بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از اورام پستان دامداری‌های اطراف تهران

بابک خرمیان‌طوسی[۱]، محمد ایمان‌عینی[۲]، محمود بلورچی[۱]، محمدامین اسلامپور[۳]، امیر نیاسری‌نسلجی[۱] ، مرضیه علی‌قلی[۲]، عباس برین[٤]، سعید ستاری[٤]، پرویز هوشتی[۱*]

چکیده

یکی از مهمترین فاکتورهای حدت استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تشکیل بیوفیلم می‌باشد. این باکتری توانایی چسبیدن و نفوذ به داخل سلول‌های اپیتلیال پستان گاو را دارد. در استافیلوکوکوس اورئوس اتصالات داخل سلولی پلی ساکاریدی (Polysaccharide intercellular adhesion, PIA) توسط ژن‌های icaA و icaD کد می‌شود. تولید PIA مسئول رشد بیوفیلم استافیلوکوکوسی می‌باشد. عفونت‌های بیوفیلمی معمولا مزمن و برگشت پذیر بوده و به درمان به سختی پاسخ می‌دهند. مجموع ۹۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام تهیه شده از ۵ گاوداری شیری اطراف تهران جمع آوری گردید. تمام جدایه‌ها براساس روش‌های استاندارد (National mastitis council, NMC) مورد تشخیص قرار گرفت و جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد تایید قرار گرفتند. بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت تیتراسیون انجام گردید. تمامی جدایه‌ها جهت حضور ژن های icaA و icaD با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت‌های تیتراسیون نشان داد که به ترتیب ٤/٤، ٤٠، ٤٣/٣ درصد از جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بصورت قوی، متوسط و یا ضعیف می باشند و تنها ۱۲/۲ درصد جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه نبودند. همچنین ۸۷/۷ درصد (۷۹/۹۰) جدایه ها دارای ژن های icaA و icaD بصورت جداگانه بودند. و ۸۵/۵ درصد (۷۷/۹۰) هر دو ژن را بصورت همزمان داشتند. نتایج این مطالعه شیوع بالایی از ژن‌های ایجاد کننده بیوفیلم و بیان فنوتیپی نسبتاً بالایی را در دامداری‌های اطراف تهران نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: *بیوفیلم ، استافیلوکوکوس اورئوس، ورم پستان، گاو*

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۲

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مشترک بین انسان و گونه‌های مختلف دامی است. این باکتری گستره وسیعی از فاکتورهای حدت شامل توکسین‌های خارج سلولی و ساختارهای سطحی شامل فیبرونکتین، فیبرینوژن، کلاژن، ویترونکتین، لامینین، الاستین، فاکتور ون ویل براند و سایر لیگاند باندها را داراست که این عوامل سبب اتصال به ماتریکس خارج سلولی و تسهیل کلونیزه شدن بافتی، فرار از سیستم ایمنی و تخریب بافت‌ها می‌گردد(١٤). در تحقیقات مختلف در بدن و در محیط آزمایشگاه به اثبات رسیده است که استافیلوکوکوس اورئوس توانایی چسبیدن و نفوذ به سلول‌های اپیتلیال داخل غدد پستانی گاو را دارد. بیوفیلم‌ها ساختارهایی متشکل از سلول‌های باکتری به هم چسبیده در داخل یک ماتریکس پلیمری هستند که توسط خود این باکتری‌ها ساخته می‌شوند و سبب چسبیدن به سطوح زنده یا بی‌جان می‌گردند(۵). تشکیل بیوفیلم پیامدهای بهداشتی و اقتصادی بارزی دارد. تخمین زده می‌شود که ٦٥ درصد از عفونت‌های بیمارستانی در ایالات متحده با تشکیل بیوفیلم‌ها در ارتباط بوده و خسارات اقتصادی ناشی از بیوفیلم‌ها سالیانه بیش از یک میلیارد دلار است(۱۸). تعداد زیادی از باکتری‌ها درون بدن دام بصورت فاز بیوفیلمی رشد می‌کنند. بر اساس علائم هیستوپاتولوژی و ظاهر فراساختمانی باکتری‌های درون بافت حدس زده می‌شود که بیوفیلم در بیماری‌های مهمی همچون پنومونی (مانهیمیا همولیتیکا، پاستورلا مولتی سیدا) آبسه کبدی (فوزوباکتریوم نکروفورم)، لنفوآدنیت (کورینه باکتریوم

۱- گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران(hovaresh@ut.ac.ir)

۲- گروه میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

٤- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

سودوتوبرکولوزیس، گونه‌های استرپتوکوس) آنتریت (اشرشیا کلای، گونه‌های سالمونلا)، عفونت‌های زخم (استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا) به خصوص ورم پستان (استافیلوکوکوسس اورئوس و استرپتوکوکوس اگالاکتیه) نقش داشته باشد (۱۵). نقش بیوفیلم در بیشتر عفونت های مزمن و مقاوم به درمان به اثبات رسیده است. عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عفونت‌های طولانی مدت و مقاوم به درمان در میان دیگر عفونت‌ها شاخص می‌باشد. تشکیل بیوفیلم شامل دو مرحله است: مرحله اول اتصال سلول‌ها به یک سطح که بوسیله فاکتورهای اتصال دیواره سلولی تسهیل می گردد (۱۱). مرحله دوم شامل تکثیر سلول‌ها و ایجاد یک ساختار بالغ است که از تعداد زیادی لایه‌های مختلف سلولی تشکیل شده و توسط اتصالات داخل سلولی پلی ساکاریدی (PIA) به یکدیگر متصل می‌شوند (۱۲و۱۹) لوکوس ica از ژن‌های *icaA* و*icaB* و*icaC* و*icaD* تشکیل شده است که پروتئین‌های میانجی سنتز PIA را سنتز می‌کنند. از میان ژن‌های لوکوس ica، *icaA* و *icaD* نقش بیشتری در تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس بازی می‌کند. *icaA* ان ـ استیل گلوکوزامیل ترانسفراز را کد می‌کند که آنزیم درگیر در سنتز ان–استیل گلوکوزامین الیگومراز است (۱). گزارش شده است که *icaD* نقش حیاتی در بیان حداکثری ان–استیل گلوکوزامیل ترانسفراز دارد و منجر به بیان فنوتیپی پلی ساکاریدهای کپسولی می شود (۸). ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و فاکتورهای حدت وابسته، تنوع گسترده‌ای دارد و به توانایی فاکتورهای اتصال و منشا جدایه‌ها بستگی دارد(۵). از آنجا که فاکتور حدت ایجاد بیوفیلم نقش اثبات شده‌ای در عدم درمان بیماری بوسیله آنتی بیوتیک‌ها و عدم همخوانی نتایج تست آنتی بیوگرام و نتایج درمان دام دارد(۱۲). این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم درعفونت‌های اورام پستان استافیلوکوکوس اورئوسی در دامداری‌های اطراف تهران انجام گرفته است.

مواد و روش کار

مجموع ۹۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های شیر خام ۵ دامداری در اطراف تهران جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها بر اساس توصیه NMC (مجمع بین‌المللی اورام پستان، ۱۹۹۹) جمع‌آوری و کشت گردید. اورگانیسم‌ها بر اساس روش‌های بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کواگولاز، DNase، اکسیداسیون و فرمانتاسیون مانیتول مورد شناسایی قرار گرفت جهت تایید تشخیص فنوتیپی، حضور ژن Nuc با توالی *nucA*-F:5'-CTGGCATATGTATGGCAATTGTT-3' و *nucA*-R:5'-TAT TGA CCT GAA TCAGCG TTG TCT-3' به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. جهت استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده و عصاره سلولی بدست آمده در ٤ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

تمامی جدایه‌ها بوسیله PCR جهت بررسی حضور ژن‌های تشکیل بیوفیلم (*icaA, icaD*) مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی نوکلئوتیدهای پرایمرهایی در این مطالعه از مطالعه Arciola و همکاران در سال ۲۰۰۱ گرفته شد (۱). که شامل:

icaA,F:5-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3 و

icaA,R:5-TCTGGAACCAACATCCAACA-3 و

icaD,F:5-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3
icaD,R:5-AGTATTAATGTTTAAAGCAA-3

می‌باشد. هر محلول واکنش PCR به مقدار ۲۵ میکرولیتر شامل 10X PCR Buffer ، Mgcl2 (1.5 Mm) ، dNTPs mix (0.2mM) ، Taq DNA Polymerase (0.25U) و جفت پرایمرهای رفت و برگشت بود. شرایط ترموسایکل پس از بهینه‌سازی عبارت بود از: ۱) مرحله واسرشت اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (یک سیکل)، ۲) واسرشت ٤٥ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳) مرحله جور شدن (آنیلینگ) ٤٥ ثانیه در دمای ٤٩ درجه سانتی‌گراد ٤) تکثیر(ازدیاد) ٤٥ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، (مراحل ۲ تا ٤، ۳۰ سیکل تکرار شد) ۵) واسرشت نهایی ۵

دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد(یک سیکل). کنترل صحت تکثیر PCR با استفاده از کنترل های مثبت و منفی بررسی گردید. محصول PCR پس از انجام الکتروفورز (ژل آگاروز ۱ درصد و بافر TBE) در محلول اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و توسط ژل داک تصویربرداری گردید.

توانایی جدایه‌های جدا شده استافیلوکوکوس اورئوس در تولید بیوفیلم در محیط آزمایشگاه توسط روش گزارش شده بوسیله Peeters و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مختصری تغییر مورد ارزیابی قرار گرفت (۱٦). به طور خلاصه جدایه‌ها پس از کشت در محیط آبگوشت TSB یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از رقیق‌سازی در محیط TSB تازه میزان ۱۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی در پلیت‌های میکروتیتر پلی استیرن ۹٦ خانه‌ای ریخته شد. پس از اینکه ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت به آرامی ۳ مرتبه توسط ۲۰۰ میکرولیتر از PBS شسته و بصورت وارونه قرار داده شد تا پلیت خشک گردد. جهت فیکس کردن بیوفیلم‌ها از متانول ۹۹ درصد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید و پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. به تمام خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ (CV) اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه پلیت‌ها در زیر آب شیر شسته شدند تا رنگ اضافی از گوده‌ها خارج شود سپس رنگ‌های باند شده با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر از اسید استیک ۳۳ درصد آزاد شد. جذب نوری (OD) هر یک از خانه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها بصورت ٤ تایی و در سه آزمایش جداگانه تکرار گردید از محیط TSB تلقیح نشده به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شد. انحراف معیار بالاتر از میانگین جذب نوری گروه کنترل منفی به عنوان Cut-off جذب نوری (ODc) مورد استفاده قرار می‌گرفت. توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های مورد آزمایش براساس جذب نوری در ٤ گروه جداگانه شامل عدم اتصال (OD<ODc)، ضعیف (ODc<OD<2xODc)، متوسط (2xODc<OD<4xODc)، قوی (4xODc<OD)قرار داده شد.

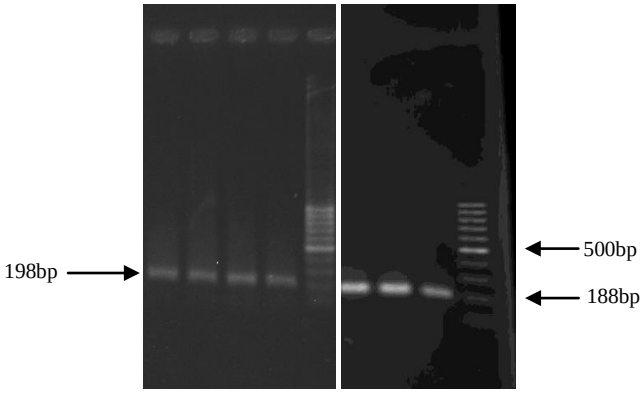
نتایج

در مطالعه حاضر مشخص شد که از میان 90 جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش بر اساس ردیابی ژنوتیپی ۸۵,۵ درصد دارای هردو ژن *icaA* و *icaD* بصورت همزمان بودند و به ترتیب میزان شیوع ژن *icaA* و *icaD* در میان جدایه ها ۸۷/۷ و ۸۷/۷ را نشان می‌داد و ۸۵/۵ درصد (۷۷/۹۰) هر دو ژن را بصورت همزمان داشتند و تنها ۱۱ جدایه مختلف فاقد این ژن‌ها بودند (شکل ۱).

مطالعه فنوتیپی جدایه‌ها براساس اندازه گیری جذب نوری نشان داد که تنها ٤ جدایه (٤/٤٤ درصد) توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در میکروپلیت را در میان استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده داشت و ۳٦ جدایه (٤۰ درصد) جذب نوری متوسط داشتند. نتایج در جدول شماره ۱ آورده شده است. آزمون رگرسیون ارتباط معنی‌داری بین تعداد زایش دام و تولید بیوفیلم بصورت ژنوتیپی و فنوتیپی نشان نداد.

جدول ۱ـ نتایج میزان شیوع و بروز ژن‌های ایجاد کننده بیوفیلم در دامداری‌های مختلف

نام دامداری	تعداد جدایه جدا شده	*icaA*	*icaD*	تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت			
				منفی	ضعیف	متوسط	قوی
دامداری الف	۱٦	۱۵	۱۵	۱	۱۵	۰	۰
دامداری ب	٤۸	۳۸	۳۸	۹	۱۷	۱۹	۳
دامداری ج	٤	٤	٤	۰	۰	٤	۰
دامداری د	۱۲	۱۲	۱۲	۰	۲	۹	۱
دامداری ه	۱۰	۱۰	۱۰	۱	۵	٤	۰
مجموع	۹۰	۷۹	۷۹	۱۱	۳۹	۳٦	٤



تصویر ۱ـ ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن (۱۹۸ bp)icaD سمت چپ و ژن (188 bp)*icaA* سمت راست در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان

بحث

حدت استافیلوکوکوس اورئوس به توانایی تولید توکسین‌ها و فاکتورهای خارج سلولی مثل بیوفیلم که توانایی چسبندگی و مقاومت به فاگوسیتوز را به باکتری می‌دهد، در ارتباط است (۱۷). توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در تشکیل بیوفیلم‌ها به زنده ماندن باکتری در محیط میزبان کمک می‌کند امروزه بیوفیلم را به عنوان یکی از دلایل مزمن شدن عفونت‌های استافیلوکوکوسی به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس هم در پزشکی و هم در دامپزشکی مطرح شده است (۵).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در میان باکتری‌های دیگر از جهت تولید لایه لعابی شناخته شده است. تا سال ۱۹۹٦ در مورد ترکیبات سازنده این لایه لعابی اتفاق نظر وجود نداشت. Mack و همکارانش در سال ۱۹۹٦ توانستند دو ساختار پلی ساکاریدی را از این لایه خالص سازی کنند. پلی ساکارید ۱ (بیش از ۸۰ درصد) که یک هموگلیکان خطی از استخلاف بتا ۱–٦ متصل به ان استیل گلوکزامین است. پلی ساکارید۲ (کمتر از ۲۰ درصد) مقدار کمتری از استخلاف دی گلوکزامینیل‌های غیر ان استیله دارد و در عوض فسفات و سوکسینات متصل به استر دارد. پلی ساکارید ۱ دارای بار مثبت است درحالیکه پلی ساکارید ۲ دارای بار منفی می‌باشد. پلی ساکارید ۲ به عنوان یک ساختار منحصر به فرد با ادهیزین‌های پلی ساکاردی داخل سلولی (PIA) در ارتباط بوده که فعالیتشان سبب تشکیل تجمعات سلولی می‌شود. مطالعه فوق الذکر بر روی جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس انجام شد. مطالعات بعدی بر روی دیگر گونه‌های استافیلوکوکوس از جمله استافیلوکوکوس اورئوس وجود PIA را در این گونه ها به تایید رساند. باید توجه داشت که در کنار PIA مواد دیگری همچون اسید تیکوئیک و پروتئین سطحی استافیلوکوکوسی (SSP-1)، پروتئین مرتبط با تجمع (AAP)، پروتئین مرتبط با بیوفیلم (BAP) و سایر پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها در ساختن بیوفیلم نقش دارند (۹).

مطالعه بر روی دو ژنوتیپ متفاوت جدایه جهش یافته 47-0 استافیلوکوکوسوس اپیدرمیدیس نشان داد که موتانت‌هایی که توانایی تولید بیوفیلم و PIA را ندارند، نمی‌توانند تجمعات سلولی تشکیل دهند. بررسی بر روی این موتانت‌ها نشان داد که حذف ژن icaR که در تکمیل تولید PIA نقش دارد با جلوگیری از بیان PIA از تولید آن جلوگیری می‌کند.(۹) اپران ica دارای چهار ژن icaADBC است که در اغلب جدایه‌های استاف اورئوس وجود دارد. بسیاری از فاکتورهای محیطی مثل غلظت نمک، گلوکز و اتانول در بیان PIA نقش دارند. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که بیان ژن PIA در محیط‌های بی‌هوازی شدیدا فعال می‌شود. بسیاری از مقالات ارتباط بین شدت بیماری و حضور لوکوس ica و ارتباط بین لوکوس ica و فاکتورهای حدت به اثبات رسیده است. این مطالعات نشان می‌دهد که جدایه‌های بیوفیلم مثبت نسبت به بیوفیلم منفی به صورت واضحی با عفونت ها ارتباط بیشتری را نشان می‌دهند(۱). Cramton و همکاران در سال ۱۹۹۹ مشاهده کردند که جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس با وجود داشتن لوکوس ica ممکن است نتوانند در محیط ازمایشگاه تشکیل بیوفیلم دهند (٦). Arciola و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش دادند تغییر فنوتیپ ممکن است با عدم

وجود ژن‌های icaA و icaD و یا حذف کامل لوکوس ica در ارتباط باشد (۱).

به هر حال مطالعات کمی در ارتباط با شیوع ژن‌های icaA و icaD و نقش آنها در تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کننده ورم پستان انجام شده است. مطالعات گذشته نشان دادند که تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه با شرایط رشد جدایه ها در محیط آزمایشگاه در ارتباط است (۳و۲). بنابراین مجموعه ای از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باید جهت شناسایی و ردیابی تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه به کار گرفته شود. این مطالعه برای اولین بار میزان شیوع بیوفیلم بصورت ژنوتیپی و فنوتیپی را در سطح برخی از دامداری های اطراف تهران مورد بررسی قرار می دهد. در این مطالعه از روش طبقه بندی جدید چهار گروهی جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت به کار گرفته شد که نسبت به روش طبقه بندی دوتایی دقیق تر می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۷۹ جدایه از ۹۰ جدایه دارای ژن icaA و ژن *icaD* بودند این در حالی است که تمام جدایه های دارای ژن در محیط آزمایشگاه توانایی تولید بیوفیلم را نداشتند. نتایج این مطالعه با نتایج بدست آمده توسط Zmantar و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی داشت در آن مطالعه نشان داده شد که ۷۸,۲۶ درصد از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های گوش انسان دارای ژن‌های *icaA* , *icaD* بودند و بصورت فنوتیپی در تست کنگو رد ۵۶,۵ درصد تشکیل لایه لعابی می دادند(۲۰). در مطالعه Gad و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شد که از ۱۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از سوندهای ادراری انسان ۱۵ جدایه (۸۳ درصد) تشکیل بیوفیلم می دادند و بر اساس طبقه بندی سه تایی ۵۶,۶ درصد بیوفیلم قوی، ۳۰,۲ درصد بیوفیلم متوسط و ۱۳,۲درصد بیوفیلم تشکیل نمی‌دادند. در این مطالعه تمامی جدایه‌هایی که بصورت فنوتیپی بیوفیلم تشکیل می‌دادند برای ژن‌های*icaA* , *icaD* مثبت و جدایه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی منفی بودند فاقد ژن‌های ica بودند (۷). در مطالعه Iorio و همکاران در سال ۲۰۱۱ از میان ۴۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از خون ۴۰ جدایه دارای ژن‌های ica بودند و در آزمایش تشخیص فنوتیپی بیوفیلم ۲۵ جدایه (62.5%) در میکروپلیت مثبت بود (۱۰). Arciola و همکاران نیزمشاهده کردند که ۱۴ جدایه از ۲۳ جدایه جدا شده ازسوندهای ادرار بیماران مبتلا به عفونت و ۱۱ جدایه از ۱۵ جدایه عفونت های periprosthetic در انسان توانایی تشکیل لایه لعابی را داشتند (۱). در مطالعاتی که تشکیل بیوفیلم در اورام پستان گاو را مورد بررسی قرار داده است میزان شیوع متفاوتی گزارش گردیده است Vasudevan و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که از میان ۳۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده همگی دارای ژن های لوکوس ica بودند (۱۸). Cifter و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که ۱۵ جدایه از ۵۹ جدایه جدا شده از اورام پستان دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند و ۱۶ جدایه و۳۸ جدایه به ترتیب دارای ژن *icaA* و *icaD* بودند (۴). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که از ۳۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ۱۰۲ جدایه (۳۵/۲۹ درصد) دارای هر دو ژن *icaA* و icaD بودند(۱۷). از آنجا که عفونت‌های پستانی مزمن که ارتباط تنگاتنگی با تشکیل بیوفیلم دارند به سختی با درمان‌های آنتی بیوتیکی حذف می‌شوند (۱۲) و از طرف دیگر نتایج این مطالعه نشان داد که بسیاری از دامداری‌ها در اطراف تهران دارای شیوع بالایی از ژن های ica می باشند و مستعد ایجاد بیوفیلم می باشند. بنابراین تشخیص سریع جدایه‌های دارای توانایی تشکیل بیوفیلم جهت اتخاذ تصمیمات درمانی و مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد.

فهرست منابع

1- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L. (2001a): Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J. Clin. Microbiol. 39:2151– 2156.

2-Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B. (1993): Phase variation of slime production in Staphylococcus aureus: implications in colonization and virulence. Infect. Immun. 61:4857–4862.

3-Christensen, G.D., Baddour, L.M., Simpson, W.A. (1987): Phenotypic variation of Staphylococcus epidermidis slime production in vitro and in vivo. Infect. Immun. 55:2870–2877

4-Ciftci, A., Findik A., Emek Onuk E., Savasan S. (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of staphylococcus aureus in bovine mastitis. Brazilian Journal of Microbiology. 40:254-261.

5-Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284:1318–1322.

6-Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Gotz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. Infection and Immunity 67, 5427–5433.

7-Gad, G.F., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H., El-Baky, R.M. (2009): Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries. 3(5):342-51.

8-Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., Gotz, F. (1998): Characterization of the Nacetyl glucosaminyl transferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem. 273: 18586–18593.

9-Gotz, F. (2002): Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiology. (43):1367–1378.

10-Iorio, N.L., Lopes, A.P., Schuenck, R.P., Barcellos, A.G., Olendzki, A.N., Lopez, G.L., dos Santos, K.R. (2011): A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of Staphylococcus in blood cultures. Microbiol Immunol. 55(1):28-33.

11-Mack, D. (1999): Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. Journal of Hospital Infection 43 (Suppl.):113–125.

12-Melchior, M.B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. (2006): Biofilms: a role in recurrent mastitis infection. Vet.J. 171:398–407.

13-Nirmala, R., Navamathavan, R., Kang, H., El-Newehy, M., Kim, H. Y. (2010) Preparation of polyamide-6/chitosan composite nanofibers by a single solvent system via electrospinning for biomedical applications. Colloid Surface B: Biointerfaces. 83,173-178.

14-O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, DA., O'Gara JP. (2007): Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in staphylococcus aureus isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol. 45(5) :1379-88.

15-Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002): Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res. 66(2):86-92.

16-Peeters, E., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2008): Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods. 72:157-165.

17-Takeuchi, S., Maeda, T., Hashimoto, N., Imaizum, I.K., Kaidoh, T., Hayakawa, Y. (2001): Variation of the agr locus in Staphylococcus aureus isolates from cows with mastitis. Vet. Microbiol. 79:267–274.

18-Vasudevan, P., Mohan Nair, M.K., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. (2003): Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.Vet Microbial. 92:179-85.

19-Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2003): Quorum sensing in Staphylococcus infections. Journal of Clinical Investigation. 112:1620–1625.

20-Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F.B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2008): Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical Staphylococcus aureus. J Basic Microbiol. 48(4):308-14.