# بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر خام تعدادی از کارخانه‌های لبنی شهر تهران

بهاره هندیجانی[۱]، امیر شاکریان[۲*]، ابراهیم رحیمی[۳]، فرحمند صالح‌زاده[٤]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

٤. دفتر نظارت بر بهداشت موادغذایی، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: amshakerian@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹٦/٦/۱۵ پذیرش نهایی: ۹٦/۸/۳۰)

## چکیده

*استافیلوکوکوس ارئوس* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شیر و فرآورده‌های آن تکثیر نموده و منجر به بیماری‌زایی در انسان گردد. عوامل حدت مختلفی در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها قابلیت ایجاد بیوفیلم می‌باشد.این باکتری توانایی تولید پلی ساکاریدها و فاکتورهای پروتئین چسبیده به سطح را دارد که سبب تولید بیوفیلم می‌گردد. در این مطالعه به‌منظور بررسی آلودگی شیرخام شهر تهران به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* و توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم، تعداد ۹۹ نمونه شیرخام از چهار کارخانه بزرگ شیر در شرایط سترون نمونه‌برداری و با روش‌های متداول میکروبیولوژی کشت داده شدند و در نهایت با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور تشخیص تأییدی جدایه‌ها به‌عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* ژن اختصاصی *nuc* و برای شناسایی ژن‌های مولد بیوفیلم از ژن‌های *fnbA*، *clfB*، *icaA* و *icaD* و پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن استفاده گردید. با توجه به نتایج حاصل از کشت میکروبی و تأیید آن با روش مولکولی، ٤ جدایه (٤/۰٤ درصد) به‌عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* شناسایی شدند. ژن‌های مولد بیوفیلم *fnbA*، *clfB* و *icaA* در هر چهار جدایه (۱۰۰ درصد) شناسایی گردید و فقط یک جدایه (۲۵ درصد) حامل ژن *icaD* بود. با توجه به این‌که میزان فراوانی ژن‌های مولد بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جداشده از شیرخام شهر تهران قابل‌توجه می‌باشد،لذا رعایت اصول بهداشتی به‌منظور کنترل و پیشگیری از ایجاد بیوفیلم روی تجهیزات فرآوری شیر و فرآورده‌های آن، ضروری است.

**واژه‌های کلیدی:** ژن‌های مولد بیوفیلم، *استافیلوکوکوس ارئوس*، شیرخام، تهران

**مقدمه**

استافیلوکوک‌ها از باکتری‌های مهم در پزشکی و دامپزشکی هستند (Bennett *et al*., 2003). به این معنی که برخی از اعضای این جنس از شایع‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های پستانی در گاو و گوسفند می‌باشند (Dastmalchi *et al*., 2009). *استافیلوکوکوس ارئوس* ازجمله باکتری‌های بیماری‌زا در انسان به‌شمار می‌رود و یکی از رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است. علاوه بر این عامل ایجاد عفونت‌های گوارشی، ادراری و برخی باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و مقاوم به درمان می‌باشند (Miller *et al*., 2014). شیر و فرآورده‌های آن به‌عنوان یک محیط مغذی نقش بسیار مهمی در انتقال انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ازجمله *استافیلوکوکوس ارئوس* به مصرف‌کنندگان دارد (Anonymous, 2011). عوامل حدت مختلفی در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارند یکی از مهم‌ترین فاکتورهای حدت در سویه‌های استافیلوکوکی تولید بیوفیلم است (Otto, 2008). بیوفیلم به گروهی از میکروارگانیسم‌ها اطلاق می‌شود که به یک سطح جامد و به همدیگر چسبیده‌اند و درون یک ماتریکس خارج سلولی پلیمری که خود تولید کننده آن هستند محصورند (Kafil and Mobarez., 2015). توانایی تشکیل بیوفیلم باعث ایجاد مقاومت این باکتری در برابر تنش‌های محیطی گردیده به‌گونه‌ای که سبب می‌شود پاک‌سازی مکانیکی و مواد ضدمیکروبی متداول تأثیر معنی‌داری بر روی آن‌ها نداشته و سبب گسترش آلودگی محیط‌های صنایع غذایی و متعاقباً آلودگی غذا گشته و یکی از مشکلات اصلی در صنعت غذا به‌حساب می‌آید (Anand *et al*., 2014).

بیوفیلم‌ها از دیدگاه صنایع غذایی، سیستم‌های آبی و صنایع بسته‌بندی از اهمیت زیادی برخوردارند. زیرا حضور آن‌ها بر روی مواد غذایی، ابزارها و سطوح باعث انتقال میکروب‌های بیماری‌زا و آلودگی ثانویه می‌شود. علاوه بر این تشکیل آن‌ها در لوله‌های دستگاه پاستوریزاسیون باعث ایجاد اختلال در انتقال حرارت می‌شود (Simoes *et al*., 2010).

در *استافیلوکوکوس ارئوس* تشکیل بیوفیلم مستلزم وجود مجموعه ژن‌هایی (ica ADBC) است که با رمزگذاری آنزیم‌های دخیل در سنتز پلی ساکاریدهای چسبنده داخل سلولی صورت می‌گیرد. مطالعات مختلفی در ایران در خصوص توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام شد، ۷۳ درصد از جدایه‌های مورد بررسی واجد ژن‌های *icaAB* بودند. در این گزارش حدود ۷۰ درصد جدایه‌ها توانایی کمتری برای تشکیل بیوفیلم واجد ژن‌های *icaA* بودند (Eftekhar and Dadaei., 2011). در پژوهش انجام شده در شهر تهران ۹۰ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* از نمونه‌های شیر خام ۵ دامداری در اطراف تهران جمع‌آوری گردید که به‌ترتیب ۷۸/۷ درصد و ۷۹/۹ درصد جدایه‌ها دارای ژن‌های *icaA* و *icaD* به‌صورت جداگانه بودند و ۸۵/۵ درصد و

۷۷/۹ درصد هر دو ژن را به‌صورت هم‌زمان داشتند (Khoramian *et al*, 2009).

با در نظر گرفتن قدرت بیماری‌زایی، پراکندگی وسیع این باکتری در محیط و انسان و هم‌چنین قدرت تشکیل بیوفیلم هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آلودگی شیرهای خام به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در شهر تهران، قابلیت ایجاد بیوفیلم ازنقطه نظر داشتن ژن‌های مولد آن و توزیع این ژن‌ها در سویه‌های جداشده از نمونه‌های مزبور می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**- روش نمونه‌گیری**

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی تعداد ۹۹ نمونه به تفکیک ۲۵، ۲۵، ۲۵ و۲٤ نمونه از شیرهای خام چهار کارخانه بزرگ شیر در شهر تهران تهیه گردید. نمونه‌ها از محل دریافت شیر به‌وسیله سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری سترون به صورتی‌که دامداری‌ها تکراری نباشد در زمستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی مربوط به مرکز تشخیص آزمایشگاهی سازمان دامپزشکی کشور انتقال داده شد.

**- جداسازی *استافیلوکوکوس ارئوس***

به‌منظور ترغیب رشد این باکتری ۱ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های اخذ شده را به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت BHI (Merck, Germany) افزوده و به‌مدت ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس بر روی محیط کشت برد پارکر آگار (Merck, Germany) به همراه سوسپانسیون زرده تخم‌مرغ همراه با تلوریت پتاسیم افزوده شده با استفاده از روش سطحی کشت داده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۸ ساعت مجدداً گرمخانه‌گذاری گردید. پس از این مرحله پرگنه‌های سیاه رنگ با هاله شفاف به‌منظور انجام آزمون‌های بیوشیمیایی ازجمله کاتالاز و کوآگولاز مورد ارزیابی قرارگرفتند. جدایه‌های مثبت به‌عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* فرض گردیده و تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در محیط Tryptic soy broth (Merck, Germany) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

**- استخراج DNA**

هر یک از پرگنه‌های خالص شده به ۲ میلی‌لیتر نوترینت براث (Merck, Germany) انتقال داده شد و ۱۸ تا ٢٤ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. بعد از خروج از گرم‌خانه به خوبی یکنواخت گردید. به موازات آن به‌منظور کنترل منفی از آب عاری از نوکلئاز استفاده گردید. استخراج DNA به‌روش کیت صورت پذیرفت. در این پژوهش از کیت استخراج آلمانی (Roche, Germany) استفاده گردید و عمل استخراج مطابق با دستورالعمل آن به‌شرح ذیل انجام شد.

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب ۲ سی‌سی منتقل و به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰x g در سانتریفیوژ یخچال‌دار (sigma, Germany) با دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس مایع رویی جدا گردید و رسوب باقی‌مانده با محلول BPS استریل به حالت مخلوط درآورده شد و به‌میزان ۵ میکرولیتر لیزوزیم به هر میکروتیوب اضافه و مجدداً هم زده شد. سپس در دستگاه ترمومیکسچر (Eppendorf, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵

دقیقه قرار داده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر Binding buffer و پروتئین کیناز به‌میزان ٤٠ میکرولیتر به هر نمونه افزوده و هموژن گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد.

در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه نموده و هموژن گردید. هر نمونه در یک فیلتر تیوب قرار داده شد و در یک کالکشن تیوب قرار گرفت و به‌مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰x g سانتریفیوژ گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibitor removal buffer به فیلتر تیوب افزوده و مجدداً به‌مدت ۱ دقیقه در ۳۰۰۰x g سانتریفیوژ گردید. در مرحله شستشو به هر فیلتر تیوب ۵۰۰ میکرولیتر بافر واش اضافه نموده و به‌مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰x g سانتریفیوژ گردید و پس از آن فیلتر تیوب در یک کالکشن تیوب جدید قرار داده شد و به‌مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ x g سانتریفیوژ گردید تا عمل شستشو به‌طور کامل انجام پذیرد و به‌مدت ۱۵ ثانیه در x g ۱۳۰۰۰ قرار داده شد. فیلترتیوب را در میکروتیوب قرار داده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول رهاسازی ( Elution buffer) با دمای ۷۰ درجه سلسیوس اضافه گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰x g قرار داده شد. در این مرحله فیلتر تیوب را خارج نموده و ژن خالص شده در میکروتیوب به‌دست آمده است.

**- اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA**

پس از استخراج DNA به‌منظور اطمینان از صحت کار انجام گرفته با استفاده از دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ ورژن ۳٫۸۱ غلظت و خلوص آن اندازه‌گیری گردید.

**- آزمون PCR به‌منظور شناسایی ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) و توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم**

به‌منظور تشخیص تأییدی جدایه‌های مشکوک *استافیلوکوکوس آرئوس* از نظر تکثیر ژن ترمونوکلئاز و هم‌چنین بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم از روش PCR استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با جدول ذیل صورت پذیرفت. برای کنترل منفی از آب عاری از نوکلئاز و از DNA استخراج شده از سویه لیوفیلیزه *استافیلوکوکوس ارئوس* (ATCC33592) تهیه شده از مرکز ملی تشخیص‌های آزمایشگاهی سازمان دامپزشکی کشور به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول (۱)- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR به‌منظور بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر خام در شهر تهران

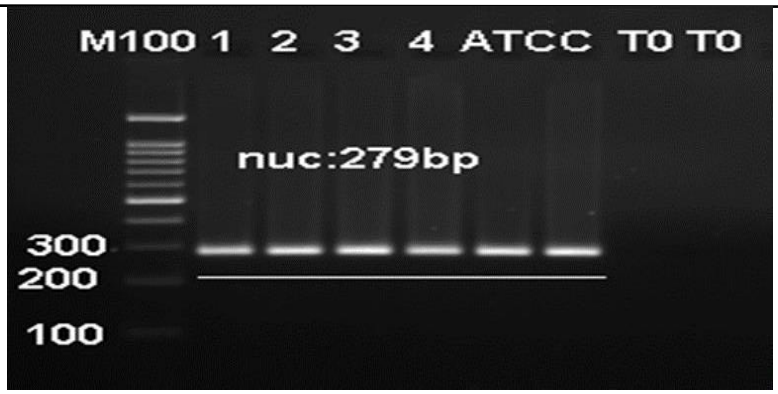
| نام ژن | توالی پرایمر | دمای اتصال | اندازه محصول | منابع |
|---|---|---|---|---|

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Rohde *et al*., 2001 | ۱۹۸ | ۵۵ | 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3 '<br>5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3' | ***icaD*** |
| Tristan *et al*., 2003 | ۲۰۳ | ۵۵ | 5'-ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC-3'<br>5'-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3 | ***clfB*** |
| Rohde *et al*., 2001 | ۱۸۸ | ۵۵ | 5-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'<br>5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3' | ***icaA*** |
| Vancraeynest *et al*., 2004 | ۱۲۸ | ۵۵ | 5'-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3'<br>5'- ATCAGCAGCTGAATTCCCATT-3' | ***fnbA*** |
| Brakstad *et al*., 1992 | ۲۷۹ | ۵۵ | 5'-GCGATTGATTGATGGTGATACGGTT-3'<br>5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3' | ***nuc*** |

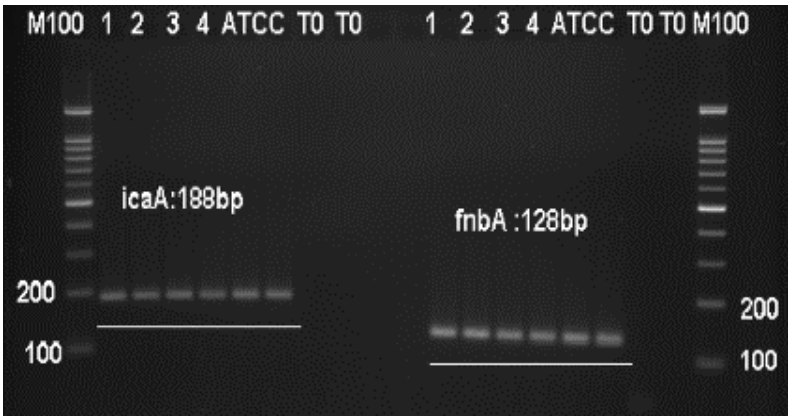
واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های فوق در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵میکرولیتر بافر۱۰X، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میلی مول $MgCl_2$ و ۲ میکرولیتر DNA و ۱۶/۲۵ میکرولیتر D.W. الگو و با برنامه حرارتی ۱ سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۰ ثانیه، ۵۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۰ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (Cinagen, Iran) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت به‌مدت ۷۰ دقیقه انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه ترانس لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

## یافته‌ها

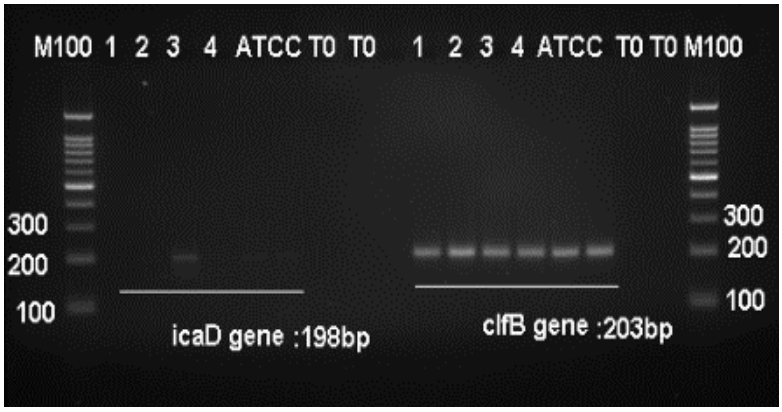
از مجموع ۹۹ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده بر اساس روش کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی و انجام آزمون تأییدی مولکولی از نظر داشتن ژن ترمونوکلئاز اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس ارئوس*، ٤ نمونه معادل ٤/۰٤ درصد از نقطه نظر آلودگی به باکتری مورد نظر مثبت گزارش گردید. در مطالعه حاضر هر یک از ژن‌های مولد بیوفیلم شامل *icaA*، *icaD*، *fnbA* و *clfB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. در هر چهار سویه جدا شده از نمونه‌های شیر خام ژن‌های *icaA*، *fnbA* و *clfB* با فراوانی (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید و ژن *icaD* در یک سویه با فراوانی (۲۵ درصد) یافت شد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد ۲۵ درصد نمونه‌ها واجد هر چهار ژن مورد بررسی به‌طور هم‌زمان هستند. غلظت DNA استخراج شده در این پژوهش به‌طور میانگین ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و خلوص آن به‌طور میانگین ۱/۹۱می‌باشد. این میزان از خلوص بیانگر انجام دقیق کار و استخراج مناسب DNA می‌باشد.




شکل(۱)- ژل الکتروفورز محصول PCR ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) منظور شناسایی ژنوتیپی ایزوله‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر خام تهران. ستون ۱: نشانگر DNA، ستون ٤-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ٥ و ٦ کنترل مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC33592، ستون ۷ و ۸ کنترل منفی




شکل(۲)- ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به شناسایی ژن *icaA* و ژن *fnbA* در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر خام تهران. ستون ۱: نشانگر DNA، ستون ٤-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ٥ و ٦ کنترل مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC33592، ستون ۷ و ۸ کنترل منفی



شکل(۳)- ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به شناسایی ژن*icaD* و *clfB* در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر خام تهران. ستون ۱: نشانگر DNA، ستون ٤-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ٥ و ٦ کنترل مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC33592، ستون ۷ و ۸ کنترل منفی

## بحث و نتیجه‌گیری

*استافیلوکوک*ها یک پاتوژن مشترک بین انسان و گونه‌های مختلف دامی هستند (O'Neill *et al.*, 2007). به این معنی که برخی از اعضای این جنس از شایع‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های پستانی در گاو و گوسفند می‌باشند (Dastmalchi *et al.*, 2009). 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* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شیر و فرآورده‌های 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 (Aarnisalo *et al.*, 2007).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد شیوع آلودگی شیر خام در شهر تهران به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* ٤/٠٤ درصد بوده و ژن‌های *icaA*، *fnbA* و *clfB* با فراوانی (۱۰۰ درصد) و ژن *icaD* در یک سویه با فراوانی (۲۵ درصد) یافت شد. در مطالعه‌ای که در ایران در شهر سنندج در سال ۲۰۱٤ بر روی ۱۲۰ نمونه شیر خام انجام گرفت ٤۹ نمونه (٤۰/۸۳درصد) از نقطه نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت گزارش شده است. در این مطالعه فراوانی هر یک از ژن‌های عامل حدت مولد بیوفیلم شامل *fnbA*،*clfB*، *icaD* و *icaA* به‌ترتیب (٦۹/۳۸درصد) *fnbA*، (۳۲/٦درصد) *clfaB*، (۳۸/۷۷ درصد) *icaD* و (٥۹/۱۸ درصد) *icaA* گزارش شد (Shojaei *et al*, 2014). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱٥ در یکی از کارخانه‌های شیر استان اصفهان انجام شد نتایج حاکی از آن است که غالب‌ترین جنس باکتریایی در شیر خام این کارخانه *استافیلوکوکوس ارئوس* با فراوانی ۱۹ درصد می‌باشد (Saleheh Vaezi *et al.*, 2015). در پژوهش انجام شده در برزیل در سال ۲۰۱۰ از ۲۰۸ نمونه شیر خام تهیه شده از گاو و ۳۷ نمونه شیر خام تهیه شده از تانک شیر ۱۸ مورد (۷/۳ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس ارئوس* گزارش نمودند (Helena *et al.*, 2010). در سال ۲۰۱۰ در یک پژوهش نشان داده شد که ۷۸/۲٦ درصد از سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده دارای ژن‌های *icaA* و *icaD* بوده‌اند (Tarek *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۰۳ گزارش گردید که از میان ۳٥ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* حاصله از ورم پستانی همگی دارای ژن‌های *لوکوس ica* بودند (Vasudevan *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که ۱٥ جدایه از ٥۹ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* جداشده از ورم پستان دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند و ۱٦ جدایه دارای ژن *icaA* و ۳۸ جدایه به‌ترتیب دارای ژن *icaD* بودند (Ciftci *et al.*, 2009). با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر در شهر تهران ۲٥ درصد نمونه‌ها هر دو ژن مورد نظر را هم‌زمان داشته‌اند که با نتیجه مطالعه حاضر تطابق دارد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱٦ در برزیل از مجموع ۱۱۲

*استافیلوکوکوس ارئوس* به‌دست آمده از گاوهای ورم پستانی فراوانی ژن‌های *icaA* و *icaD*، ۸٦/٦ درصد و فراوانی ژن‌های *clfA* و *fnbA* و *bap* به‌ترتیب ۷۰، ۷۷/۷ و ۱۳/٤ درصد می‌باشد (Özkan and Cemil., 2016). در کشور هند در پژوهش انجام شده در سال ۲۰۱۰، از بین ۱۰۲ *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای دارای ورم پستان فقط ۳٦ مورد (۳۵/۲) درصد هر دو ژن *icaA* و *icaD* را هم‌زمان داشتند (Dhanawade *et al*., 2010). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۷ از ۲۷ سویه جدا شده *استافیلوکوکوس ارئوس* از مجموع ۳۰۲ نمونه همگی دارای ژن *icaA* بودند و هیچ‌کدام از نمونه‌ها حامل ژن *icaD* نبودند. این در حالی است که از نظر وجود *icaA* در کلیه سویه‌های جدا شده با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی‌داشته است (Grinholc *et al*., 2007). در پژوهش سال ۲۰۱۲ در برزیل ۸۵ سویه *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای ورم پستانی از نظر وجود هفت ژن حدت بررسی و گزارش شد که ژنوتیپ باکتری‌های جمع شده از مناطق مختلف، متفاوت بوده و الگوی معمول مشاهده نگردید. ممکن است اختلاف نتایج مطالعه حاضر با برخی مطالعه‌های دیگر ناشی از همین مسئله باشد. هم‌چنین این پژوهشگران عنوان نمودند که قدرت باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در ایجاد عفونت ممکن است به‌دلیل بیان متفاوت فاکتورهای حدت در ایزوله‌های مختلف باشد (Raphael *et al*., 2012).

میزان شیوع پایین آلودگی شیر خام تهران نسبت به سایر مناطق می‌تواند به‌دلیل رعایت اصول بهداشت در دامداری‌ها، سطح بالای سلامت دام‌ها، کنترل به‌موقع بیماری‌های دام، تمیز بودن ظروف جمع‌آوری شیرخام، رعایت مناسب بهداشت فردی کارکنان دامداری‌ها، شرایط مناسب حمل‌ونقل و انجام صحیح نمونه‌برداری و آزمایش باشد. در خصوص توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم نتایج مطالعه حاضر با برخی از مطالعات هم‌خوانی داشته و با برخی دیگر هم سو نباشد. به‌طورکلی می‌توان اظهار داشت ژنوتیپ مختلف به‌دست آمده از ژن‌های مولد بیوفیلم در پژوهش‌های انجام شده ممکن است به دلیل خواستگاه‌های مختلف باکتری، مناطق جغرافیایی مختلف، محل نمونه‌برداری، خصوصیات ژنتیکی ایزوله‌ها، شرایط و نحوه انجام آزمایش، وضعیت بهداشتی محل جمع‌آوری نمونه‌ها و استفاده از ضدعفونی کننده‌ها باشد. هم‌چنین در برخی مطالعات رابطه معکوس بین حضور ژن bap و ژن‌های *icaA* و *icaD* در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* مشاهده گردیده است (Piotrz *et al*., 2012). ممکن است در مطالعه حاضر نیز عدم مشاهده ژن *icaD* در اکثر نمونه‌ها مربوط به حضور ژن bap باشد. در نهایت نتیجه‌گیری می‌شود که انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای شناسایی ژن‌های چندگانه بیوفیلم حاصل از باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر خام بسیار کاربردی و دقیق می‌باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از ریاست و کارکنان مرکز تشخیص آزمایشگاهی سازمان دامپزشکی کشور و مدیران عامل و کارکنان کارخانه‌های شیر پاستوریزه تهران اعلام می‌دارند.

**تعارض منافع**

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

## 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.
- Anand, S. Singh, D. Avadhanula, M. and Marka, S. (2014). Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety، 13(1):18-33.
- Anonymous. (2011). Dairy quality assurance scheme regulations for Belgium. (Lastenboek IKM Productie) 5:11-86.
- Bennett, R. W. Monday, S.R. (2003). *Staphylococcus aureus*. In: Miliotis M. D., and Bier, J. W., (Eds.), International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, Inc. 41–59.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal of 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.
- Dastmalchi, H. Ahmadi, M. Mardani, K. Batavani, R. A.(2009). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated form bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Veterinary Microbiology, 137: 202–206.
- Dhanawade N.B., Kalorey, D.R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S.B. and Kurkure N.V. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Veterinary Research Communication, 34: 81–89.
- Eftekhar F. and Dadaei, T. (2011). Biofilm formation and detection of icaAB genes in Clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iran Journal Basic Medical Science،14 (2): 132-136.
- Grinholc M. G. Wegrzyn and J. Kurlenda. (2007). Evaluation of biofilm production and prevalence of the icaD gene in methicillin resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. Immunology and Medical Microbiology, 50: 375–379.
- Helena, F., Luciana, B., Antonio, N., Luciano, M. and Carlos, A. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produce in dairy farms in SAO Paulo state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 376-380.
- Kafil, H.S. and Mobarez, A.M. (2015). Assessment of biofilm formation by Enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. Journal of King Saud University – Science, 6: 124-128.
- Khoramian, B., Emaneini, M., Bolourchi, M., Eslampour, M.A., Niasari-Naslaji, A., Aligholi, M. *et al.* (2009). Evaluation of the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Iran. Iranian Journal of Comparative Biopathology, 6(4).
- Miller, P.J., Farland, A.M., Knovich, M.A., Batt, K.M. and Owen, J. (2014). Successful treatment of intravenously abused oral Opana ER-induced thrombotic microangiopathy without plasma exchange. American Journal of Hematology, 89: 695-697

- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A. *et al*. (2007) Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *staphylococcus aureus* isolates from device related infections. Journal of Clinical Microbiology, 45(5):1379-88.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322: 207–228.
- Özkan, A. and Cemil, D. (2016). Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. Journal of Dairy Science, 99:1–7.
- Piotrz, S., Mart, S., Slawomir, M., Aneta, F. and Antony, J. (2012): Biofilm production and presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. Journal of Microbiology, 61 (1): 65-69.
- Rafael, ck. Mary, HFK. Maria, A. Luciano, GF. Andrea, d. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity، prevalence and the expression of adhesin encoding gene. Veterinary Microbiology, 160: 183-188
- Saleheh Vaezi, A., Tahmourespoor, A. and Goli, M. (2015). Identification of some of the biofilm forming bacteria from the pasteurized milk production line. Journal of Food Microbiology, 6: 1-13. [In Persian]
- Shojaei, M., Karimi Darehabi, H. and Javadi, A. (2014). Distribution of genes encoding biofilm production in *S. aureus* isolated from raw milk in Kurdistan. Journal of Food Hygiene, 4(14). [In Persian]
- Simoes, M., Simoes, L.C. and Vierira, M.J. (2010). A review of current emergent biofilm control strategies. LWT- Food Science and Technology, 43: 573-583.
- Takeuchi, S., Maeda, T., Hashimoto, N., Imaizum, I.K., Kaidoh, T. and Hayakawa, Y. (2001). Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. Veterinary Microbiology, 79: 267–274.
- 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 *Staphylococcus aureus* in raw milk supplied in Tehran

Hendijani, B.[1], Shakerian, A.[2*], Rahimi, E.[3], Salehzadeh, F.[4]

1. M.Sc Graduate of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
1. Research Center of Nutrition and Organic Products (RCNOP), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Research Center of Nutrition and Organic Products (RCNOP), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Research Center of Nutrition and Organic Products (RCNOP), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4. Office of Food Quality Control, Iran National Veterinary Organization (IVO), Tehran, Iran
*Corresponding Author: Amshakerian@yahoo.com
Received: 2017/9/6 Accepted: 2017/11/21

## Abstract

*Staphylococcus aureus* is one of the important pathogens in milk and dairy products that may cause several diseases in human. Several virulence factors are involved in *S. aureus* pathogenicity, amongst is biofilm production. *S. aureus* is capable of producing polysaccharides and proteinaceous substances attached to the surfaces that lead to biofilm formation. In this study to assess the presence of genes encoding the biofilm formation of *S.aureus* and its distribution in raw milk samples of Tehran area, a total of 99 raw milk was obtained from four local milk processing establishments and assessed by conventional microbiological culture methods and confirmed by PCR. For this, the *nuc* gene was used as the specific target sequence to detect *S.aureus* To identify the presence of *fnbA*, *clfB*, *icaA*, *icaD* genes which encode biofilm formation, the specific primers of every gene were exploited. Based on results, 4 isolates were identified as *s.aureus* (4.04%). All *fnbA*, *cltB*, and *icaD* (encoding biofilm formation) were detected in the 4 isolates (100%). However, only one isolate (25%) contained *icaD* gene. Because of the relatively high frequency of biofilm encoding genes separated from raw milk samples of Tehran area, it is essential to implement hygienic principles is essential to control and prevent biofilm formation on the surfaces of dairy equipment.

Conflict of interest: None declared.

Key Words: Biofilm Encoding Genes, *Staphylococcus aureus*, Raw Milk