View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by kashan university of medical sciences

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

Original Article

Gene molecular study of biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from fresh milk using multiplex polymerase chain reaction

Mahmoudi-Kojedi A, Amini K*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I. R. Iran.

Received December 3, 2016; Accepted June 8, 2017

Abstract:

Background: *Staphylococcus aureus* is one of the main causes of food poisoning in the world. This pathogen has the ability to create biofilms that can lead to food contamination. The presence of biofilm genes in bacteria is very important. The aim of this study was to identify sticky genes (*eno*, *cna*, *ebp*, *bbp*) that play an important role in virulence and pathogenicity of the bacteria and even prevent the penetration of antibiotics in pathogenicity time.

Materials and Methods: A total of 100 samples of fresh milk were collected from live animals and 60 isolates were selected to identify sticky genes (*eno*, *cna*, *ebp*, *bbp*) in the production of biofilm of *S. aureus* using the multiplex polymerase chain reaction method. In addition, the frequency rates of *S. aureus* strains resistant and susceptible to antibiotics such as methicillin, vancomycin, and clindamycin were determined among the samples.

Results: From a total of 60 isolates of fresh milk, 43.4% of the colonies had laminin-binding protein gene or *eno* gene. Also, 90% of the isolates were sensitive to vancomycin, 50% sensitive to clindamycin and 43.4% sensitive to methicillin. Distribution rates of other sticky genes including *ebp*, *cna*, *bbp* were 11.6%, 20% and 25%, respectively. Molecular study results showed that the highest and lowest percentages of genes were related to the *eno* and *bbp* genes, respectively.

Conclusion: The present study shows that the maximum sensitivity of the samples (90%) was related to vancomycin and the least amount of sensitivity (43.3%) was related to methicillin.

Keywords: Milk, Biofilm, *Staphylococcus aureus*, Multiplex polymerase chain reaction

* **Corresponding Author.**
Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
Tel: 0098 912 545 4074
Fax: 0098 8642 241 511

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 352-358

Please cite this article as: Mahmoudi-Kojedi A, Amini K. Gene molecular study of biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from fresh milk using multiplex polymerase chain reaction. ***Feyz*** 2017; 21(4): 352-8.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

بررسی مولکولی ژن‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیر خام با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه

عاطفه محمودی کجیدی [۱]، کیومرث امینی [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی در جهان می‌باشد. این باکتری پاتوژن توانایی ایجاد بیوفیلم را دارا بوده که می‌تواند منجر به ایجاد آلودگی‌های غذایی گردد. حضور ژن‌های بیوفیلم در باکتری بسیار حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه شناسایی وجود ژن‌های چسبنده در باکتری است که نقش بسیار مهمی در ویرولانس و قدرت بیماری‌زایی آن داشته و حتی از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها در زمان بیماری‌زایی جلوگیری به‌عمل می‌آورد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه شیر تازه از دام زنده جمع‌آوری شد و به‌منظور شناسایی ژن‌های چسبنده *(eno, cna, ebp, bbp)* در ساخت بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۶۰ جدایه از آن‌ها با روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه براین، فراوانی استافیلوکوکوس‌های مقاوم و حساس به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، ونکومایسین و کلیندامایسین در بین نمونه‌های مورد مطالعه نیز تعیین گردید.

نتایج: از مجموع ۶۰ جدایه از شیر تازه، ۴۳/۴ درصد کلونی‌ها دارای ژن کدکننده پروتئین متصل شونده به لامینین یا همان ژن *eno* بودند. به‌علاوه، ۹۰ درصد نمونه‌ها حساس به ونکومایسین، ۵۰ درصد حساس به کلیندامایسین و ۴۳/۴ درصد حساس به متی‌سیلین بودند. هم‌چنین، توزیع سایر ژن‌های چسبنده (*ebp, cna, bbp*) به‌ترتیب ۱۱/۶، ۲۰ و ۲۵ درصد بود. نتایج بررسی مولکولی حاکی از آن بود که بیشترین درصد ژن موجود، *eno* بوده و کمترین درصد مربوط به *bbp* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت در مطالعه حاضر بیشترین میزان حساسیت نمونه‌ها (۹۰ درصد) به ونکومایسین بوده و کمترین مقدار حساسیت (۴۳/۳ درصد) مربوط به متی‌سیلین می‌باشد.

واژگان کلیدی: شیر، بیوفیلم، *استافیلوکوکوس اورئوس*، PCR چندگانه

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۵۸-۳۵۲

مقدمه

در دهه‌های گذشته وقوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی نه‌تنها در کشورهای درحال‌توسعه با فقر بهداشتی، که در کشورهای توسعه‌یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز روبه‌افزایش بوده و این درحالی‌است‌که وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی اغلب گزارش نشده است. عوامل بیماری‌زای غذایی تهدید کننده بهداشت عمومی کشورها هستند و می‌توانند توسط رعایت ضوابط بهداشتی در فرآیند تهیه مواد غذایی از وقوع آن‌ها جلوگیری نمود. عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مواد غذایی اثر مهمی بر سلامت عمومی دارد [۱].

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ابتدا در غذا رشد کرده، افزایش می‌یابد و پس از تولید سم، باعث ایجاد مسمومیت غذایی می‌گردد. انتروکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، گروهی هتروژن از پروتئین‌های کروی و تک‌رشته‌ای قابل حل در آب و مقاوم به حرارت می‌باشند که متعلق به خانواده بزرگی از توکسین‌ها به‌نام توکسین‌های پیوژن هستند [۲]. این باکتری کوکسی گرم مثبت و کاتالاز مثبت بوده و هم‌چنین دارای متابولیسم اکسیداتیو و متابولیسم تخمیری می‌باشد. جنس استافیلوکوک دارای بیش از ۲۷ گونه و ۷ زیرگونه بوده و شایع‌ترین گونه آن که اغلب عامل بیماری استافیلوکوکی می‌باشد، استافیلوکوک طلایی است. *استا-فیلوکوک اورئوس*، مقداری ترکیبات خارج سلولی تولید کرده که شامل همولیزین‌ها، آنتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، کواگولاز، نوکلئاز و لیپاز می‌باشد. در هر غذا درجه حرارت بهینه جهت تولید آنتروتوکسین چند درجه بیشتر از درجه حرارت بهینه برای رشد است؛ تغییر درجه حرارت تولید آنتروتوکسین را بیشتر از رشد تحت تأثیر قرار می‌دهد. رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در pH بین ۹/۸-۴ اتفاق می‌افتد و pH بهینه آن برابر ۷-۶ بوده و البته pH به‌تنهایی عامل مؤثر بر رشد و تولید آنتروتوکسین

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه

* **نشانی نویسنده مسئول:**
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴ **دورنویس:** ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۶/۳/۱۸

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

نمی‌باشد. در شرایط هوازی رشد و تولید آنتروتوکسین در pH=۴ نیز صورت می‌گیرد، درصورتی‌که در شرایط بی‌هوازی این محدوده به ۴/۶ در مورد رشد و ۵/۳ در مورد تولید توکسین تغییر می‌یابد؛ به‌همین‌دلیل از اسیدهای آلی به‌عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. اسیدهای آلی که فعالیت ضد میکروبی دارند عبارتند از: لاکتیک، رپیونیک، سوربیک و بنزوئیک. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در درجه حرارتی که معمولا در فرآوری غذاها استفاده می‌شود از بین رفته ولی حرارت ۷۱/۱ برای اغلب سویه‌های استا-فیلوکوکوس کشنده است [۲]. امروزه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به‌موقع عفونت‌های میکروبی استفاده می‌شود. باتوجه به شایع بودن آلودگی نمونه‌های لبنی به انواع گونه‌های استافیلوکوکوس و هم‌چنین بازده پائین روش‌های پاراکلینیکی، هم‌چون کشت میکروبی، می‌توان گفت که جایگزینی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌جای روش‌های مذکور کمک به‌سزائی در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن می‌نماید [۳]. یکی از عوامل مهم در افزایش قدرت بیماری‌زایی و مقاومت در برابر عوامل ضدمیکروبی توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم یک جمعیت میکروبی پیچیده و به‌هم چسبیده است که توسط یک ماده زمینه‌ای پلیمری خارج سلولی که توسط خود میکروب تولید می-شود احاطه شده است [۴]. بیوفیلم دارای ویژگی‌های کلینیکی مهمی است که باکتری‌های موجود دارای مقاومت ذاتی به آنتی-بیوتیک‌ها بوده و باعث کاهش بازده درمانی می‌گردند. در مواردی که باکتری قادر به تشکیل بیوفیلم باشد، میزان بروز عفونت بیمارستانی پیچیده را افزایش می‌دهد. بیش از ۸۰ درصد عفونت-های مزمن بیمارستانی ناشی از تشکیل بیوفیلم است. توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* برای اتصال و تشکیل بیوفیلم یک مرحله تعیین کننده از مزمن شدن بیماری است [۵]. در این بین ژن-های *eno*، *ebp*، *cna* و *bbp* عامل تولید پروتئین‌های متصل شونده بوده که در ایجاد کلونیزاسیون و تولید بیوفیلم برای باکتری به‌منظور ایجاد عفونت نقش اساسی دارند [۶]. هدف از این تحقیق شناسایی ژن‌ها چسبنده بیوفیلم (*eno*، *ebp*، *cna* و *bbp*) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر تازه بوده است.

مواد و روش‌ها

ابتدا ۱۰۰ نمونه شیر از گاوداری‌های منتخب جمع‌آوری گردید. تعداد ۶۰ جدایه از باکتری مورد نظر در محیط مانیتول-سالت‌آگار کشت داده شد و پس از مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مذکور، پلیت‌ها بررسی شده و باکتری مد نظر با اطمینان شناسایی گردید.

آزمایشات بیوشیمیایی

باتوجه به اهمیت استریل بودن محیط‌های کشت، محلول-ها و ظروف شیشه‌ای توسط اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پاسکال به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از تهیه جدایه‌ها اقدام به کشت، جداسازی و تأیید بیوشیمیایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گردید. بهترین راه ارزیابی تشخیصی برای باکتری کشت در محیط مانیتول‌سالت‌آگار بود. از سایر تست-ها جهت اطمینان بیشتر در شناسایی و تشخیص استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده دیگر، مولرهینتون‌آگار (مرک، آلمان) بود که جهت انجام آنتی‌بیوگرام استفاده شد. باانجام چهار تست تشخیصی دیگر و با ایجاد همولیز بتا در محیط بلادآگار، تمایز بین استا-فیلوکوک کوآگولاز مثبت از سایر استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی صورت پذیرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها بر مبنای نیم‌مک‌فارلند

استاندارد مک‌فارلند جهت بررسی تاثیر مواد ضد-میکروبی از سوسپانسیون ضدمیکروبی با تراکم مناسب استفاده می-شود. از کلونی تازه کشت شده (۱۶ تا ۲۴ ساعت) برداشت کرده و در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. پس از تهیه محلول هموژن، با سواب استریل آن را به محیط کشت مولرهینتون-آگار انتقال داده و به‌طور کامل به‌وسیله سواب روی محیط یکنواخت کشت شد. بعد از کشت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: سفپیم، نیتروفورانتوئین، سفتریاکسون، سفکسیم، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، و آمپی-سیلین انتخاب شده و روی محیط کشت قرار گرفتند. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بعد از ۲۴-۱۸ ساعت زیر نور چراغ بررسی شده تا قطر هاله عدم رشد را بتوان با خط‌کش اندازه‌گیری نمود. باتوجه به جدول همراه دیسک‌ها، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت حساس، مقاوم و یا نیمه‌حساس بیان شد. به‌منظور اطمینان حاصل کردن از کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی خریداری شده، آنها توسط سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* CCTA۲۵۹۲۳ مورد ارزیابی و تائید قرار گرفتند. آزمایش دیسک‌دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های آنتی-بیوتیکی روی جدایه‌های مورد آزمایش انجام گرفت. پرایمرها پس از طراحی و ساخت از طرف شرکت سازنده (سیناژن، ایران) به-صورت لیوفیلیزه جهت انجام تست PCR چندگانه از پرایمرهای تجاری جهت شناسایی ژن‌های چسبنده بیوفیلم باکتری (*eno*، *ebp*، *cna* و *bbp*) در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت (جدول شماره ۱). ابتدا هر ویال از پرایمر با ۵۰۰ میکرولیتر آب

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

مقطر DNase free که از همان شرکت تامین شده بود، مخلوط شد و چند مرتبه هم‌زده شد تا کاملا مخلوط و حل گردد. پس از تهیه استوک ۱۰ میکرومولار از این مخلوط، پرایمرها با غلظت ۱ میکرومول برای ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش استفاده شدند. در پایان نیز محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های بیوفیلم استخراج شده از شیر دامی از نظر وجود ژن‌های *ebpS*، *eno*، *cna* و *bbp* و ارتباط این ژن-ها با یکدیگر مورد بررسی و مطالعه قرارگرفتند.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

ژن	پرایمر	Nucleotide sequence در جهت '5 به '3	اندازه محصول
bbp	BBP-F BBP-R	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	575
cna	CAN-F CAN-R	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423
eno	ENO-F ENO-R	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302
ebpS	EBP-F EBP-R	CATCCAGAACCAATCGAAGAC CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	186

نتایج

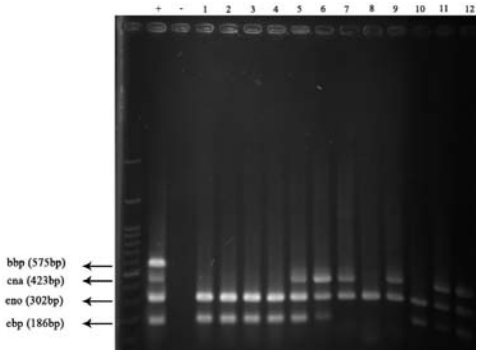
نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی انجام شده در این تحقیق به این قرار هستند: تست کاتالاز مثبت، تست کوآگولاز مثبت، تست DNase مثبت، کشت مانیتول‌سالت‌آگار به‌دلیل وجود قند مانیتول و معرف فنل رد، پس از رشد استافیلوکوک طلایی تولید کلونی زرد رنگ با هاله زرد رنگ نمود، درصورتی‌که سایر استافیلوکوک-ها معمولا کلونی‌های قرمز با هاله بنفش رنگ ایجاد می‌کنند. در ادامه بررسی تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و انجام تست آنتی‌بیوگرام مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI صورت گرفت که نتایج آن در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی بر حسب حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده در مطالعه حاضر

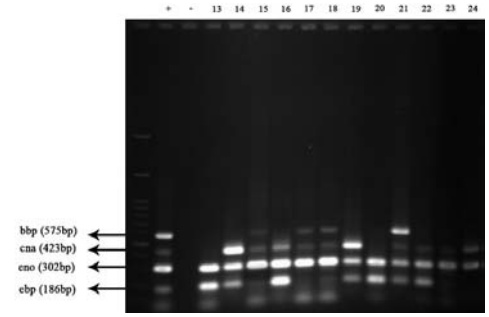
نوع	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
نوع آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کلیندامایسین	۱۱(۱۸/۴)	۱۹(۳۱/۶)	۳۰(۵۰)
ونکومایسین	۰	۶(۱۰)	۵۴(۹۰)
متی‌سیلین	۳۱(۵۱/۶)	۳(۵)	۲۶(۴۳/۴)

نتایج آزمون‌های PCR چندگانه

پس از تایید نتایج تست‌های بیوشیمیایی و میکروبی از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برای انجام PCR چندگانه از چهار جفت پرایمر معرفی شده در جدول شماره ۱ (*ebp*، *eno*، *cna*، *bbp*) استفاده شد و نتایج آن‌ها در شکل‌های شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده هستند. در نمودار شماره ۱ نیز توزیع درصد و فراوانی ژن‌ها بیان شده است.

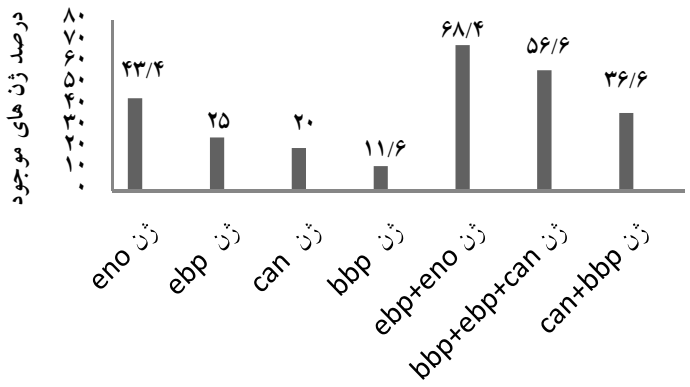


شکل شماره ۱- تعیین هویت نمونه‌های ۱۲-۱ *استافیلوکوکوس اورئوس با روش* PCR چندگانه با استفاده از چهار جفت آغازگر *ebp* (186 bp)، *eno* (302 bp)، *can* (423 bp)، *bbp* (575 bp). از سمت چپ: مارکر ۱۰۰ bp، ستون +: شاهد مثبت، ستون -: شاهد منفی (*اشریشیا کلی*) و ستون‌های ۱۲-۱: سویه‌های مجهول به لحاظ ژن‌های *ebp*، *eno*، *cna*.



شکل شماره ۲- تعیین هویت نمونه‌های ۲۴-۱۳ *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش PCR چندگانه با استفاده از چهار جفت آغازگر ebp (186 bp)، eno (302 bp)، can (423 bp)، bbp (575 bp). از سمت چپ مارکر ۱۰۰ bp، ستون +: شاهد مثبت، ستون -: شاهد منفی (*اشریشیا کلی*) و ستون‌های ۲۴-۱۳: سویه‌های مجهول به لحاظ ژن‌های *ebp*، *eno*، *cna*.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017



نمودار شماره ۱- توزیع درصد ژن‌های چسبنده در جدایه‌های شیر تازه گاو

بحث

تشکیل بیوفیلم از عوامل بیماری‌زای مهم بوده و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزبان محافظت می‌نماید. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بیشترین موارد مسمومیت‌های غذایی باکتریال را شامل می‌شود. ژن‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای تنوع فراوانی بوده و هریک از این ژن‌ها نقشی در چسبندگی باکتری به بافت را برعهده دارند. ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل *eno*؛ ژن کد کننده پروتئین متصل شونده به لامینین که بخشی از غشای پایه سلول می‌باشد، ژن *ebp*؛ کد کننده اتصال به الاستین، *cna*؛ ژن کد کننده اتصال به کلاژن و *bbp*؛ ژن کد کننده اتصال به سیالوپروتئین مربوط به استخوان می‌باشد [۶،۴]. در مطالعات مشابه که شناسایی عوامل موثر بر چسبندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت‌های خونی در انسان به روش PCR چندگانه پرداخته است، از بین ۱۵۷ نمونه جداشده از سوآب بینی افراد بدون علائم بالینی و بیماران مبتلا به اُستئومیلیت، تمام نمونه‌ها دارای ژن‌های *eno* و *clfB* بوده‌اند، ۴۳ درصد افراد مورد بررسی دارای ژن *ebp*، ۳۶ درصد دارای ژن *cna* و ۲۲ درصد ژن *bbp* بوده‌اند، همچنین، یک نمونه از بین ۹ ژن مورد بررسی دارای ۸ ژن بوده است، ۲۰ نمونه ۷ ژن از ۹ ژن را دارا بوده و ۶۷ نمونه دارای ۶ ژن مورد بررسی در این تحقیق بوده است [۸،۷]. طبق گزارشات، ۴۰-۱۴ درصد همه موارد بیماری‌های منتقله از راه غذا را به این باکتری نسبت می‌دهند [۱۰،۹]. در تحقیق حاضر ۲۵ درصد نمونه‌ها فاقد ژن‌های مورد ارزیابی بودند، ولی بیشترین درصد مربوط به ژن *eno* بوده و کمترین مورد مربوط به ژن *bbp* می‌باشد. باتوجه به آنتی‌بیوگرام انجام شده، ۹۰ درصد نمونه‌ها به ونکومایسین حساس بودند و در کمترین مقدار حساسیت مربوط به متی‌سیلین، ۴۳/۳ درصد، بود. علت آنکه بیشترین تعداد ژن *eno* در نمونه‌ها دیده شد را این‌گونه می‌توان بررسی کرد که ژن *eno* به‌دلیل کد کردن پروتئین‌های متصل شونده به غشای پایه سلولی در درمان زخم‌های عمقی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* اهمیت بالاتری دارد؛ چراکه برای درمان زخم‌ها و عفونت‌های استافیلوکوکی بتوان نتیجه بهتر و سریع‌تری اتخاذ گردد. De و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه خود نشان دادند که از ۷۱ نمونه پنیر جمع‌آوری شده، ۴۳ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت و ۹ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* پاتوژنیک بودند و درصد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر ۸/۱۲ درصد بود [۱۱]. در یک مطالعه ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم (۱۳ ژن) به‌همراه گروه‌های agr با پرایمرهای اختصاصی به‌صورت PCR ساده، دوگانه و چندگانه و از ۱۲۰ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های مختلف کلینیکی بررسی گردیده، و فراوانی ژن‌های بیوفیلم در سویه‌های حساس به متی‌سیلین به این صورت گزارش گردید: ژن‌های *eno* ۸۷ درصد، *cna* ۶۳ درصد، *ebps* ۹ درصد، *bbp* ۱/۰۷ درصد، *clfA* ۹۹ درصد، *fnbA* ۶۶ درصد، *fnbB* ۵/۳۶ درصد، *fib* ۵۷ درصد، *icaA* ۷۱ درصد، *icaB* ۴۱ درصد، *icaC* ۷۶ درصد و *icaD* ۸۹ درصد. هم‌چنین، در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین فراوانی ژن‌های *eno* ۹۶ درصد، *ebps* ۲۲ درصد، *cna* ۵۵ درصد، *bbp* صفر درصد، *clfA,B* ۱۰۰ درصد، *fnbA* ۴/۸۱ درصد، *fnbB* ۶۳ درصد، *fib* ۵۶ درصد، *icaA* ۷۴ درصد، *icaB* ۷۴ درصد، *icaC* ۶۳ درصد و *icaD* ۷۴ درصد تعیین شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به‌طور قابل توجهی بالاتر بود [۱۲]. ژن *cna* در بافت‌ها استقرار یافته و در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم، استئومیلیت، آرتریت عفونی و عفونت‌های استافیلوکوکی موثر است؛

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

ازاین‌رو، انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط با قابلیت ژنتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به لحاظ داشتن پروتئین‌های سطحی امری ضروری به‌نظر می‌رسد و این فاکتور ویرولانس در سویه‌های مهاجم بیشتر یافت می‌شود [۱۳]. Kuzma و همکاران در بررسی ۱۲۶ نمونه اخذ شده از دام‌های مبتلا به عفونت پستان با استفاده از روش PCR اقدام به یافتن ژن‌های تشکیل‌دهنده (*fnbA, fnbB, fib, clfA, clfB, bbp, cna, eno ebpS and spa*) بیوفیلم نمودند. تقریبا تمام نمونه دارای ۳ ژن *clfA, clfB, fib* بوده و *ebp* در ۸۲ مورد، *cna* در ۱۴ مورد و *bbp* در ۹ مورد یافت شد. درصد ژن‌های *fib, clfA, clfB, fnbA fnbB, eno ebpS* در این تحقیق قابل مقایسه با ژن‌های موجود در منابع انسانی بوده و شیوع ژن‌های *bbp* و *cna* در انسان بیشتر از منابع دامی می‌باشد [۱۴]. در یک مطالعه مشابه دیگر همه جدایه‌های مورد مطالعه به ونکومایسین حساس بودند. مقاومت به اگزاسیلین ۳۰ درصد و در سویه‌های حساس به متی‌سیلین مقاومت به تترا-سایکلین ۶/۶۶ درصد، اریترومایسین ۱۱/۱۱ درصد، کوتریموکسا-زول ۴/۴۴ درصد، آموکسی‌سیلین ۹۰ درصد، جنتامایسین ۴/۴۴ درصد و کلیندامایسین ۶/۶۶ درصد تعیین شد. هم‌چنین، در سویه-های مقاوم به متی‌سیلین مقاومت به تتراسایکلین ۳۱/۱۱ درصد، اریترومایسین ۷۷ درصد، تری‌متوپریم-متوکسازول ۲۳/۳۳ درصد، آموکسی‌سیلین ۸۷ درصد، جنتامایسین ۵۶/۶۶ درصد و کلیندا-مایسین ۷۶/۷ درصد تعیین شد [۱۵]. Fueyo و همکاران بیان کرده‌اند که ظرفیت چسبندگی استافیلوکوک‌ها به سلول‌های میزبان و خواص سطح باکتری بستگی داشته که یکی از آنها خاصیت آب‌گریزی است. تولید بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* با ایجاد لایه نازک در سویه‌های بیماری‌زا در پی عفونت‌های جراحی عامل مهمی در تشدید عفونت بوده و در کشت حاصل از نمونه-گیری به چشم می‌خورد. حضور این سویه‌های چسبنده در مخاطات افراد مبتلا به سینوزیت در عود مجدد بیماری کمک زیادی می‌نماید [۱]. در سال ۲۰۱۱ محققین گزارش کرده‌اند که ۹۰ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ۲۵ درصد سویه‌های این باکتری نسبت به کلیندامایسین مقاوم هستند [۱۱] که این نتایج با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابقت کمتری داشت، زیرا در مطالعه کنونی نمونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سلین حدود ۲۷/۵ درصد نمونه‌ها را تشکیل می-دادند و مقاومت به کلیندامایسین در حدود ۱۷/۵ درصد مشاهده شد؛ بااین‌وجود، مقاومت به متی‌سلین نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک-های مورد آزمایش بیشتر بود.

نتیجه گیری

در مجموع می توان گفت ۹۰ درصد نمونه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر حساس به ونکومایسین، ۵۰ درصد حساس به کلیندامایسین و ۴۳/۴ درصد حساس به متی‌سیلین بودند. همچنین، توزیع سایر ژن‌های چسبنده (ebp, cna, bbp) به‌ترتیب ۱۱/۶، ۲۰ و ۲۵ درصد بود و نتایج بررسی‌های مولکولی حاکی از آن بود که بیشترین درصد ژن موجود مربوط به eno بوده و کمترین درصد مربوط به bbp می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد تهران به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده ایشان و از عزیزانی که در مسیر انجام این تحقیق ما را یاری و همراهی نمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Fueyo JM, Mendoza MC, Martin MC. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in Staphylococcus aureus recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. ***Microb Infect*** 2005; 7(2): 187-94.

[2] Adwan GM, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk in the North of Palestine. ***Turk J Biol*** 2006; 29(4): 229-32.

[3] Qasemi HR. Iran and Its Policy Against Terrorism. Eradicating Terrorism from the Middle East: Springer; 2016. p. 201-21.

[4] Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of Staphylococcus aureus from hospitalized children. ***Iran J Pathol*** 2015; 10(4): 258-64.

[5] Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. Prevalence of cna fnbA and fnbB adhesin genes among Staphylococcus aureus isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. ***FEMS Microbiol Letters*** 2005; 246(1): 81-6.

[6] Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in Staphylococcus

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:35 +0330 on Saturday November 11th 2017

aureus biofilms. ***J Bacteriol*** 2004; 186(6): 1838-50.
[7] Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. ***J Appl Environ Microbiol*** 2003; 69(1): 18-23.
[8] Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. ***J Clin Microbiol*** 2003; 41(9): 4465-7.
[9] Maktabi S, Pourmehdi M, Zarei M, Fooladgar AA. Detection of Antibiotic Resistant Listeria spp. in Beef Burgers Distributed in Ahvaz City, Iran. ***Jundishapur J Health Sci*** 2016; 8(2).
[10] Bakhshandeh H, Soleimani M, Hosseini SS, Hashemi H, Shabani I, Shafiee A, et al. Poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous ring surrounding a polyvinyl alcohol hydrogel for the development of a biocompatible two-part artificial cornea. ***Int J Nanomedicine*** 2011; 6: 1509.
[11] De S, Brahma B, Polley S, Mukherjee A, Banerjee D, Gohaina M, et al. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. ***Food Control*** 2011; 22(5): 690-6.
[12] El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Marialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya. ***J Med Microbiol*** 2006; 55(2): 179-82.
[13] Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. ***Clin Infectious Dis*** 2008; 46(Supplement 5): S350-9.
[14] Kuzma K, Malinowski E, Klossowska A, Kaczmarowski M, Smulski S. Detection of adhesin genes by PCR and analysis of their distribution in Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis. ***Bull Vet Inst Pulawy*** 2006; 50(3): 319.
[15] Miller LG, Diep BA. Colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. ***Clin Infect Dis*** 2008; 46(5): 752-60.