

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 بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس جداسده 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 دارد که می‌تواند منجر به ایجاد آلوگن‌های غذایی گردد. حضور ژن‌هایی بیوفیلم در باکتری بسیار حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه شناسایی وجود ژن‌هایی چسبنده در باکتری است که نقش بسیار مهمی در ویرولانس 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 ژن‌هایی چسبنده (*eno*, *cna*, *ebp*, *bbp*) در ساخت بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۶۰ جدایه از آن‌ها با روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، 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. به علاوه، ۹۰ درصد نمونه‌ها حساس به ونکومایسین، ۵۰ درصد حساس به کلیندامایسین و ۴۳/۴ درصد حساس به متی‌سیلین بودند. هم‌چنان، توزیع سایر ژن‌هایی 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 پیشترین 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 پنجم و یکم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۵۸-۳۵۲

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 تکرشتادی 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 پیش از ۲۷ گونه و ۷ زیرگونه بوده و شایع‌ترین گونه آن که اغلب عامل بیماری استافیلوکوکی می‌باشد، استافیلوکوک طایبی است. استافیلوکوک اورئوس، مقداری ترکیبات خارج سلولی تولید کرده که شامل همولیزین‌ها، آنتروکسین‌های استافیلوکوکی، کواگولاز، نوکلئاز و لیپاز می‌باشد. در هر غذا درجه حرارت بهینه تولید آنتروکسین چند درجه بیشتر از درجه حرارت بهینه برای رشد است؛ تغییر درجه حرارت تولید آنتروکسین 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 بهینه‌ای عامل مؤثر بر رشد و تولید آنتروکسین

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].

^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

***نشان نویسنده مسئله:**

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴، دوبلیوال: ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

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

آزمایشات بیوشیمیابی

باتوجه به اهمیت استریل بودن محیط‌های کشت، محلول-ها و ظروف شیشه‌ای توسط اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پاسکال به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از تهیه جدایه‌ها اقدام به کشت، جداسازی و تأیید بیوشیمیابی باکتری استافیلیکوکوس اورئوس گردید. بهترین راه ارزیابی تشخیصی برای باکتری کشت در محیط مانیتول‌سالت آگار بود. از سایر تست‌ها جهت اطمینان بیشتر در شناسایی و تشخیص استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده دیگر، مولرهیتون آگار (مرک، آلمان) بود که جهت انجام آنتی‌بیوگرام استفاده شد. بالجام چهار تست تشخیصی دیگر و با ایجاد همولیز بتا در محیط بلادآگار، تمایز بین استافیلوکوک کواگولاز مثبت از سایر استافیلیکوکهای کواگولاز منفی صورت پذیرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها بر مبنای نیم‌مکفارلنند

استاندارد مکفارلنند جهت بررسی تاثیر مواد ضد-میکروبی از سوسپانسیون ضدمیکروبی با تراکم مناسب استفاده می‌شود. از کلونی تازه کشت شده (۱۶ تا ۲۴ ساعت) برداشت کرده و در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. پس از تهیه محلول هموزن، با سواب استریل آن را به محیط کشت مولرهیتون آگار انتقال داده و به طور کامل به‌وسیله سواب روی محیط یکنواخت کشت شد. بعد از کشت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: سفپیم، نیتروفورانتوئین، سفتراکسون، سفکسیم، نالیدیکسیک اسید، اریتروماسین، آمیکاسین، جنتاماسین، سپروفلوکساسین، و آمپی-سیلین انتخاب شده و روی محیط کشت قرار گرفتند. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت زیر نور چراغ بررسی شده تا قطر هاله عدم رشد را بتوان با خط کش اندازه‌گیری نمود. باتوجه به جدول همراه دیسک‌ها، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت حساس، مقاوم یا نیمه‌حساس بیان شد. به منظور اطمینان حاصل کردن از کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی خریداری شده، آنها توسط سویه استاندارد استافیلیکوکوس اورئوس CCTA۲۵۹۲۳ مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفتند. آزمایش دیسک‌دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی 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 (bbp، cna، ebp، eno) در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت (جدول شماره ۱). ابتدا هر ییال از پرایمر با ۵۰۰ میکرومیتر آب

نمی‌باشد. در شرایط هوایی رشد و تولید آنتروکسین در pH=۴ نیز صورت می‌گیرد، در صورتی که در شرایط بی‌هوایی این محدوده به ۴/۶ در مورد رشد و ۵/۳ در مورد تولید توکسین تغییر می‌یابد؛ به‌همین دلیل از اسیدهای آلی به عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. اسیدهای آلی که فعالیت ضد میکروبی دارند عبارتند از: لاکتیک، ریپونیک، سوربیک و بنزوئیک. باکتری استافیلیکوکوس اورئوس در درجه حرارتی که معمولاً در فرآوری غذاها استفاده می‌شود از بین رفته ولی حرارت ۷۱/۱ برای اغلب سویه‌های استافیلوکوکوس کشنده است [۲]. امروزه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به موقع عفونت‌های میکروبی استفاده می‌شود. باتوجه به شایع بودن آلدگی نمونه‌های لبنی به انواع گونه‌های استافیلیکوکوس و همچنین بازده پائین روش‌های پاراکلینیکی، همچون کشت میکروبی، می‌توان گفت که جایگزینی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به جای روش‌های مذکور کمک به سرعتی در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن می‌نماید [۳]. یکی از عوامل مهم در افزایش قدرت بیماری‌زاوی و مقاومت در برابر عوامل ضدمیکروبی توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم یک جمعیت میکروبی پیچیده و بهم چسبنده است که توسط یک ماده زمینه‌ای پلیمراز 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 استافیلیکوکوس اورئوس برای اتصال و تشکیل بیوفیلم یک مرحله تعیین کننده از مزمن شدن بیماری است [۵]. در این بین ژن‌های bbp، cna، ebp و eno عامل تولید پروتئین‌های متصل شونده بوده که در ایجاد کلونی‌سایون و تولید بیوفیلم برای باکتری به منظور ایجاد عفونت نقش اساسی دارند [۶]. هدف از این تحقیق شناسایی ژن‌ها چسبنده بیوفیلم (bbp، cna، ebp، eno) باکتری استافیلیکوکوس اورئوس در شیر تازه بوده است.

مواد و روش‌ها

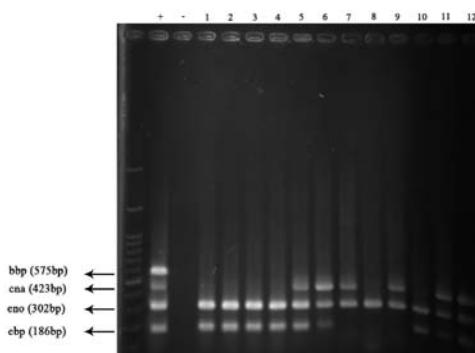
ابتدا ۱۰۰ نمونه شیر از گاوداری‌های منتخب جمع‌آوری گردید. تعداد ۶۰ جدایه از باکتری مورد نظر در محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شد و پس از مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مذکور، پلیت‌ها بررسی شده و باکتری مدنظر با اطمینان شناسایی گردید.

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

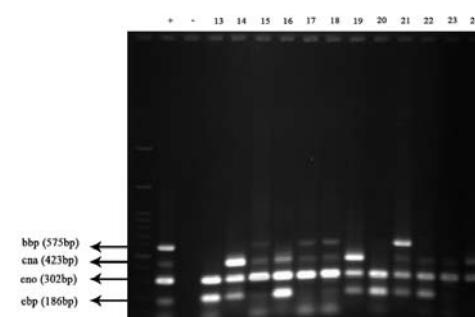
مقطر DNase free که از همان شرکت تامین شده بود، مخلوط شد و چند مرتبه همزده شد تا کاملاً مخلوط و حل گردد. پس از تهیه استوک ۱۰ میکرومولار از این مخلوط، پرایمرها با غلظت ۱ میکرومول برای ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش استفاده شدند. در

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

ژن	پرایمر	Nucleotide sequence در جهت ۵' به ۳'	اندازه محصول
<i>bbp</i>	BBP-F	AACTACATCTAGTACTCAACACAG	575
	BBP-R	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	
<i>cna</i>	CAN-F	GTCAAGCAGTTATTAAACCCAGAC	423
	CAN-R	AATCAGTAATTGCACCTGGTCCACTG	
<i>eno</i>	ENO-F	ACGTGCAGCAGCTGACT	302
	ENO-R	CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	
<i>ebpS</i>	EBP-F	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186
	EBP-R	CTTAACAGTTACATCATGTTATCTTG	



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



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

نتایج

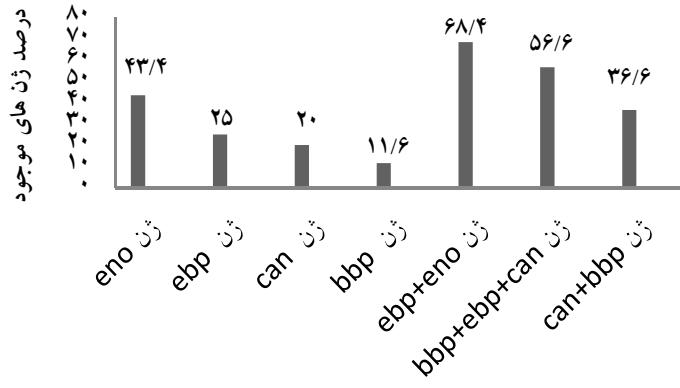
نتایج بررسی‌های بیوشیمیابی انجام شده در این تحقیق به این قرار هستند: تست کاتالاز مثبت، تست کوآگولاز مثبت، تست DNase مثبت، کشت مانیتول سالات‌آگار به دلیل وجود قند مانیتول و معرف فتل رد، پس از رشد استافیلوکوک طلایی تولید کلونی زرد رنگ با هاله زرد رنگ نمود، در صورتی که سایر استافیلوکوک‌ها معمولاً کلونی‌های 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 آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)	نیمه حساس	مقاآم	نوع آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کلیندامایسین	(۳۱/۶)۱۹	(۱۸/۴)۱۱	(۳۰)۳۰	ونکومایسین	۰	(۱۰)۶
(۹۰)۵۴	۰	(۴۲/۴)۲۶	(۵)۳	متی‌سیلین	(۵۱/۶)۳۱	(۴۲/۴)۲۶

نتایج آزمون‌های PCR چندگانه

پس از تایید نتایج تست‌های بیوشیمیابی و میکروبی از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس برای انجام PCR چندگانه از چهار جفت پرایمر معرفی شده در جدول شماره ۱ (*eno*, *ebp*) 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.



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

به متی سیلین، ۴۳/۳ درصد، بود. علت آنکه بیشترین تعداد ژن *eno* در نمونه ها دیده شد را این گونه می توان بررسی کرد که ژن *eno* بدليل کد کردن پروتئین های متصل شونده به غشاء 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، دو گانه و چند گانه و از ۱۲۰ ایزو وله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جداد 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، *fnbA* ۹۹ درصد، *clfA* ۹۹ درصد، *bbp* ۱/۰۷ درصد، *icaB* ۵/۳۶ درصد، *fib* ۵۷ درصد، *icaA* ۷۱ درصد، *clfA,B* ۱۰۰ درصد، *cna* ۵۵ درصد، *ebps* صفر درصد، *fnbB* ۶۳ درصد، *fib* ۵۶ درصد، *icaA* ۷۴ درصد، *icaB* ۶۳ درصد و *icaC* ۷۴ درصد. همچنین، در سویه های مقاوم به متی سیلین، در فراوانی ژن های *eno* ۹۶ درصد، *cna* ۲۲ درصد، *fnbA* ۵۵ درصد، *clfA,B* صفر درصد، *ebps* ۴/۸۱ درصد، *bbp* ۴۸/۸۱ درصد، *icaA* ۷۴ درصد، *icaB* ۷۴ درصد، *icaC* ۶۳ درصد، *clfA,B* ۱۰۰ درصد، *cna* ۱۰۰ درصد، *fnbB* ۶۳ درصد، *fib* ۵۶ درصد، *icaA* ۷۴ درصد، *icaB* ۷۴ درصد، *icaC* ۷۴ درصد، *clfA,B* ۱۰۰ درصد، *cna* ۱۰۰ درصد، *fnbB* ۶۳ درصد، *fib* ۵۶ درصد، *icaA* ۷۴ درصد، *icaB* ۷۴ درصد، *icaC* ۷۴ درصد. مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های مقاوم به متی سیلین به 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- میلت، آرتربیت عفونی و عفونت های استافیلوکوکی موثر است؛

بحث

تشکیل بیوفیلم از عوامل بیماری زای مهم بوده و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزان 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 بر عهده دارند. ژن های مورد بررسی در این تحقیق شامل ژن *eno* کد کننده پروتئین متصل شونده به لامینین که بخشی از غشاء پایه سلول می باشد، ژن *ebp* کد کننده اتصال به الازن 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 چند گانه پرداخته است، از بین ۱۵۷ نمونه جداد شده از سواب 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، ۱۴-۴۰ 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 قادر ژن های مورد ارزیابی بودند، ولی بیشترین درصد مربوط به ژن *eno* بوده و کمترین مورد مربوط به ژن *bbp* می باشد. با توجه 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 به دست آمده در این تحقیق مطابقت کمتری داشت، زیرا در مطالعه کنونی نمونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین حدود ۲۷/۵ درصد نمونه‌ها را تشکیل می‌دادند و مقاومت به کلیندامایسین در حدود ۱۷/۵ درصد مشاهده شد؛ با این وجود، مقاومت به متی‌سیلین نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بیشتر بود.

نتیجه گیری

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 میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد تهران به خاطر راهنمایی‌های ارزشمند ایشان و از عزیزانی که در مسیر انجام این تحقیق ما را یاری و همراهی نمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری به عمل می‌آید.

از این‌رو، انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط با قابلیت ژنتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به لحاظ داشتن پروتئین‌های سطحی امری ضروری به نظر می‌رسد و این فاکتور ویرولانس در سویه‌های مهاجم بیشتر یافت می‌شود [۱۲]. 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*) *clfA*, *clfB*, *fib* بیوفیلم نمودند. تقریباً تمام نمونه دارای ۳ ژن *fnbA*, *clfB*, *fib* در ۹ مورد بوده و *ebp* در ۸۲ مورد، *cna* در ۱۴ مورد و *bbp* در ۶ مورد یافت شد. درصد ژن‌های *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *eno* *ebpS* در این تحقیق قابل مقایسه با ژن‌های موجود در منابع انسانی بوده و شیوع ژن‌های *cna* و *bbp* 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 ترا-سایکلین ۶/۶۶ درصد، اریترومایسین ۱۱/۱۱ درصد، کوتريموکسا-زول 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 ترا-سایکلین ۳۱/۱۱ درصد، اریترومایسین ۷۷ درصد، تری‌متوبریم-متوكسازول ۲۳/۲۳ درصد، آموکسی‌سیلین ۸۷ درصد تعیین شد [۱۵]. Fueyo و همکاران بیان کرده‌اند که ظرفیت چسبنده استافیلوکوک‌ها به سلول‌های میزبان و خواص سطح باکتری بستگی داشته که یکی از آنها خاصیت آب‌گردیزی است. تولید بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس با ایجاد لایه نازک در سویه‌های بیماری‌زا در پی عفونت‌های جراحی عامل مهمی در تشديد عفونت بوده و در کشت حاصل از نمونه-گیری به چشم می‌خورد. حضور این سویه‌های چسبنده در

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*

- 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, Ghengesh 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.