

## 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.

# بررسی مولکولی ژن‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمر از چندگانه

عاطفه محمودی کجیدی<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>

## خلاصه:

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

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۰۰ نمونه شیر تازه از دام زنده جمع‌آوری شد و به منظور شناسایی ژن‌های چسبنده (*eno*, *cna*, *ebp*, *bbp*) در ساخت بیوفیلیم *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۶۰ جدایه از آن‌ها با روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، فراوانی *استافیلوکوکوس*‌های مقاوم و حساس به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، ونکومايسين 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. به علاوه، ۹۰ درصد نمونه‌ها حساس به ونکومايسين، ۵۰ درصد حساس به کلیندامایسین و ۴۳/۴ درصد حساس به متی‌سیلین بودند. همچنین، توزیع سایر ژن‌های چسبنده (*ebp*, *cna*, *bbp*) به ترتیب 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 ونکومايسين بوده و کمترین مقدار حساسیت (۴۳/۳ درصد) مربوط به متی‌سیلین می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** شیر، بیوفیلیم، *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 نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی، که در کشورهای توسعه‌یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز روبه‌افزایش بوده و این در حالی است که 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. آنتروکسین‌های *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 به نام 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 طلائی* است. *استافیلوکوک اورئوس*، مقداری ترکیبات خارج سلولی تولید کرده که شامل همولیزین‌ها، آنتروتوکسین‌های *استافیلوکوکی*، کوآگولاز، 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 ۴-۹/۸ اتفاق می‌افتد و pH بهینه آن برابر ۶-۷ بوده و البته pH به‌تنهایی عامل مؤثر بر رشد و تولید آنتروتوکسین

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه

<sup>۲</sup> 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\_amin@yaho.com

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

نمی‌باشد. در شرایط هوایی رشد و تولید آنتروتوکسین در  $pH=4$  نیز صورت می‌گیرد، در صورتی که در شرایط بی‌هوایی این محدوده به  $4/6$  در مورد رشد و  $5/3$  در مورد تولید توکسین تغییر می‌یابد؛ به همین دلیل از اسیدهای آلی به‌عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. اسیدهای آلی که فعالیت ضد میکروبی دارند عبارتند از: لاکتیک، ریپونیک، سوربیک و بنزوئیک. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در درجه حرارتی که معمولاً در فرآوری غذاها استفاده می‌شود از بین رفته ولی حرارت  $71/1$  برای اغلب سویه‌های استا-فیلوکوکوس کشنده است [۲]. امروزه از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به‌موقع عفونت‌های میکروبی استفاده می‌شود. با توجه 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 پلیمرز 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 ضد میکروبی 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 می‌شود 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 عفونت‌های مزمن بیمارستانی ناشی از تشکیل بیوفیلم است. توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* برای اتصال و تشکیل بیوفیلم یک مرحله تعیین‌کننده 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  $37$  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  $121$  درجه سانتی‌گراد و فشار  $15$  پاسکال به‌مدت  $15$  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، مولر هینتون‌آگار (مرک، آلمان) بود که جهت انجام آنتی‌بیوگرام استفاده شد. با انجام چهار تست تشخیصی دیگر و با ایجاد همولیز بتا در محیط بلا‌آگار، تمایز بین استا-فیلوکوک کوآگولاز مثبت از سایر *استافیلوکوک*‌های کوآگولاز منفی صورت پذیرفت.

### آماده‌سازی نمونه‌ها بر مبنای نیم‌مک‌فارلند

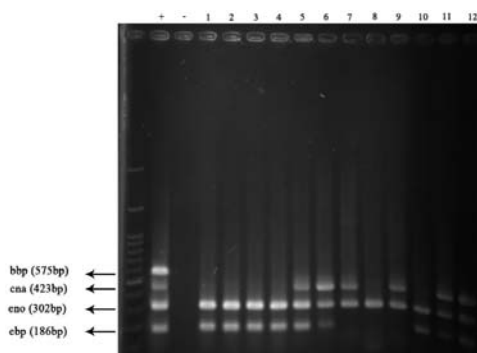
استاندارد مک‌فارلند جهت بررسی تاثیر مواد ضد-میکروبی از سوسپانسیون ضد میکروبی با تراکم مناسب استفاده می‌شود. از کلونی تازه کشت شده ( $16$  تا  $24$  ساعت) برداشت کرده و در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. پس از تهیه محلول هموژن، با سواب استریل آن را به محیط کشت مولر هینتون-آگار انتقال داده و به‌طور کامل به‌وسیله سواب روی محیط یکنواخت کشت شد. بعد از کشت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: سفپیم، نیتروفوران‌توئین، سفتریاکسون، سفکسیم، نالیدیکسیک اسید، اریتروماکسین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، و آمپی-سیلین انتخاب شده و روی محیط کشت قرار گرفتند. پلیت در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بعد از  $24-18$  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 هر یک 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* CCTA25923 مورد ارزیابی و تأیید 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  $500$  میکرولیتر آب

پایان نیز محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های بیوفیلیم استخراج شده از شیر دامی از نظر وجود ژن‌های *eno*، *ebpS* و *bbp* و ارتباط این ژن‌ها با یکدیگر مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند.

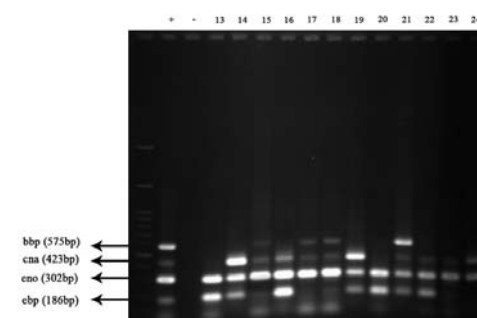
مقتر DNase free که از همان شرکت تامین شده بود، مخلوط شد و چند مرتبه هم‌زده شد تا کاملاً مخلوط و حل گردد. پس از تهیه استوک ۱۰ میکرومولار از این مخلوط، پرایمرها با غلظت ۱ میکرومول برای ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش استفاده شدند. در

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

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



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



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

## نتایج

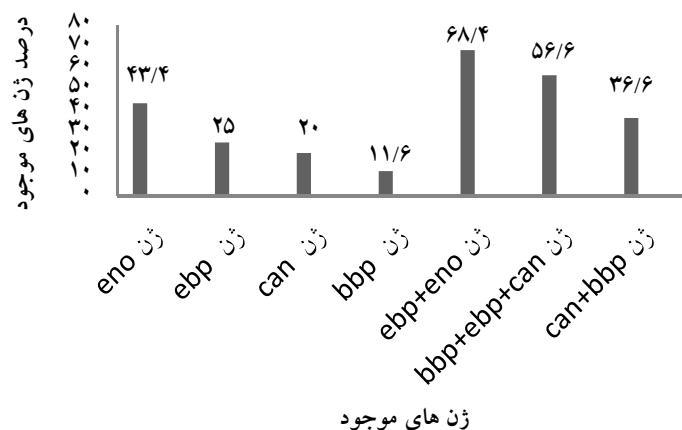
نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی انجام شده در این تحقیق به این قرار هستند: تست کاتالاز مثبت، تست کوآگولاز مثبت، تست DNase مثبت، کشت مانیتول‌سالت‌آگار به دلیل وجود قند مانیتول و معرف فتل رد، پس از رشد استافیلوکوک طلایی تولید کلونی زرد رنگ با هاله زرد رنگ نمود، در صورتی که سایر استافیلوکوک‌ها معمولاً کلونی‌های 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 اورئوس جدا شده در مطالعه حاضر

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

## 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 (*eno*، *ebp*)، *cna*، *bbp*) استفاده شد و نتایج آن‌ها در شکل‌های شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده هستند. در نمودار شماره ۱ نیز توزیع درصد فراوانی ژن‌ها بیان شده است.



نمودار شماره ۱- توزیع درصد ژن های چسبنده در جدایه های شیر تازه گاو

## بحث

به متی سیلین، ۴۳/۳ درصد، علت آنکه بیشترین تعداد ژن *eno* در نمونه ها دیده شد را این گونه می توان بررسی کرد که ژن *eno* به دلیل کد کردن پروتئین های متصل شونده به غشای پایه سلولی در درمان زخم های عمقی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس اهمیت بالاتری دارد؛ چراکه برای درمان زخم ها و عفونت های استافیلوکوکی بتوان نتیجه بهتر و سریع تری اتخاذ گردد. De و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه خود نشان دادند که از ۷۱ نمونه پنیر جمع آوری 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 ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم (۱۳ ژن) به همراه گروه های *agr* با پرایمرهای اختصاصی به صورت PCR ساده، دوگانه و چندگانه و از ۱۲۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های مختلف کلینیکی بررسی گردیده، و فراوانی ژن های بیوفیلم در سویه های حساس به متی سیلین به این صورت گزارش گردید: ژن های *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. هم چنین، در سویه های مقاوم به متی سیلین فراوانی ژن های *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 آنتی بیوتیکی در سویه های مقاوم به متی سیلین به طور قابل توجهی بالاتر بود [۱۲]. ژن *cna* در بافت ها استقرار یافته و در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم، استئو-میلیت، آرتریت عفونی و عفونت های استافیلوکوکی موثر است؛

تشکیل بیوفیلم از عوامل بیماری زای مهم بوده و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزبان محافظت می نماید. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بیشترین موارد مسمومیت های غذایی باکتریال را شامل می شود. ژن های تشکیل دهنده بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس دارای تنوع فراوانی بوده و هریک از این ژن ها نقشی در چسبندگی باکتری به بافت را برعهده دارند. ژن های مورد بررسی در این تحقیق شامل *eno*؛ ژن کد کننده پروتئین متصل شونده به لامینین که بخشی از غشای پایه سلول می باشد، 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 می باشد [۶،۴]. در مطالعات مشابه که شناسایی عوامل موثر بر چسبندگی استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت های خونی در انسان به روش PCR چندگانه پرداخته است، از بین ۱۵۷ نمونه جدا شده از سوآب بینی افراد بدون علائم بالینی و بیماران مبتلا به استئومیلیت، تمام نمونه ها دارای ژن های *eno* و *clfb* بوده اند، ۴۳ درصد افراد مورد بررسی دارای ژن *ebp*، ۳۶ درصد دارای ژن *cna* و ۲۲ درصد ژن *bbp* بوده اند، 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 بیماری های منتقله از راه غذا را به این باکتری نسبت می دهند [۱۰،۹]. در تحقیق حاضر ۲۵ درصد نمونه ها فاقد ژن های مورد ارزیابی بودند، ولی بیشترین درصد مربوط به ژن *eno* بوده و کمترین مورد مربوط به ژن *bbp* می باشد. باتوجه به آنتی بیوگرام انجام شده، ۹۰ درصد نمونه ها به ونکومایسین حساس بودند و در کمترین مقدار حساسیت مربوط

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 می‌دادند و مقاومت به کلیندامایسین در حدود ۱۷/۵ درصد مشاهده شد؛ با این وجود، مقاومت به متی‌سلین نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بیشتر بود.

### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان 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*) به ترتیب 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 میکروبی‌شناسی 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.

از این رو، 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 ویروالانس 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 تشکیل دهنده (*fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *bbp*, *cna*, *eno* *ebpS* and *spa*) بیوفیلم نمودند. تقریباً تمام نمونه دارای ۳ ژن *fnbA*, *clfB*, *fib* بوده و *ebp* در ۸۲ مورد، *cna* در ۱۴ مورد و *bbp* در ۹ مورد یافت شد. درصد ژن‌های *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 تتراسایکلین ۶/۶۶ درصد، اریترومایسین ۱۱/۱۱ درصد، کوتریموکسازول ۴/۴۴ درصد، آموکسی‌سیلین ۹۰ درصد، جنتامایسین ۴/۴۴ درصد و کلیندامایسین ۶/۶۶ درصد تعیین شد. همچنین، در سویه‌های 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 کلیندامایسین 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 نمونه‌گیری به چشم می‌خورد. حضور این سویه‌های چسبنده در

- [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*

- 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.