فراوانی ژن‌های اتصال در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های لبنی در شهرستان شهرکرد

رسول پژوهش[1]، الهه تاج بخش[2]*، حسن ممتاز[2]، ابراهیم رحیمی[3]

۱. دانش آموخته‌ی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸

چکیده

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک بیماری‌زای فرصت‌طلب در انسان و حیوان است که می‌تواند با آلوده ساختن لبنیات، علاوه بر خسارت‌های اقتصادی، صدمات جسمی قابل توجهی به‌وجود آورد. در این تحقیق تعداد ۲۵۰ فراورده‌ی لبنی سنتی شامل کره، ماست، پنیر، کشک و خامه از نقاط مختلف شهرستان شهرکرد تهیه و در ظروف استریل در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل شد. جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابق با پروتکل‌های استاندارد و روش مولکولی صورت گرفت. ارزیابی ژنتیکی بیوفیلم با روش PCR جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کد کننده بیوفیلم (*icaA*، *icaB*، *icaC*، *icaD*، *bap*، *fnbA*، *fnbB*، *clfA*، *clfB*) انجام شد. از مجموع ۲۵۰ نمونه‌ی مورد بررسی، ۵۰ نمونه (۲۰ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. آلودگی در کشک ۲۶، در کره ۲۴، در پنیر ۲۲، در خامه ۱۶ و در ماست ۱۲ درصد گزارش شد. فراوانی ژن‌های مذکور به‌ترتیب: ۷۴ درصد، ۶۸، ۶۴، ۷۶، ۳۰، ۹۶، ۹۰، ۳۲ و ۲۸ درصد گزارش شد. در روش میکروتیتر پلیت در ۳۰ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد که در ۲۰ ایزوله (۶۶/۶۶ درصد) بیوفیلم قوی و در ۱۰ ایزوله بیوفیلم ضعیف (۳۳/۳۳ درصد) مشاهده شد. در ۵ ایزوله (۱۶/۶۶ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده نگردید. براساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مورد بررسی و واکنش بیوفیلم قوی و متوسط رابطه آماری معنی‌دار گزارش شد.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم، ژن‌های اتصال، فراورده‌های لبنی.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس متعلق به خانواده میکروکوکاسه می‌باشد و یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریال در انسان و حیوانات محسوب می‌شود. این باکتری، گرم مثبت، بی حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است (DeLeo and Chambers, 2009). اکثر استافیلوکوک‌های بیماری‌زا طلائی رنگند، همولیز بتا تولید می‌کنند، کوآگولاز، DNAse، لیپاز، فسفاتاز مثبت هستند. مانیتول را تخمیر و ژلاتین را ذوب می‌کنند ولی مهم‌ترین خاصیتی که می‌تواند دلیل قطعی بر بیماری‌زا بودن *استافیلوکوک* باشد آزمایش کوآگولاز است (Gotz, et al., 2006). هم‌چنین تولید کوآگولاز، تخمیر مانیتول و ترهالوز و تولید ترمونوکلئاز مقاوم به حرارت از خصوصیات منحصر به فرد این باکتری است که در سایر گونه‌های استافیلوکوکوس دیده نمی‌شود (DeLeo and Chambers, 2012; Jorgensen, et al., 2005; Smith, et al., 1982). یکی از عوامل مهم در افزایش قدرت بیماریزایی و مقاومت در برابر عوامل ضدمیکروبی، توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیش از ۸۰ درصد

عفونت‌های مزمن باکتریایی ناشی از تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم جمعیت میکروبی پیچیده به‌هم‌چسبیده‌ای است که توسط یک ماده زمینه‌ای پلیمری خارج سلولی که توسط خود میکروب تولید می‌شود، احاطه شده است. بیوفیلم دارای ویژگی‌های کلینیکی است و باکتری‌های موجود درآن دارای مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و سیستم ایمنی میزبان هستند که این موضوع زمینه ساز مقاومت به درمان است (Eyoh, et al., 2014).

محققین نشان داده‌اند که مرحله اول در عفونت‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* اتصال این باکتری به سطوحی از قبیل ابزارهای پزشکی، بافت‌های میزبان است که به ترکیبی از عوامل خارج سلولی مانند توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم نسبت داده می‌شود (Solati, et al., 2015). این مرحله توسط پلی ساکارید چسبنده بین سلولی[1] که پروتئین‌های عامل اتصالی بین سلولی *IcaA*، *IcaB*، *IcaC* و *IcaD* در تولید آن دخالت دارند واسطه گری می‌شود. این مجموعه روی یک اپران واقع شده‌اند (Pereyra, et al., 2016). این پلی‌ساکارید پلیمری از واحدهای گلیکوز-آمینوگلیکان با اتصال ۱ و ۶ (۸۵-۸۰ درصد) بخش کوچک‌تر گلیکوز آمینیل‌های غیر استیله آنیونی حاوی فسفات و سوکسینات – استر (۲۵-۲۰ درصد) می‌باشد که توسط آنزیم ان-استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز می‌شود. بیان این آنزیم توسط لوکوس *ica* انجام می‌شود. سنتز این پلی‌ساکارید در پی بیان آنزیم مربوطه توسط *icaA* صورت می‌گیرد. مشارکت *icaD* با این لوکوس موجب افزایش سنتز پلی‌ساکارید و ایجاد فنوتیپ کپسولی می‌گردد. نقش ژن *icaB*، د-استیله کردن پلی‌ساکارید قبل از اتصال به غشای سلولی بوده و ژن *icaC* یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که به طویل سازی و ترشح پلی‌ساکارید از سلول کمک می‌کند. بیان و اپران *icaADBC* توسط سیستم‌های تنظیمی از قبیل *SarA* و سیگما B (*SigB*) افزایش می‌یابد. از سوی دیگر *icaR* به‌عنوان یک کنترل‌کننده منفی قوی با اتصال به ناحیه راه‌انداز (پروموتر) اپران *ica* می‌تواند باعث کاهش بیان ژن‌های موجود در این اپران گردد. علاوه بر موارد ذکر شده، سیستم *agr* نیز در توانایی باکتری در ایجاد بیوفیلم و تنظیم تولید پروتئین‌های اتصالی و ترشحی نقش قابل‌توجهی دارد. پلی‌ساکارید چسبنده سلولی به‌عنوان عوامل اصلی تشکیل‌دهنده بیوفیلم در گونه‌های استافیلوکوکی مطرح هستند. اخیراً نقش بیوفیلم در ایجاد عفونت‌های بالینی و نقش ژن‌های مختلف دخیل در اتصال و تشکیل بیوفیلم مورد توجه قرار گرفته است. جدایه‌های حاصل از نمونه‌ها و بخش‌های مختلف می‌توانند توانایی متفاوتی در اتصال و تشکیل بیوفیلم داشته باشند (Avila-Novoa, et al., 2018). هدف از این تحقیق بررسی فراوانی ژن‌های عامل اتصال در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های لبنی سنتی در شهرستان شهرکرد می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق تعداد ۲۵۰ نمونه فراورده‌های لبنی شامل: کره، ماست، پنیر، کشک و خامه (از هر کدام ۵۰ نمونه) به طریقه تصادفی و از هر کدام به مقدار ۱۰۰ گرم از نقاط شرستان شهرکرد تهیه و در داخل ظروف استریل در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. برای تهیه سوسپانسیون اولیه، مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۹۴، ۵ گرم از نمونه‌های کره، ماست، پنیر، کشک و خامه در ۲۵ میلی لیتر سرم رینگر استریل غوطه‌ور و به مدت ۱۵ دقیقه در یک جای ثابت قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شده به ۹ میلی‌لیتر محیط انتخابی *استافیلوکوکوس اورئوس* (ساخت شرکت مرک آلمان) اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. به‌منظور انجام تست‌های میکروبیولوژی، یک لوپ از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط برد پارکر آگار کشت خطی داده شد و در دمای ۳۷

[1] - Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA)

درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از مشاهده کلونی‌های سیاه رنگ با هاله شفاف در محیط برد پارکر آگار به‌عنوان کلونی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس آرئوس*، رنگ‌آمیزی گرم و در صورت مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت، تست کاتالاز، کوآگولاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار و DNAse به عمل آمد. نمونه‌هایی که به‌عنوان *استافیلوکوکوس* طلایی تشخیص داده شدند، به‌منظور تشخیص مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (Singh and Praksh, 2008).

آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی قدرت اتصال باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC12228 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در این مطالعه جهت ارزیابی تولید بیوفیلم، کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد کرده بر روی محیط جامد به محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) حاوی یک درصد گلوکز تلقیح شد. از نمونه‌های تلقیح شده، کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای پلی‌استیرن منتقل شده و پس از گذشت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. چاهک‌ها با استفاده از فسفات بافر سالین (PBS) چهار مرتبه شستشو داده شد و سپس اجازه داده شد تا چاهک‌های پلی‌استرین به طور کامل خشک شوند؛ پس از آن، فرایند رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ کریستال ویوله به مدت ۱۵ دقیقه در هر چاهک صورت گرفت. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب معمولی شستشو داده شد و جهت آزاد سازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم می‌باشند، ۱۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به اضافه‌ی اتانول ۷۰ درصد به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طوح موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا بررسی گردید. نمونه کنترل منفی در این روش، محیط TSB حاوی یک درصد گلوکز بود. جهت اطمینان از روش کار، برای جدایه‌های مورد مطالعه، ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی نمونه‌ها از نظر تولید بیوفیلم نمونه‌هایی با جذب نوری کمتر از ۰/۱ به عنوان ایزوله‌های منفی از نظر تولید بیوفیلم، جدایه‌های با جذب نوری بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلم ضعیف و ایزوله‌های با جذب نوری ۰/۲ تا ۰/۳ به‌عنوان ایزوله‌های بیوفیلم متوسط و نمونه‌های با جذب نوری بالای ۰/۳ به عنوان ایزوله‌های بیوفیلم قوی مطرح شدند (Pereyra, et al., 2016). نمونه‌هایی که از نظر تشکیل بیوفیلم مثبت و منفی تشخیص داده می‌شوند، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت استخراج DNA، DNA آن‌ها استخراج گردید. به منظور تشخیص مولکولی و تائید تشخیص باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (DNPTM) شرکت سیناژن و طبق راهنمای آن استخراج شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA استخراج شده، از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه‌های DNA که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند (Sambrook and Russell, 2012). به‌منظور تشخیص قطعی باکتری در نمونه‌هایی که از نظر کشت، مثبت تشخیص داده شدند با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی *16srRNA* واکنش PCR انجام شد.

ردیابی ژن‌های مولد بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

جهت ارزیابی ژنتیکی بیوفیلم از روش PCR جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کد کننده بیوفیلم شامل ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC*، *icaD*، *bap*، *fnbA*، *fnbB*، *clfB*، *clfA* استفاده شد (Pereyra, et al., 2016; Tang, et al., 2013).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های مولد بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

ژن	توالی	شماره ی بررسی	اندازه (جفت باز)
16srRNA	F: CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R: CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	CP050691	۷۹۱
Ica A	F: GAC CTC GAA GTC AAT AGA GGT R: CCC AGT ATA ACG TTG GAT ACC	AY138959	۸۱٤
Ica B	F: ATC GCT TAA AGC ACA CGA CGC R:TAT CGG CAT CTG GTG TGA CAG	AY382582	٥٢٦
Ica C	F: ATA AAC TTG AAT TAG TGT ATT R: ATA TAT AAA ACT CTC TTA ACA	AY138959	۹۸۹
Ica D	F: AGG CAA TAT CCA ACG GTA A R:GTC ACG ACC TTT CTT ATA TT	U43366	۳۷۱
Bap	F: CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG R:GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	MF278360	۹۷۱
Fnb B	F: ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG R: ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT	KY024702	۱۹۷
Fnb A	F: GATACAAACCCAGGTGGTGG R:TGTGCTTGACCATGCTCTTC	KU145264	۱۹۱
Clf A	F: CCGGATCCGTAGCTGCAGATGCACC R:GCTCTAGATCACTCATCAGGTTGTTCAGG	CP031839	۱۰۰۰
clfB	F: TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAAC R:CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTG	AP019306	۱۹٤

بسته به اندازه قطعات ژنی مورد مطالعه، آزمایش PCR در سه مرحله در قالب PCR چندگانه‌ای با شرایط ذکر شده در جدول ۲ انجام شد:

آزمایش PCR جهت بررسی حضور ژن *16srRNA* در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده-های لبنی در حجم ۵۰ میکرولیتر، واجد ۵ میکرولیتر بافر 10xPCR، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix، ۲ میلی‌مول Mgcl2، ۱ میکرومولار زوج پرایمرهای R وF، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، ۲۰ میکرومول از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل.(Uvitech.U.K) قرائت گردید. در هر کدام از مراحل فوق محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی فراوانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در فراورده‌های لبنی مختلف با استفاده از آزمون مربع کای دو (Chi-Square test) و با نرم‌افزار آماری SPSS شماره ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مقایسات آماری $p<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری، تشخیص داده شد.

جدول ۲- برنامه PCR مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های مولد بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*

ژن	اجزای واکنش	برنامه ی دمایی

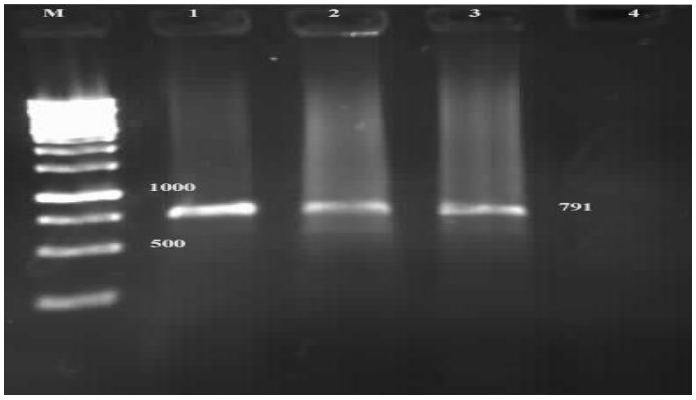
واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۱ چرخه‌ی ۴۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه، ۶۰ ثانیه در ۵۹ درجه و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه	۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار Mgcl2، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ تگ پلیمراز، ۳ میکرولیتر DNA الگو	16srRNA
واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه برای ۶ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه‌ی ۶۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه، ۹۰ ثانیه در ۵۵ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۳ درجه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۷ دقیقه	۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲/۵ میلی‌مولار Mgcl2، ۳۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۲ تگ پلیمراز، ۳ میکرولیتر DNA الگو	ica A ica B ica C ica D
واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه‌ی ۶۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه، ۶۰ ثانیه در ۵۸ درجه و ۱۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه	۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار Mgcl2، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ تگ پلیمراز، ۳ میکرولیتر DNA الگو	Bap fnb B
واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه‌ی ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۱ درجه و ۶۰ ثانیه در ۷۳ درجه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۶ دقیقه	۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲/۵ میلی‌مولار Mgcl2، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۲ تگ پلیمراز، ۳ میکرولیتر DNA الگو	fnb A clf A
واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۱ چرخه‌ی ۴۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه، ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه	۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار Mgcl2، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ تگ پلیمراز، ۳ میکرولیتر DNA الگو polymerase, 3 µL DNA template	clfB

نتایج

در این تحقیق از مجموع ۲۵۰ نمونه‌ی مورد بررسی، ۵۰ نمونه (۲۰ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشک در ۱۳ ایزوله (۲۶ درصد)، در کره در ۱۲ ایزوله (۲۴ درصد)، در پنیر آلودگی در ۱۱ ایزوله (۲۲ درصد)، در خامه در ۸ ایزوله (۱۶ درصد) و در ماست در ۶ ایزوله (۱۲ درصد) گزارش شد. پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* درحضور توالی ژن *16srRNA*، باکتری‌های جـدا شده مورد بررسی قرار گرفتند. تـمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۷۹۱ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل (۱) نشان داده شده است.

در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلم، ایزوله-های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس OD در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه-بندی شدند. به‌طوری‌که نمونه‌هایی با جذب نوری کمتر از ۰/۱ به عنوان ایزوله‌های منفی از نظر تولید بیوفیلم، جدایه‌های با جذب نوری بین ۰/۱ تا ۰/۲ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و ایزوله‌های با جذب نوری ۰/۲ تا ۰/۳ به‌عنوان ایزوله‌های بیوفیلم متوسط و نمونه‌های با جذب نوری بالای ۰/۳ به‌عنوان ایزوله‌های بیوفیلم قوی مطرح شدند. از ۵۰ ایزوله‌ی مورد بررسی در روش میکروتیتر پلیت در ۳۰ ایزوله (۶۰ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد که در۲۰ ایزوله (۶۶/۶۶ درصد) بیوفیلم قوی و در ۱۰ ایزوله بیوفیلم ضعیف (۳۳/۳۳ درصد) مشاهده شد جهت ارزیابی ژنوتیپی توان تولید بیوفیلم در ایزوله‌های مورد مطالعه از ردیابی ژن‌های *ica , bap , clf , fnb* به روش PCR چند گانه‌ای استفاده شد.

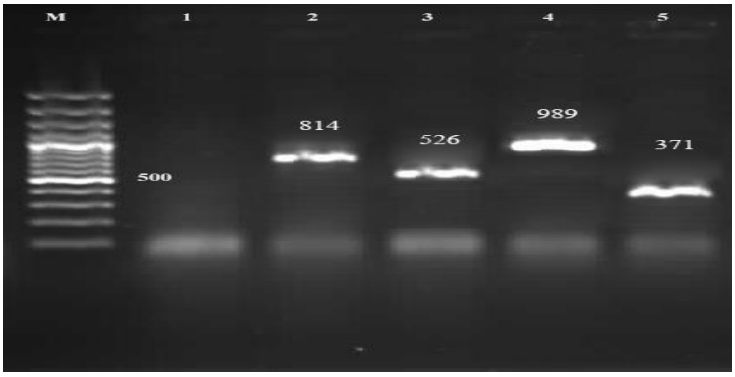
نتایج نشان داد که فراوانی حضور ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* در ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب معادل ۷۴ درصد، ۶۸ درصد، ۶۴ درصد و ۷۶ درصد می‌باشد.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *16srRNA استافیلوکوکوس آرئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت مورد بررسی واجد باند ۷۹۱ جفت باز، ستون ۴: کنترل منفی.

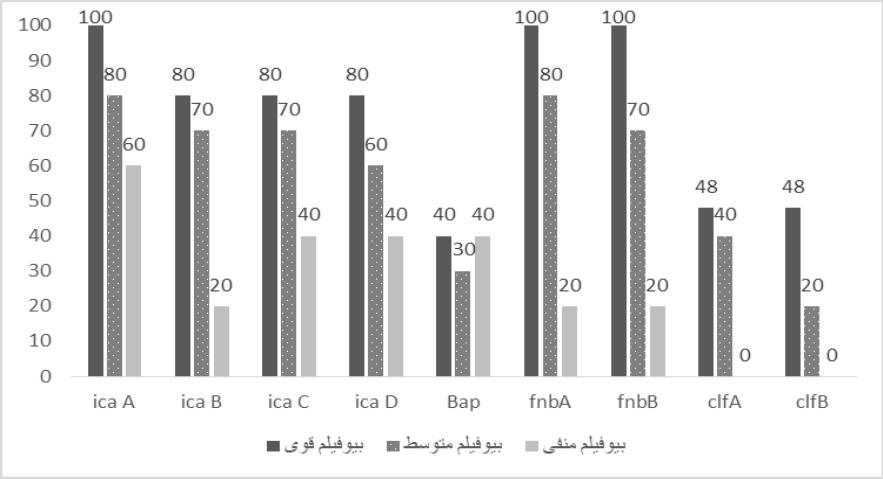
جدول۳- ژن ها

ژن	*icaA*	*icaB*	*icaC*	*icaD*	*bap*	*fnbA*	*fnbB*	*clfA*	*clfB*
تعداد موارد مثبت	۳۷	۳۴	۳۲	۳۸	۱۵	۴۸	۴۵	۱۶	۱۴
درصد	۷۴	۶۸	۶۴	۷۶	۳۰	۹۶	۹۰	۳۲	۲۸

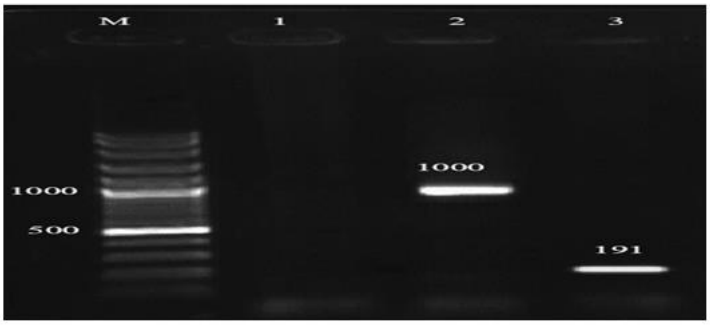


شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *ica استافیلوکوکوس آرئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۴-۲ نمونه‌های مثبت واجد ژن‌های *ica*.

از مهم‌ترین ژن‌های عامل اتصال که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت ژن *fnbA* می‌باشد که در ۴۸ ایزوله (۹۶ درصد) گزارش شد. از جمله ژن‌های دیگر که به عنوان فاکتور اتصال مورد بررسی قرار گرفتند ژن‌های *fnbB*، *bap*، *clfA* و *clfB* می‌باشند که فراوانی آن‌ها به‌ترتیب ۹۰ درصد، ۳۰ درصد، ۳۲ درصد و ۲۸ درصد گزارش گردید. براساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مورد بررسی و واکنش بیوفیلم قوی و متوسط رابطه آماری معنی‌دار گزارش گردید ($p<0/05$) اما بین سایر ژن‌ها و واکنش بیوفیلم رابطه آماری یافت نشد ($p>0/05$).



شکل۳- درصد فراوانی ژن‌های عامل اتصال در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس واکنش بیوفیلم.



شکل۴- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *clf A* و *fnb A* *استافیلوکوکوس آرئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲ نمونه مثبت واجد ژن *clfA*، ستون ۳: نمونه مثبت واجد ژن *fnbA*.

بحث

شیر و فراورده‌های آن به‌دلیل مفید بودنشان برای سلامتی و خصوصیات مناسب تغذیه‌ای آن‌ها سبب شده است که امروزه در پژوهش‌های علمی و در تجارت، پیشرفت به‌سزایی داشته باشند. شیر، یک غذای کامل اما در عین حال یک محیط رشد مناسب برای فعالیت باکتری‌های مختلف است. میکروب‌های شیر روی طعم و خواص فیزیکی شیر تاثیر نامطلوب داشته و موجب بیماری در انسان می‌شوند. شیر دوشیده شده فاقد باکتری بوده ولی اغلب با انواع میکروب‌هایی که معمولاً در مجاری شیر و ابتدای پستان به سر می‌برند آلوده می‌شود. تعداد باکتری‌ها در شیر تازه از چند صد تا چند هزار در هر میلی لیتر شیر متغیر است که در شرایط غیرپاستوریزه برای بهداشت و سلامت انسان خطرناک است. با توجه به تهیه محصولات لبنی مختلف از شیرخام و آماده سازی و رساندن آن احتمال وجود خطرات بهداشتی و انتقال باکتری‌های بیماری‌زا از گروه استافیلوکوک‌ها و انتروکوک‌ها در اثر مصرف این فراورده‌ها وجود دارد اگرچه پاستوریزاسیون می‌تواند تمام باکتری‌های بیماری‌زا را در فراورده‌های شیر از بین ببرد و انجماد از رشد سایر باکتری‌های باقی‌مانده جلوگیری کند، ولی پس از پاستوریزاسیون خطر ورود میکروب‌ها از طریق افزودن ترکیبات آلوده و نقل و انتقال نادرست هم‌چنان وجود دارد. محققین مختلف جداسازی باکتری‌های مختلفی از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز*، *یرسینیا انتروليتیکا*، *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، گونه‌های استرپتوکوکوس، میکروکوس و اشریشیا کلی را از فراورده‌های لبنی گزارش نموده‌اند (Tang, et al., 2013; Najafi, et al., 2011; Chandan, 1999; Farajvand and Alimohammadi, 2014).

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک بیماری‌زای فرصت طلب در انسان و حیوان است که می‌تواند با آلوده ساختن لبنیات، علاوه بر خسارت‌های اقتصادی، صدمات جسمی قابل توجهی به‌وجود آورد. مطالعات پیرامون این باکتری از اواخر قرن نوزده آغاز شده و از آن زمان روش‌های تشخیصی و درمانی متعددی معرفی شده است اما، استفاده از تست‌های مولکولی با نتایج دقیق‌تر، در سال‌های اخیر رو به افزایش است. در این مطالعه نیز علاوه بر روش‌های میکروبیولوژی، تست مولکولی PCR به منظور تأیید وجود آلودگی در فراورده‌های لبنی تهیه شده از شهرستان شهرکرد مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این تولید بیوفیلم توسط باکتری به روش فنوتیپی و ژنوتیپی مورد ارزیابی قرار گرفت و ارتباط بین ژن‌های عامل اتصال و تولید بیوفیلم نیز بررسی شد. در مطالعه‌ای که توسط نورمانو و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ در کشور ایتالیا بر روی ۱۶۳۴ فرآورده لبنی مختلف از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد، میزان آلودگی ۴۵ درصد گزارش گردید (Normanno, et al., 2007). گیلمور و همکاران گزارش نمودند که ۶-۳/۹ درصد از سویه‌های جدا شده از شیر گاو، از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت می‌باشند (Gilmour, 1990). در مطالعه‌ای که توسط جورجنسن و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۴ در کشور نروژ انجام گرفت میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر گاو، ۵۰ درصد، شیر بز ۹۲/۲ درصد و محصولات لبنی خام ۳۷/۸ درصد اعلام شد (Jorgensen, et al., 2005). مرحمتی زاده و همکاران در سال ۱۳۸۴ در شهرستان کازرون مطالعه‌ای بر روی پنیرهای سنتی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند و اعلام نمودند که میزان آلودگی در این شهرستان ۴۶ درصد می‌باشد (Marhamatizadeh, et al., 2006).

توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانس باکتری‌ها دارد. باکتری‌های تولید کننده بیوفیلم پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کنند که باعث تشکیل بیوفیلم می‌شود. بیوفیلم نه تنها میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می‌کند بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است. اصولاً باکتری‌ها وقتی تشکیل بیوفیلم می‌دهند، مقاومت آن‌ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می‌شود و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می‌نمایند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف می‌کنند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد هستند ولی پایداری ژنتیکی در آن‌ها بیشتر است و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر می‌باشند. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌کند. تولید پلی‌ساکارید اتصالی بین سلولی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت کنترل لکوس ژنی *ica* می‌باشد که ژن‌های *icaA, icaB, icaC* و *icaD* تشکیل شده است. بیان این لکوس ژنی تحت کنترل فاکتورهای محیطی و پروتیئن‌های تنظیمی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد تولید بیوفیلم در ارتباط با بیان این لکوس ژنی می‌باشد، اما سویه‌هایی از *استافیلوکوک*‌ها وجود دارند که تولید بیوفیلم در آن‌ها مستقل از بیان این لکوس ژنی صورت می‌گیرد. مشخص گردیده سویه‌هایی فاقد ژنی *ica* می‌باشند، بیماری‌زا نیستند (Solati, et al., 2015).

در مطالعه‌ای که توسط باسنیسی و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد، در مجموع ۳۷۶۰ نمونه شیر و محصولات لبنی از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۴ توسط آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی در ایتالیا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و از مجموع نمونه‌ها میزان ۱۲/۹ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بود و از بین آن‌ها میزان ۸/۳ درصد آلوده به سویه‌های MRSA بود (Basanisi, et al., 2017).

اومارو و همکاران مطالعه‌ای را در مورد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در شیرهای تازه و شیرهای تخمیری در کانادا و نیجریه انجام دادند در این مطالعه از ۳۷۲ نمونه شیر نمونه‌گیری به عمل آمد و بعد از انجام آزمایشات مختلف مشخص شد که از این تعداد نمونه ۱۹۵ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (Umaru, et al., 2013). ارزیابی ژنوتیپی توان تولید بیوفیلم در ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد که ژن‌های *icaA* و *icaD* با فراوانی ۷۷/۵۵ درصد شایع‌ترین ژن‌های کد کننده تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه می‌باشد. از مهم‌ترین ژن‌های عامل اتصال که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت ژن *fnbA* می‌باشد که فراوانی آن ۹۶درصد گزارش شد. از جمله ژن‌های دیگر که به‌عنوان فاکتور اتصال مورد بررسی قرار گرفتند ژن‌های *fnbB*، *bab*، *clfA* و *clfB* می‌باشند که فراوانی آن‌ها به ترتیب ۹۰ درصد، ۳۰ درصد، ۳۲ درصد و ۲۸ درصد گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری بین تولید بیوفیلم و ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC*، *icaD*، *fnbA*، *fnbB* و *clfB* ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده گردید. اما با ژن‌های *Bap* و *clfA* رابطه آماری معنی‌دار مشاهده نگردید.

نوربخش و همکاران در سال ۱۳۹۴ گزارش کردند که تشکیل بیوفیلم از عوامل بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب می‌شود که به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف و هم‌چنین افزایش الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را می‌دهد. مطالعه آن‌ها با هدف بررسی توان تشکیل بیوفیلم به روش مولکولی و فنوتیپی در نمونه‌های عفونی در شهرکرد انجام شد. نتایج نشان داد که ۷۳/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد توانایی اتصال متوسط و ۱۵/۴ درصد توانایی اتصال ضعیف دارند (Nourbakhsh and Momtaz, 2015). توانایی تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های بیمارستانی نسبت به

نمونه‌های جدا شده از شیر و فراورده‌های لبنی بیشتر است.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که درصد زیادی از نمونه‌های لبنیات به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند و بین واکنش تولید بیوفیلم با بسیاری از ژن‌های رابطه معنی‌داری وجود داشت و در ایزوله‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند ژن‌های عامل اتصال از فراوانی کمتری برخوردار بودند.

منابع

1. Avila-Novoa M.G., Iñıguez-Moreno M., Solıs-Velazquez O.A., Gonzalez-Gomez JP., Guerrero-Medina P.J. and Gutierrez-Lomelı M. 2018. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. J. Food. Qual. 112,1-8.
2. Basanisi M.G., La Bella G., Nobili G., Franconieri I. and La Salandra G. 2017. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. Food. Microbiol. 62:141-146.
3. Chandan R. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. J. Dairy. Sci. 82 (10):2245-56. 2.
4. DeLeo F.R. and Chambers H.F. 2009. Reemergence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J Clinical Inv. 119:2464-2474.
5. Eyoh A.B., Toukam M., Atashili J., Fokunang C., Gonsu H. and Lyonga E.E. 2014. Relationship between multiple drug resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from medical and non-medical personnel in Yaounde, Cameroon. Pan Afr Med J. 17:186.
6. Farajvand N. and Alimohammadi M. 2014. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in four famous brand of doogh produced in Iran. I.J.H.E. 7(1):85-94.
7. Gotz F., Tammy B. and Karl-Heinz S. 2006. The Genera *Staphylococcus* and Micrococcus. Prokaryote. 4:5–75.
8. Gilmour A. 1990. Staphylococci in milk and milk product. J. Appl. Bacteriology. 1(1):1065-1079.
9. Institute of standards and industrial research of Iran, Methods for identification and enumeration of *Staphylococcuse aureus* coagulase + in foodstuff . ISIR number 1194, 7 th ed, Tehran. 1994. P:35.
10. Jorgensen H.J., Mork T., Hogasen H.R. and Rorvik L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. App. Microbiol. 99:158-166.
11. Jorgensen H.J., Mork T., Hogasen H.R. and Rorvik. L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol. 99(1):158-166.
12. Marhamatizadeh M.H., Ghitea K., Nik Afroz R. and Peikar J. 2006. Evaluation of coagulase positive *Staphylococcus aureus* contamination of traditional cheese in Kazeroun city. 16th National Congress of Iran Food Industry. Gorgan, Iran.
13. Najafi A., Ziabakhsh D.M., Karimian H., Abedinia A.R. and Hosseininezhad M. 2011. Microbiological changes of Pousti cheese during ripening. J. Food. Tech and Nutrition. 8(2):85-91.
14. Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M. and Parisi. A.l. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int. J. Food. Microbiol. 115(3):290-296.
15. Nourbakhsh F. and Momtaz H. 2015. Detection of antibiotic resistance patterns in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015. Feyz. J. Kashan. Univ. Med. Sci. 19(4):356-363.
16. Pereyra E.A., Picech F., Renna M.S., Baravalle C., Andreotti C.S. and Russi R. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. 183:69–77.

17. Smith J.L., Buchanan R.L. and Palumbo S.A. 1982. Effect of food environment on staphylocaccal enterotoxin synthesis: review. J. Food. Prot. 46:545-555.
18. Solati S.M., Tajbakhsh E., Khamesipour F. and Gugnani H.C. 2015. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. AMB Express. 47:1-5.
19. Singh P. and Praksh, A. 2008. Isolation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from milk products sold under market conditions at Agra region. Acta Agr Slov. 92:83–88.
20. Sambrook J. and Russell D.W. 2012. Molecular cloning. Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 58-152.
21. Tang J., Chen J., Li H., Zeng P. and Li J. 2013. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different source. Foodborne. Pat. Dis. 10(9):757–763.
22. Umaru G.A., Kabir J., Umoh V.J., Bello M. and Kwage J.P. 2013. Methicillinresistant *staphylococcus aureus* (MRSA) in fresh and fermented milk in Zaria and Canada and Nigeria. J. ۀrug. Res. techno. 3(3):67-75.

Frequency of adhesion genes in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products in Shahrekord

Pajohesh R[1], Tajbakhsh E*[2], Momtaz H[2], Rahimi E[3]

1. Graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Hygiene and quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding Author:** *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

Received: 30 October 2022 Accepted: 28 January 2023

Abstract:

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen in humans and animals, which can cause significant physical injuries by contaminating dairy products, in addition to economic losses.. In this research, 250 traditional dairy products, including butter, yogurt, cheese, curd, and cream, were prepared from different parts of Shahrekord city and transported to the microbiology laboratory of Shahrekord Azad University in sterile containers with ice. The isolation of *Staphylococcus aureus* bacteria was done according to standard protocols and molecular methods. Genetic evaluation of biofilm was done by PCR method to detect the most common biofilm coding genes (*icaA, icaB, icaC, icaD, bap, fnbA, fnbB, clfB, clfA*). From the total of 250 examined samples, 50 samples (20%) were positive for *Staphylococcus aureus*. Contamination in kashk, butter, cheese, cream and yoghurt was reported: 26%, 24%, 22%, 16% and 12% respectively. The frequency of the mentioned genes was reported 74%, 68%, 64%, 76%, 30%, 96%, 90%, 32% and 28% respectively. In the microtiter plate method, biofilm reaction was observed in 30 isolates (60%), strong biofilm was observed in 20 isolates (66.66%), and weak biofilm was observed in 10 isolates (33.33%). No biofilm reaction was observed in 5 isolates (16.66%). Based on Fisher's exact test, a statistically significant relationship was reported between the studied genes and strong and moderate biofilm reaction.

Keywords: Adhesion genes, Biofilm, Dairy products *Staphylococcus aureus.*

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.