مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰
صفحات: ۱۴۹-۱۴۵

Kowsar Medical Journal
Vol. 16, No. 3, Fall 2011
Pages: 145-149

پلی‌مورفیسم ژنی *saCOL2581* و *saCOL2291*؛ ژن‌های کاندید واکسن در ایزوله‌های کلینیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

حمیده روحانی‌نژاد[۱] *MSc*، جلیل فلاح مهرآبادی[۲] *PhD*، محمدرضا پورمند[*] *PhD*،
محمدرضا ذوالفقاری[۱] *PhD*، عباسعلی ایمانی فولادی[۳] *PhD*

[*]گروه میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
[۲]انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین، تهران، ایران
[۳]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یک عامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی است. شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی درمان عفونت‌های استافیلوکوکی را مشکل کرده است، بنابراین ساخت یک واکسن مناسب ضروری به‌نظر می‌رسد. ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* کاندیدای بالقوه‌ای برای ساخت واکسن هستند که توالی آنها در بانک ژنی وجود دارد. این مطالعه با هدف تعیین موتاسیون‌ها در ایزوله‌های مختلف و تایید پروتئین این دو ژن انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۰ ایزوله کلینیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های ادرار، زخم، موکوس و CSF بیماران بستری در تعدادی از بیمارستان‌های کشور به‌صورت تصادفی جمع‌آوری شد و پس از کشت، DNA ژنومی آنها استخراج شده و سپس توسط PCR تکثیر شدند. نمونه‌ها سپس تعیین توالی شده و به‌کمک نرم‌افزار Puls4 با هم ترازبندی شدند. پس از آن توالی‌های نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار Gene runner به توالی‌های آمینواسیدی تبدیل شدند و توالی پروتئینی آنها با هم ترازبندی و آنالیز شد.

یافته‌ها: پلی‌مورفیسم در توالی نوکلئوتیدی، تغییراتی را در توالی پروتئینی این دو ژن نشان داد. این تغییرات بیشتر در ناحیه N- ترمینال قرار داشتند و توالی پروتینی ناحیه C- ترمینال حفظ شده بود.

نتیجه‌گیری: هر دو ژن در اکثر گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین ناحیه حفاظت‌شده C- ترمینال، کاندیدای خوبی برای تهیه واکسن هستند.

کلیدواژه‌ها: واکسن، *saCOL*، *استافیلوکوکوس اورئوس*

Gene polymorphism of *saCOL2291* and *saCOL2581*; candidate genes for vaccine in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Rouhani Nejad H.[1] *MSc*, Fallah Mehrabadi J.[2] *PhD*, Pourmand M. R.[*] *PhD*,
Zolfaghari M. R.[1] *PhD*, Imani Fooladi A. A.[3] *PhD*

[*]Department of Microbiology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2]MARS Bioinformatics Institute, Tehran, Iran
[3]Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: *Staphylococcus aureus* is an important nosocomial infectious agent. The prevalence of antibiotic resistance complicates the treatment of staphylococcal infections. Therefore, the development of an effective vaccine against *Staphylococcus aureus* is important. *saCOL2291* and *saCOL2581* are potential candidate genes for vaccine development and their sequences are available in Gene Bank. This study was carried out with the aim of determining the mutations in different isolates and confirming the protein of these genes.

Materials & Methods: Genomic DNA was extracted from 30 clinical *Staphylococcus aureus* isolates, randomly obtained from urine, ulcer, mucosa and CSF samples of the inpatients of different Iranian hospitals. The genomic DNA was extracted after culture and the genes were PCR-amplified. The amplicons were sequenced and aligned with Puls4 software. Then, the nucleotide sequences were changed into amino-acid sequences by Gene runner software and the protein sequences were aligned and analyzed.

Results: Nucleotide polymorphisms resulted in amino-acid sequence changes. These polymorphisms were located in the N-terminal domains, while the C-terminal domains of these genes were conserved.

Conclusion: Both genes are appropriate candidates for vaccine due to their presence in most *Staphylococcus aureus* species and the existence of conserved C-terminal domain.

Keywords: Vaccine, *saCOL*, *Staphylococcus aureus*

نویسنده مسئول: محمدرضا پورمند. تمام درخواست‌ها باید به نشانی mpourmand@tums.ir فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۹۰/۱/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۱۷

مقدمه

بیماری‌های عفونی، دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان هستند. *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله باکتری‌های ایجادکننده بیماری‌های عفونی است که بیماری‌های حد واسط توکسینی مانند سندروم شوک سمی، شوک سپتیک، باکتریمی و مسمومیت‌های غذایی را ایجاد می‌کند. این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های زیادی مانند متی‌سیلین مقاوم شده و تحت فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک قرار گرفته است. اولین‌بار مقاومت به متی‌سیلین در سال ۱۹۷۰ اتفاق افتاد و در سال ۱۹۹۰ منجر به آندمی در مراکز پزشکی شد. مقاومت به متی‌سیلین یک فاکتور قابل توجه در قدرت بیماری‌زایی باکتری محسوب می‌شود. رشد روز افزون تعداد سویه‌های MRSA (*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین) طی دو دهه اخیر نشان می‌دهد که این باکتری به یک پاتوژن مهم اکتسابی تبدیل شده است. برخی از عفونت‌های کشنده ناشی از این باکتری گزارش شده است. افزایش بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است ناشی از افزایش شیوع ژن‌های قابل انتقال *mec* و حضور اگزوتوکسین‌های بیماری‌زا باشد که هر دوی این عوامل سلامت بشر را تهدید می‌کنند [۱، ۲]. از آن پس، مقاومت به آنتی‌بیوتیک دیگری به‌نام ونکومایسین در ژاپن و سپس در سال ۲۰۰۲ در ایالات متحده گزارش شد [۳]. مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی، درمان این بیماری‌های عفونی را مشکل نموده است [۴]. به این علت، دانشمندان بسیار نگران گسترش این مقاومت‌ها هستند. بنابراین لزوم یافتن راه‌کارهایی برای پیشگیری یا استراتژی‌های درمانی، محرز است و بدین منظور استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و واکسن به‌عنوان بهترین روش‌ها پیشنهاد می‌شود [۵].

شناسایی پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های سطحی و ترشحی *استافیلوکوکوس اورئوس* که منجر به بیماری‌زایی باکتری می‌شوند، برای ساخت واکسن ضروری است. در تهیه این واکسن‌ها، بعضی پروتئین‌ها مانند ABC ترانسپورتر شناخته شده‌اند که باعث تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شوند [۶]. در همین راستا، تعدادی از آنتی‌ژن‌های استافیلوکوکی با روش‌های آزمایشگاهی بررسی شدند، مانند پروتئین متصل‌شونده به فیبرونکتین (FnbpA و FnbpB)، SA2006، SA2291، SA1472، اتولیزین و پروتئین A که در سرم بیماران منجر به تولید آنتی‌بادی می‌شدند [۷، ۸].

محققان از ساختارهایی مانند DNA، پروتئین و پلی‌ساکارید در تهیه واکسن استفاده می‌کنند [۹]. به‌عنوان مثال، با استفاده از کلامپینگ فاکتور A یک واکسن ساختند و سپس آن را به موش تزریق کردند و مشاهده نمودند که این واکسن، ایمنی‌زایی نسبی برقرار کرد [۱۰]. واکسن دیگری با استفاده از موتانت غیرسمی TSST-1 تولید و به خرگوش تزریق شد و تا حدودی در برابر عفونت‌های استافیلوکوکی محافظت ایجاد نمود [۱۱].

پروتئین‌های آنتی‌ژنی همانند سوپرآنتی‌ژن‌ها که گوناگونی کمی در توالی خود در ایزوله‌های کلینیکی مختلف نشان می‌دهند در ساخت واکسن برعلیه پاتوژن‌ها موثرتر خواهند بود [۷]. از این رو، پلی‌مورفیسم برخی از ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شده است که می‌توان به پلی‌مورفیسم ژن PVL (پانتون-والنتین‌کوسیدین) [۱۲]، پلی‌مورفیسم ژن انتروتوکسین (*egc*) [۱۳] و پلی‌مورفیسم ژن کوآگولاز در *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از خون [۱۴، ۱۵] اشاره کرد.

واکسن‌های متعددی برای این باکتری ساخته شده که هیچ‌یک پتانسیل ایمنی‌زایی بالایی ندارند و همچنین استفاده از سلول کامل *استافیلوکوکوس اورئوس* برای واکسن، ایمنی مطلوبی ایجاد نمی‌کند. از جمله آنتی‌ژن‌هایی که کاندید مناسبی برای تهیه واکسن هستند، خانواده پروتئینی Sca است. این پروتئین‌ها در ناحیه C- ترمینال حفظ شده و ۴۰ تا ۶۰٪ همولوژی دارند [۱۴]. در این تحقیق، پروتئین‌های *ScaC* و *ScaD* از خانواده Sca انتخاب شدند که به‌ترتیب توسط ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* کد می‌شوند. این پروتئین‌ها کاندید بالقوه‌ای برای ساخت واکسن استافیلوکوکی هستند، زیرا این ژن‌ها در تمام سویه‌های موجود در بانک ژنی وجود دارند.

هدف اصلی در این مطالعه، تشخیص و تعیین موتاسیون‌ها در ایزوله‌های مختلف و تایید پروتئین ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* به‌عنوان کاندید واکسن بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی: ۳۰ ایزوله کلینیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیمارستان‌های کشور به‌صورت تصادفی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل ادرار، زخم، موکوس و CSF بودند. آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کوآگولاز، کاتالاز و DNase برای اثبات این ایزوله‌ها انجام شد.

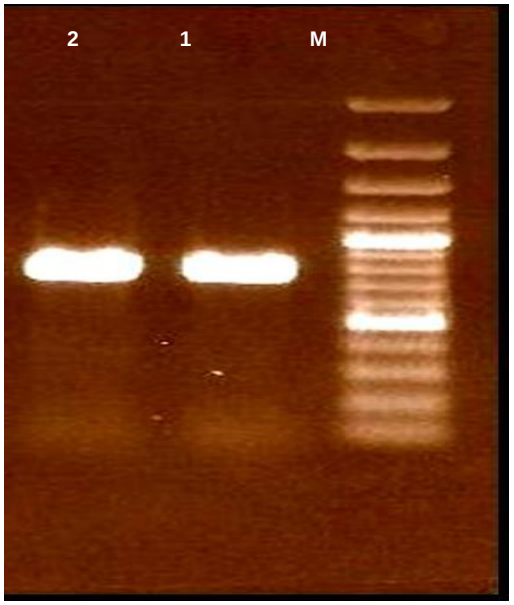
استخراج DNA: همه ایزوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۶ ساعت در محیط کشت LB (لوریا برتانی) کشت داده شدند. سپس DNA ژنومی از باکتری‌های کشت‌داده‌شده بر طبق پروتکل کیت (بیونیر؛ کره جنوبی) استخراج شد.

تکثیر و تشخیص موتاسیون‌ها در ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581*: همه مواد مورد استفاده در این آزمایش از شرکت فرمنتاز تهیه شد. DNA-Pfu پلیمراز با خاصیت تصحیح برای واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای ژن‌های (NC_2951.2) *saCOL2291* و *saCOL2581* (NC_002951.2) براساس توالی سویه COL موجود در NCBI (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی) طراحی شدند (جدول ۱). برنامه دوره حرارتی PCR، دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه در ۳۵ دوره، در لوپ اول ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، ۶۲/۷ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و

جدول ۱) توالی‌های پرایمر مورد استفاده برای تکثیر دو ژن *saCOL2291* و *saCOL2581*

تعیین پرایمر		توالی ´۵ به ´۳	محصول PCR
پرایمر ***saCOL2291***	پیش‌رو	GCGCGCCATATGTCTGAGCAAGATAACTACGGTT	۷۴۴ جفت‌باز
	پس‌رو	GCGCGCCTCGAGGTGAATGAAGTTATAACCAGCAG	
پرایمر ***saCOL2581***	پیش‌رو	GCGCGCCATATGGCAGGACTTGCCACTATCGC	۷۵۵ جفت‌باز
	پس‌رو	GCGCGCCTCGAGATGAATGAAATTATATGAACCTGC	

دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود. همه قطعات تکثیرشده تعیین توالی شدند (شرکت ژن فن‌آوران؛ ایران) و با توالی سویه COL در BLAST (ابزار پایه جستجوی تراز موضعی) ترازبندی شدند. همچنین همه ۳۰ توالی نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار Puls4 با هم ترازبندی شدند. پس از آن، توالی‌های نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزار Gene runner به توالی‌های آمینواسیدی تبدیل شدند و این بار توالی پروتئینی آنها با هم ترازبندی شد.



شکل ۱) نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581*. ستون M) مارکر ۱۰۰جفت‌بازی (فرمنتاز SM0311)، ستون ۱) ۷۴۴ جفت‌باز برای ژن *saCOL2581* و ستون ۲) ۷۵۵ جفت‌باز برای ژن *saCOL2291*.

نتایج

تکثیر ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581*: توالی‌های حاصل از PCR دو ژن *saCOL2291* و *saCOL2581* بررسی شدند (شکل ۱). توالی نوکلئوتیدی دو ژن *saCOL2291* و *saCOL2581* در همه ۳۰ ایزوله یک به یک با توالی اصلی این دو ژن یعنی سویه COL، ترازبندی و آنالیز شدند. ترازبندی با سویه مرجع، ۹۸/۳٪ برای ژن *saCOL2291* و ۹۷/۸٪ برای ژن *saCOL2581* همولوژی نشان داد. بررسی‌ها نشان داد که ناحیه C– ترمینال این ژن‌ها بسیار حفظ شده است. سپس توالی‌های پروتئینی ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* که به‌ترتیب *ScaD* و *ScaC* نامیده می‌شوند، در سطح آمینواسیدی برای تشخیص هر نوع تغییر، مانند جهش‌های خاموش، ترانزیسیون و ترانس‌ورسیون بررسی شدند. بررسی جهش‌ها در همه نمونه‌ها عدم ارتباط بین نوع ایزوله‌ها و نرخ جهش را نشان داد.

پلی‌مورفیسم در ژن *saCOL2291*: در *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه COL، ژن ssaA2 (۸۰۴bp) در لوکوس *saCOL2291* قرار گرفته بود. این ژن، آنتی‌ژن ترشحی استافیلوکوکی ssaA2 را بیان می‌کرد و شامل ۲۶۷ آمینواسید بود که آمینواسیدهای ۲۷–۱ سیگنال پپتیداز C_5 در ناحیه N– ترمینال را تشکیل می‌دادند. جهش‌ها براساس ترازبندی توالی نوکلئوتیدی همه ۳۰ ایزوله با هم نشان داده شده است (جداول ۲ و ۳). جهش‌های ترانزیسیون به‌طور میانگین ۱/۶ و جهش‌های ترانس‌ورسیون ۱/۳ در هر ایزوله بودند. بعضی از این جهش‌ها بر توالی آمینواسیدی تاثیر می‌گذاشتند که برخی در یک خانواده آمینواسیدی بودند و برخی دیگر در خانواده آمینواسیدی متفاوت قرار داشتند. این تغییرات توسط ترازبندی توالی‌های آمینواسیدی نشان داد که بیشترین جهش در ناحیه N– ترمینال صورت گرفته و اکثر جهش‌های ناحیه C– ترمینال بی‌اثر بوده و این ناحیه حفظ شده است.

پلی‌مورفیسم در ژن *saCOL2581*: ژن ssaA1 (۷۶۸bp) در لوکوس *saCOL2581* در *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه COL قرار گرفته بود که آنتی‌ژن ترشحی استافیلوکوکی ssaA1 شامل ۲۵۵ آمینواسید را بیان می‌کرد. آمینواسیدهای ۲۶–۱ سیگنال پپتیداز C_5 را کد می‌کردند. جهش‌های ترانزیسیون به‌طور میانگین ۳/۴ و جهش‌های ترانس‌ورسیون ۰/۷ در هر ایزوله قرار داشتند. بعضی از این جهش‌ها بر توالی آمینواسیدی تاثیر می‌گذاشتند که برخی در یک خانواده آمینواسیدی، اما برخی دیگر در خانواده آمینواسیدی متفاوتی قرار داشتند. تغییرات به‌وسیله ترازبندی توالی‌های آمینواسیدی نشان داد که جهش‌ها در ناحیه N–ترمینال صورت گرفته و اکثر جهش‌های ناحیه C– ترمینال بی‌اثر بوده و این ناحیه حفظ شده است (جداول ۲ و ۳)

بحث

در قرن ۲۱، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مشکل بزرگی ایجاد نموده است. برخی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مانند متی‌سیلین و پنی‌سیلین در چند دهه گذشته به‌وجود آمده‌اند. در

حال حاضر، مقاومت در برابر لینازولید و آنتی‌بیوتیک‌های دیگر نیز افزایش پیدا کرده است [۱۵]. بنابراین شناسایی مکانیزم‌های مقاومت برای طراحی واکسن‌های جدید برای جلوگیری از عفونت‌های استافیلوکوکی، بسیار حیاتی است. یکی از واکسن‌های طراحی‌شده، کپسول پلی‌ساکاریدی کونژوگه بود که در بیماران همودیالیزی استفاده شد. عفونت در ۵۶٪ بیماران طی ۱۰ ماه کاهش یافت [۱۶]. واکسن دیگر استافیلوکوکی، پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBP2a) بود که برعلیه سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده شد. *استافیلوکوکوس اورئوس* در کلیه افراد ایمونیزه در مقایسه با بیماران غیرایمونیزه کاهش یافت، اما نتایج رضایت‌بخشی به‌دنبال نداشت [۱۷].

جدول ۲) موتاسیون‌های مشاهده‌شده در توالی ژن‌های *saCOL2581* و *saCOL2581*.

ژن	ترانزیسیون	ترانس‌ورسیون	حذف	اضافه
saCOL2291	T(165) → C [9]	A(331) → T [5]	CAT(40-42) [3]	TATAAC (181-187) [6]
	T(267) → C [6]			GCTACA (178-184) [6]
saCOL2581	C(342) → T [6]	G(112) → A [6]	30bp [1]	202bp [1]
	C(390) → T [30]			
	T(432) → C [30]	T(514) → A [5]		
	C(492) → T [10]			
	C(498) → T [6]			

اعداد داخل کروشه، ایزوله‌هایی را که دارای موتاسیون مشابه هستند و اعداد داخل پرانتز، موقعیت موتاسیون‌ها را نشان می‌دهد. علی‌رغم وجود اضافه و حذف‌شدن نوکلئوتیدها، هیچ موتاسیون تغییر قالبی رخ نداده است. نرخ آنالیز موتاسیون‌ها در این جدول تا ۵ موتاسیون برای هر نمونه را نشان می‌دهد، به‌جز اضافه و حذف‌شدگی‌ها.

جدول ۳) موتاسیون‌های مشاهده‌شده در توالی پروتئینی دو ژن *saCOL2581* و *saCOL2581*.

پروتئین	ترانزیسیون	ترانس‌ورسیون	حذف	اضافه
ScaC	Asn(55) → Asn [9]	Asn(111) → Tyr [5]	His* [3]	Tyr+Asn#(61-62) [6]
	Asn(89) → Asn [6]			Ala+Tyr^(60-61) [6]
ScaD	Pro(130) → Ser [30]	Asp(38) → Asn [6]	----	-----
	Ala(114) → Val [6]			
	Gly(166) → Gly [6]	Ala(172) → Val [5]		
	Arg(164) → Trp [10]			
	Ala(144) → Val [30]			

اعداد داخل کروشه، تعداد ایزوله و اعداد داخل پرانتز، موقعیت آمینواسیدها را نشان می‌دهد.

(*) آمینواسید هیستیدین در ۳ ایزوله حذف شده است، اما تغییر قالبی ایجاد نکرده است. (#) اسیدآمینه آسپارژین و تیروزین و (^) آلانین و تیروزین در توالی آمینواسیدی وارد شدند و هیچ تغییری در قالب توالی ایجاد نکرده‌اند. نرخ موتاسیون ۵ عدد به‌ازای هر نمونه است، به‌جز موتاسیون‌های حذفی و اضافی.

مطالعه روی پروتئین سطحی *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌نام IsdB (تعیین‌کننده سطح آهن) به‌عنوان واکسن پروفیلاکتیک برعلیه عفونت‌های استافیلوکوکی انجام شد. این پروتئین در اکثر ایزوله‌های کلینیکیِ سویه‌های حساس و مقاوم به پنی‌سیلین حفظ شده است. IsdB به موش تزریق شد و تیتر بالایی از آنتی‌بادی را نشان داد [۱۸]. یک واکسن ترکیبی نیز از ۴ آنتی‌ژن سطحی پروتئینی IsdA، IsdB، SdrD و SdrE ساخته شد. سپس به موش تزریق و با القای تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیزه‌کننده ایجاد ایمنی نمود [۱۹]. علاوه بر این، پروتئین‌های *ScaC* و *ScaD* به‌عنوان ایمنوژن، استفاده و به موش تزریق شدند. این پروتئین‌ها پاسخ ایمنی خونی را القا کرده و آنتی‌بادی اختصاصی تولید نمودند. در نتیجه، مشخص شد که این دو پروتئین ایمنوژن هستند [۲۰].

گیل و همکاران، کل ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه COL را تعیین توالی نمودند [۲۱]. در مطالعه ما، ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* از سویه COL به‌عنوان توالی مرجع، استفاده شد و همین ژن‌ها در ایزوله‌های بالینی ترازبندی شدند. با توجه به توالی ژنوم، ۶۰ آنتی‌ژن سطحی و ترشحی مهم با استفاده از روش "نمایش باکتریایی" به‌عنوان ایمنوژن‌های جدید در *استافیلوکوکوس اورئوس* شناخته شدند. یکی از این آنتی‌ژن‌های سطحی محصول *saCOL* است [۹].

پروتئین‌های خانواده Sca با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک در *استافیلوکوکوس اورئوس*، شناسایی و به‌نام آنتی‌ژن‌های حفاظت‌شده استافیلوکوکی (Sca) نامیده شدند. براساس مطالعات بیوانفورماتیکی، بیان شد که بسیاری از این ژن‌ها در ناحیه C–ترمینال حفظ شده‌اند و کاندید جدیدی برای واکسن هستند [۱۴]. در نتیجه، برای اثبات این فرضیه لازم بود تا در شرایط آزمایشگاهی نیز این بررسی‌ها صورت گیرد تا صحت این ادعا ثابت شود. اولین‌بار برای تشخیص ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581*، این ژن‌ها کلون و یک نمونه از آنها تعیین توالی شد. نتیجه با توجه به همترازی با سویه COL نشان داد که این ژن در این نمونه کاملاً حفظ شده و هیچ نوع موتاسیونی مشاهده نشده است [۲۲]. در تحقیق ما، این خانواده در ناحیه N–ترمینال هر دو ژن دارای موتاسیون بوده است.

برای شناسایی پلی‌مورفیسم ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* از DNA–Pfu پلیمراز استفاده شد، به این دلیل که این آنزیم دارای ویژگی تصحیح است. در نتیجه، بررسی جهش در توالی‌های ژنی از صحت بیشتری برخوردار بوده و هیچ موتاسیونی

به‌دلیل اشتباه آنزیم نخواهد بود. از جمله موتاسیون‌های مورد بررسی، اضافه‌شدن توالی پلی‌نوکلئوتیدی در دو ایزوله از ژن‌های *saCOL2291* و *saCOL2581* است که احتمال می‌رود باکتری، این قطعات را از طریق نوترکیبی یا ترانسپوزون گرفته باشد. در بعضی ایزوله‌ها نیز حذف صورت گرفته است که شاید دلایل مشابهی داشته باشد. این موتاسیون‌ها بر قالب خواندن آمینواسیدی تاثیری نداشته‌اند، یعنی حذف‌ها یا اضافه‌ها از قالب سه‌نوکلئوتیدی پیروی می‌نمودند. تاثیر موتاسیون‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک در سطح آمینواسیدی بررسی شدند که برخی از این موتاسیون‌ها بر توالی آمینواسیدی تاثیر داشتند و باید در آینده در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شوند.

نتیجه‌گیری

به‌دلیل وجود این ژن‌ها در اکثر گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین ناحیه حفاظت‌شده C– ترمینال، این ژن‌ها کاندید خوبی برای تهیه واکسن هستند. در آینده با مطالعاتی که در سطح پروتئومیکس انجام خواهد گرفت و همچنین با استفاده از قطعات کوتاه ایمنوژن ناحیه C– ترمینال در مدل‌های حیوانی، اثبات خواهد شد که آیا این دو ژن واکسن مناسبی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* خواهند بود یا نه.

منابع

1- Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA, et al. Origins of community strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2004;39(1):47-54.

2- Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: Emergence of a single clone that produces Panton-valentine leukocidin. Clin Infect Dis. 2002;35(7):819-24.

3- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Staphylococcus aureus resistant to vancomycin United States 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51(26):565-7.

4- Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of Staphylococcus aureus. J Clin Investig. 2003;111(9):1265-73.

5- Josephson E, Hartford O, Obrien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A: A novel virulence determinant. J Infect Dis. 2001;184(12):1572-80.

6- Burine JP, Matthews RC, Carter T, Beaulieu E, Donohoe M, Chapman C, et al. Identification of an immunodominant ABC transporter in methicillin resistant Staphylococcus aureus infection. Infect Immun. 2000;68(6):3200-9.

7- Etz H, Min DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, et al. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from Staphylococcus aureus. Appl Biol Sci. 2002;99(10):6573-8.

8- Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, et al. Identification of vaccine candidate antigens of Staphylococcus aureus by serological proteome analysis. Proteomics. 2002;2(5):580-90.

9- Foster TJ. Potential for vaccination against infections caused by Staphylococcus aureus vaccine. Vaccine. 1991;9(4):221-7.

10- Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vernachio JH, Syribeys PJ, Gorovits EL, et al. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing Staphylococcus aureus MSCRAMM protein clumping factor A. Infect Immun. 2003;71(12):6864-70.

11- Hu DL, Omoe K, Sasaki S, Sashinami H, Sakuraba H, Yokomizo Y, et al. Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against Staphylococcus aureus infection. J Infect Dis. 2003;188(5):743-52.

12- Dumitrescu O, Tristan A, Meugnier H, Bes M, Gouy M, Etienne J, et al. Polymorphism of the Staphylococcus aureus Panton-valentine leukocidin genes and its possible link with the fitness of community-associated methicilin-resistant S. aureus. Infect Dis. 2008;198(5):792-4.

13- Blaiotta G, Fusco V, VonEiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of entritoxigenic Staphylococcus aureus by entrotoxin gene cluster (egc) polymorphism. Appl Environ Mcrobial. 2006;72(9):6117-23.

14- Kim YK, Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM. Molecular typing of Staphylococcus aureus isolated from blood on the basis of coagulase gene polymorphism and toxin genes. Korean J Lab Med. 2008;28(4):286-92.

15- Silva ER, Boechat JU, Silva N. Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from goat mastitis in Brazilaien dairy herds. Lett Appl Microbial. 2006;42(1):30-4.

16- Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, et al. Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. N Engl J Med. 2002;346(7):491-6.

17- Senna JP, Roth DM. Protective immune response against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a murine model using a DNA vaccine approach. Vaccine. 2003;21(19-20):2661-6.

18- Nelly AK, Desmond JC, Susan S, James C, Leslie DC, Tessie M, et al. A novel Staphylococcus aureus vaccine: Iron surface determinant B induces rapid antibody responses in Rhesus macaques and specific increased survival in a murine S. aureus sepsis model. Infec Immun. 2006;74(4):2215-23.

19- Yukiko K. Stranger J, Taeok B, Olaf S. Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus. Emil C, editor. New York: Rockefeller University Publication; 2006.

20- Dryla A, Prustomersky S, Gelbmann D, Hanner M, Beetinger E, Kocsis B. Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy individuals and in acutely infected patients. Clin Diagn Lab Immun. 2005;12(3):387-39.

21- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. J Bacteriol. 2005;187(7):2426-38.

22- Menbari SH, Pourmand MR, Shirazi MH, Mardani N. Cloning and sequencing of Sacol a novel gene from Staphylococcus aureus. Iran Med Microbial J. 2008;2(1):9-14.