بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیرهای خام عرضه‌شده در شهرستان سنندج

مهسا شجاعی[۱]، هیوا کریمی دره آبی*[۲]، افشین جوادی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، سنندج، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، استادیار گروه بهداشت موادغذایی، سنندج، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Hiva60iran@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۸/۱۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۶/۷)

چکیده

استافیلوکوکوس ارئوس یکی از عوامل اصلی بیماری ورم پستان گاوی می‌باشد. این باکتری گستره وسیعی از عفونت‌ها و بیماری‌های تهدیدکننده زندگی را در انسان ایجاد می‌نماید. عوامل حدت مختلفی در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارند یکی از مهم‌ترین فاکتورهای حدت *استافیلوکوکوس ارئوس* قابلیت تشکیل بیوفیلم می‌باشد. این باکتری قادر به تولید پلی‌ساکاریدها و فاکتورهای پروتئینی چسبیده به سطح است که منجر به تولید بیوفیلم می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی میزان آلودگی *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیرهای خام، از ۱۲۰ نمونه شیر خام عرضه‌شده در سطح شهرستان سنندج نمونه‌برداری و با روش‌های متداول میکروبیولوژی کشت‌داده شده و نتایج با استفاده از PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تشخیص تاییدی جدایه‌ها به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* با استفاده از PCR ژن اختصاصی *nuc* و برای شناسایی ژن‌های عامل تولیدکننده بیوفیلم *fnbA*، *clfaB*، *icaD* و *icaA* از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن با استفاده از روش Multiplex PCR استفاده گردید. با توجه به نتایج حاصل از کشت میکروبی و تایید آن با روش مولکولی، ٤٩ جدایه بوسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد و نیز تکثیر ژن ترمونوکلئاز اختصاصی گونه (*nuc*) به‌عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از Multiplex PCR ژن‌های مولد بیوفیلم *fnbA*(٪٦٩/٣٨)، *clfaB* (٪٣٢/٦)، *icaD* (٪٣٨/٧٧) و *icaA* (٪٥٩/١٨) در جدایه‌ها تشخیص داده شد. نتایج حاکی از آلودگی بالای شیرخام عرضه‌شده در سطح شهرستان سنندج به *استافیلوکوکوس ارئوس* و نیز قابلیت بالای جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: شیر خام، *استافیلوکوکوس ارئوس*، بیوفیلم، سنندج

مقدمه

شیر و فرآورده‌های آن به عنوان یک محیط مغذی می‌توانند نقش بسیار موثری در انتقال انواع میکروارگانیسم‌های عامل فساد و عوامل بیماری‌زا به مصرف‌کننده می‌باشد (Anonymous, 2011). *استافیلوکوکوس ارئوس* به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شیر و فراورده‌های آن تکثیر پیدا کرده و منجر به بیماری‌زایی در انسان شود از سوی دیگر می‌تواند از طریق تولید بیوفیلم نقش مهمی در ایجاد بیماری مزمن ورم پستان ایفا نماید (Kumar and Anand, 1998). این باکتری قادر به تولید پلی ساکاریدها و فاکتورهای پروتئینی چسبنده به سطح است که از این طریق در تولید بیوفیلم نقش دارد. در حقیقت بیوفیلم، گروهی ازمیکرروارگانیسم‌ها می‌باشد که با شبکه‌ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکو پروتئینی و پلی ساکاریدی خارج سلولی به نام ماده پلیمری خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده پلیمری خارج سلولی از پلی ساکارید، پروتئین، فسفولیپید، اسید تیکوییک و دیگر مواد پلیمریک هیدراته با ۸۵ تا ۹۵ درصد آب تشکیل شده است و از این طریق می‌توانند باعث چسبیده شدن انواع عوامل بیماری‌زا در روی سطح داخلی کارتیه‌ها و سطوح تجهیزات صنایع غذایی شده که این روند باعث انتقال انواع میکروب‌های بیماری‌زا می‌گردد. از دیگر مشکلات بیوفیلم در صنایع غذایی تشکیل آن در مکان‌هایی مانند مبادله‌کننده‌های حرارتی ماشین‌آلات صنایع غذایی می‌باشد که باعث کاهش بازدهی انتقال حرارتی می‌شود. علاوه بر این برخی از میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم، واکنش‌های شیمیایی و بیولوژیکی را که منجر به خوردگی سطوح فلز می‌شوند کاتالیز می‌کنند (Costerton *et al*., 1999). در *استافیلوکوکوس ارئوس* تشکیل بیوفیلم مستلزم مجموعه ژن‌های (*ica* ADBC) است که با رمزگذاری آنزیم‌های دخیل در سنتز پلی‌ساکاریدهای چسبنده داخل سلولی (polysaccharide intercellular adhesin) صورت می‌گیرد. لوکوس *ica* (Intercellular adhesion) از ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* تشکیل شده است. از میان ژن‌های لوکوس *ica* ، *icaA* و *icaD* نقش بیشتری را برای تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* دارا می‌باشند (Foster and Hook, 1998). ژن‌های *fnbA* *fnbB*(fibronectin-binding protein) *clfA* *clfB*(clumping factor, نیز نقش مهمی را در بالا رفتن احتمال چسبیدن باکتری به سطوح دارند (OConnell *et al*., 1998).

هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان درصد آلودگی شیرهای خام عرضه‌شده به *استافیلوکوکوس ارئوس*، و توانایی این میکروارگانیسم از نقطه نظر داشتن ژن‌های عامل حدت تولیدکننده بیوفیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۲۰ نمونه از شیرهای خام تولیدی از ۸ مرکز عمده پرورش گاوهای شیری به صورت کاملاً تصادفی در سطح شهرستان سنندج در بازه زمانی دی ماه سال ۹۱ تا اردیبهشت ماه سال۹۲ در شرایط استریل نمونه‌برداری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم پزشکی کردستان انتقال داده شد.

جداسازی *استافیلوکوکوس ارئوس*

برای ترغیب رشد *استافیلوکوکوس* ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌های اخذ شده بعد از یکنواخت کردن به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت Cooked meat براث (Merck، آلمان) انتقال داده و به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کرده سپس بر روی محیط کشت جامد Baird parker agar (Merck، آلمان) با استفاده از روش کشت سطحی کشت داده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. هر کدام از پرگنه‌های سیاه دارای هاله روشن را در مرحله بعد بر روی محیط کشت افتراقی Mannitol agar salt (Merck، آلمان) به منظور بررسی تخمیر مانیتول و انجام تست‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز و کواگولاز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌های مانیتول، کاتالاز و کواگولاز مثبت به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* فرض گردیده و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط Tryptic soy broth (Merck، آلمان) حاوی ۱۵درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

استخراج DNA

هر کدام از پرگنه‌های خالص شده به ۱/۵ میلی‌لیتر نوترینت براث انتقال داده و ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس با دور ۷۵۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در مرحله بعد به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز و ۵ میکرولیتر پروتئاز اضافه و به طور کامل به همزده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۵ سلسیوس قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ٤۰۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده مخلوط شد و برای ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب‌دهنده به مخلوط اضافه شد و به وسیله حرکت دورانی به مدت ۳ تا ۵ ثانیه مخلوط گردید و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی خالی گردیده و یک میلی‌لیتر بافر شستشو به رسوب حاصله اضافه و برای ۵-۳ ثانیه مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد، سپس بافر شستشو به طور کامل خالی گردید و برای ۵ دقیقه در ٦۵ درجه سلسیوس قرار داده شد تا خشک شود. ماده ته‌نشین در ۳۰ میکرولیتر از بافر حل‌کننده به وسیله تکان دادن آرام و قرار دادن در ٦۵ درجه سلسیوس برای مدت ۵ دقیقه به طور کامل حل شد. مواد غیرمحلول با سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰ ته‌نشین شد. ماده شناور رویی حاوی DNA خالص است. غلظت DNA. بعد از الکتروفورز روی ژل الکتروفورز ۱/۲٪ اندازه‌گیری شد (http://cinnagen.com).

آزمون PCR برای شناسایی ژن ترمو نوکلئاز (*nuc*)

جهت تشخیص تاییدی جدایه‌های مشکوک *استافیلوکوکوس ارئوس* از نظر تکثیر ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) از روش PCR استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، که در این حجم DNA 2 µl، Primer ، Taq DNA polymerase 1µl ، dNTPs 1µl Buffer (10X) 6 µl, Mgcl2 2.5µl, 1µl و D.W.36.5 µlاستفاده گردید. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل به‌جای اسید نوکلئیک استفاده کرده و از DNA استخراج‌شده از سویه لیوفیلیزه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 12228 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

واکنش تکثیر بـا برنامـه زمـانی: دناتوراسـیون اولیـه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۷ چرخـه دمایی شامل دناتوراسـیون در ۹٤ درجـه سلسـیوس بـه مدت ۱ دقیقه، اتصال در۵۵ درجه سلسیوس به مدت۳۰ ثانیه و امتداد در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مـدت ۱/۵ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی واکـنش در دمـای ۷۲ درجـه سلسـیوس بـه مـدت ۵ دقیقـه انجـام گرفـت (Brakstad *et al*., 1992). واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز در دسـتگاه ترموسـایکلر گرادیـان دار (شـرکت Ependorph) انجـام گرفـت. فـرآورده PCR پـس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲درصد و مشاهده در زیر دستگاه ماوراء بـنفش بررسـی شـد. انـدازه محصـول PCRبا استفاده از مارکرهـای سـاخت شـرکت فرمنتـاز کشـور آلمـان مشـخص گردیـد. جدایـه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* پس از تشـخیص قطعـی وجـود ژن ترمونوکلئاز به طول تقریبی ۲۷۹ جفت باز بـه عنـوان *استافیلوکوکوس ارئوس* در نظر گرفته شدند.

آزمون مولتی پلکس PCR برای شناسایی ژن‌های مولد بیوفیلم

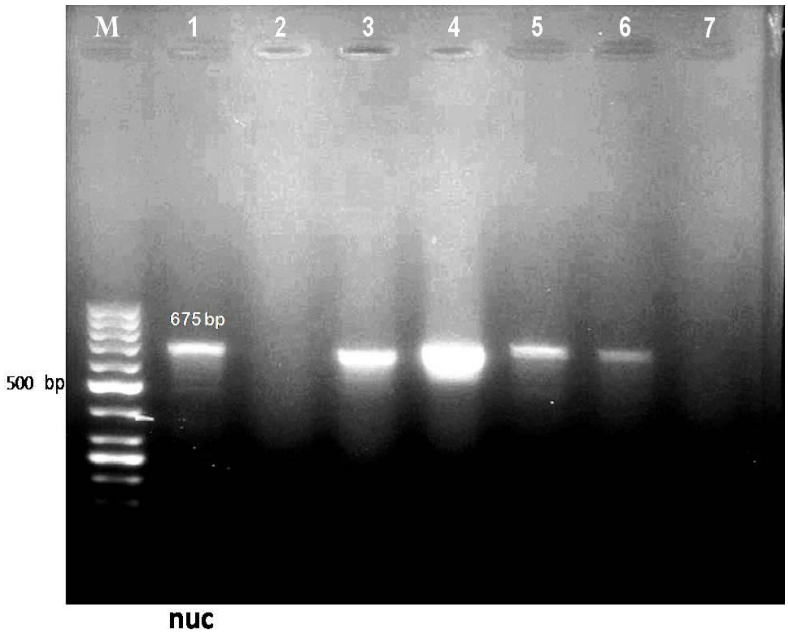
این واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر، کـه شـامل کیـت مستر PCR 10.5 میکرولیتـر، ۱ میکرولیتـر پرایمـر (µL ۰/۵ پرایمر forward و µL ۰/۵ پرایمـر reverse), 3µL نمونه DNA هر کدام از سویه‌های جدا شده و µL ۳۵/۵ آب مقطر دوبار تقطیـر شـده بـرای رسـاندن بـه حجـم رساندن تیوپ‌های PCR مـی‌باشـد. تـوالی پرایمرهـای اختصاصی مورد استفاده برای ژن‌هـای *icaD,clfB,icaA* و*fnbA* مورد نظـر در جـدول ۱ آمـده اسـت. تکثیـر ژن هدف در ترموسایکلر با برنامه سیکل‌های حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹٤ درجه سلسیوس بـه مـدت ٤ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مـدت ۳۰ ثانیـه، ۷۲ درجـه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله بسط نهـایی در ۷۲ درجـه سلسـیوس بـه مـدت ۱ دقیقـه صـورت گرفـت. محصولات حاصله پس از الکتروفورز روی ژل آگـاروز ۱/۵٪ و بـا اسـتفاده از دسـتگاه ژل داکیومنـت مـورد عکـس‌بـرداری قـرار گرفـت. بـرای نشـان دادن انـدازه قطعـات تکثیـری 100 bp DNA Ladder اسـتفاده شـد (http://cinnagen.com).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای جستجوی ژن‌ها

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول	منابع
icaD	5′-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3′ 5′-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3′	۵۵	۱۹۸	Rohde *et al*., 2001
clfB	5′-ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC-3′ 5′-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3	۵۵	۲۰۳	Tristan *et al*., 2003
icaA	5-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3′ 5’-TCTGGAACCAACATCCAACA-3′	۵۵	۱۸۸	Rohde *et al*., 2001
fnbA	5′-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3′ 5′- ATCAGCAGCTGAATTCCCATT-3′	۵۵	۱۲۸	Vancraeynest *et al*., 2004
nuc	5′-GCGATTGATTGATGGTGATACGGTT-3′ 5′-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3′	۵۵	۲۷۹	Brakstad *et al*.,1992

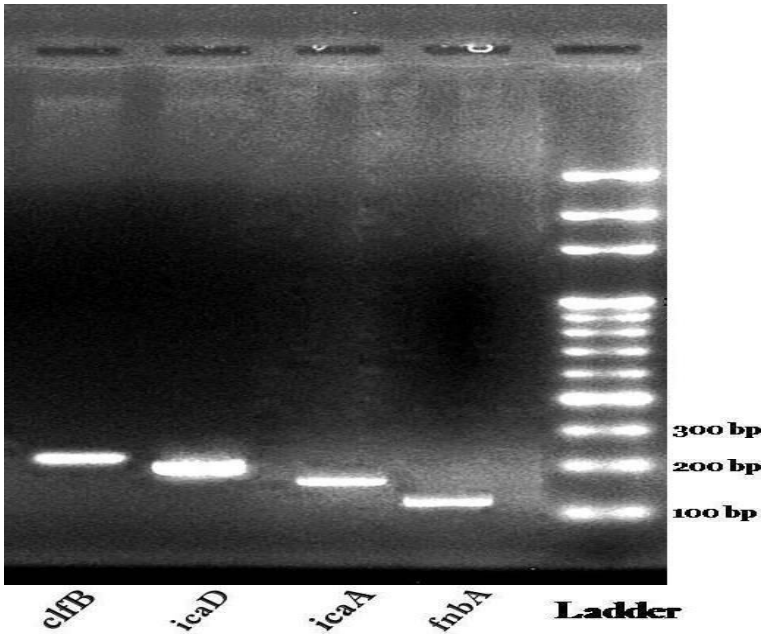
یافته‌ها

از ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، بر اساس روش کشت، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد و انجام تست تائیدی مولکولی از نظر داشتن ژن ترمو نوکلئاز(*nuc*) اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس ارئوس*، ۴۹ نمونه (۴۰/۸۳٪) از نقطه نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت گزارش شدند (شکل ۱).



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *nuc* به منظور شناسایی ژنوتیپی ایزوله‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس ارئوس*. ستون M: نشانگر DNA، ستون ۱: کنترل مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC-12228 ستون۲: کنترل منفی، ستون 3-6 ایزوله‌های مثبت
از نظر *استافیلوکوس ارئوس*، ستون‌های۷: ایزوله‌های منفی از نظر *استافیلوکوکوس ارئوس*.

در مطالعه حاضر هر یک از ژن‌های عامل حدت مولد بیوفیلم شامل *icaD,clfaB, fnbA* و*icaA* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با استفاده از روش مولتی پلکس PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. فراوانی هر یک از ژن‌ها به ترتیب (۶۹/۳۸٪) *fnbA* (۳۲/۶٪) *clfaB*, (۳۸/۷۷٪ *icaD*۵۹/۱۸٪) *icaA* می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج PCR مربوط به سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* دارای ژن *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD*

بحث و نتیجه‌گیری

دسته وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌توانند با تولید بیوفیلم، منبع مهمی برای گسترش عوامل عفونت‌زا در روی سطوح مورد تماس با انواع مواد غذایی باشند که در این میان *استافیلوکوکوس ارئوس* به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شیر و فراورده‌های آن تکثیر پیدا کرده و منجر به بیماری‌زایی در انسان گردد و از سوی دیگر می‌تواند از طریق تولید بیوفیلم نقش مهمی در ایجاد بیماری مزمن ورم پستان گاوی داشته باشد (Armisalo *et al.*, 2007). باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در میان باکتری‌های دیگر از جهت تولید لایه لعابی (Slime layer) شناخته شده است. باکتری‌هایی که قادر به تولید لایه لعابی نیستند بایوفیلم ضعیف‌تری تشکیل می‌دهند. طبیعت شیمیایی این لایه چسبناک هنوز به طور کامل روشن نیست ولی شواهد نشان می‌دهد که عمدتا از پلی‌ساکاریدهای هیدراته تشکیل شده است. مک و همکاران در سال ۱۹۹۶ توانستند دو ساختار پلی‌ساکاریدی را از این لایه خالص‌سازی کنند. پلی‌ساکارید یک (بیش از ۸۰٪) یک هموگلیکان خطی از استخلاف بتا ۱-۶ متصل به ان استیل گلوکز آمین است، پلی‌ساکارید دو (کمتر از ۲۰٪) مقدار کمتری از استخلاف دی گلوکز آمینیل‌های غیر ان‌استیله دارد و در عوض فسفات و سوکسینات متصل به استر را دارا می‌باشد. پلی‌ساکارید یک دارای بار مثبت است در حالیکه پلی‌ساکارید دو دارای بار منفی می‌باشد. پلی‌ساکارید دو به عنوان یک ساختار منحصر به فرد با پلی‌ساکاریدی چسبنده داخل سلولی (PIA) در ارتباط

بوده که فعالیتشان سبب تشکیل تجمعات سلولی می‌شود (Gotz, 2002).

در این مطالعه میزان آلودگی شیر خام به *استافیلوکوکوس ارئوس* در شهرستان سنندج ۴۰/۸۳٪ گزارش شد. در مرحله بعد پس از ارزیابی میزان حضور ژن‌های عامل حدت تولید بیوفیلم از هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از مولتی‌پلکس PCR فراوانی هر یک از ژن‌های *icaD ,icaA.fnbA,clfB* به ترتیب ۳۲/۶٪، ۶۹/۳۸٪، ۵۹/۱۸٪، ۳۸/۷۷٪ بود. در این مطالعه میزان حضور ژن *fnbA* نسبت به بقیه بیشتر گزارش گردید.

واسدوان و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که از میان ۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* حاصله از ورم پستان همگی دارای ژن‌های لوکوس *ica* بودند (Vaseduan *et al*., 2003). مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (*fnbpA* و *fnbpB*) نقش بسیار مهمی در تجمع، اتصال و تهاجم *استافیلوکوکوس ارئوس* به سلول‌های غده پستان و از آن جمله غده پستان گاو دارند (Dziewanowska *et al*., 1999). تارک و همکاران در سال ۲۰۱۰ در یک تحقیق نشان دادند که ۷۸/۲۶٪ از سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جداشده دارای ژن‌های *icaA* و *icaD* بوده‌اند که این درصد بالای آلودگی با مطالعه ما هم‌خوانی دارد.

سیفتیک و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که ۱۵ جدایه از ۵۹ جدایه جدا شده از ورم پستان دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند و ۱۶ جدایه دارای ژن *icaA* و ۳۸ جدایه به ترتیب دارای ژن *icaD* بودند. در مطالعه‌ای که توسط دوران و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* حاصله از زخم‌های جراحی به منظور شناسایی ژن‌های بیوفیلم انجام گردید، ۶۹ جدایه از ۸۸ جدایه مورد مطالعه (۷۸/۴ درصد) حاوی ژن *cna* و ۸۶ جدایه (۹۷/۷٪) حاوی ژن *fnbA* بوده‌اند. در مطالعه ایریو و همکاران در سال ۲۰۱۱ از میان ۴۷ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از خون ۴۰ جدایه دارای ژن‌های *ica* بودند و در آزمایش تشخیص فنوتیپی بیوفیلم ۲۵ جدایه در میکرو پلیت مثبت بود. آلودگی بالای شیر خام به *استافیلوکوکوس ارئوس* در این شهرستان نشان‌دهنده کاهش سطح بهداشتی در گاوداری‌ها و نیز رعایت نکردن موازین بهداشتی است. با توجه به نتایج بدست آمده توسط محققان دیگر و نتیجه مطالعه حاضر، در پژوهش ما نمونه‌ای یافت نشد که به لحاظ وجود ٤ ژن مورد بررسی منفی باشد که این مطلب قابلیت بالای این باکتری را در تشکیل بایوفیلم نشان می‌دهد.

منابع

- Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H. and Wirtanen, G. (2007). Susceptibility of Listeriamonocytogenes strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT - Food Science and Technology, 40(6): 1041-1048.
- Anonymous. (2011). DQA—dairy quality assurance scheme regulations for Belgium. (Lastenboek IKM Productie) Version 5-11-86.

- Brakstad O.G., Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal. Clinical Microbiology, 30: 1654–1660.
- Ciftci, A., Findik A., Emek Onuk E. and Savasan S. (2009). Detection of meticillin resistance and slime factor production of *s.aureus* in bovin mastitis. Brazilian Journal of Microbiology, 40: 254-261.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, 284: 1318–1322.
- Duran, N., Dogramaci, Y., Ozer, B., Demir, C. and Kalaci, A. (2010). Detection of adhesin genes and slime production among Staphylococci in orthopaedic surgical wounds. African Journal of Microbiology Research, 4(9): 708-715.
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R. and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infection and Immunity, 67: 4673-78.
- Foster, T.J. and Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Journal. Trends Microbial, 6(12): 484–488.
- Gotz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms Molecular Microbiology, (43): 1367-1378.
- Iorio, N.L., Lopes, A.P., Schuenck, R.P., Barcellos, A.G., Olendzki, A.N., Lopez, G.L., *et al*. (2011). A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of Staphylococcus in blood cultures. Microbiology and Immunology, 55(1): 28-33.
- Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., and Foster, T.J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 30: 245–257.
- O'Connell, D.P., Nanavaty, T., McDevitt, D., Gurusiddappa, S., Hook, M. and Foster, T.J. (1998). The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca^{2+}-dependent inhibitory site. The Journal of Biological Chemistry, 273(12): 6821–6829.
- Tarek, Z., Bochra, K., Hanene, M., Kacem, M. and Amina, B. (2010). A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. The New Microbiologica, 33(2): 137-145.
- Vasudevan, P., Nair, M.K., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veterinary Microbiology, 92(1-2): 179-185.

Distribution of genes encoding biofilm production in *S. aureus* isolated from raw milk in Kurdistan

Shojaei, M.[1], Karimi Darehabi, H.[2*], Javadi, A.[3]

1- M.Sc Student in food science and technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
2- Assistant Professor of Food Hygiene Department, College of Veterinary Science, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
3- Associate Professor of Food Hygiene Department, College of Veterinary Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author email: Hiva60iran@yahoo.com
(Received: 2013/11/9 Accepted: 2014/8/29)

Abstract

Staphylococcus aureus is a major cause of bovine mastitis. Several virulence factors are involved in mastitis. One of the important virulence factors is the ability of the bacterium to produce biofilms. These bacteria are capable of producing polysaccharides and proteinaceous substances attached to the surfaces, leads to biofilm formation. In this study, a total of 120 raw milk samples was obtained from Kurdistan province and analyzed for the presence of *S. aureus*. The presence of *S. aureus* was assessed by conventional culture method and confirmed by PCR assay. For this, *nuc* gene was exploited as the specific target sequence to detect *S. aureus*. Moreover, Multiplex PCR was used to identify the presence of *clfaB*, *fnbA*, *icaD* and *icaA* genes which encode biofilm formation. Based on results, *S. aureus* was found in 49 (40.83%) of the samples. The frequency of each of the genes was determined as 69.38%, 32.6%, 38.77%, and 59.18 for *fnbA*, *clfaB*, *icaD* and *icaA*, respectively. Results revealed a high contamination rate of raw milks with *S. aureus*, and the ability of the isolates to form biofilms.

Key words: Raw milk, *Staphylococcus aureus*, Biofilms, Sanandaj