوده و در انتهای C ترمینال دارای یک CHAP domain می‌باشد که در همه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به طور کامل حفظ شده است.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن اصلی مسئول عفونت های بیمارستانی و کسب شده از جامعه می‌باشد(۱۰). تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس در روند بهبود بیماری و کاهش هزینه ها تاثیر قابل توجهی دارد(۱۱). استافیلوکوکوس اورئوس مجموعه‌ای از ژن‌های بسیار حفاظت شده ای را حمل می کند که می‌توان از این ژن‌ها در جهت تشخیص سریع این پاتوژن استفاده کرد. در مطالعات مولکولی، ژن حفاظت شده *femA* برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس به کار گرفته می‌شود(۱۲، ۱۳). ضمناً برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از ردیابی ژن *mecA* استفاده می‌شود که این روش شناسایی سریع،اختصاصی و حساس می‌باشد(۱۴،۱۵). روش‌های دیگر مولکولی برای ژن‌هایی نظیر *pvl* (۱۶،۱۷)،*sea* و *seb* (۱۸،۱۹) در جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس به کار گرفته شده است. علاوه بر این، در مطالعات مولکولی به منظور شناسایی سریع استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از ژن femA-SE استفاده می شود(۲۰،۲۱). با توجه به تنوع ژنی استافیلوکوکوس اورئوس ظرفیت استفاده از ژن‌های دیگر میسر می باشد. علاوه بر سویه‌های حساس به آنتی بیوتیک تعیین توالی شده در این گونه، حداقل ده سویه استافیلوکوکوس اورئوس به صورت کامل تعیین توالی شده‌اند. امروزه به راحتی حتی از ژن *vanA* می‌توان جهت غربالگری ایزوله‌های مقاوم به ونکومایسین بهره گرفت. روش‌های شناسایی مولکولی براساس ژن‌های ذکر شده، نیازمند زمان کم‌تری را در مقایسه با روش‌های متداول فنوتیپی است. اگرچه از ژن *pvl* می‌تواند در جهت شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌های پوستی و بافت نرم و ژن های

sea و *seb* در مسمومیت‌های غذایی استفاده کرد ولی نمی‌توان همه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس را با آن‌ها ردیابی نمود. در حالی‌که با استفاده از ژن *scaF* نه تنها می‌توان سویه‌های خاص بلکه هر ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را در نمونه‌های بالینی مورد بررسی قرار داد. با استفاده از ژن *scaF* نمی‌توان عفونت را ناشی از سویه های مقاوم به متی سیلین به شمار آورد. جهت رفع این ابهام می‌توان همزمان به بررسی ژن *mecA* پرداخت. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که در باکتری استافیلوکوکوس اورئوسپروتئین‌های خانواده Sca در حد بالایی حفاظت شده بوده و اعضای این خانواده در استافیلوکوکوس اورئوس فاقد LPTXG در ردیف اسیدآمینه ای خود می باشند، با این حال به دلیل وجود سیگنال پپتید در انتهای N ترمینال اینپروتئین‌ها، همه اعضائاین خانواده ممکن است ترشحی و یا در سطح سلولباکتری عرضه شوند(۹). این خانواده نقش حیاتی در کلونیزه کردن استافیلوکوکوس اورئوس روی سلول میزبان دارد(۹). در این مطالعه ما ژن *scaF* را در ۴۵ ایزوله با روش PCR بررسی کردیم که نتایج حاصل از PCR نشان داد که این ژن در همه ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به صورت دستنخورده قابل مشاهده می‌باشد. از آن‌جایی که ژن *scaF* از خانواده ژنی *Sca*، در همه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حفاظت شده می‌باشد و مشابه این ژن در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سایر گونه‌های باکتریایی یافت نشده است می‌توان از ردیابی این ژن با روش‌های مولکولی به منظور شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با پشتیبانی و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفته است.

References

1. Bettin A, Causil C, Reyes N. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. Braz J Infect Dis 2012;16(4):329-334.
2. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agrgroups (alleles), and human disease. Infect immun 2002;70(2):631-641.
3. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Yazdchi SB. Molecular typing of clinical and nasal carriage isolates of *staphylococcus aureus* by spa gene patterns. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(94): 28-34 (Persian).
4. Sedghian H, Pourmand MR. Molecular Detection of bacterial pathogens involved in urinary tract infection. Iran J Med Microbiol2008; 1 (4): 41-45.
5. Hussain M, von Eiff C, Sinha B, Joost I, Herrmann M, Peters G, et al. eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2008; 46(2): 470-476.
6. Carroll KC. Rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current status. Mol Diagn Ther 2008; 12(1): 15-24.
7. Sturenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. Ger Med Sci 2009; 7: Doc06.
8. Tacconelli E. Screening and isolation for infection control. J Hosp Infect 2009; 73(4): 371-377.

9. MR Pourmand, S Foster. A novel bioinformatic approach for Staphylococcal vaccine development. Tehran University Medical Journal 2006; 64(6): 19-26.
10. Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterileclinical samples by a new molecular assay. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 254-260.
11. Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, Gigi J, Vandercam B, Reynaert M, et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2366-2368.
12. Abimanyu N, Krishnan A, Murugesan S, Subramanian GK, Gurumurthy S, Krishnan P. Use of Triplex PCR for Rapid Detection of PVL and Differentiation of MRSA from Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci. J Clin Diagn Res 2013;7(2):215-218.
13. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin- resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(11): 2864-2867.
14. Kwon SJ, Jeon T, Seo D, Na M, Choi EG, Son JW, et al. Quantitative PCR for Etiologic Diagnosis of Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus Pneumonia in Intensive Care Unit. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2012; 72(3):293-301.
15. Rashid ZZ, Bahari N, Othman A, Jaafar R, Mohamed NA, Jabbari I, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Malaysian tertiary centre. Southeast Asian J TropMed Public Health 2013; 44(1): 104-108.
16. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29(5):1128-1132.
17. Ohadian Moghadam S, Havaei SA, Pourmand MR. Prevalence of Methicilin-Resistant *Staphylococus aureus* Carrying Panton- Valentine Leukocidin Gene in Cutaneous Infections in the City of Isfahan. J Med Bacteriol; (2012): 1(1,2) 9- 16, 9-16.
18. Imani Fooladi A, Tavakoli H, Naderi A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iran J Microbiol 2010; 2(3): 137-142.
19. Pourmand Mohammad Reza, Memarian Mojtaba, Hoseini Mostafa, agherzadeh Yazdchi Sahar. High Prevalence of SEAGene Among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in in Tehran. Acta Medica Iranica 2009; 47(5): 357-361.
20. Jukes L, Mikhail J, Bome-Mannathoko N, Hadfield SJ, Harris LG, El-Bouri K, et al. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci and meticillin susceptibility testing directly from growth-positive blood cultures by multiplex real-time PCR. J Med Microbiol 2010; 59(Pt12): 1456-1461.
21. Pourmand MR, Abdossamadi Z, Salari MH, Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of mecA and aap genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. J Infect Dev Ctries 2011; 5(1): 34-40.